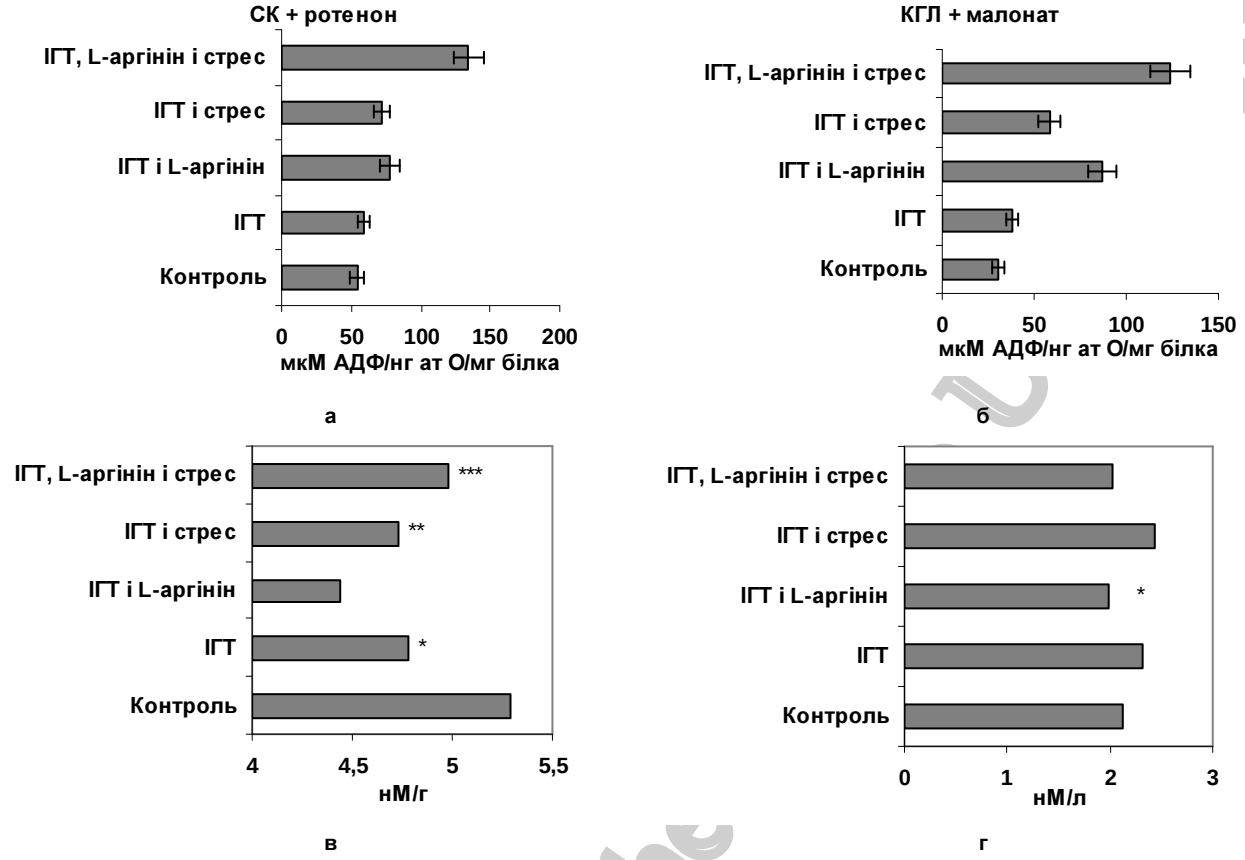

Рис. 1. Ротенончутлива компонента окиснення сукцинату (а) і малонатчутлива компонента окиснення α-кетоглутарату (б) показника АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда, вміст ТБК-активних продуктів у міокарді (в) і крові (г) щурів за умов інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ), ІГТ з уведенням L-аргініну та стресу

Висновки. Таким чином, адаптація до гіпоксії в інтервальному режимі, знижуючи інтенсивність процесів ліпопероксидації та ушкодження функціонування мітохондріальних мембран шляхом економізації процесів використання кисню, виступає важливим протекторним чинником й опосередковується оксидом азоту.

1. *Кургалюк Н.Н.* // Успехи физиол. наук. – 2002. – Т. 33, № 4. – С. 65–79. 2. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С.* – М., 1998. *3. Чекман Т.С., Горчакова Н.О.,Рибальченко В.К.* та ін. // Галицький лік вісн. – 2000. – № 2. – С. 8–11. 4. *Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И.* // Лаб. дело. – 1988. – № 4. – С. 209–211. 5. *Bredt D.S., Snyder S.H.* // Ann. Rev. biochem. – 1994. – Vol. 63. – P. 175–195. 6. Brown G. // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1411, № 2–3. – P. 351–369. 7. *Chance B., Williams G.* // Adv. Enzymol. – 1956. – Vol. 17. – P. 65–134. 8. *Halliwell B., Gutteridge J.* Free radical in biology and medicine. – Oxford, 1989. – P. 543–555. 9. *Kurhalyuk N., Ikkert O., Halkiv M.* et al. // Aminoacids and their derivatives in biology and medicine. – Grodno, 2001. – P. 65–66. 10. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 575

А.С. Драницина, асп.,
Г.Д. Телегеєв, канд. біол. наук, М.В. Дибков

МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ДНК: МАРКЕРИ RAPD І МІНІСАТЕЛІТИ

Узагальнено літературні дані, отримані при вивченні поліморфізму ДНК за допомогою таких молекулярно-генетичних маркерів: мінісателітів і маркерів RAPD. Відмічено сфери застосування даних ДНК-маркерів, розглянуто обмеження їхніх можливостей при аналізі генетичних процесів у популяціях.

In the present paper literature data obtained during studying of DNA polymorphism by the following molecular-genetic markers: minisatellites and RAPD-markers have been summarized. Fields of application of these DNA-markers were designated and limitations of their possibilities were considered in analysis of genetic processes in populations.

Новий клас генетичних маркерів з'явився в середині 1980-х років після відкриття поліморфізму ДНК завдяки розвитку методів виділення, клонування та розрізання (рестрикції) генів. Вирішальну роль у становленні й розвитку "нової генетики" зіграло відкриття полімеразної ланцюгової реакції. На сьогодні поліморфізм ДНК знайдено в мітохондріальній та ядерній ДНК, у кодуючих і некодуючих ділянках останньої, в їхніх унікальних послідовностях і в тих, що повторюються [1].

За допомогою методу ампліфікації випадкових фрагментів ДНК, або ампліфікації ДНК з одиничним випадковим праймером (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (він ще має інші, менш популярні, назви: AP-PCR (від Arbitrary Primers – PCR) і DAF (від DNA Amplified

© А.С. Драницина, Г.Д. Телегеєв, М.В. Дибков, 2005

Fragments)) можна отримати набір продуктів, зчитаних з різних, випадково відібраних праймером ділянок ДНК, котрі за електрофоретичного фракціонування дають набір смуг (патерн, спектр) різної інтенсивності [2, 3].

Швидкості зміни патернів RAPD у різних великих таксонів (примати, дрозофіла) суттєво відрізняються, але всередині таксона можна прослідкувати залежність між ступенем дивергенції патернів і часом віддалення таксону. Ступінь поліморфізму патернів залежить від специфіки ДНК і праймера, його довжини, умов ампліфікації та від якості ферменту.

На відміну від мікросателітів чи однолокусних мінісателітів, за допомогою яких вивчаються конкретні локуси геному, маркери RAPD, як і мультилокусні мінісателіти, дозволяють досліджувати геном у цілому, не потребують знання конкретної послідовності й попереднього картування та секвенування і дозволяють отримувати відповідні "фінгерпринти", або дактиловідбитки – набори характерних специфічних смуг певної геномної ДНК [3, 4].

Для аналізу RAPD використовують звичайно короткі (10–20 нуклеотидів) праймери з довільно обраними послідовностями й за допомогою ПЛР ампліфікують анонімні ділянки ДНК. Так, широко застосовують готові набори фірми "Operon Ltd" (USA), які містять по 20 10-мерних олігонуклеотидів. Сайти зв'язування праймерів випадково розподілені по геному, а поліморфізм у таких сайтах виявляється в присутності відповідних фрагментів у гені [5, 6].

Також поліморфізм RAPD-профілів зумовлений повною/неповною комплементарністю праймерів до сайтів геномної ДНК і відстанями між ними. Звідси RAPD-смуги з'являються або зникають унаслідок дії мутацій, інверсій, делецій, хромосомних перебудов відносно сайтів зв'язування праймерів. RAPD-смуги різної молекулярної маси розглядаються як окремі локуси. Різниця в інтенсивності смуг може пояснюватись різною кількістю копій продуктів, гетерозиготністю, коміграцією та частковою незбіжністю сайтів відпалу праймерів [7].

RAPD-маркерам притаманне менделівське наслідування, як правило, домінантного типу. Проте за наявності даних про потомство можна виявити й деякі кодомінантні маркери, що складають, наприклад, 2–3 % від усіх RAPD-маркерів.

RAPD-маркери локалізовані переважно в некодуючих ділянках ДНК, оскільки вона складає переважну частину геному еукаріотів. Швидкість утворення мутацій у некодуючій ДНК приблизно вдвічі вища, ніж у кодуючій. До того ж RAPD-маркери іноді ампліфікуються з регіонів ДНК, що повторюються і можуть відображати високі швидкості їхнього мутаційного процесу [1].

Однак слід зазначити, що даний метод має і певні недоліки: однакові за розміром фрагменти можуть бути зчитаними з різних локусів або, навпаки, смуги різного розміру можуть містити гомологічні локуси. Вважається, що маркери RAPD можуть скринінгувати геном не так випадково, як на це сподівалися. Беручи до уваги те, що RAPD-праймери мають високий GC вміст [2, 3], потрібний для успішного відпалу за низьких температур, вони можуть виявляти GC-багаті регіони, нерівно розподілені по геному. З іншого боку, відповідно до випадкової природи ампліфікації, як ядерна, так і ДНК органел може бути ампліфікованою під час ПЛР. Наприклад, у дослідах Аагаарда та співроб. на піхті (*Pseudotsuga menziesii*) 19 % смуг RAPD-фінгерпринту могли бути віднесеними до ДНК органел. Відповідним фрагментам не притаманне менделівське наслідування через їхню гаплоїдність і клональну спадковість [7].

Існує проблема домінантних і "нуль" алелів; у гаплоїдних організмах як домінантні (присутність) і "нуль" алелі (відсутність) можуть бути зчитаними, але в диплоїдних організмів не можливо встановити, чи є генотип гомозиготним за домінантним алелем або гетерозиготним [8]. Також RAPD-аналіз характеризується низькою відтвореністю попередніх результатів [5]. Найвагомішою похибкою даного методу є так зване змагання між різними фрагментами ДНК за участь у ампліфікації. Частота таких похибок для поліморфних смуг становить ≈ 15 % незалежно від складності геному [6]. Не виключена можливість появи артефактних смуг унаслідок утворення вторинних структур у праймерах чи продукті. Проте дані недоліки є наслідком того, що виникнення артефактів здебільшого залежить від властивостей ДНК, праймера, і можуть контролюватися за допомогою певних підходів, наприклад, ідентифікація продуктів RAPD методом перенесення за Саузерном, секвенування смуг, поліпшення електрофоретичного розподілу тощо [7, 8].

Таким чином, RAPD-маркери залишаються хорошим робочим інструментом, особливо на перших етапах молекулярно-генетичних досліджень.

Метод RAPD дозволяє виявити велику кількість (до декількох сотень) маркерів, розсіяних по всьому геному, тому саме такі маркери є зручними для побудови генетичних карт [5] або карт зчеплення з локусами господарсько-важливих властивостей. Прикладом цього є роботи з генетичного картування винограду та аналізу родинних зв'язків між різними фруктами, їхніми мутантами та клонами [9].

Завдяки використанню даного методу було показано подібність патернів RAPD за різними праймерами в диких і домашніх форм баранів, що свідчило про їхню найближчу спорідненість. За допомогою методу RAPD досліджено деякі види копитних, змій, риб. Доведено гібридне походження та визначено двостатеві види ящірок, котрі в минулому були батьківськими [4]. Дослідження в цьому напрямку полегшується мономерністю й стабільністю патернів RAPD у партеногенетичних популяцій рептилій і невеликим рівнем гетерогенності батьківських видів [4].

У роботі [10] з порівняння генетичних профілів ентеробактерій (*Yersinia enterocolitica*) різних штамів і серотипів, що були виділені з людей і свиней, за допомогою RAPD-аналізу було показано, що деякі фрагменти ДНК продукують більшу кількість смуг, ніж інші. Це явище можна було пояснити або ампліфікацією з численних ідентичних регіонів ДНК, або ампліфікацією різних послідовностей ДНК, що продукували фрагменти однакового розміру. Різний розмір спектрів у штамах однієї групи пояснювався делеціями та інсерціями, що модифікували розмір фрагментів ДНК. Також при порівняні RAPD-спектрів, отриманих за допомогою різних праймерів, було одержано несподіваний результат: штами різних серотипів виявляли однакові ампліфікаційні профілі [10].

При аналізі RAPD-фінгерпринтів ДНК кількох видів хвойних було показано, що поряд із мінливими всередині виду RAPD-маркерами виявляються інваріантні, що не показують індивідуальну й географічну мінливість, проте здатні до диференціації видів усередині роду, тобто видоспецифічні. Таку ДНК запропонували відрізняти від поліморфної, назвавши її RAMD – randomly amplified monomorphic DNA, і розглядати як вияв генетичного мономорфізму на рівні ДНК, відкритого раніше для білкових маркерів. Можливо, такого роду видоспецифічні RAMD-маркери виявляються розповсюдженими й серед інших організмів і можуть використовуватися при вирі-

шені таксономічних питань [1]. Так, RAPD-аналіз явив собою зручне знаряддя ідентифікації. За допомогою даних маркерів визначено видову належність і філогенетичні зв'язки різних видів збудників лептоспірозу (*Leptospira interrogans spp*), виділених із хворих людей. При використанні одного і того самого праймера для аналізу одного і того ж виду всі головні смуги RAPD-фінгерпринту були однаковими (видоспецифічними) і відрізнялися від RAPD-спектрів інших видів [11].

RAPD-маркери можуть бути використані для пошуку специфічних для різних хромосом продуктів ампліфікації. Так, у птахів виявлено смугу, специфічну для W-хромосоми. Даний фрагмент було виділено, секвеновано й показано, що він є одним із консервативних регуляторних білків структурування ДНК (CHO_2) [12]. Специфічний маркер Y-хромосоми було виявлено у вівці, свині, бика, причому два види бичачих відрізнялися за наявністю цього фрагмента [4]. При скануванні продуктів від 700 праймерів, які було отримано на ДНК самців і самиць дикого (*Bombyx mandarina*) і домашнього (*B. mori*) видів шовкопряда (формули статевих хромосом: у самців ZZ, у самиць ZW), удалося, напевне, знайти фракції, специфічні для W-хромосоми. Дані такого типу можуть виявитися інструментом для вивчення механізмів визначення статі та партеногенезу.

Наявність видоспецифічних ознак RAPD дозволяє використовувати ці маркери для вивчення гібридогенезу як видоутворювальної події. Для дослідів з міжвидової гібридизації особин, яких узяли в природі, наприклад при вивченні сітчастої еволюції, потрібні відомості про індивідуальну мінливість батьківських популяцій.

Нині проводяться роботи з ідентифікації продуктів RAPD, чому сприяє поєднання цього методу з методом переносу за Саузерном із подальшою гібридизацією з обраним праймером. Серед продуктів ампліфікації сьогодні виявлено всі типи ДНК – унікальні гени, середні й повтори, що часто повторюються, причому, наприклад, у ДНК сої з 11 досліджених фрагментів 6 зчитані з унікальних генів, а 3 та 2 – відповідно з указаних повторів [2]. У секвенованих фрагментах RAPD ДНК паразитичних нематод роду *Trichinella* містяться здебільшого унікальні локуси та такі, що мають невелику кількість повторів, серед яких виявлені гени хітинази, матурази й численні послідовності, гомологічні генам нематод *Caenorhabditis elegans*. Очевидно, серед RAPD-фрагментів можна очікувати появу будь-яких локусів залежно, в основному, від специфіки праймера [4, 6].

Маркери RAPD успішно використовуються для ідентифікації статі, як це було показано при визначенні статі економічно важливих тварин. RAPD-спектри свиней містили смуги, специфічні для самців. На їхній основі були сконструйовані праймери для масштабного визначення статі вищезазначених тварин за допомогою простого й ефективного методу ПЛР [12].

RAPD-аналіз може бути використаним в екотоксикології, даючи інформацію про всі прямі й непрямі шляхи дії токсичних речовин на генетичну структуру популяцій.

У літературі зазначено, що RAPD-аналіз, проведений за точно визначеними умовами, може бути корисним засобом визначення токсичних популяційних генетичних ефектів, особливо беручи до уваги те, що даний метод є відносно недорогим та інформативним (значна кількість виявлюваних локусів). На сьогодні даний напрямок досліджень є новим. Тому, відповідно до своєї "випадкової" природи, дані RAPD мають розглядатися як попередні до їхнього підтвердження шляхом клонування, секвенування та гібридизації із зондами [1, 7].

Обговорюється питання широкомасштабного впровадження методу RAPD у судову медицину, де різні види мух, личинки яких, знайдені на трупі, розвиваються в різний час, є необхідними для визначення часу настання смерті. Оскільки личинок м'ясної мухи важко ідентифікувати, особливо на ранніх стадіях розвитку, і через брак часу в розслідуваннях невідкладних кримінальних справ, де очікування перетворення личинок на імаго є неприпустимим, RAPD-аналіз як швидкий, недорогий і надійний метод є безцінним знаряддям ідентифікації [13].

Таким чином, метод RAPD за адекватного використання та інтерпретації даних є достатньо інформативним сучасним засобом вивчення генетичного різноманіття видів у природі, зокрема для дослідження генетичного поліморфізму популяцій на внутрішньо- та міжвидовому рівнях.

Він є незамінним інструментом при встановленні ступеня спорідненості та подібності й широко використовується для генетичної паспортизації порід і ліній домашніх тварин. Даний метод особливо ефективний для вирішення демографічних проблем і численних завдань, пов'язаних з оцінкою генетичного різноманіття, раціонального використання генетичних ресурсів, а також для розробки наукового обгрунтування рекомендацій щодо збереження та відтворення рідкісних видів тварин і рослин [4, 7].

Застосування RAPD аналізу значно розширило коло біологічних проблем, що вирішуються, і дозволило проводити в більш стислі терміни вивчення генетичної мінливості організмів будь-якого таксономічного рангу, незалежно від знання структури й розмірів геному, якості та кількості досліджуваних зразків (особливо на першому етапі досліджень).

Геномна дактилоскопія – це метод виявлення та аналізу гіперваріабельних тандемних повторів, або мінісателітів, описаних Джеффрісом та співавт. у середині 80-х років [14].

Мінісателіти, або число тандемних повторів, що варіює (VNTR – variable number of tandem repeats). Послідовності, які утворені з тандемних повторів з довжиною "мотиву" (core) від 9–10 до сотень нуклеотидів кожна і який повторюється 4–64 рази. За приблизними оцінками в геномі людини нараховується приблизно 1500 диспергованих локусів даного типу [15, 16].

Мінісателітам притаманна еволюція. Так, швидкість спонтанного мутаційного процесу за даними ділянками геному становить близько 2–4 мутацій на 10000 п·н/локус (10^{-2}–10^{-4} п·н/локус) за покоління (в алозимних генів – близько 5–6 мутацій на 10000 п·н/локус (10^{-5}–10^{-6} п·н/локус)).

Мутації типу інсерцій, делецій, котрі виникають через зсув і неточне спарювання ланцюгів ДНК при реплікації та внаслідок нерівного кросинговеру, змінюють число повторів, тобто загальну довжину такої багатокопійної послідовності, і, таким чином, є причиною поліморфізму, що спостерігається.

Такі гіперваріабельні ділянки ДНК мають багатий GC вміст і характеризується менделівським кодомінантним успадкуванням алелів.

Ступінь гетерозиготності за локусами мінісателітів є достатньо високою (на порядок перевищує алозимну); досягає майже 100 %, і, відповідно, вони можуть бути використаними як маркерів при картуванні генів [1, 14].

Дані локуси в основному розташовані в некодуючих ділянках геному і, таким чином, зазвичай є селективно нейтральними. Це загальне правило, напевне, має деякі виключення у випадку тісного зчеплення з адаптив-

но значущими генами. Ряд фактів засвідчують, що деякі мінісателіти можуть слугувати кодуючими або регуляторними елементами, іноді їх знаходили всередині екзонів і асоціювали з хворобами [1].

Властивості довгих полімерів, зокрема тандемних повторів, дають їм можливість утворювати структури вищих порядків, котрі, наприклад, описуються кривизною молекули. Ця кривизна, вважають, відіграє роль у позиціонуванні часток нуклеосомного кора і в утворенні компактного сателітного гетерохроматину так само, як і у зв'язуванні певних білків.

Не виключена спеціальна роль, наприклад, альфоїдної ДНК, у компактизації нуклеосом центромірних ділянок. Конструкції УАС, що містять альфоїдну ДНК центромірних ділянок, при їх уведені в клітини людини чи хом'яка утворюють структури, котрим притаманні властивості центромір, що виявляються цитологічно [4].

Мінісателіти людського геному розташовані нерівномірно, головним чином на кінцях хромосом, що передбачає обмеження у використанні даних послідовностей при аналізі зчеплення. Така субтеломерна локалізація людських мінісателітів корелює з високою густиною хіазм під час мейозу та свідчить про асоціацію з мейотичним кросинговером. Людська Х-хромосома містить мало мінісателітів, хоча кластер мінісателітів розташований у Х–У парному регіоні. На відміну від людей мишачий геном не має кластерів мінісателітів на кінцях хромосом [16] .

При вивченні хромосомної еволюції південноамериканського гризуна туко-туко (*Ctenomis*) знайдено кореляції між хромосомними перебудовами й ампліфікацією та делецією мажорного сателіта цього організму.

Мегасателіт RS 447 людини кодує убіквітинізуючий фермент, причому транскрипція тієї ж ділянки іншого ланцюга з утворенням антисенсової РНК може модулювати рівень експресії ферменту в мозку [4].

Велике алельне різноманіття та гетерозиготність, висока швидкість мутаційного процесу, соматична й онтогенетична стабільність відкривають широкі можливості для індивідуальної ідентифікації, зокрема для вирішення деяких завдань судової медицини (ДНК-фінгерпринтинг) [14, 15], вивчення індивідуального мутаційного процесу, а також у різних демографічних, екологічних і природоохоронних дослідженнях [17].

Мінісателіти виявляють при розрізанні ДНК за допомогою рестриктаз; Саузерн-блотингу зі специфічною пробою ДНК (зондом), комплементарною до послідовності, що повторюється. Полілокусні проби дозволяють виявляти одразу кілька гіперваріабельних локусів завдяки спорідненості повторів у деяких родин мінісателітів, що призводить до утворення високо індивідуальної картини – геномного дактиловідбитку (DNA fingerprints). Однолокусні проби виявляють лише одну родину мінісателітів. У більшості випадків монолокусні зонди при "пом'якшенні" умов гібридизації використовувалися як полілокусні, і навпаки, за більш "жорстоких" умов полілокусні проби можуть проявляти властивості монолокусних.

Розміри алельних варіантів, що виявляються за допомогою зондів, можуть бути різними: від 23000 п. н. до повної відсутності їх – "нуль" алелів, які з'являються внаслідок мутації [15].

Джеффрізу зі співавт. [14] вдалося вперше показати, що зонди на основі кор-послідовності тандемних повторів можуть бути використані для одночасного виявлення великої кількості відповідних генетичних локусів. Це стало можливим після відкриття невеликого мінісателіта в гені людського міоглобіну, що містить 4 повтори послідовності, яка складалася з 33 п. н. у межах одного з інтронів.

Відповідні зонди, названі 33.6 та 33.15, існують у вигляді рекомбінантних форм векторів, отриманих на основі бактеріофага М13. Кожна з них виявляє близько 15 високополіморфних смуг у діапазоні 4000–20000 п. н. [18, 19].

Зонд на основі фага М13, описаний Вассартом та співроб., а також Рисковим та співроб. [15] є одним із найпоширеніших зондів, що використовуються для виявлення гіперваріабельних ділянок геному організмів, котрі належать до різних таксономічних груп [8]. Послідовність із геному одноланцюгового бактеріофага М13 виявляє родину гіперваріабельних послідовностей, якщо використовується як зонд при гібридизації з геномною ДНК людини. Ця послідовність є частиною фагового гена III, який кодує білок, що бере участь у прикріпленні до бактеріальних F-пілей під час інфекції та містить дві ділянки GC-багатих тандемних повторів. Родина гіперваріабельних ділянок геному, що виявляється тандемним повтором із гена III бактеріофага М13, відрізняється від родин, які детектуються за допомогою мінісателітних зондів 33.6 та 33.15, але подібні високим ступенем поліморфізму, а також тим, що частота алелей зменшується пропорційно їх розмірам.

Середня частота співвідношення для однієї смуги в індивідів європейського походження, що не є родичами, становить близько 0,20 для фрагментів більш 2000 п. н., причому для окремого індивіда таких смуг виявляється 15–20. Отже, тандемний повтор М13 виявляє картину "відбитків ДНК", порівняну за своєю складністю з картинами, що отримують при використанні мінісателітів, і дозволяє проаналізувати 15–20 додаткових гіперваріабельних ділянок у ДНК людини та інших ссавців [15].

ДНК-дактиловідбитки повністю специфічні для певної людини і, таким чином, являють собою ефективний інструмент для позитивної ідентифікації [1, 4, 14]. Вони майже завжди характеризуються соматичною стабільністю, є ідентичними в монозиготних близнюків і підтримуються в культурі клітинних ліній. Відомі лише два приклади соматичної варіації. По-перше, незначні відмінності між тканинами були знайдені, використовуючи рестрикційні ендонуклеази, такі як Hinf I та Sau 3A, сайти яких можуть бути блокованими метилуванням (наприклад, сайт Sau 3A, що має на кінці mCG, GATmCG, стійкий до дії Sau 3A). Така варіація дактиловідбитків ДНК, можливо, є результатом різниці тканин щодо метилування і зникає, коли використовуються рестриктази, наприклад, Alu I та Hae III, котрі не можуть бути блокованими CpG метилуванням. Друге виключення з правила соматичної стабільності можна спостерігати в пухлинах [15]. ДНК-фінгерпринти також демонструють стабільність клітин зародкового шляху і всі тандемні повтори ДНК дитини прослідковуються не лише в батьків, але й у минулих поколіннях. Узагалі, ДНК-дактиловідбитки характеризуються індивідуальною специфічністю, виключення складають лише монозиготні близнюки [14]. Смуги, що складають ДНК-фінгерпринти, як уже зазначалося, успадковуються за законами Менделя. Вважаючи, що швидкість мутаційного процесу становить 4 помилки на 10000 (10^{-4}) п. н/мейоз, можна зробити висновок, що майже всі смуги геномного дактиловідбитку даної людини мають виявлятися також у відбитках ДНК або його матері, або батька. Близько половини смуг у нащадків повинні мати батьківське походження. І це є достатнім для достовірного встановлення родинних зв'язків та ідентифікації особистості в судовій медицині, незважаючи на те, що більшість батьківських фраг-

ментів не мають чітко визначених алельних пар, передбачаючи існування значної різниці в розмірі між алелями даного локусу і те, що алелі часто присутні в комплексі малих фрагментів ДНК, які важко детектувати. Якщо можливий батько не є біологічним батьком, більшість смуг його ДНК-фінгерпринта будуть відсутні в дактиловідбитку дитини, демонструючи численні виключення.

Широко досліджуючи різні родини, де батьківство поза сумнівом, Джеффріз із співавт. попередньо підрахували, що 1 із 300 фрагментів нащадка не може бути визначеним у будь-якого з батьків. Цей грубий підрахунок рівня мутаційного процесу щодо нової довжини алелей, котрий узгоджується з попередніми популяційно-генетичними підрахунками, є, звичайно, низьким серед усіх тандемних повторів і, ймовірно, змінюється від локусу до локусу. Ймовірність того, що можливий батько буде випадково мати всі 15 фрагментів і що помилкове батьківство буде встановлене, дуже мала ($< 4 \cdot 10^{-11}$, якщо можливий батько не родич справжнього батька, $< 4 \cdot 10^{-5}$, якщо вони брати) [14, 15].

Якщо кор-послідовність ДНК людини – це сигнал рекомбінації [14, 18], який, ймовірно, зберігається в еволюційному процесі, то це свідчить про те, що людські полілокусні зонди здатні гібридизуватися з мінісателітами ДНК інших видів. Дійсно, були проведені досліди, в яких обидва зонди 33.6 та 33.15 гібридизувалися з численними повторами ДНК різних хребетних, починаючи із ссавців і птахів та закінчуючи рептиліями, амфібіями й рибами. До того ж, розглядаючи інтенсивність і складність гібридизаційних зразків, можна побачити відсутність систематичного спадання відповідно філогенетичного віддалення від людини. У собак складність і генетичні властивості ДНК-фінгерпринту подібні до таких у людини, але з більш високоваріабельними фрагментами, що були одержані з численного розсіяного аутосомного собачого локусу. ДНК-відбитки котів виявилися менш складними, хоча так само високо інформативними [18].

Середня кількість локусів, що виявлялися на людському фінгерпринті, становила 29,5 (використовуючи обидва зонди 33.6 та 33.15) і була вдвічі й утричі більшою, ніж відповідно у собак (13,0) і котів (10.0). Середнє число смуг, отриманих у хатнього горобця (залежно від умов проведення ДНК-фінгерпринтингу) було від 7,5 до 21,5 [19].

Потрібно зазначити, що мультилокусний ДНК-фінгерпринтинг із M13 як зонд є на сьогоднішній день найефективнішим методом аналізу клонального різноманіття та індивідуальної мінливості в популяціях одностатевих видів хребетних, як це було показано при дослідженні популяцій партеногенетичної скельної ящірки (*Darevskia rostombekovi*) [20].

Гібридизація людського полілокусного зонда з ДНК тварин також сприяє дослідженню мінісателітів у генетично вивчених тварин. Аналіз ДНК "відбитків" у рекомбінантних інбредних родів мишей дає змогу локалізувати індивідуальні фрагменти ДНК "відбитків" на мишачих хромосомах. Як і в людей, варіабельні локуси є аутосомними та розсіяними, і, що більш важливо, не є краще асоційованими з регіонами повторюваної ДНК: теломерами й центромерами. Таким чином, використовуючи роди мишей із відомими родоводами, стає можливим оцінити рівень нестійкості зародкової лінії різних мінісателітів. Несподіваним є те, що цей рівень змінюється від локусу до локусу. Один мишачий мініsателіт після специфічного виникнення характеризується незвичною нестійкістю, темп мутаційного процесу котрого щодо нової довжини алелів, становить більш ніж 1 % на гамету. Такі високо нестабільні локуси створюють ідеальну систему для більш спрямованого вивчення темпів і механізмів зміни довжини алелів у мінісателітів і для дослідження додаткової гіпотези, що кор-послідовність – це сигнал рекомбінації в ДНК хребетних. Окрім цього існує багато можливих прикладів використання ДНК-фінгерпринтингу у тварин, наприклад, ідентифікація вкрадених тварин; перевірка зразків сперми задля штучного запліднення; визначення родоводів, аналіз зчеплення та пошук кількісних специфічних екологічно важливих локусів. Тестування батьки – діти на тваринах може призвести до більш детального розуміння генетичної структури природних популяцій і також може використовуватися для видів, що зникають, задля максималізації розмноження тварин у неприродних умовах [1, 14, 17].

Отже, метод RAPD можна використовувати для вивчення генетичного внутрішньопопуляційного поліморфізму й сегрегації, історії та географії популяцій, вивчення гібридогенезу на межі алопатичних популяцій і видів; дослідження механізму утворення гібридогенних партеногенетичних форм; батьківського аналізу та ідентифікації батьківських форм у поліандричних угрупуваннях; пошук споріднення диких і домашніх форм; визначення критеріїв для розмежування понять вид – підвид – популяція та інші проблеми.

Мінісателіти можна широко застосовувати в генетиці популяцій (особливо з використанням однолокусних зондів); мультилокусні зонди більш ефективні для ідентифікації індивідуальних генотипів, для оцінки спорідненості, аналізу родоводів, паспортизації видів, виявлення зчеплення маркера з локусами хвороб або господарсько-важливих ознак, дослідженні індукованого мутаційного процесу (зокрема під впливом радіаційного чи хімічного забруднення навколишнього середовища), для дослідження популяційної дивергенції та мікроеволюції.

1. *Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А.* // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 9. – С. 1173–1195. 2. *Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J.* et al. // Nucleic Acids Research. – 1990. – Vol. 18, № 22. – P. 6531–6535. 3. *Welsh J., McClelland M.* // Nucleic Acids Research. – 1990. – Vol. 18, № 24. – P. 7213–7218. 4. *Гречко В.В.* // Генетика. – 2002. – Vol. 38, № 8. – С. 1013–1083. 5. *Uptmoor R., Wenzel W., Friedt W.* et al. // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 106. – P. 1316–1325. 6. *Hansen M., Hallden C.* et al. // Plant Mol. Biol. Rep. – 1998. – Vol. 16. – P. 139–146. 7. *Wolf H.D., Blust R., Backeljan T.* // Mutation Research. – 2004. – Vol. 566. – P. 249–262. 8. *Taylor J.W., Geiser D.M., Burt A.* et al. // Clinical Microbiology Reviews. – 1999. – Vol. 12, № 1. – P. 126–146. 9. *Ye G., Weeden N.F., Reisch B.I.* et al. // Vitis. – 1998. – Vol. 37. – P. 33–38. 10. *Leal T.C.A., Leal C.N.* et al. // Genet. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 22. – P. 109–115. 11. *Natarajaseenivasan K., Prabhy N., Selvanayaki K.* et al. // Jpn. J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 57. – P. 193–197. 12. Horng Yan-Ming, Huang Mu-Chion // Theriogenology. – 2003. – Vol. 59. – P. 841–848. 13. *Benecke M.* // Forensis international. – 1998. – Vol. 98. – P. 157–168. 14. *Jeffreys A.J., Wilson V., Wong Z.* et al. // Biochem. Soc. Symp. – 1987. – Vol. 53. – P. 165–180. 15. Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дейвис. – М., 1990. 16. *Ramel C.* // Environmental Health Perspectives. – 1997. – Vol. 105. – P. 781–788. 17. *Васильев В.А., Стекленев Е.П., Морозова Е.В.* и др. // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 515–520. 18. *Jeffreys A.J., Morton D.B.* // Animal Genetics. – 1987. – Vol. 18. – P. 1–15. 19. *Burke T., Bruford M.W.* // Nature. – 1987. – Vol. 327. – P. 149–152. 20. *Мартиросян И.А., Рысков А.П., Петросян В.Г.* и др. // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 6. – С. 828–835.

Надійшла до редколегії 24.09.04