
УДК 599.742.73

С. А. Зятьков¹, Г. Г. Гончаренко²

¹Старший преподаватель, кафедра зоологии, физиологии и генетики, физиологии и генетики,
УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»,
г. Гомель, Республика Беларусь

²Член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор,
кафедра зоологии, физиологии и генетики,
заведующий кафедрой зоологии, физиологии и генетики,
УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»,
г. Гомель, Республика Беларусь

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЛОКУСЫ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДАКТИЛОСКОПИИ ОСОБЕЙ И ПОРОД ДОМАШНЕЙ КОШКИ *FELIS CATUS L.*

*В работе представлены данные по геному домашней кошки *Felis catus*. Рассмотрены микросателлитные локусы в качестве наиболее удобных генетических маркеров для дактилоскопии особей и пород *F. catus*. Охарактеризованы идентификационная панель, основанная на использовании 10 локусов с динуклеотидными повторами с вероятностью совпадения генотипа, равной 10^{-10} , а также 11-локусная панель с тетрануклеотидными повторами с вероятностью совпадения $10^{-6} \cdot 10^{-8}$.*

Ключевые слова: микросателлиты, *Felis catus*, STR-локус, праймеры, идентификационная панель.

Введение

Успешное развертывание исследований по проекту «Геном кошки» (2002-2007) [1, 657-686], [2, 1675-1689] дало возможность анализировать на молекулярном уровне, как отдельные структурные гены, так и любые другие участки ДНК в геномах этого вида. Установлено, что гаплоидный геном домашней кошки *Felis catus L.* (19 хромосом) содержит $2,7 \times 10^9$ нуклеотидных пар (н.п.) и более 20 тыс. генов [2, 1675-1689].

В последние годы на основе данных по структуре генома стремительно развиваются методы ДНК-идентификации, позволяющие проводить дактилоскопию отдельных особей, генетическую паспортизацию пород и установление видовой принадлежности особей семейства (сем.) Кошачьи.

Целью данной статьи было охарактеризовать микросателлитные локусы в качестве наиболее удобных генетических маркеров для дактилоскопии особей и пород *F. catus*. и рассмотреть многолокусные идентификационные панели, использующиеся в практической работе.

Результаты исследований и их обсуждение

Характеристика микросателлитных локусов

Одним из наиболее удобных и широко используемых маркеров для ДНК-идентификации являются **микросателлиты**. Это особый класс ДНК-маркеров, представляющих собой фрагменты ДНК с большим количеством – до ста и выше – tandemно повторяющихся идентичных «мотивов». Мотивом является короткая последовательность из нескольких (от двух до восьми) пар нуклеотидов, обычно называемая «повтором» [3, 21-28].

В зависимости от длины повтора микросателлиты классифицируют на локусы с ди-, три-, тетра-, пента- и гексануклеотидными повторами. Таким образом, **микросателлитом**, или микросателлитным локусом (STR-локусом, Short Tandem Repeats) называют участок ДНК, расположенный в конкретной хромосоме и содержащий **короткие tandemные повторы**.

Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга числом повторов и, как следствие, длиной. Микросателлитные локусы высокополиморфны, т. е. для каждого из них имеется много аллелей. Например, локус FCA149, локализованный в хромосоме B1 домашней кошки, содержит динуклеотидные повторы ТГ [4, 1039-1051]. В популяциях *F. catus* обнаружено

6 аллелей этого локуса (с числом повторов от 13 до 18). Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, содержащего повторы ТГ и прилежащие к повторам справа и слева (фланкирующие) последовательности ДНК, представлены на рисунке 1. Из рисунка хорошо видно, что данный аллель локуса FCA149 имеет 17 повторов ТГ. Поэтому формула данного локуса записывается как FCA149 (ТГ)₁₇ [4, 1039-1051].

5' - ggacttccat ttaataagac ccccaactccc tgaaaaagaaa **tatgtgtgtg tgtgtgtgtg**
tgtgtgtgtg tgtgtgtacg tattcatccc acacatggtg agacacccag antnctctag-3'

Рисунок 1. – Фрагмент ДНК, содержащий ТГ повторы локуса FCA149 и фланкирующие участки

Микросателлитные фрагменты выявляют методом полимеразной цепной реакции (**ПЦР**), обеспечивающим **амплификацию** – многократное увеличение копий данного фрагмента ДНК. Синтез этого фрагмента инициируется ДНК-затравками в виде пары **праймеров**, синтетических олигонуклеотидов, комплементарных нуклеотидным последовательностям на границах исследуемого фрагмента. Так как микросателлитные аллели короткие и вместе с праймерами обычно не превышают 200–300 п.н., то даже сильно поврежденный биологический материал может содержать полные копии исследуемого фрагмента ДНК, обеспечивая их успешную амплификацию. Именно по этой причине ПЦР микросателлитов оказался особенно важным для судебно-медицинских исследований. Для исследуемого микросателлитного локуса конструируют такую пару праймеров, чтобы комплементарные им фланкирующие участки ДНК были высокоспецифичны, т.е. отсутствовали в других участках генома. Длина праймеров должна быть не менее 20–30 п.н., их 3'-концы не должны быть комплементарными друг другу [5, 74-78].

Интересным примером микросателлитного локуса является protoонкоген вируса саркомы кошки fes/fps, который расположен в длинном плече хромосоме 15 человека и содержит тетрануклеотидные повторы ATTT в инtronе 5 этого гена. Повторы ATTT и определяют микросателлитный локус, обозначаемый как FES/FPS. В популяциях человека обнаружен ряд аллелей локуса FES/FPS с числом повторов от 7 до 15. На рисунке 2 дана нуклеотидная последовательность фрагмента интрана 5 гена fes/fps между позициями 4631 и 4800, где располагаются повторы ATTT (полная длина гена fes/fps превышает 12 тыс. пар нуклеотидов). Формула STR-локуса FES/FPS записывается как (ATT)₁₁, поскольку в наиболее характерном аллеле содержится 11 повторов ATTT (на рисунке 2 выделены жирным). На этом же рисунке подчеркнуты участки ДНК для пары праймеров, которые успешно используются при амплификации аллелей локуса FES/FPS.

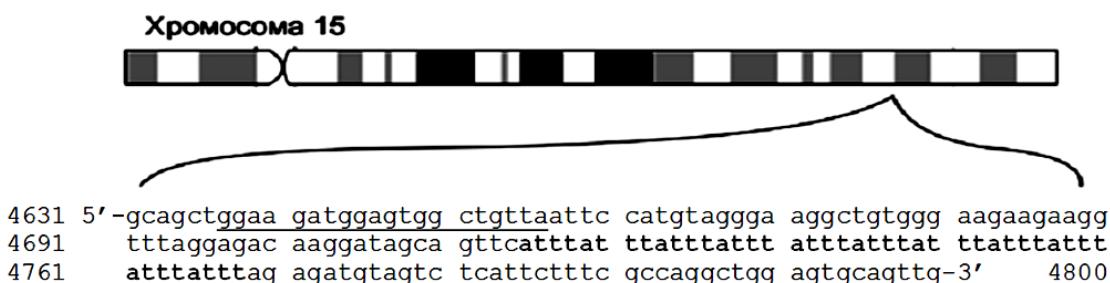


Рисунок 2. – Фрагмент ДНК, содержащий ATTT повторы микросателлитного локуса FES/FPS и фланкирующие участки, расположенные в интроне 5protoонкогена вируса саркомы кошки fes/fps, локализованного в длинном плече хромосоме 15 человека

Необходимо подчеркнуть, что в последние десятилетия были разработаны эффективные методы анализа микросателлитов с использованием праймеров, меченых флуоресцентными красителями, с последующей детекцией продуктов реакции с помощью автоматических секвенаторов ДНК [6, 1026-1031].

*Панель микросателлитных локусов для идентификации особей *F. catus**

За последние годы было установлено, что микросателлитные локусы у всех исследованных видов являются высокополиморфными, включая и микросателлиты *F. catus*, с десятками аллелей в каждом локусе и высокими темпами мутирования [7, 278-281], [8, 235-245], [9, 2749-2757].

Поскольку микросателлитные локусы являются селективно-нейтральными, они не подвержены действию естественного отбора. Комбинация аллелей таких локусов является уникальной характеристикой каждой особи.

Интересно отметить, что уже в первой работе, посвященной разработке методов дактилоскопии кошек на основе микросателлитов Менотти-Раймонд с соавторами [4, 1039-1051] использовали **10 микросателлитных локусов с динуклеотидными повторами**. В предыдущем разделе нашей статьи приведен пример (рисунок 1) для одного локуса FCA 149. В нем обнаружено 6 аллелей, содержащих динуклеотидный мотив ТГ с количеством повторов от 13 до 18. Следовательно, при 6 аллелях в популяциях *F. catus* по этому локусу будет 21 различный генотип. Если использовать для идентификации кошек, кроме локуса FCA 149, еще один локус также с 6 аллелями, это позволит различать (21x21) 441 генотип. В работе Менотти-Раймонд и др. [4, 1039-1051] использовалось 10 микросателлитных локусов, количество аллелей в каждом из которых варьировало от 5 до 10. Это означает, что количество возможных многолокусных генотипов по этим 10 генам у кошек составляет более 10 миллиардов (10^{10}). Иными словами, только у одной особи *F. catus* из 10 млрд генотип при использовании этого набора локусов может совпасть с какой-либо другой особью. Таким образом, разработанная по **10 микросателлитным локусам идентификационная панель** позволяет проводить точную генетическую дактилоскопию любой особи *F. catus*.

В дальнейшем исследователи предложили для дактилоскопии кошек использовать набор из **11 микросателлитных локусов**, содержащих **тетрануклеотидные повторы** [10, 1061-1070]. Тетрануклеотидный мотив, хромосомная локализация, количество аллелей, а также оптимальный набор праймеров для амплификации этих 11 локусов приведены ниже в таблице 1. Данная **идентификационная панель** позволяет проводить точную генетическую дактилоскопию для 28 пород *F. catus* с вероятностью совпадения генотипов у двух особей, равной 10^{-6} , а для непородистых – 10^{-8} [10, 1061-1070]. Эта панель прошла этапы сертификации и получила статус стандарта для ДНК-тестирования в криминалистических лабораториях США.

Таблица 1. – Характеристика 11 тетрануклеотидных микросателлитных локусов, иллюстрирующих ДНК идентификационную панель

Локус	Мотив	Хромосомная локализация	Количество аллелей	Размер ампликонов, н.п.	Последовательность праймеров 5'-3' с указанием флуоресцентной метки
FCA 723	(GGAA) ₈ G (GAAA) ₁₅	A1	20	243–317	F 6FAM-TGAAGGCTAAGGCACGATAGATAGTC R GCCACCCAGGTGCTCTGCTTC
FCA 731	(CCAT) ₈ /(CCAT) ₁₁	B1	6	337–401	F 6FAM-ATCCATCTGTCATCCATCTATT R GGTCAAGCATCTCCACTTGAGG
FCA 733	(GATA) ₁₁	B2	16	128–226	F GATCCATCAATAGGTAATGGATAAAGAAGATG R 6FAM-TGGCTGAGTAAATATTCCACTGTCTC
FCA 736	(ATAC) ₁₀ (CA) ₃ (ATAG) ₁₄	B4	23	164–222	F VIC-CCGAGCTCTGTTCTGGTATGAA R GTGCTTTCTAGTTGGTCGGTCTGTCTATCTG
FCA 740	(GATA) ₁₁	C1	7	308–336	F NED-CCAAGGAGCTCTGTGATGCAAA R GTTCCCCACAGGTAAACATCAACCAA
FCA 742	(CTTT) ₁₁	D4	15	122–175	F NED-AAATTCAATGTCTGACAACGCATAAG R GCCAGGAACACCATGTTGGCTA
FCA 749	(GATA) ₁₀ / (GATA) ₆	F2	14	276–416	F PET-GAGGAGCTTACCTAACAGAGCATGGCTTC R GTGCTTAAACCTATATTGGATTGTGCCGTCT
F124	(GAAA) ₁₅	E1	20	255–367	F VIC-TGTGCTGGGTATGAAGCCTACTG R GTGCTTCCATGCCATAAAGGCTCTGA
F53	(GAAA) ₈	A1	11	115–272	F PET-CCTATGTTGGGAGTAGAGATCACCT R GTGCTTGAAGTGGCTGTGGCAATTCC
F85	(CTTT) ₁₀ (CT) ₁₀ (T) ₄ (CTTT) ₁₅	B1	32	183–301	F NED-TAAATCTGGCCTCACGTTTTC R GCCTGAAAATGTATCCATCACTTCAGAT
FCA 441	(GATA) ₉	D3	8	113–137	F GTGTCTTGATCGGTAGGTAGGTAGATATAG R VIC-ATATGGCATAAGCCTTGAAGCAAA

Необходимо добавить, что для контроля происхождения и индивидуальной идентификации кошек Международным обществом генетики животных (ISAG) с 2006 года рекомендована также **идентификационная панель**, использующая систему маркеров, основанную на анализе 9 микросателлитных локусов с ди- и тетрануклеотидными повторами [11, 371-377], [12, 1-7].

Выводы

Таким образом, в данной статье рассмотрены микросателлитные локусы в качестве наиболее удобных генетических маркеров для дактилоскопии особей и пород *F. catus*. Охарактеризованы идентификационная панель, основанная на использовании 10 локусов с динуклеотидными повторами с вероятностью совпадения генотипа, равной 10^{-10} , а также 11-локусная панель с тетрануклеотидными повторами с вероятностью совпадения $10^{-6}\text{-}10^{-8}$.

Работа проводилась в рамках тем ГПНИ 16-14 и ГПНИ 16-32, при выполнении Государственных программ «Биотехнологии» и «Природопользование и экология».

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. O'Brien, S. J. The Feline Genome Project / S. J. O'Brien [et al.] // Annu. Rev. Genet., 2002. – V. 36. – P. 657-686.
2. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome / J. U. Pontius[et al.] // Genome Res., 2007. – V. 17. – P. 1675-1689.
3. Tautz, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences / D. Tautz // DNA Fingerprinting: State of the Science, Basel, Switzerland, 1993.– P. 21-28.
4. Genetic Individualization of Domestic Cats Using Feline STR Loci for Forensic Applications / M. Menotti-Raymond [et al.] // Journal Of Forensic Sciences, 1997. – V. 42 (6). – P. 1039-1051.
5. Животовский, Л. А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения / Л. А. Животовский // Вестник ВОГиС, 2006. – Т. 10. – № 1. – С. 74-96.
6. Ziegler, J. S. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci / J. S. Ziegler, Y. Su, K.P. Corcoran // Genomics, 1992. – V. 14. – P. 1026-1031.
7. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA / A. J. Jeffreys [et al.] // Nature, 1988. – V. 332. – P. 278-281.
8. Spontaneous mutation at the hypervariable mouse minisatellite locus Ms6-hm: flanking DNA sequence and analysis of germline and early somatic mutation events / R. Kelley [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. B., 1991. – V. 245. – P. 235-245.
9. Henderson, S. T. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae* / S. T. Henderson, T.D. Petes // Mol. Cell. Biol., 1992. – V. 12. – P. 2749-2757.
10. An STR Forensic Typing System for Genetic Individualization of Domestic Cat (*Felis catus*) Samples / M. A. Menotti-Raymond [et al.] // J. Forensic. Sci., 2005. – Vol. 50 (5). – P. 1061-1070.
11. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*) / M. J. Lipinski [et al.] // Anim Genet., 2007. – V. 38(4). – P. 371-377.
12. Lyons, L. A. Genetic testing in domestic cats / L. A. Lyons // Molecular and Cellular Probes, 2012. – doi:10.1016/j.mcp.2012.04.004.

Поступила в редакцию: 01.11.2016

E-mail: zyatkov@gsu.by

Zyat'kov Sergey A., Goncharenko Grigory G.

MICROSATELLITE LOCI IN THE GENETIC FINGERPRINTING OF SPECIES AND BREEDS OF DOMESTIC CATS *FELIS CATUS* L.

This article describes the genome of the domestic cat *Felis catus*. The forensic genotyping panel of 10 dinucleotide STR loci (power of discrimination 10^{-10}) and 11 tetranucleotide STR loci (power of discrimination $10^{-6}\text{-}10^{-8}$) for *F. catus* was characterized.

Keywords: Microsatellites, *Felis catus*, STR-locus, primers, identification panel.