

Факультативные доминантные летали (ФДЛ) являются мутациями регуляторных генов, управляющих онтогенезом (онтогенов). Линии, содержащие ФДЛ, демонстрируют высокую нестабильность. В двух диморфных линиях с ФДЛ обнаружили множественные перемещения ретротранспозона 412. Считаем, что мутация в онтогене является ключевым событием, переводящим генотип из стабильного состояния в нестабильное.

**ЧУМАЧЕНКО А.Г., МЯЗИН А.Е., РАМАЙЯ Л.К., ПОМЕРАНЦЕВА М.Д., ШАЙХАЕВ Г.О., РУБАНОВИЧ А.В.**

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, РАН, Москва.*

*E-mail: a\_chumachenko@mail.ru*

### **ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА ТРАНСГЕНЕРАЦИОННУЮ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ RAPD-МАРКЕРОВ ПОТОМКОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C**

Одним из факторов экспериментальной и естественной микроэволюции является воздействие ионизирующих излучений, как природного, так и техногенного происхождения. Поэтому, актуальной проблемой радиационной генетики, на разрешение которой направлены многие современные исследования, является изучение эффектов воздействия ионизирующих излучений, передающихся по наследству от облученных родителей потомству. Значительная часть таких исследований посвящена изучению явления геномной нестабильности (НСГ)[1-4]. При этом большое внимание уделяется возникновению полиморфизма в высоковариабельных микро- и минисателлитных локусах, для которых было показано повышение частоты мутаций вследствие воздействия физических и химических факторов, в первую очередь – ионизирующей радиации.

В данной работе была поставлена задача исследовать генетический эффект облучения в дозе 3 Гр, проявляющийся у потомков облученных мышей, с использованием оценки полиморфизма RAPD-маркеров (random amplified polymorphic DNA). К настоящему времени опубликован ряд работ, в которых с помощью RAPD-теста, были обнаружены радиационно-индуцированные эффекты, передающиеся потомкам облученных мышей и человека [5, 6, 7].

#### **Материалы и методы**

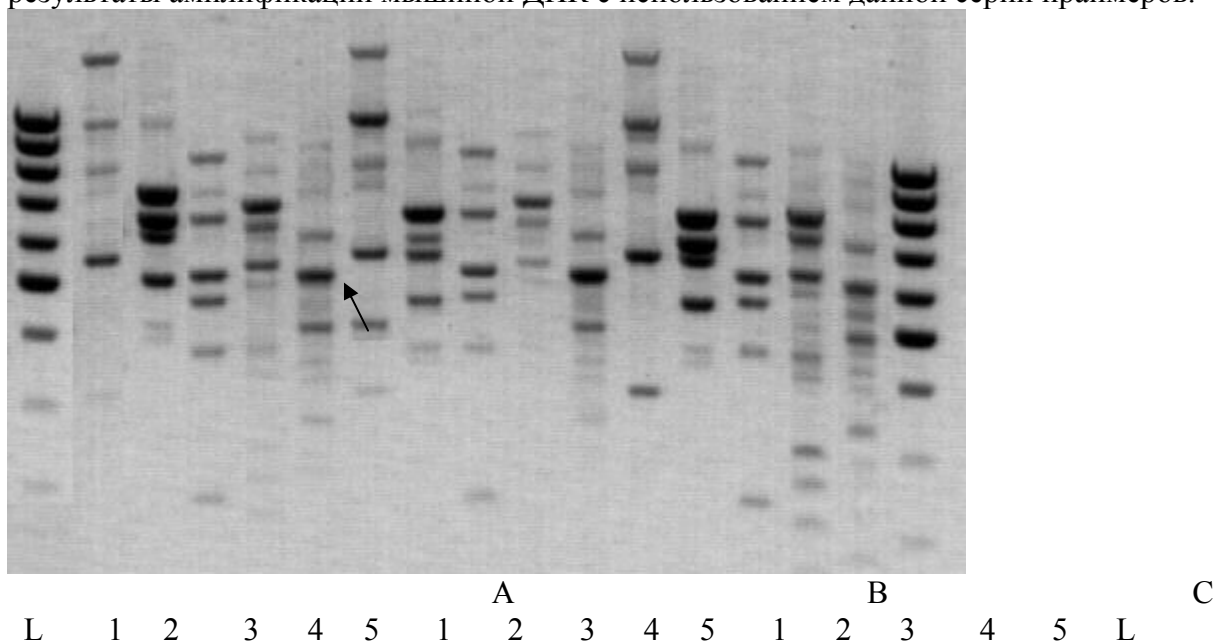
RAPD-анализ основан на использовании серии случайных праймеров. Электрофореграммы продуктов такой амплификации дают картину, специфичную для данного генома, так называемые ДНК-фингерпринты, «отпечатки пальцев ДНК». При этом предварительное секвенирование генома данного организма не требуется. Это позволяет широко применять данный метод для филогенетических исследований, для стандартизации пород, линий, сортов и штаммов. Следовательно, RAPD-анализ является ценным методом для радиационно-генетического мониторинга, поскольку дает возможность мультилокусного «сканирования» гипервариабельных локусов в геноме практических любых организмов, являющихся объектами мониторинга. Минусом является низкая воспроизводимость электрофореграмм, связанная с высокой чувствительностью метода к изменению параметров амплификации и состава реакционной смеси. Большое значение имеет стабильность работы полимеразы и количество матричной ДНК. То есть, требуется предварительная отработка условий, с целью стандартизации реакции.

Мышей-самцов линии BALB/c облучили в дозе 3 Гр на установке ГУПОС-1 (4,5 Гр/мин,  $^{137}\text{Cs}$ ). Через три месяца после облучения, самцов скрестили с самками той же

линии. В этом случае в оплодотворении участвовали спермии, облученные на стадии стволовых сперматогониев. Потомство контрольных и облученных самцов содержали в стандартных условиях и забивали в возрасте 3-4 недель. Выделение ДНК из печени и ПЦР проводили с помощью наборов Diatom DNAPrep и GenePak PCR Core (ООО «Изоген»), руководствуясь прилагаемыми инструкциями. Программа амплификации состояла из 35-ти циклов: Тд- 95 °С, 25 сек, Тм – 42 (циклы 1-4), затем- 58 °С (циклы 5-35), 5 сек, Тс- 74 °С, 80 сек. Для ПЦР использовали программируемый термостат ПТ-48 (ООО «ТДЛ»). Сочетание использования ингибированной полимеразы и повышения температуры отжига в процессе амплификации, обеспечило высокую воспроизводимость результатов ПЦР. Продукты амплификации разделяли в 1,5%-ном агарозном геле. Для гель-документации использовали видеосистему Gel Imager. Результаты анализа электрофореграмм обрабатывали статистически.

#### Результаты и обсуждение

Предварительно из 20-ти схожих по составу праймеров были отобраны девять (табл. 1), которые были использованы в дальнейшей работе. На рис.1 представлены результаты амплификации мышинной ДНК с использованием данной серии праймеров.



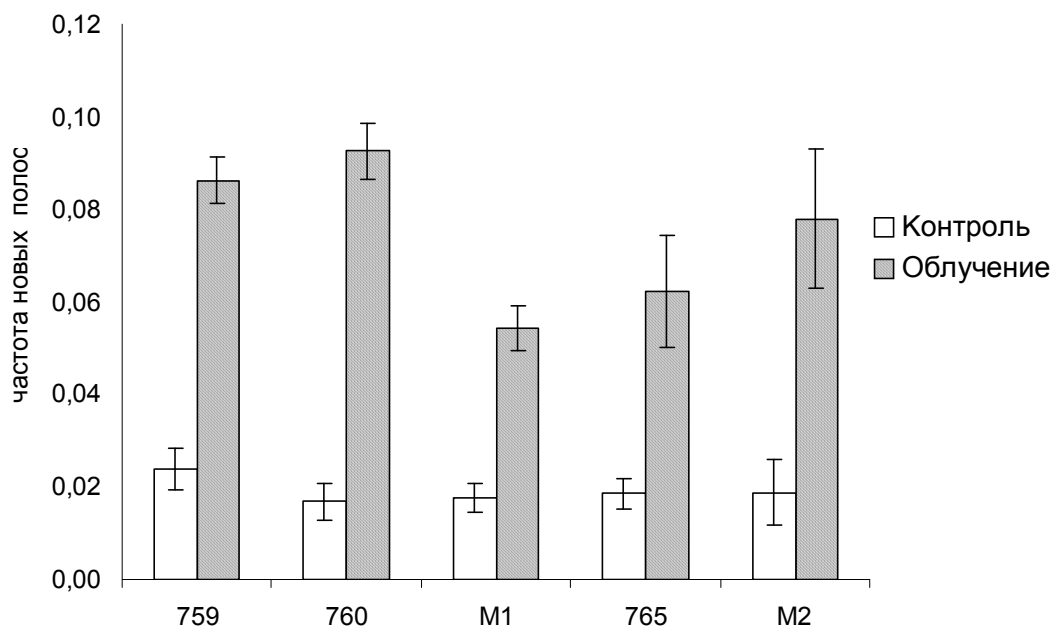
**Рис.1.** Электрофореграмма RAPD-маркеров облученного самца (А), потомка (В) и самки (С). 1- 759, 2- 760, 3- 765, 4 – М1, 5- М2, L- ладдер 1000-100 п.о. Стрелочкой отмечена неродительская полоса.

Анализ RAPD-профилей потомков контрольной и опытных групп проводили по таким параметрам, как процент новых, «неродительских полос», и средняя частота появления новых полос на одно животное. Всего была проанализирована ДНК 98-ми потомков опытной и 97-ми - контрольной группы (табл.2). В силу специфики метода, реакция полимеризации должна всегда проходить в стандартных условиях. Поэтому, была использована ингибированная полимеразы в составе лиофилизированных смесей. Для повышения воспроизводимости результатов, была отработана программа амплификации, включающая в себя циклы с более низкой температурой отжига (42°С).

Нами обнаружено увеличение процента и частоты неродительских полос у потомков облученной группы относительно контрольной группы. В зависимости от праймера, данные показатели в 3-6 раз превышали контрольные значения. Средняя частота новых полос в контрольной группе была примерно одинакова (Рис.2).

Повышение уровня полиморфизма RAPD-маркеров, а так же повышение частот мутаций в микро- и минисателлитных локусах, в потомстве родителей, подвергшихся хроническому либо острому облучению, отмечено в ряде работ. Например, Безлепкин и

др. [5] обнаружили в потомстве мышей линии BALB/c, подвергшихся хроническому облучению в дозах 0,25-0,5 Гр, достоверное увеличение частоты появления неродительских полос в сравнении с контролем. Острое облучение в дозах 0,5-2 Гр также приводило к увеличению уровня полиморфизма ДНК в потомстве [6]. Dubrova et al [8] выявили повышенную частоту минисателлитных мутаций методом ДНК-фингерпринтов в потомстве мышей линии СВА/Н подвергшихся острому и хроническому воздействию нейтронов (0,125-0,5 Гр) и рентгеновских лучей (0,5-1 Гр).



**Рис.2.** Средняя частота появления «неродительских» полос на одного потомка опытной и контрольной группы.

Неожиданно высокий уровень минисателлитных мутаций был обнаружен у детей, родители которых подвергались облучению в зонах радиоактивного загрязнения в Могилевской области после Чернобыльской аварии. Уровень этих мутаций у потомства облученных родителей существенно превышал ожидаемые значения точечных мутаций, определяемых по кодирующим локусам [9]. В работе [8] приводятся результаты обследования с помощью RAPD и inter-SSP-PCR детей ликвидаторов последствий Чернобыльской аварии, у которых отмечено достоверное увеличение частоты неродительских полос. Следовательно, результаты, полученные в настоящей работе, не противоречат литературными данными.

Еще в 50-60-ые годы двадцатого века были показаны различия в чувствительности к мутагенному действию ионизирующей радиации половых клеток на разных стадиях сперматогенеза. По литературным данным, наименьшую генетическую радиочувствительность проявляют сперматогонии, тогда как сперматиды и сперматозоиды обладают наибольшей радиочувствительностью. Но также следует отметить, что результаты исследований по генетической радиочувствительности стволовых половых клеток и сперматогониев противоречивы и не дают представления о природе возникающих вследствие облучения мутаций [10]. Примененный нами методический подход позволил выявить повреждения, полученные премейотическими половыми клетками в результате облучения и реализовавшиеся в потомстве как увеличение уровня полиморфизма RAPD-маркеров. При этом, высокий уровень полиморфизма выявляется, несмотря на селективные процессы, происходящие в ходе созревания половых клеток, и направленные на элиминацию клеток с

повышенным уровнем поврежденности ДНК. Обнаруженный повышенный полиморфизм RAPD-маркеров может являться следствием как спонтанных генетических мутаций, так и трансгенерационного явления НСГ в потомстве облученных родителей, которая могла реализоваться в ходе клеточной пролиферации, имеющей место в процессах гаметогенеза, а так же в процессе эмбриогенеза и постнатального развития организма.

#### **Выводы**

Обнаружено увеличение процента и частоты неродительских полос у потомков облученной группы в сравнении с контрольной группой

#### **Литература**

1. *Morgan W.F., Day J.P., Kaplan M.I.* Radiat. Res. 1996. V. P. 247-258
2. *Little J.B.*// Int. J. Radiat00. Biol. 1998. V. 74. P. 663-671.
3. Genetic Instability and Tumorigenesis / Ed. M.B. Kastan. B.: 1997. 210 p.
4. *Шевченко В.А.* Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье человека/ Под.Ред. Е.Б. Бурлаковой. М.: ЦЭПР, 1996, с 50-67.
5. *Безлепкин В.Г., Васильева Г.В., Ломаева М.Г., Сирота Н.П., Газиев А.И.* Радиационная биология. Радиоэкология, 2000, т. 40, №5, с. 506-512.
6. *V. Bezlepkina, G. Vasil'eva, M. Lomaeva, N. Sirota, A. Gaziev* Genetic Consequences of Emergency Radiation Situations. Proceedings. Moscow, June 10-13, 2002. p. 45-46
7. *Weinberg H., Korol A., Kirzhner V. et al.* Proc. R. Soc. Lond. B(2001) 268, p. 1001-1005.
8. *Dubrova Yu, Plumb M., Brown J. and Jeffreys A.* Int. J. radiat. Biol. 1998, v. 74, № 6, 689-696.
9. *Dubrova Yu, Nesterov V., Krouchinsky N. et al.* Nature, vol. 380, April 1996.
10. *Шевченко В.А., Померанцева М.Д.* Генетические последствия действия ионизирующих излучений. М.: Наука, 1985, 279 с.

#### **Резюме**

С помощью RAPD-анализа мы изучали трансгенерационные последствия облучения. Анализ RAPD-профилей потомков контрольной и опытных групп проводили по таким параметрам, как процент новых, «неродительских полос», и средняя частота появления новых полос на одно животное. Обнаружено увеличение процента и частоты неродительских полос у потомков облученной группы в сравнении с контрольной группой.

За допомогою RAPD-аналізу ми вивчали трансгенерационні наслідки опроміювання. Аналіз RAPD-профілів нащадків контрольної і досвідчених груп проводили по таких параметрах, як відсоток нових, «небатьківських смуг», і середня частота появи нових смуг на одна тварина. Виявлено збільшення відсотка і частоти небатьківських смуг у нащадків опроміненої групи порівняно з контрольною групою.

By random amplified polymorphic DNA we studied trasgeneration consequences of radiation treatment. We estimated RAPD-patterns in offspring of experimental and control groups according to the rates of new "not parental bands" and the average frequency of appearance new bands per mouse. We revealed increase of rate and frequency not parental bands in offspring of irradiated group relatively control group.