

Молекулярно-генетические маркеры и их использование. Влияние мутагена в изменение и анализ последовательностей ДНК

1. Молекулярно-генетические маркеры и их использование

Молекулярно-генетические маркеры – это гены или последовательности ДНК, используемые для идентификации индивидуумов или видов.

Молекулярно-генетические маркеры используют в:

1. Криминалистике;
2. Идентификации останков;
3. Судебной экспертизе;
4. Для диагностики заболеваний человека, животных, растений;
5. Для идентификации новых видов;
6. Для характеристики природных сообществ;
7. Для ускорения селекционного процесса;
8. Для выявления хозяйственно полезных признаков и свойств.

2. Генетические маркеры в растениеводстве, их свойства и отличительные особенности

Для оценки генетического разнообразия по фенотипу (совокупность всех признаков организма – морфологические (внешние) признаки (цвет глаз, окраска цветков), анатомические и т. д.) и генотипу (совокупность генов организма) используют маркеры, которые могут обнаружить в них изменчивость. Маркеры генетического разнообразия делятся на:

- морфологические (фенотипические);
- протеиновые (биохимические);
- цитогенетические;
- маркеры ДНК (молекулярные).

Таблица 1. Генетические маркеры, их свойства и отличительные особенности

Свойства, отличительная особенность	маркеры			
	фенотипические	биохимические	молекулярные	цитогенетические
Выявление	Визуально	Прокрашивание в геле посредством различного рода красителей и субстратов	Прокрашивание в геле бромистым этидием, флуоресцентное или радиоактивное мечение	Цитологическое, флуоресцентное или радиоактивное мечение
Уровень проявления	Морфология	Белки (ферменты, белки семян, клеток, тканей), метаболиты (углеводы, сахара и т. п.)	Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК)	Нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), белки (клеток, тканей)

Тип наследования	Доминантный, рецессивный	Доминантный, кодоминантный	Доминантный, кодоминантный	Доминантный
Возможность автоматизации	Нет	Нет	Да	Нет
Распространение в геноме/ покрытие генома	Низкое	Низкое	Высокое	Среднее
Необходимость спец. оборудования	Нет	Да	Да	Да
Цена	Низкая	Средняя	Высокая	Высокая

Электрофоретический метод по определению полиморфизмов белка является основным для паспортизации с/х растений. Но применение белковых маркеров (как морфологических, так и цитогенетических) при генетическом анализе растений сходит на нет по причине большого числа недостатков и считается устаревшим на современном этапе селекции и генетики. На смену белковым маркерам приходят ДНК-маркеры, так как методы генетической паспортизации, основанные на них, считаются более перспективными в силу повышенной разрешающей способности, быстроты, простоты и доступности.

ДНК-маркеры по своей сути полиморфны, могут быть выявлены при помощи методов молекулярной биологии для определенных генов и любых других участков хромосом, при сопоставлении отличающихся друг от друга геномов, популяций, сортов и линий. Другими словами, ДНК-маркеры – короткие участки ДНК, расположенные максимально близко к гену (или нескольким генам) в ДНК, привносимый в растение выбранный селекционером признак (многопочатковость, сахаристость и т. д.) при создании новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур. Признание к ДНК-маркерам пришло после того, как Edwin Southern рассказал о методе определения «специфические последовательности среди ДНК-фрагментов, разделенных гель-электрофорезом» во второй половине XX в. Спектр применения ДНК-маркеров довольно широк. Их используют для паспортизаций генотипов, оценки полиморфизма популяций, генетического картирования, филогенетических исследований, диагностики заболеваний и др. Так, технологии выявления молекулярных маркеров становятся одним из основных стандартов селекции растений. Главными преимуществами использования ДНК-маркеров являются точное и быстрое выявление генетического разнообразия популяций, видов, подвидов, составление подробных молекулярных карт генома растений и животных, определение хозяйственно-ценных признаков еще на уровне ДНК. Также ускорению селекционного процесса у растений способствуют маркер-опосредованная селекция (Marker-Assisted Selection, MAS) и геномная селекция GS (Genomic Selection), в основе которых лежит исследование ДНК-маркеров; на основании получаемой генетической информации, паспортизации разрабатывают стратегию сохранения генетической изменчивости и их рационального

использования при создании новых сортов культурных растений. Также методы генетической паспортизации применяются в семеноводстве для выявления соответствия семян тому или иному сорту. Такие признаки (качества), как надежность, информативность, достоверность, воспроизводимость и определяют значительное превосходство молекулярных маркеров над другими методами исследования с применением морфологических и биохимических маркеров. Также одним из преимуществ молекулярного метода анализа является устойчивость результатов к внешним факторам. Развитие и совершенствование молекулярных маркеров происходит акцентированно на быстроту, простоту и универсальность в использовании, а также на экономичность. Исходя из проведенных исследований сформулированы требования к ДНК-маркерам, включающие в себя комплекс характеристик, которым должны соответствовать ДНК-маркеры:

- высокополиморфность;
- кодоминантность;
- повсеместное распределение по геному;
- нейтральность;
- простота и дешевизна в использовании;
- высокая воспроизводимость;
- возможность обмена результатами между лабораториями;
- нейтральность и устойчивость к изменениям внешней среды.

Но по причине несоответствия комплексу перечисленных критериев существующих на сегодняшний день молекулярных маркеров возникает необходимость применения нескольких типов ДНК-маркеров при решении тех или иных задач, что приводит к более однозначным и достоверным результатам.

3. Разновидности молекулярных маркеров используемых в растениеводстве

Разновидностей молекулярных маркеров, используемых в растениеводстве, порядка нескольких десятков. Наиболее часто используемые следующие (табл. 2).

Таблица 2. Классификация и сравнительная характеристика ДНК-маркеров

Классификация	Монолокусные маркеры	Мультилокусные маркеры
Методы, основанные на блот-гибридации	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	Минисателлиты
Методы, основанные на ПЦР	SSR (Simple Sequence Repeats) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты)	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК
	SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) – нуклеотидная последовательность,	ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – межмикросателлитный полиморфизм

	характеризующая амплифицированную область	
	STS (Sequence Tagged Site) – нуклеотидные последовательности, характеризующие локус	IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами
	SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) – конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов
	CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) – расщепленные амплифицированные	SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей
Методы, основанные на применении ДНК чипов	SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм	DarT (Diversity Array Technology) – ДНК-чиповая технология для изучения генетического разнообразия
Тип наследования и область применения		
Наследование	Кодоминантный тип	Доминантный тип
Область применения у растений	• Картирование генов, хромосом и геномов	• Филогенетические исследования
	• Маркирование генов • Выделение нуклеотидных последовательностей генов	• Филогенетические исследования
	• Селекция с помощью молекулярных маркеров	• Картирование генов геномов (только AFLP, DarT)
	• Молекулярная паспортизация сортов	• Молекулярная паспортизация сортов
	• Диагностика заболеваний	• Исследование генетического разнообразия
	• Исследование генетического разнообразия	

В зависимости от степени выявления уровней внутривидового полиморфизма молекулярные маркеры делятся на группы:

- минимальный (RAPD, RFLP и CAPS);
- умеренный (AFLP);
- сравнительно высокий (ISSR);
- повышенный (SSR, SNPs и DarT).

4. Характеристика молекулярных маркеров

RFLP (англ. Restriction Fragment Length Polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов – ПДРФ) – один из первых способов исследования геномной ДНК.

Область применения:

- 1) возможность построения генетических карт;
- 2) используют для генетических анализов;
- 3) используют для оценки генетического разнообразия в популяциях;
- 4) для идентификации индивидуумов по уникальным вариабельным участкам (фингер-принтинг метод);
- 5) для исследования по хромосомным локализациям генов.

Анализ ПДРФ проходит следующим образом:

- выделение ДНК из ткани исследуемого материала;
- рестрикция ДНК;
- электрофоретическая детекция и разделение продуктов рестрикции;
- метод Блоттинга по Саузерну – нанесение полученных участков ДНК на мембраны с последующей гибридизацией с меченым зондом;
- анализирование по положению на радиоавтографах.

Преимущества:

- надежность;
- возможность проверки в разных лабораториях;
- кодоминантность, что позволяет различать гомо- и гетерозиготы, не требует информации о нуклеотидной последовательности;
- высокоэффективен при составлении генетических карт.

Недостатки:

- необходимость большого количества ДНК; требует больших временных и денежных затрат (при использовании гибридизации по Саузерну);
- неравномерность распределения ПДРФ-маркеров по геному и др.

SSR-маркеры ((микросателлиты) англ. Simple Sequence Repeats – простые повторяющиеся последовательности) – участки ДНК, состоящие из коротких tandemных повторов (фрагменты генома) длиной 2–6 нуклеотидов.

Область применения:

- изучение филогеографии;
- изучение популяционной структуры;
- идентификации сортов;
- определение родительских форм.
- использование при дифференцировке растений внутри вида;
- ДНК-идентификация сортов;
- составление генетических карт;
- изучении генетического разнообразия сельскохозяйственных растений и их паспортизации;
- в маркерной селекции.

Преимущества метода:

- кодоминантность;
- сравнительно легко детектируются;
- высокая точность;
- надежность;
- хорошая воспроизводимость результатов;

- практичность при выявлении гетерозигот по данному локусу.

Недостатки:

- для подбора специфических праймеров необходимо наличие информации о нуклеотидных последовательностях генома;
- дороговизна метода (необходимость амплификации, определения нуклеотидной последовательности у произвольных участков ДНК, выявления микросателлитных повторов и определения фланкирующих частей генома исследуемого локуса при конструировании того и или иного праймера).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – случайно амплифицированная полиморфная ДНК) представляет собой проведение ПЦР (амплификацию) фрагментов ДНК с использованием одного праймера с содержанием небольшого числа произвольных нуклеотидов (около 10).

Область применения:

- оценка полиморфизма среди соматических клонов;
- для выявления межсортовой дифференциации у одного вида растений

Преимущества метода:

- простота его проведения;
- дешевизна;
- экспресс-методом для полиморфизма генома ДНК.

Недостатки:

- доминантный тип наследования, что снижает точность анализа;
- неустойчивость к изменениям условий реакций, следствием чего является снижение воспроизводимости результатов;
- низкая температура отжига, провоцирующая возникновение ошибок.

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности).

Область применения:

- поиск полиморфизма генетических локусов, ответственных за устойчивость к вирусам и болезням, гербицидам;
- составление генетических карт;
- изучение строения, функции, экспрессии и регуляции генов;
- локализация QTL (Quantitative Trait Loci – локусы количественных признаков).

Принцип работы:

- выделения ДНК из исследуемого материала;
- ПЦР-анализ с применением специфического праймера;
- гидролиз ампликона с применением эндонуклеаз рестрикции;
- разделение участков ДНК электрофорезом в соответствующем геле.

CAPS-метод можно определить как объединение метода ПЦР с RFLP-методом, с той лишь разницей, что в данном методе проводится ПЦР-амплификация небольшого участка ДНК вместо всего генома.

Преимущества метода:

- кодоминантный тип наследования;
- простота в использовании;

- высокая эффективность CAPS-маркеров в растениеводстве независимо от семейства растений.

Недостатки:

- менее полиморфны по сравнению с микросателлитными маркерами;
- дороговизна метода.

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов.

AFLP-анализ осуществляется в три этапа:

- рестрикция геномной ДНК двумя рестриктазами;
- лигирование (сшивание молекул ДНК посредством ферментов ДНК-лигаз) продуктов рестрикции (геномной ДНК) с адаптером;
- амплификация полученных фрагментов с использованием праймеров.

Область применения:

- ДНК-фингерпринтинг (англ. finger – палец и print – печать, «отпечатки пальцев»);
- изучение локусов сцепленных с хозяйственно-ценными признаками таких растений;
- установление генетического разнообразия;
- оценка и изучение самоклональной изменчивости, для геномного картирования.

Преимущества метода:

- надежность;
- стабильность;
- хорошая воспроизводимость метода;
- высокая информативность при оценке взаимосвязей между породами и близкими видами;
- не нуждается в предварительном клонировании и секвенировании ДНК;
- не требует знания первичной последовательности и специфических праймеров.

Недостатки:

- доминантный тип наследования;
- метод весьма сложный;
- дорогой;
- медленный и неточный.

ISSR (Inter Simple Sequence repeats – межмикросателлитные последовательности) – метод, в котором проводится амплификация между повторами простых последовательностей генома ДНК.

Область применения:

- оценка генетического разнообразия культурных растений.

Преимущества метода:

- нет необходимости амплифицировать и секвенировать фрагменты при подборе того или иного праймера;

- не требует знаний нуклеотидной последовательности, удобен для генетического анализа;

- дешевизна и простота.

Недостатки:

- необходимость подбора последовательностей ISSR-праймеров с большей точностью;

- доминантность;

- процесс реамплификации – вторичное копирование, которое увеличивает число ампликонов посредством изменения условий реакции.

SNP (Single-Nucleotide Polymorphism – мононуклеотидный полиморфизм) – это мононуклеотидная позиция в геномном ДНК, для которой в популяции встречаются различные вариации последовательности (аллелей) с встречающимся уникальным аллелем не менее 1 %: AAAАСАА и AAAАТАА – разница в один нуклеотид говорит о существовании двух аллелей (С и Т).

Область применения:

- изучение аллельного полиморфизма;

- тестирование чистоты семян;

- анализа гаплотипа и родословных;

- генотипирование и построение генетических карт.

Анализ проводят в 3 этапа:

- создание ДНК-чипов (или приобретение);

- выделение ДНК, обработка ДНК для дальнейшей гибридизации с ДНК-чипами;

- сбор и анализ результатов

Преимущества метода:

- возможность использования сравнительно малого количества исходного материала;

- надежность; удобство маркеров в использовании благодаря высокой плотности и эволюционной стабильности однонуклеотидных полиморфизмов;

- высокая информативность;

- возможность полной автоматизации анализа;

- подходят для геномной селекции;

- SNP располагается на или у интересующих в процессе исследований генов;

- кодоминантный тип наследования.

Недостатки:

- наличие технических трудностей, связанных с выявлением SNP;

- дороговизна;

- необходимость знания последовательностей и фланкирующих областей.

Подготовка DArT-чипа происходит следующим образом:

- выделение и подготовка ДНК пробы путем рестрикции ДНК и лигирования;

- разделение полученного материала на неполиморфные и полиморфные фрагменты;

- отбор полиморфных фрагментов посредством их клонирования и трансформации в *E. coli*;

- амплификация полиморфных фрагментов, отобранных для создания генной библиотеки, с последующей окраской синим флуорофором и нанесением на стеклянные диски, в результате чего образуется DArT-чип.

На основании этих чипов осуществляют гибридизацию с подготовленными «ДНК мишенями» путем геномной репрезентации и мечеными зеленым флуорофором. Далее идет сканирование чипов и измерение интенсивности флуоресцентного свечения для каждого маркера.

Преимущества метода:

- точность;
- эффективность.

Недостатки:

- требует применения сложного оборудования.