

## Тест-система для выявления нулевых вариантов в генах, ответственных за синтез ключевых ферментов у видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*

А. А. СУРКОВ, Г. Г. ГОНЧАРЕНКО

### Введение

Одной из важных характеристик популяционно-генетической структуры является соотношение частот встречаемости активных и так называемых нулевых аллелей. Ноль-аллели возникают под воздействием как природных, так и техногенных факторов и приводят к утрате активности фермента или к полному подавлению синтеза полипептида. Поскольку даже гетерозиготы по нулевым аллелям имеют только 50% активности соответствующего фермента – отрицательное влияние этих аллелей на биологическое состояние особей очевидно и было показано как на представителях рода *Drosophila* (O'Braen, McIntire, 1972; Полякова, 1990), так и на человеке (Griffiths et al., 1999).

Одним из наиболее оптимальных методов выявления нулевых аллелей остается электрофоретический анализ изоферментов (Mukai, Coccerhem, 1977; Voelker et al., 1979; Tsuno, 1981; Allendorf et al., 1982), поскольку он даёт возможность определить все 100% мутаций, приводящие к нарушению функции ферментов (нулевые аллели).

Довольно удобным объектом для определения насыщенности популяций нулевыми аллелями являются представители рода *Drosophila*.

Целью нашего исследования была разработка методов изоферментного анализа, позволяющих выявлять нулевые аллели (мутации) у представителей рода *Drosophila* в природных популяциях Северной Евразии.

### Материалы и методы

В настоящее время на территории Беларуси найдены только два представителя *Drosophila* группы *virilis* в природных популяциях. Особи *D. lummeli* и *D. littoralis* обитают вблизи незагрязненных рек и озёрных систем Беларуси и сопредельных территорий. Месторасположение проанализированных популяций показаны на рис. 1.

В поисках оптимальных условий электрофоретического анализа изоферментов было апробировано несколько буферных систем. Для 11 ферментов, использовавшихся в нашей работе, наилучшие результаты получены в 2 системах. Ферменты алкогольдегидрогеназа (ADH,

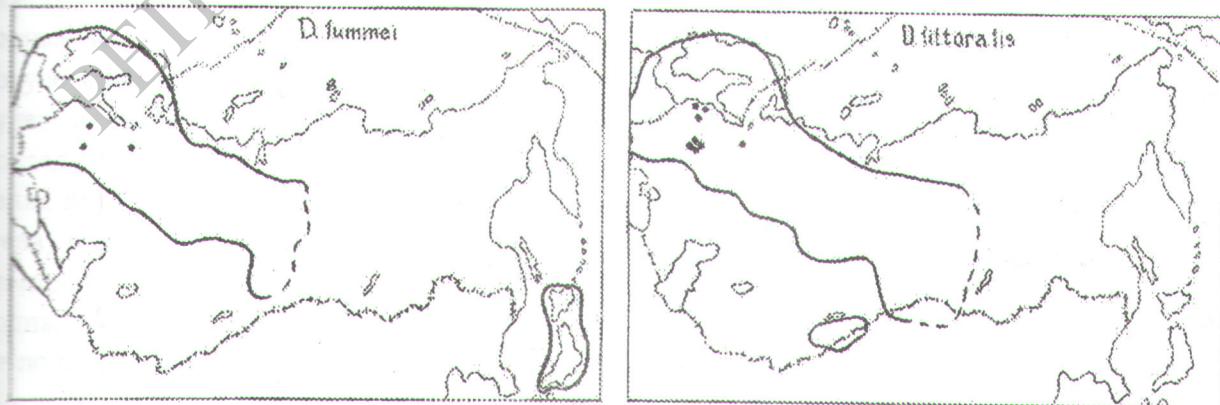


Рис. 1. Места взятия выборок и распространение двух палеарктических видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* на территории Беларуси и сопредельных стран

К.Ф. 1.1.1.1.), гексокиназа (HK, К.Ф. 2.7.1.1.), кислая фосфатаза (ACPH, К.Ф. 3.1.3.2.), октанолдегидрогеназа (ODH, К.Ф. 1.1.1.1.), фосфоглюкомутаза (PGM, К.Ф. 2.7.5.1.), малик-энзим (ME, К.Ф. 1.1.1.40.), эстераза (EST, К.Ф. 3.1.1.1.) и фумараза (FUM, К.Ф. 4.2.1.2.) анализировались в **трипл-ЭДТА-богатой** системе (рН 8,6): *маточный буфер* включает 900 мМ трипл-(оксиметил)-аминометан, 500 мМ борную кислоту, 20 мМ ЭДТА, 40 мМ MgCl<sub>2</sub>, *анодный буфер* готовится путем разведения *маточного буфера* в 5 раз дистиллированной водой, *катодный буфер* готовится путем разведения *маточного буфера* в 7 раз дистиллированной водой, *гелевый буфер* готовится путем разведения *маточного* 20 раз дистиллированной водой.

Электрофоретическая разгонка трех ферментов – изоцитратдегидрогеназы (IDH, К.Ф. 1.1.1.42.), малатдегидрогеназы (MDH, К.Ф. 1.1.1.37.) и α-глицерофосфатдегидрогеназы (GPDH, К.Ф. 1.1.1.8.) проводилась в **трипл-цитрат, рН 6,2 / трипл-HCl, рН 8,0** системе - **электродный буфер** которой включает 233 мМ трипл-(оксиметил)-аминометан и 86,15 мМ лимонную кислоту, *гелевый буфер* содержит 500 мМ трипл-(оксиметил)-аминометан гидрохлорид, pH доводят 1Н NaOH. В этой системе электрофорез длился 4-5 часов при 3-7°C, напряжении 320-360 В и силе тока 60-80 мА.

Взрослые особи двух видов *Drosophila* группы *virilis* исследовались методом электрофореза. Гель готовили на крахмале (13-14%) и сахарозе (10%) при 0 - 5 °C и параметрах, описанных нами ранее (Гончаренко и др., 1989; 1991; Goncharenko, Emelianov, 1992; Гончаренко, Силин, 1997; Гончаренко, 1999; 2002а,б,в; Сурков и др., 2003).

По окончании электрофореза крахмальный блок разрезался на горизонтальные пластины с последующим гистохимическим окрашиванием по ранее описанным прописям с небольшими нашими модификациями (Гончаренко и др., 1989). Обозначение найденных аллелей дано по номенклатуре Пракаша (Prakash et al., 1969). Наиболее часто встречающийся в данном локусе аллель получал цифровой символ 1.00. Остальные аллели обозначались в соответствии с их электрофоретической подвижностью относительно аллеля 1.00. Нулевые аллели - символом 0.

Электрофоретический анализ материала потомков первого поколения полученных от самок *Drosophila* из природных популяций проводился нами по 11 ген-ферментным системам. Название ферментов, их кодовый номер, предпочтаемая для анализа буферная система, а также количество используемых локусов приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Ферменты, их кодовый номер, буферные системы и количество локусов, использованные для анализа видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* Палеарктики

Фермент	Аббревиатура	Кодовый номер	Буферная система	Количество локусов
Алкогольдегидрогеназа	ADH	1.1.1.1.	A	1
Гексокиназа	HK	2.7.1.1.	A	2
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	1.1.1.42.	B	1
Кислая фосфатаза	ACPH	3.1.3.2.	A	1
Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37.	B	2
Малик	ME	1.1.1.40	A	1
Октанолдегидрогеназа	ODH	1.1.1.1.	A	1
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1.	A	1
Эстераза	EST	3.1.1.1.	A	2
Фумараза	FUM	4.2.1.2.	A	1
α-Глицерофосфатдегидрогеназа	GPDH	1.1.1.8.	B	1

Для выявления нулевых вариантов из природных популяций необходимо отловить самок индикаторных видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*. Провести родственные скрещивания и электрофоретический анализ высших мух. Для случаев, когда активные изоферментные аллели отловленной в природе самки и оплодотворившего ее самца совпадут, приведена схема выявления нулевых электрофоретических вариантов на рис. 2.

Необходимые для выявления нулевых мутаций родственные скрещивания и анализ потомков первого и второго поколения возможны только в условиях лабораторного культивирования насекомых. При выявлении нуль-аллелей проводилось электрофоретическое исследование от 20 до 50 потомков второго поколения, полученных в индивидуальных скрещиваниях. Этапы анализа для случая, когда активные изоферментные аллели отловленной в

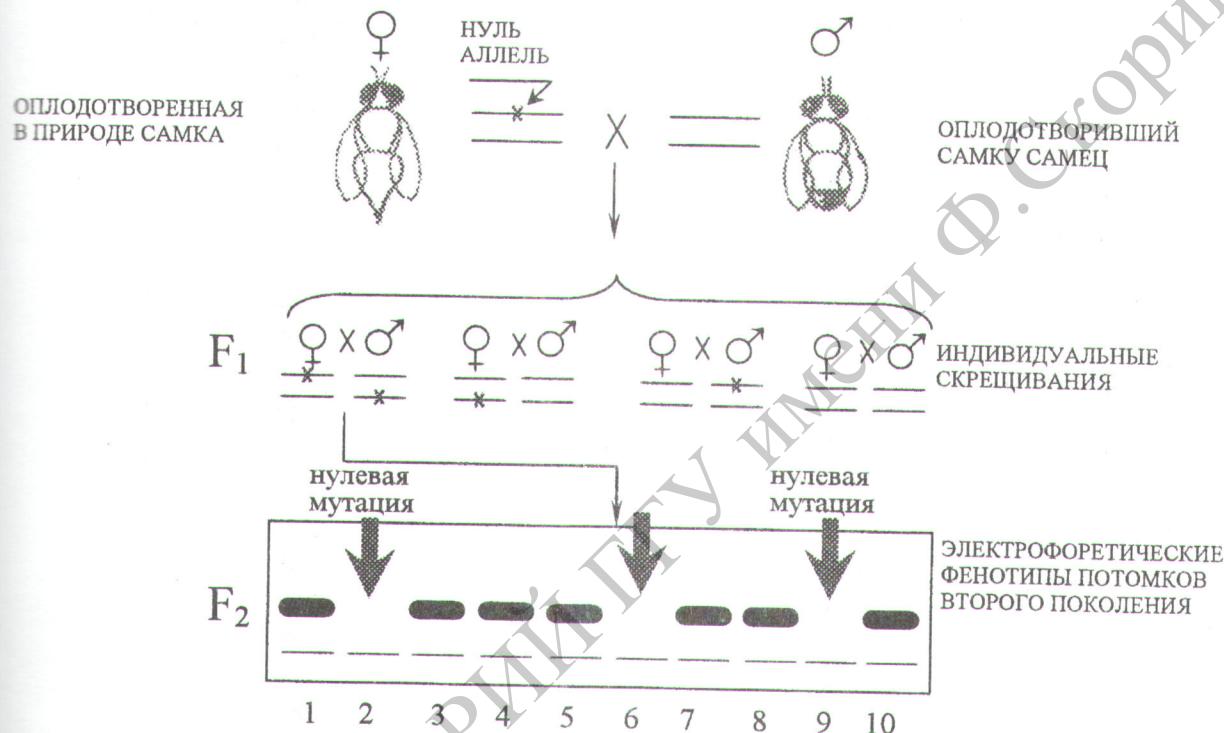


Рис. 2. Схема выявления нулевых электрофоретических вариантов в потомстве самок *Drosophila*, оплодотворенных в природных популяциях

природе самки и оплодотворившего ее самца совпадали, приведены на рис. 2.

Согласно схеме выявления нулевых мутаций, у самки, содержащей в исследуемом локусе только один нулевой аллель из двух, оплодотворенной в природе самцом без нулевого аллеля по этому же локусу, необходимо получить потомство. Для этого потребуется лабораторные условия культивирования насекомых. Мухи первого поколения ( $F_1$ ) в исследуемом локусе могут иметь только один нулевой аллель, как у самок, так и самцов, а второй аллель будет нормально функционировать (вырабатывать фермент). В данном случае необходимо последующее их родственное скрещивание (между собой) в лабораторных условиях. Получение потомков ( $F_2$ ) позволит локализовать нулевую мутацию в двух аллелях одного локуса (гена) в гомозиготном состоянии, т.к. нарушается синтез ключевого фермента. Проведение электрофоретического анализа потомков второго поколения, полученных от самок из природных популяций, позволит четко типировать наличие ноль-мутации на электрофореграмме по отсутствию фракций (бэндов) рис. 2.

Материал для исследования палеарктических видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* был взят из природных популяций в течении сезонов 1988-2004 годов.

### Результаты и обсуждение

Для исследования нулевых мутаций у видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* использовалась представленная выше тест-система, согласно которой были проведены близкородственные скрещивания и электрофоретические исследования по каждому из 14 локусов 11 ген-ферментным систем. Полученные в результате электрофоретического анализа данные представлены в таблице 2 в виде аллельных частот.

**Таблица 2.** Аллельные частоты по 14 локусам у *D. lummei*, *D. littoralis* из природных популяций Беларуси и сопредельных территорий

Локус	Аллели	<i>D. lummei</i>		<i>D. littoralis</i>	
		1	2	3	4
Pgm	n <sup>1)</sup>			99	.570
	0.40			.000	.018
	0.80			.929	.958
	1.00			.071	.019
	1.20			.000	.005
Me	n			98	.605
	1.00			1.000	.000
	1.10			.000	.002
	1.20			.000	.998
	n			96	.539
Hk-1	1.00			1.000	.011
	1.40			.000	.978
	1.80			.000	.007
	2.00			.000	.004
	n			96	.539
Hk-8	1.00			1.000	.998
	1.05			.000	.002
	n			96	.539
	1.00			1.000	.998
	n			96	.539
β-Est-2	0			.050	.000
	1.02			.870	.000
	1.11			.010	.000
	1.16			.070	.000
	1.36			.000	.002
	1.39			.000	.002
	1.44			.000	.074
	1.46			.000	.021
	1.48			.000	.575
	1.51			.000	.326
	n			95	.594
	0			.042	.000
	0.90			.905	.002
α-Est-3	0.95			.053	.178
	1.00			.000	.052
	1.02			.000	.332
	1.10			.000	.296
	1.14			.000	.140
	n			98	.603
	0			.000	.001
	1.01			.020	.000
Acpn-1					

1	2	3	4
	1.03	.000	.017
	1.07	.051	.000
	1.08	.643	.869
	1.14	.000	.071
	1.20	.000	.053
	1.26	.276	.000
	1.80	.010	.000
<b>Adh</b>	n	96	535
	1.00	1.000	.002
	1.40	.000	.998
<b><math>\alpha</math>-Gpdh</b>	n	66	34
	1.00	1.000	1.000
<b>Odh</b>	n	32	133
	0.95	.031	.015
	1.00	.969	.917
	1.05	.000	.023
	1.10	.000	.038
	1.20	.000	.007
<b>Fum</b>	n	44	525
	1.00	1.000	1.000
<b>c-Mdh</b>	n	90	188
	0.90	.044	.000
	0.91	.000	.952
	0.94	.000	.048
	0.96	.056	.000
	1.00	.900	.000
<b>m-Mdh</b>	n	90	188
	1.00	1.000	1.000
<b>Idh</b>	n	90	34
	0.95	.011	.000
	0.98	.000	.912
	1.00	.989	.088

Примечание: <sup>1)</sup> n – число проанализированных геномов

В результате проведенного нами генетического анализа было установлено, что все 56 электрофоретических вариантов (табл. 2), выявленных нами по 11 ферментным системам у двух представителей *Drosophila* группы *virilis*, находятся под генетическим контролем 14 локусов. Все эти аллельные варианты и их относительная электрофоретическая подвижность наглядно изображены на рис. 3, где хорошо видно, что нулевые аллели обнаружены нами только у *D. lummei* в двух локусах, кодирующих  $\alpha$ -эстеразу-3 и  $\beta$ -эстеразу-2, а у *D. littoralis* только в одном локусе, кодирующем кислую фосфотазу-1.

Причем, если по Acph-1 у *D. littoralis* нуль – аллель можно отнести к редким, то у *D. lummei* частота нулевых аллелей по  $\alpha$ -Est-3 и  $\beta$ -Est-2 равнялась 4,2 и 5,0% соответственно (табл. 3). Столь высокая концентрация нулевых аллелей у *D. lummei* еще раз убедительно указывает на неблагополучное состояние генофонда в природных популяциях этого вида, выявленное на основании значений показателей полиморфизма. Интересно отметить этот факт, что нам не удалось обнаружить ни одной особи *D. lummei*, которая была бы гомозиготна по нулевым аллелям сразу в двух локусах. По-видимому, такое сочетание у *D. lummei* приводит к летальному исходу и отчасти может объяснять низкую плодовитость самок этого вида в природных популяциях.

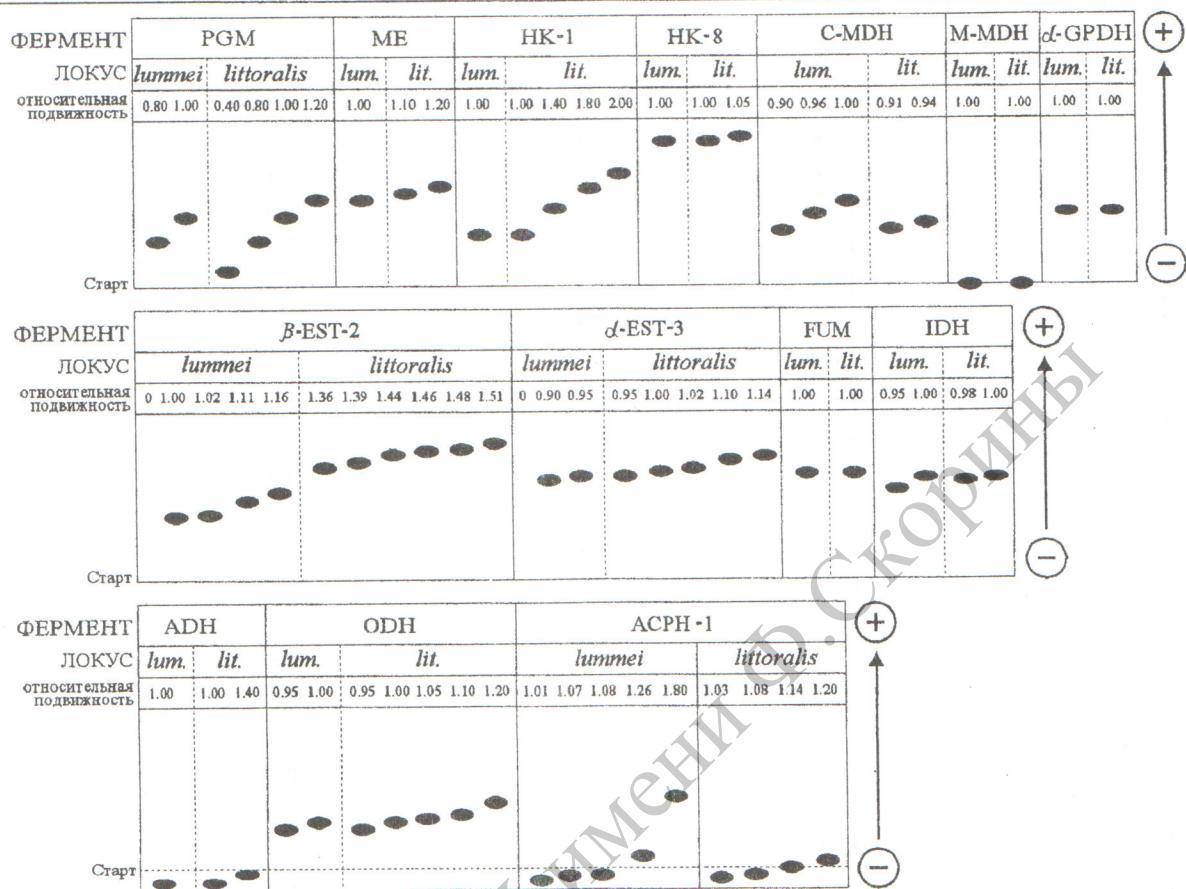


Рис. 3. Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 14 локусов у представителей *Drosophila* группы *virilis* *D. lummei* и *D. littoralis*

Как было показано в ряде работ, частота возникновения мутаций по электрофоретическим аллельным вариантам у *Drosophila* колебалась в пределах от  $1,7 \times 10^{-5}$  до  $4,6 \times 10^{-6}$  (Tsunoda, 1981; Tobari, Kojima, 1972). Следовательно, обнаруженные нами нулевые варианты в популяциях *D. lummei* и *D. littoralis* не могут быть вновь возникшими мутациями, поскольку частоты их встречаемости на локус / на поколение равны  $7,0 \times 10^{-3}$  и  $1,0 \times 10^{-4}$ , соответственно (табл.3).

Таблица 3. Частоты нулевых аллелей у видов *Drosophila* группы *virilis* *D. lummei* и *D. littoralis*

Локусы	Частоты нулевых аллелей	
	<i>D. lummei</i>	<i>D. littoralis</i>
$\alpha$ -Est-3	0.0420	0.0000
$\beta$ -Est-2	0.0500	0.0000
Acph-1	0.0000	0.0010
Среднее по 14 локусам	0.0070	0.0007

Анализ частот встречаемости нулевых аллелей в природных популяциях 2 видов *Drosophila* выявил у *D. lummei* высокую концентрацию нуль-аллелей, в отличие от *D. littoralis*, которая указывает на значительный сегрегационный груз и неблагоприятное состояние генофонда в популяциях этого вида.

Таким образом, разработанная тест-система для выявления нулевых вариантов (мутаций) с освоенным набором генов, ответственных за синтез ключевых ферментов, из различных метаболических цепей, у индикаторных видов двойников *Drosophila* группы *virilis* я

ляется вполне надежной, хорошо функциональной базой для выявления и мониторинга нулевых мутаций в структурных генах и определения частот нулевых аллелей в природных популяциях с экологическими особенностями.

Работа выполнялась в рамках программ ГПОФИ “Радиация и антропоэкология”, гранта Министерства Образования Республики Беларусь и программ по преодолению последствий катастрофы на ЧАЭС, а также поддержаны различными научными грантами, такими как ISF “RW 2000”, “RW 2300”. Авторы выражают благодарность сотрудникам Института Генетики и Цитологии, Минск; Института биологии и развития и Института биологии гена РАН, Москва, которые оказывали содействие на различных этапах генетических исследований.

**Abstract.** The authors developed some methods of detecting zero-alleles of the sibling-species of *Drosophila*, group *virilis*, taken from the natural population of the isolated region of Belarus. The authors give examples of zero-alleles obtained in the result of the loss of the gene product activity (zero variant) of enzymes.

## Литература

1. Г. Г. Гончаренко, *Геносистематика и эволюционная филогения лесообразующих хвойных Палеарктики*, Минск, Тэхнагогія, 1999.
2. Г. Г. Гончаренко, *Генетическая структура тихты белой в Беловежской пуще и других популяциях северо-восточной части ареала*, Весці НАН Беларусі, № 3 (2002), 31–37.
3. Г. Г. Гончаренко, *Геносистематика и эволюционная филогения хвойных Палеарктики. Сообщение III. Геносистематика и филогения елей*, Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, № 3 (12) (2002), 81–115.
4. Г. Г. Гончаренко, *Методический подход к исследованию популяционно-генетических ресурсов хвойных*, Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, № 4 (13) (2002), 134–146.
5. Г. Г. Гончаренко, С. И. Ивановская, Э. Нево, *Геносистематика и эволюционная филогения хвойных Палеарктики. Сообщение I. Геносистематика и филогения двуххвойных сосен*, Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов ИЛ НАН Беларуси, Гомель, ИЛ НАН Беларуси, 50 (1999), 106–145.
6. Г. Г. Гончаренко, В. Г. Кривко, В. В. Потенко, акад. Л. В. Хотылева, *Эндоспермы *Picea abies* как тест-система для определения темпов мутирования в районах с радиоактивным загрязнением*, Докл. АН БССР, 35, № 4 (1991), 365–369.
7. Г. Г. Гончаренко, В. Е. Падутов, В. В. Потенко, *Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов*, Гомель, Госкомитет СССР по лесу, 1989.
8. Г. Г. Гончаренко, А. Е. Силин, *Популяционная и эволюционная генетика сосен Восточной Европы и Сибири*, Минск, Тэхнагогія, 1997.
9. Е. В. Полякова, *Нуль-аллели генов, контролирующих синтез ферментов: распространение в природе и биологическое значение*, Успехи современной биологии, Москва, 111, Вып. 3 (1990), 339–352.
10. F. W. Allendorf, K. L. Knudsen, G. M. Blake, *Frequencies of null alleles at enzyme loci in natural populations of ponderosa and red pine*, Genetics, 100 (1982), 497–504.
11. G. G. Goncharenko, I. M. Emelianov, *An electrophoretic key to adult members of the sibling species belonging to the *Drosophila virilis* group (Diptera, Drosophilidae) inhabiting Soviet Union and adjacent countries*, Journal of Zoological Systematic and Evolutionary Research, 30 (1992), 281–286.
12. A. J. F. Griffiths, W. M. Gelbart, J. H. Miller, R. C. Lewontin, *Modern genetic analysis*, Freeman and company, New York, 1999.
13. T. Mukai, C. C. Cockerham, *Spontaneous mutation rates of isozyme genes in *Drosophila melanogaster**, PNAS, 74, № 6 (1977), 2514–2517.

14. S. O'Brien, R. McIntyre, *Genetics and biochemistry of enzymes and specific proteins of Drosophila*, In Ashburner, M., and Wright, T. (eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, New York, **2a** (1978), 395–551.
15. S. Prakash, R. C. Lewontin, J. L. Hubby, *A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of Drosophila pseudoobscura*, *Genetics*, **61** (1969), 841–858.
16. K. Tsuno, *Studies on mutation at esterase loci in Drosophila virilis I. Spontaneous mutation rate and newly arisen variants*, *Japanese Journal of Genetics*, **56** (1981), 155–174.
17. Y. Tobari, K. Kojima, *A study of spontaneous mutatuon rates at ten loci detectable by starch gel electroforesis in Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **70** (1972), 397–403.
18. R. A. Volker, H. E. Schaffer, T. Mukai, *Spontaneous allozyme mutations in Drosophila melanogaster: rate of occurrence and nature of the mutants*, *Genetics*, **94** (1980), 961–968.

Гомельский государственный  
университет им. Ф. Скорины

Поступило 15.03.05