

**УДК 577.213.3:597.55**

## **ИЗМЕНЧИВОСТЬ RAPD-PCR СПЕКТРОВ ДНК МОРСКОГО ЕРША В СЕВАСТОПОЛЬСКИХ БУХТАХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

*Королёва А.В., Симчук А.П.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: anna.undymiel@gmail.com*

Проведены исследования изменчивости ДНК нервной ткани (головной мозг) морского ерша. Выявлены особенности ДНК-спектров нервной ткани морского ерша. Изучение особенностей ДНК-спектров нервной ткани рыб может способствовать оценке физиолого-биохимического состояния рыб и среды их обитания.

**Ключевые слова:** морской ерш, ДНК-спектры, ДНК-фрагменты, полимеразная цепная реакция, нервная ткань, антропогенная нагрузка.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Геном живых организмов подвергается постоянной атаке различных физических (ультрафиолетовая и ионизирующая радиация) и химических (генотоксические и канцерогенные вещества) факторов как окружающей среды, так и продуктов собственного метаболизма (свободные радикалы), которые могут повреждать ДНК клеток. Повышение уровня загрязнения окружающей среды генотоксическими веществами приводит к накоплению повреждений ДНК и угнетению систем репарации [1].

Установлено, что при хроническом воздействии вредных химических веществ на организм выявляемые изменения отдельных показателей его жизнедеятельности достоверно отличаются от соответствующих показателей физиологической нормы [2, 3].

Повышение уровня загрязнения окружающей среды генотоксическими веществами приводит к накоплению повреждений ДНК и угнетению систем репарации [1]. Разнообразные повреждения ДНК, или так называемые ДНК-аддукты, могут возникать спонтанно либо под действием внешних факторов. ДНК представляет собой огромную мишень для различного рода повреждающих факторов [4].

Среди различных технологий маркирования генома наиболее эффективными являются методы полимеразной цепной реакции. ДНК-маркеры, полученные с помощью данного метода, успешно применяются для выявления индивидуальной и популяционной изменчивости организмов, для определения видовой принадлежности отдельной особи, а также для оценки темпа мутаций,

индуцированных радиационным или химическим загрязнением окружающей среды [5, 6, 7]. Данным методом можно оценить и уровень внутрипопуляционной генетической изменчивости. Мономорфизм обычно связывают с жестким естественным отбором [8]. Кроме того, загрязнение морской воды может в значительной степени нивелировать микрогетерогенность условий существования организмов, а также служить дополнительным фактором отбора, усиливая его давление. Следовательно, загрязнение морских экосистем должно оказывать влияние на уровень полиморфизма в популяциях морских организмов.

В связи с вышеизложенным, настоящая работа посвящена исследованию изменчивости ДНК-спектров морского ерша в условиях разной степени загрязнения среды его обитания.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был выбран донный вид рыб – морской ерш (*Scorpaena porcus* L.), отловленный в прибрежной части Черного моря в районе г. Севастополя. Данный вид полностью отвечает требованиям, предъявляемым к биомониторным объектам: повсеместное распространение в водоеме, хорошо изученная биология, не совершает длительных миграций. Материалом для исследования служил гомогенат мозга морского ерша.

Для экстракции ДНК использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». Для проведения амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб использовали ПЦР-смесь с Taq-полимеразой («АмплиСенс-200-1»). Амплификацию проводили в автоматическом режиме на программируемом амплификаторе с использованием приема «горячий старт». При этом пробирки с реагентами помещали в амплификатор, нагретый до температуры 93-94°C. Данный прием позволяет избежать неспецифического отжига праймеров [9].

Продукты амплификации исследовали методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле в трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия. Это вещество встраивается в двухцепочечную молекулу ДНК и флуоресцирует в ультрафиолетовом свете [9]. В таком виде ДНК-фрагменты были зафиксированы на цифровой фотоаппарат и проанализированы.

Сравнительный анализ полученных спектров осуществляли качественно и количественно. Статистическая обработка данных производилась с помощью стандартной программы «EXCEL-2010».

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований был подобран наиболее информативный праймер для проведения ПЦР-анализа ДНК морского ерша. Им оказался стандартный праймер Olig-14 с нуклеотидной последовательностью CACGGCGAGT.

Далее был проведен анализ вариабельности случайно амплифицированной ДНК методом RAPD-PCR со стандартным 10-нуклеотидным праймером Olig-14. RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA PCR) – это ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется для изучения изменчивости

близких по генетической последовательности организмов, например, разных сортов культурных растений, пород собак или близкородственных микроорганизмов. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер может оказаться частично комплементарным случайным участкам ДНК исследуемых организмов.

Результаты исследований влияния антропогенных факторов на особенности ДНК-спектров мозга морского ерша, полученных методом ПЦР-анализа, представлены на рисунках 1 – 3.

Проведенные исследования показали, что ДНК-спектр морского ерша, отловленного в Стрелецкой бухте, содержит в себе 11 случайно амплифицированные ДНК-фрагментов длиной от 180 до 1000 пар нуклеотидов (рис. 1.).

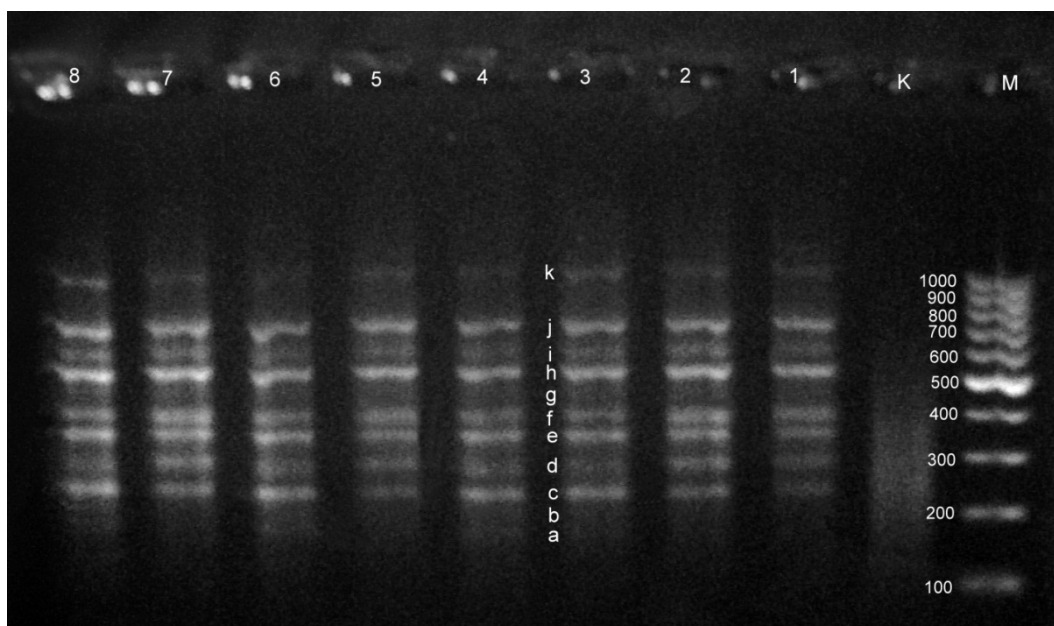


Рис. 1. RAPD-PCR-спектры морского ерша, отловленного в Стрелецкой бухте

Не у всех особей ДНК-спектры идентичны. Так, фрагменты *a* длиной 180 п.н. и *b* длиной 210 п.н. присутствуют только у четырех особей. ДНК-фрагмент *g*, длина которого составляет 430 п.н., входит в состав только двух ДНК-спектров: у особей под номером 3 и 9.

Необходимо отметить, что фрагмент *h* длиной 550 п.н. является наиболее ярко выраженным во всех ДНК-спектрах. А ДНК-фрагменты, присутствующие только у отдельных особей, такие как *g*, *b* и *a* могут служить маркерами различных процессов и характеристик, отличающих данные особи.

При изучении ДНК-спектров скорпен, выловленных в Карантинной бухте, было обнаружено 8 ДНК-фрагментов длиной от 210 до 790 п.н. (рис. 2.).

Как и в предыдущем исследовании, были обнаружены отличия между ДНК-спектрами разных особей. Так, фрагмент *b* длиной 210 п.н. присутствует у двух особей морского ерша (под номером 4 и 5), а фрагмент *j* длиной 790 п.н. отсутствует только у особи под номером 6. ДНК-фрагмент длиной 300 п.н. (*d*) отмечен у половины исследуемых особей морского ерша. А ДНК-фрагменты длиной 370 (*e*), 400 (*f*) и 550 (*h*) п.н. ярко выражены у всех исследуемых особей. Фрагмент *a* также найден во всех ДНК-спектрах, однако ярко выражен только у двух особей (4 и 5).

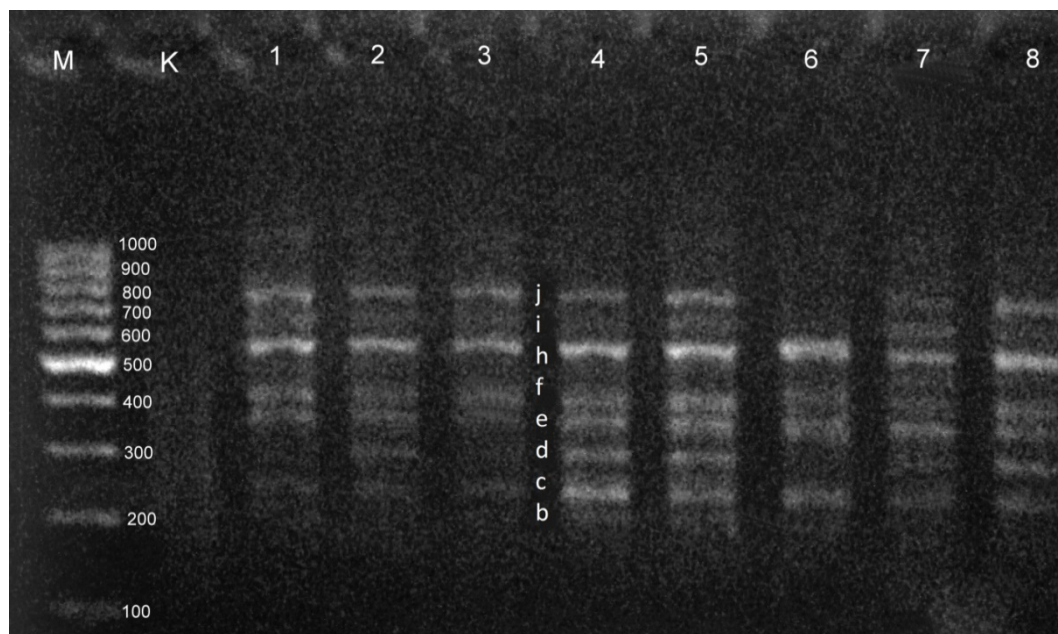


Рис. 2. RAPD-PCR-спектры морского ерша, отловленного в Карантинной бухте

В ДНК-спектрах морского ерша, отловленного в Карантинной бухте, также обнаружен наиболее ярко выраженный ДНК-фрагмент *h* длиной 550 п.н. А ДНК-фрагменты *b* и *d*, присутствующие лишь у отдельных особей, могут служить маркерами различных процессов и характеристик, отличающих данные особи.

При сравнении ДНК-спектров скорпен, отловленных в Стрелецкой и Карантинной бухтах, выяснилось, что все ДНК-фрагменты, наработанные у особей из Карантинной, встречаются и у особей из Стрелецкой, что подтверждает их безусловное родство. Однако отмечены и некоторые различия, которые, прежде всего, проявились в общем количестве наработанных ДНК-фрагментов (у особей из Стрелецкой отмечено большее количество – 11) и в различных пределах длин пар нуклеотидов: у особей из Карантинной отмечены меньшие пределы (210 – 790 п.н.) по сравнению с особями из Стрелецкой (180 – 1000 п.н.). Некоторые характерные ДНК-фрагменты скорпен, отловленных в Стрелецкой бухте, встречаются лишь у нескольких особей. Таким образом, можно сделать вывод, что особи из популяции ерша Стрелецкой бухты характеризуются большим числом фрагментов ДНК, а

популяция этого вида из Карантинной бухты отличается большей внутривидовой, индивидуальной изменчивостью.

В ходе анализа ДНК-спектров было выполнено сравнение по частоте встречаемости ДНК-фрагментов у особей из разных бухт. Четыре фрагмента встречаются у всех особей исследуемых групп – это фрагменты *c*, *e*, *f* и *h* (рис. 3). Частота встречаемости данных фрагментов составляет 100%. Практически у всех скорпен отмечен фрагмент *j* – 90% у особей из Карантинной бухты и 100% у особей из Стрелецкой. ДНК-фрагменты *i* и *d* обнаружены у всех особей из Стрелецкой бухты, а у особей из Карантинной частота встречаемости этих фрагментов составила 70 и 50% соответственно. Довольно редко у скорпен обеих групп встречается фрагмент *b* (у особей из Карантинной бухты 20%, из Стрелецкой – 40%). Частота встречаемости ДНК-фрагментов *g* и *a* у особей из Стрелецкой бухты составляет 20 и 40% соответственно, а у морского ерша, отловленного в Карантинной бухте, данные фрагменты не обнаружены.

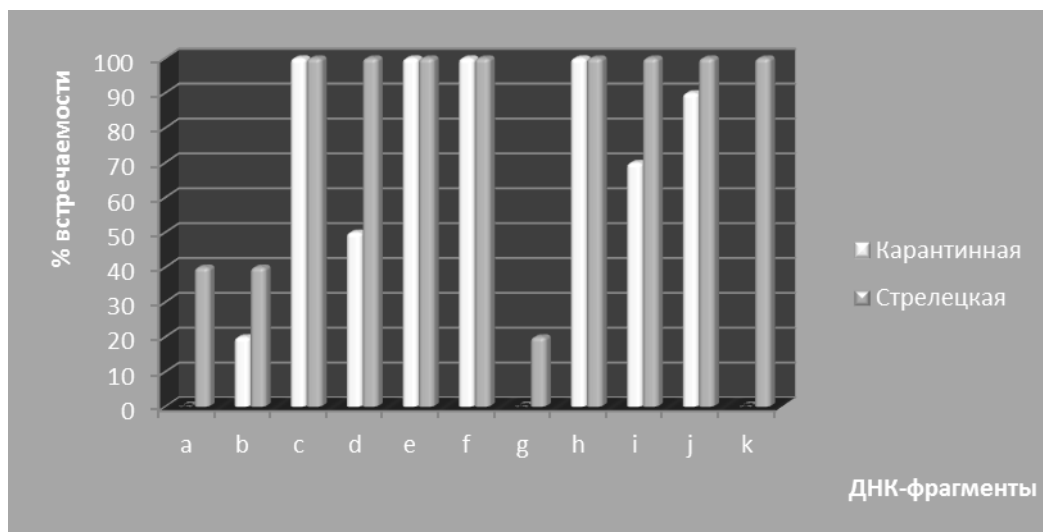


Рис. 3. Частота встречаемости ДНК-фрагментов скорпен, отловленных в бухтах с различным уровнем загрязненности

Наиболее интересным фрагментом в данных ДНК-спектрах является фрагмент *k* длиной 1000 п.н.. Он отмечен у всех особей из Стрелецкой бухты (100%-ая частота встречаемости) и отсутствует у рыб из Карантинной бухты.

Предполагается, что RAPD-маркеры локализованы в основном в некодирующей области ДНК, поскольку она составляет подавляющую часть генома эукариот. Скорость же мутирования в некодирующей ДНК примерно в 2 раза выше, чем в кодирующей [10]. К тому же RAPD-маркеры иногда амплифицируются из регионов повторяющейся ДНК [11] и, таким образом, могут отражать высокие скорости их мутирования, которое может быть индуцировано радиационным или химическим загрязнением окружающей среды.

В ходе анализа полученных методом полимеразной цепной реакции ДНК-спектров рыб, отловленных в бухтах с разным уровнем загрязнения, были обнаружены как полиморфные, так и мономорфные ДНК. Инвариантные RAPD-маркеры, не показывающие индивидуальной и географической изменчивости. Такую ДНК предложено отличать от полиморфной и рассматривать как проявление генетического мономорфизма на уровне ДНК [12]. В ДНК-спектрах рыб обоих выборок такой мономорфный маркер был обнаружен. Это ДНК-фрагмент *h* длиной 550 п.н., ярко выраженный у всех изученных особей данного вида. Полиморфными ДНК-маркерами, которые могут отвечать за различные характеристики отдельных особей, явились ДНК-фрагменты *a*, *b*, *g* у особей из Стрелецкой бухты и *b*, *d*, *i* – у особей из Карантинной.

Наиболее интересный ДНК-фрагмент *k*, длиной 1000 п.н., который обнаружен у всех особей из Стрелецкой бухты (100%-ая частота встречаемости) и отсутствует у рыб из Карантинной бухты. Следует отметить, что Карантинная бухта в значительно большей степени подвержена антропогенному воздействию (дать ссылку, или объяснить почему). Вполне вероятно, что данный ДНК фрагмент распространился среди рыб популяции Карантинной бухты именно вследствие влияния загрязнений. Мономорфизм часто является результатом жесткого естественного отбора [8]. Именно таким отбором, вызванным загрязнением окружающей среды, можно объяснить единообразие ДНК спектров рыб, обитающих в Карантинной бухте. Дальнейшее исследование этого вопроса позволит выявить ДНК-маркеры загрязнения морских вод. Анализ уровня внутривидовой изменчивости позволит оценить степень неблагоприятного воздействия загрязнения на популяции рыб и морские экосистемы в целом.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности ДНК-спектров морского ерша в двух бухтах, различающихся уровнем загрязнения окружающей среды. Обнаружен уникальный ДНК-фрагмент у особей, обитающих в более загрязненной акватории.
2. ДНК-спектры скорпен, собранных из более загрязненной бухты, характеризуются большей степенью единообразия, что свидетельствует о жестком естественном отборе.

## Список литературы

1. Сорочинская У.Б. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды / У.Б. Сорочинская, В.М. Михайленко // Онкология. – Т. 10, № 3. – 2008. – С. 303 – 309
2. Басова М.М. Функциональные особенности химического состава печени, мышц и гонад самцов и самок черноморской камбалы // Дисс. канд. биол. наук. – Севастполь. – 2002. – 132 с.
3. Джабаров М.И. Электрофоретическое исследование белков сыворотки крови сазана и шемаи в период созревания гонад / М.И. Джабаров // Экологическая физиология рыб: тез. докл. III Всесоюз. Конф., Киев, ноябрь, 1976. – К.: Наукова думка, 1976. – С. 136 – 138
4. Райс Р.Х. Повреждение ДНК и репарация. Биологические эффекты токсических соединений: курс лекций / Р.Х. Райс, Л.Ф. Гуляева – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т., 2003. – 208 с.

5. Алтухов Ю.П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 9. – С. 1173 – 1195
6. Зеленина Д.А. Сравнительные исследования популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов / Д.А. Зеленина, А.М. Хрусталева, Волков А.А. // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 693 – 704 Мейен В.А. К вопросу о годовом цикле изменений яичников костистых рыб // Изв. АН СССР. – 1939. – № 39. – С. 229 – 418
7. Семенова С.К. Индивидуальная и популяционная изменчивость церкарий шистоматид группы *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Schistosomatidae), выявляемая с помощью полимеразной цепной реакции / С.К. Семенова, Хрисанфова Г.Г., Филиппова Е.К. [и др.] // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 17 – 22
8. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. 2-е изд., перераб. и доп. / Ю.П. Алтухов. – М.: Наука, 1989. – 328 с.
9. Оберемок В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода / В.В. Оберемок. – Симферополь: из-во ТНУ, 2008. – 34 с.
10. Nei M. Molecular evolutionary genetic / M. Nei. – N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. – 512 p.
11. Karp A. DNA markers: a global overview / A. Karp, K. Edwards // DNA Markers: Protocols, Applications and Overview / Eds G. Caetano-Anolles, P.M. Gressnoff. – N.Y.: Wiley-VCH, 1977. – P. 1–13
12. Алтухов Ю.П. Мономорфная видоспецифичная ДНК, выявляемая в полимеразной цепной реакции со случайными праймерами / Ю.П. Алтухов, А.Б. Абрамова // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 12. – С. 1674–1681

**Корольова Г.В. Мінливість RAPD-PCR спектрів ДНК морського йоржа в Севастопольських бухтах з різним ступенем антропогенного забруднення / Г.В. Корольова, А.П. Сімчук // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 74-80.**

Зроблені дослідження ДНК-спектрів нервової тканини морського йоржа. Були виявлені особливості ДНК-спектрів морського йоржа у двох бухтах, які відрізняються рівнем забруднення навколишнього середовища. Виявлені унікальні ДНК-фрагменти у особей, які мешкають в більш забрудненій акваторії. ДНК-спектри скорпен, які були зібрані із більш забрудненої бухти, характеризуються більшим ступенем однаковості, що свідчить про жорсткий природний відбір.

**Ключові слова:** морський йорж, ДНК-спектри, ДНК-фрагменти, полімеразна ланцюжкова реакція, нервова тканина, антропогенне навантаження.

**Korolyova A.V. The changeable of RAPD-PCR specters DNA of *Scorpaena porcus* in the Sevastopol's bays with different degree of anthropogenic pollution / A.V. Korolyova, A.P. Simchuk // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 74-80.**

The investigations of DNA-spectres from *Scorpaena porcus*' nervous tissue were made. The DNA-spectres' peculiarities of *Scorpaena porcus* from two bays, which have different level of environment pollution, were ascertained. The uncial DNA-fragments of specieses, which are living in more polluted aquatory, were discjvered. The DNA-spectres of *Scorpaena porcus*, which were gathered from more polluted bay, are characterizing of more degree of uniformity, that is testify about hard nature selection.

**Keywords:** *Scorpaena porcus*, DNA-spectres, DNA-fragments, polymerase chain reaction, nervous tissue, anthropogenic load.

Поступила в редакцію 17.09.2012 г.