

УДК-577.151.05+575.857

Дроганов Е.И.

Московский государственный областной университет

**ДИЗАЙН ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ
ДЛЯ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ МЕЖМИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ
ФРАГМЕНТОВ ДНК**

E. Droganov

Moscow State Regional University

**DESIGN OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS FOR PCR-AMPLIFICATION
OF INTERMICROSATELLITE DNA FRAGMENTS**

Аннотация. Рассматриваются особенности дизайна олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-исследований. Охарактеризованы такие виды анализа, которые можно осуществить с использованием ISSR- и RAPD-методов: анализ молекулярного полиморфизма ДНК, выявление индивидуальных, внутривидовых или видовых особенностей наследственности. Микросателлиты с большой частотой встречаются в эукариотических геномах, а микросателлитные повторы часто используются в изучении полиморфизма ДНК. Для достижения высокоспецифичных результатов в таких исследованиях концы олигонуклеотидных праймеров необходимо закреплять с помощью селективных нуклеотидов. Достоинством данной разновидности ПЦР-анализа является то, что для создания соответствующих праймеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК.

Ключевые слова: ПЦР, праймер, ISSR-анализ, RAPD-анализ, межмикросателлитные последовательности ДНК, молекулярный полиморфизм ДНК.

Abstract. We consider the design of oligonucleotide primers for PCR. Those types of tests are described that can be performed using ISSR and RAPD methods: molecular analysis of DNA polymorphism and detection of individual, intra-population or species peculiarities of heredity. Microsatellites are encountered with high frequency in eukaryotic genomes. Microsatellite repetitions are often used in the study of DNA polymorphism. In order to achieve highly specific results in these studies the ends of oligonucleotide primers need to be consolidated with the help of selective nucleotides. The advantage of the variety of PCR analysis is the fact that the establishment of appropriate primers does not require prior knowledge of the nucleotide sequence of the target DNA.

Key words: PCR, primer, ISSR analysis, RAPD, inter-microsatellite sequence, molecular DNA polymorphism.

Одним из наиболее важных составляющих любого ПЦР-исследования является дизайн олигонуклеотидных праймеров. Праймеры, необходимые для амплификации целевых фрагментов ДНК, можно подбирать на основе уже известной, расшифрованной последовательности ДНК изучаемого объекта или филогенетически близких ему видов. Необходимость в анализе молекулярного полиморфизма ДНК, в выявлении индивидуальных, внутривидовых или видовых особенностей наследственности часто возникает помимо амплификации охарактеризованных секвенированием целевых последовательностей определенных генов, регуляторных участков ДНК и др. В этих случаях одними из самых распространенных методик ПЦР-амплификации становятся амплификация межмикросателлитных последовательностей ДНК (Inter Simple Sequence Repeats) и случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA).

Микросателлиты ядерной ДНК представляют собой короткие повторяющиеся фрагменты длиной от 2 до 6 пар нуклеотидов. Микросателлиты с большой частотой встречаются в эукариотических геномах и достаточно равномерно распределены по длине генома. Такие повторы часто используются в изучении полиморфизма ДНК [2]. Для ISSR-анализа применяют, как правило, один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида, состоящих из 2-4 тандемных нуклеотидных повторов, комплементарных микросателлитному участку ДНК, например: GTGTGTGTGTGTGTGTGTG, ATCATCATCATCATCATC, CACACACACACACA и др. Однако для достижения высокоспецифичных результатов 5'- или 3'-концы праймеров необходимо закреплять с помощью селективных нуклеотидов (так называемый «якорь»). В противном случае у праймера не будет определенного сайта локализации, и внутри целевой микросателлитной ДНК он будет гибридизоваться с ней случайным образом. В результате ампликоны будут синтезироваться разной длины и их невозможно будет идентифицировать на электрофореграмме. В то же время «заякоренные» праймеры позволяют амплифицировать фрагменты ДНК (как

правило, уникальные), находящиеся даже между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. В результате ПЦР с такими праймерами может быть синтезировано большое число фрагментов, хорошо различимых по их молекулярной массе (рис. 1).

В ряду (1) представлена первоначальная последовательность ДНК, в которой определены две разные повторяющиеся последовательности (CA), направленные в противоположные стороны и расположенные близко друг к другу. Если праймеры были сконструированы только из повторяющихся элементов, фрагмент был бы амплифицирован, но при этом повторение его синтеза не может быть обеспечено из-за неопределенной локализации праймеров на микросателлитной последовательности. В ряду (2) показан продукт ПЦР, как результат амплификации фрагмента ДНК, заключенного между повторяющимися элементами, с 3'-закрепленных праймеров (CA)nNN. CA является повторяющейся последовательностью, дополненной двумя нуклеотидами NNN, которые комплементарны области между повторяющимися элементами. Продукт ПЦР в ряду (3) является аналогичным результатом использования

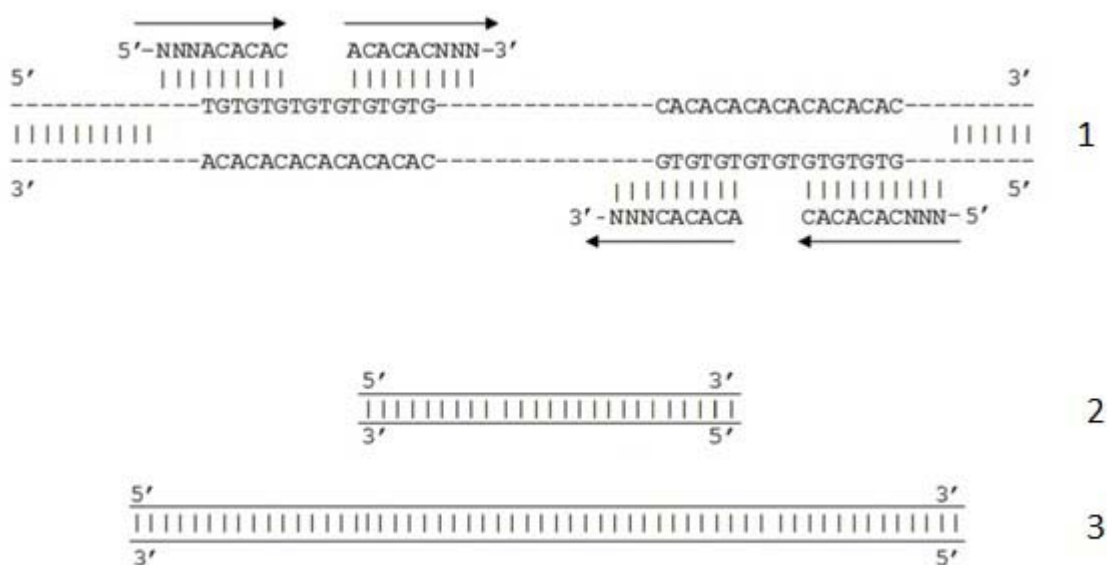


Рис. 1. Схема дизайна олигонуклеотидных праймеров для ISSR-анализа (объяснения в тексте).

праймеров с последовательностью (CA)_n, но дополненных нуклеотидами NNN по 5'-концам.

Достоинством данной разновидности ПЦР-анализа является тот факт, что для создания ISSR-маркеров не требуется предварительного знания нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК, дизайн можно производить «вслепую», а наиболее удачные праймеры из всей подготовленной совокупности отбирать экспериментально. Кроме того, метод обладает хорошей воспроизводимостью и может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев – и для индивидуального генотипирования [4]. В частности, для исследования внутривидового полиморфизма моллюсков нами был

разработан и протестирован ряд микросателлитных праймеров собственного дизайна. Продукты ПЦР с некоторыми из них представлены на электрофореграмме (рис. 2).

В RAPD-методе в отличие от ISSR-метода обычно используются праймеры со случайной, произвольно подобранной последовательностью из 8-15 нуклеотидов. Для дизайна таких праймеров также нет необходимости в знании конкретных нуклеотидных последовательностей. Праймеры с произвольной последовательностью должны лишь отвечать определённым требованиям по соотношению GC-пар (около 60%) и длине. Можно использовать одновременно от 1 до 5-6 праймеров в одной реакции в любом сочетании до тех пор, пока не будет достигнут требуемый объем информации о полиморфизме исследуемой совокупности препаратов ДНК [3].

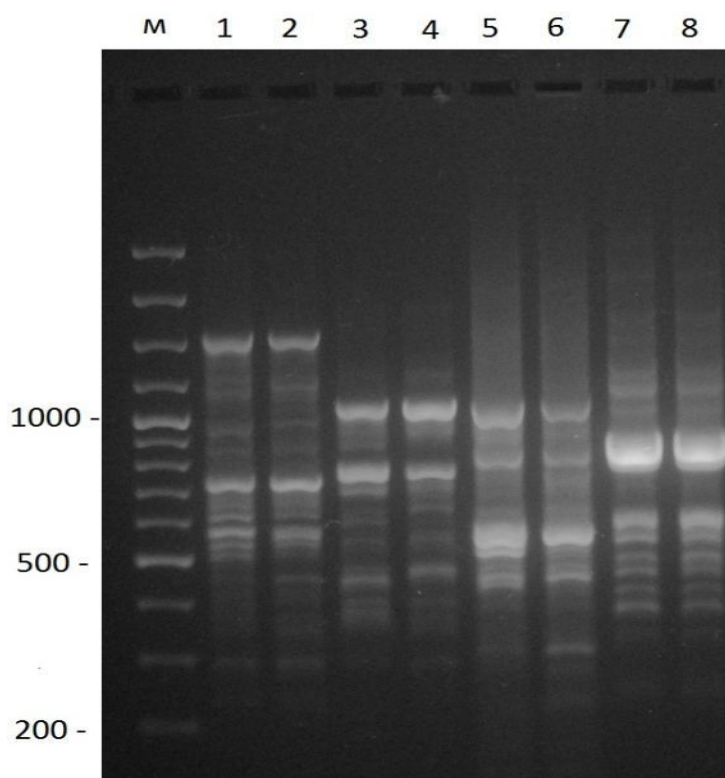


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации ДНК моллюсков живородка речная, четырех разных особей: 1-8 – препараты ДНК, по два из каждой особи, использованные для ПЦР с четырьмя разными праймерами; М – маркер нуклеотидных пар; 200, 500, 1000 – размер фрагментов маркера, п.н.

RAPD-анализ может служить своеобразным экспресс-методом выявления генетического полиморфизма, что особенно актуально для малоизученных таксономических групп. Диагностические возможности RAPD-технологии успешно проиллюстрированы на многочисленных примерах описания генетического разнообразия микроорганизмов, высших растений, беспозвоночных и позвоночных животных [1]. К недостаткам метода следует отнести низкую воспроизводимость результатов, обусловленную повышенной чувствительностью к условиям реакции – качеству и активности *Taq*-полимеразы, концентрации ионов магния, соотношению концентрации праймер/матрица, температурному режиму и пр.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. – 1997. – Т. 33 (№ 4). – С. 443-450.
2. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34 (№4). – С. 141-156.
3. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами // Цитология и Генетика. – 1994. – Т. 28. – С. 54-61.
4. Nei M. Molecular evolutionary genetics. – N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. – 512 p.