



RU0110531

# ИССЛЕДОВАНИЕ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ПУТЕМ АНАЛИЗА AP-PCR ФИНГЕРПРИНТОВ ДНК ПОТОМСТВА САМЦОВ-МЫШЕЙ, ПОДВЕРГНУТЫХ ХРОНИЧЕСКОМУ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЮ В МАЛЫХ ДОЗАХ

Газиев А.И., Безлепкин В.Г., Васильева Г.В., Ломаева М.Г., Сирота Н.П.  
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, РФ

Результаты эпидемиологических и экспериментальных исследований указывают на индукцию нестабильности генома (НСГ) у потомства родителей, подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации. Эта НСГ, прежде всего, проявляется повышением темпов мутирования и увеличением риска возникновения опухолевых и других патологий у потомства. Однако, оценка генетического риска действия малых доз радиации у потомства человека и животных до недавнего времени, в значительной мере, базировалась на экстраполяции эффектов больших доз, полученных с использованием традиционных маркеров. В настоящем исследовании мы попытались найти оптимальные условия получения количественно воспроизводимых фингерпринтов ДНК методом ПЦР с произвольно выбранным праймером (AP-PCR) и использовать сравнительный анализ микросателлит-ассоциированных последовательностей на мультилокусных фингерпринтах для оценки возможности индукции НСГ в соматических клетках потомства ( $F_1$  поколения) мышей-самцов, подвергшихся облучению малыми дозами  $\gamma$ -радиации. Самцов мышей BALB/c подвергали облучению в дозах 10,25 и 50 сГр при мощности 1 сГр/сутки и через 15 дней после облучения спаривали с необлученными самками. Для выделения ДНК брали биопсию кончика хвоста (7-8 мм) у самцов мышей до и после облучения, у необлученных самок и у потомства в двухмесячном возрасте. Для проведения AP-PCR были тестированы 17 различных олигонуклеотидов с позиции их пригодности для использования в качестве "арбитражи"-праймеров, позволяющих получить воспроизводимые для количественного анализа ДНК-фингерпринты. Эти праймеры представляли собой "коровые" последовательности микро- и/или минисателлитов, или фланкирующие их последовательности. Воспроизводимость AP-PCR фингерпринтов также зависела от количества ДНК-матрицы (0,7-35 нг), концентрации праймеров (0,1-1  $\mu$ М) в реакционной смеси и температуры отжига. Наиболее качественные, воспроизводимые AP-PCR фингерпринты геномной ДНК получены при использовании в качестве праймера 20-мерного олигонуклеотида 5'- TGG TGT TCC TGC CAC AGA AA-3', фланкирующего микросателлитный локус Atp1b2 в окрестностях гена p53 на 11-й хромосоме мыши. Результаты анализа среднего числа полос в ДНК-фингерпринтах на животных в группах демонстрируют увеличение числа продуктов AP-PCR на 30 и 50% у потомства самцов, облученных в дозе 25 и 50 сГр по сравнению с таковым у потомства контрольных самцов. Сравнительный анализ индивидуальных AP-PCR фингерпринтов потомства облученных и необлученных самцов выявляет не только увеличение вариабельности микросателлит-ассоциированных последовательностей, но и частоты «неродительских полос» (на 12 и 37%) на фингерпринтах ДНК потомков самцов, облученных в дозах 10 и 25 сГр за 15 дней до спаривания (на постмейотической стадии сперматогенеза). Результаты исследования указывают на возможность трансмиссии в соматические клетки потомства изменений, повышающих НСГ, от самцов-родителей, подвергнутых до спаривания низкоинтенсивному гамма-облучению. Причиной формирования состояния НСГ в соматических клетках потомства, возможно, является закрепление илетальных нарушений в ДНК половых клеток самцов. Работа была частично поддержана РФФИ, грант 97-04-48243.

Investigation of genomic instability by analysis of AP-PCR DNA fingerprints in the offspring of male mice exposed to chronic low doses of  $\gamma$ -radiation

*A.I. Gaziev, V.G. Bezlepkin, G.V. Vasil'eva, M.G. Lomaeva, N.P. Sirota*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The results of epidemiological and experimental studies suggest the possibility of arising of genomic instability in the progeny of ionizing radiation-exposed parents. The genomic instability manifests itself primarily as an increased mutation frequency and an increased risk of tumors and other pathologies in the progeny. However, the estimates of genetic risk of low doses of ionizing radiation for human and animals progeny up to recently essentially based on the data of extrapolation of high-dose effects and by application of traditional genetic markers. In the present study, we tried to find optimum conditions for obtaining quantitatively reproducible fingerprints of genome DNA by the method of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) and to use a comparative analysis of multilocus fingerprints (microsatellite-related sequences) of to estimate the possibility for arising of genomic instability in somatic cells of the progeny (F1 generation) of male mice exposed to low doses of low-intensity  $\gamma$ -radiation. Male BALB/c mice exposed to 10-50 cGy at the dose rate of 1 cGy/day and in fifteen days after irradiation, were mated with unirradiated females. DNA was isolated from biopsies taken from tail tips (7-8 mm) of male mice before and after irradiation, of unirradiated females and of two-month old offspring. In order to carry out AP-PCR, 17 different oligonucleotides were tested for their suitability for being used as arbitrary primers to obtain DNA fingerprints reproducible for quantitative assays. These primers were core sequences of micro- and minisatellites or their flanking sequences. Other conditions for AP-PCR were also carefully chosen. The reproducibility and quality of DNA fingerprints were determined as a function of DNA template amount (from 0.7 to 35 ng), oligonucleotide primers concentration (from 0.1  $\mu$ M to 1.0  $\mu$ M), and the temperature of their annealing. Best quantitatively reproduced AP-PCR fingerprints of genomic DNA were obtained by using of a 20-mer oligonucleotide 5'- TGG TGT TCC TGC CAC AGA AA-3' flanking the microsatellite locus *Atp1b2* near *p53* gene on mouse chromosome 11. In order to analyze AP-PCR fingerprints obtained for a variety of mice individuals, we created a computer program essentially facilitating the comparative analysis of variability of discrete bands. The assessment of the average number of bands in DNA fingerprints per animal in a group demonstrated an increase in AP-PCR product number by 30% and 50% in the progeny of males irradiated with 25 cGy and 50 cGy, as compared to the control correspondingly. Comparative analysis of individual AP-PCR fingerprints from the progeny of irradiated and intact males revealed not only an increased variability of microsatellite-associated sequences but also an increased frequency of «non-parental bands» (from 12 to 37%) in DNA fingerprints from the progeny of males irradiated with 10 cGy and 25 cGy (at the postmeiotic stage of spermatogenesis) 15 days before conception. The results of the present study show a possibility for alterations increasing genome instability to be transmitted from male parents exposed to low-level gamma radiation prior to conception to the somatic cells of the progeny. The changes leading to genomic instability in the somatic cells of the progeny are probably the result of nonlethal damages fixing in the germ cells DNA of the parents.

The study was partially supported by the RFBR, Grant 97-04-48243.