

**Д.В. Юдкин**

**Цитогенетическая и  
молекулярная организация  
В-хромосом хищных семейства  
Canidae**

Научный руководитель  
д.б.н. А.С.Графодатский

Лаборатория цитогенетики человека  
и животных ИЦиГ СО РАН

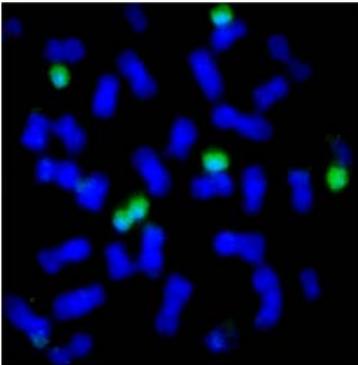
В-хромосомы найдены у 67 видов млекопитающих из 8 отрядов

## **В В-хромосомах млекопитающих до настоящего времени не обнаружено уникальных генов**

В семействе Canidae пять видов несут В-хромосомы:

- Лисица (*Vulpes vulpes*)
- Бенгальская лисица (*Vulpes bengalensis*)
- Африканская лисица (*Vulpes pallida*)
- Малая лисица (*Atelocynus microtis*)
- Енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*)

В-хромосомы лисицы



Цель работы:

исследование структуры и  
возможных функций В-  
хромосом млекопитающих

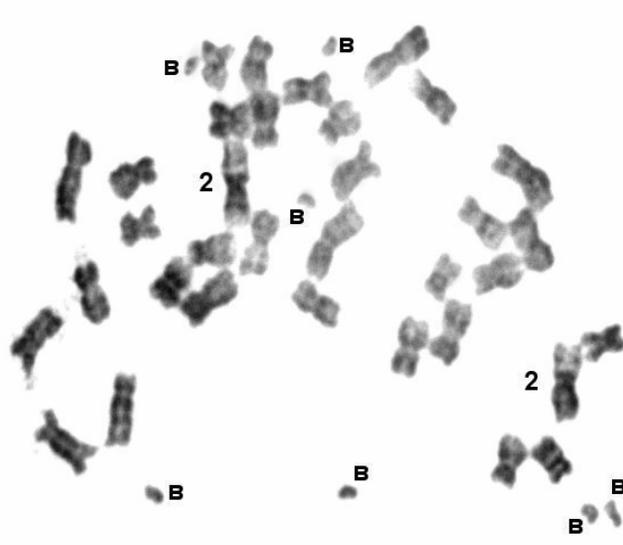
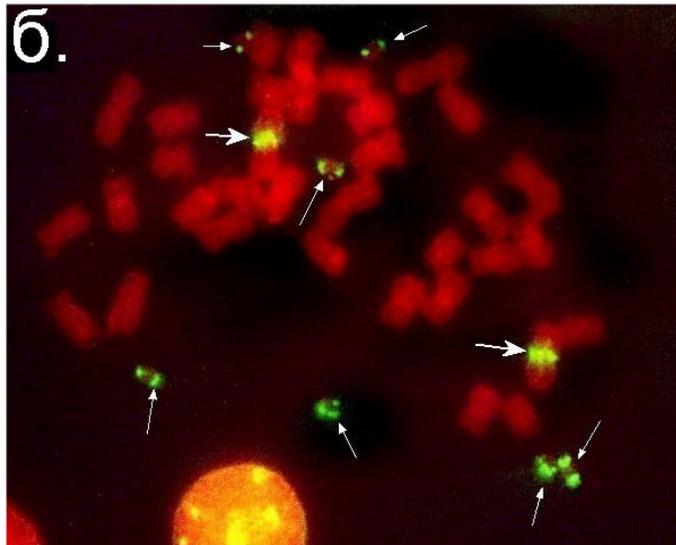
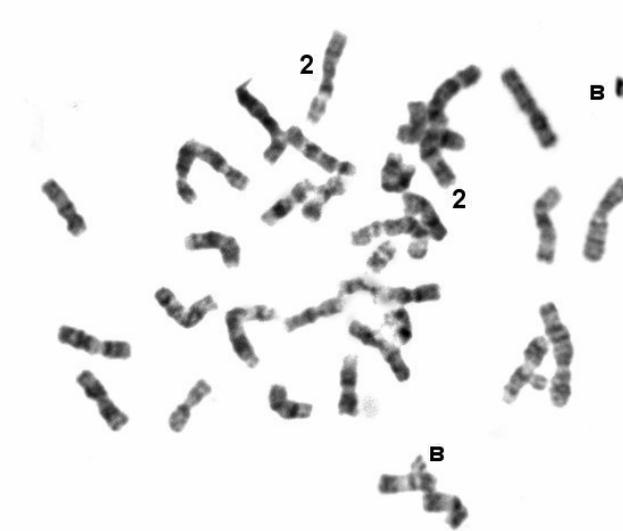
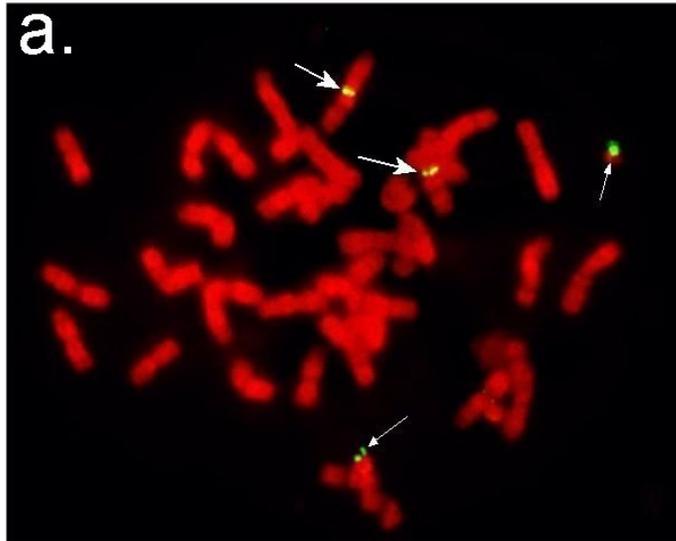
# Задачи:

1. Локализовать ген С-KIT на метафазных хромосомах видов семейства Canidae, содержащих В-хромосомы, а так же на метафазных хромосомах близкородственных видов, не содержащих добавочные элементы.
2. Исследовать структуру В-хромосомной копии гена С-KIT и сравнить ее со структурой этого же гена, локализованного в аутосомах.

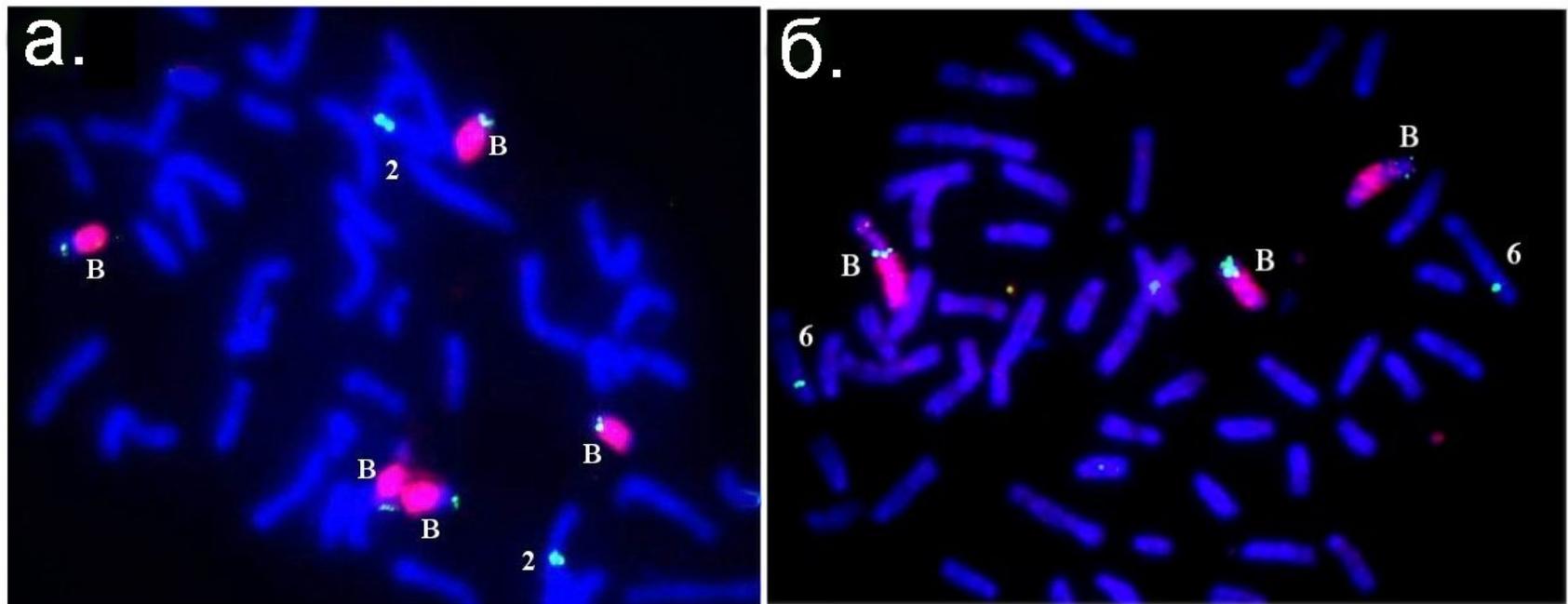
# Задачи:

3. Провести исследование добавочных элементов на предмет присутствия в них других последовательностей, окружающих ген C-KIT, в аутосоме.
4. Проанализировать распределение повторенных последовательностей в В-хромосомах.

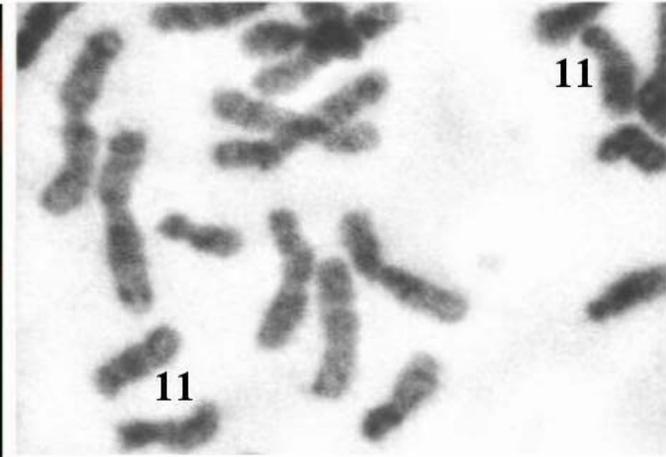
# Локализация гена С-KIT на хромосомах лисицы



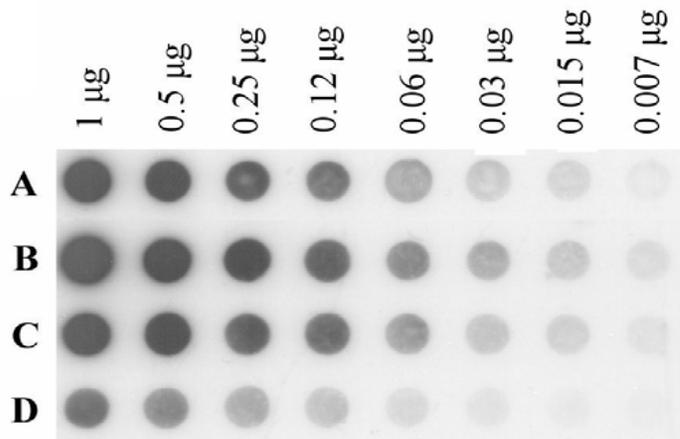
# Локализация гена С-KIT на хромосомах японской (а) и китайской (б) енотовидных собак



# Локализация гена С-KIT на хромосомах собаки (а) и песца (б)

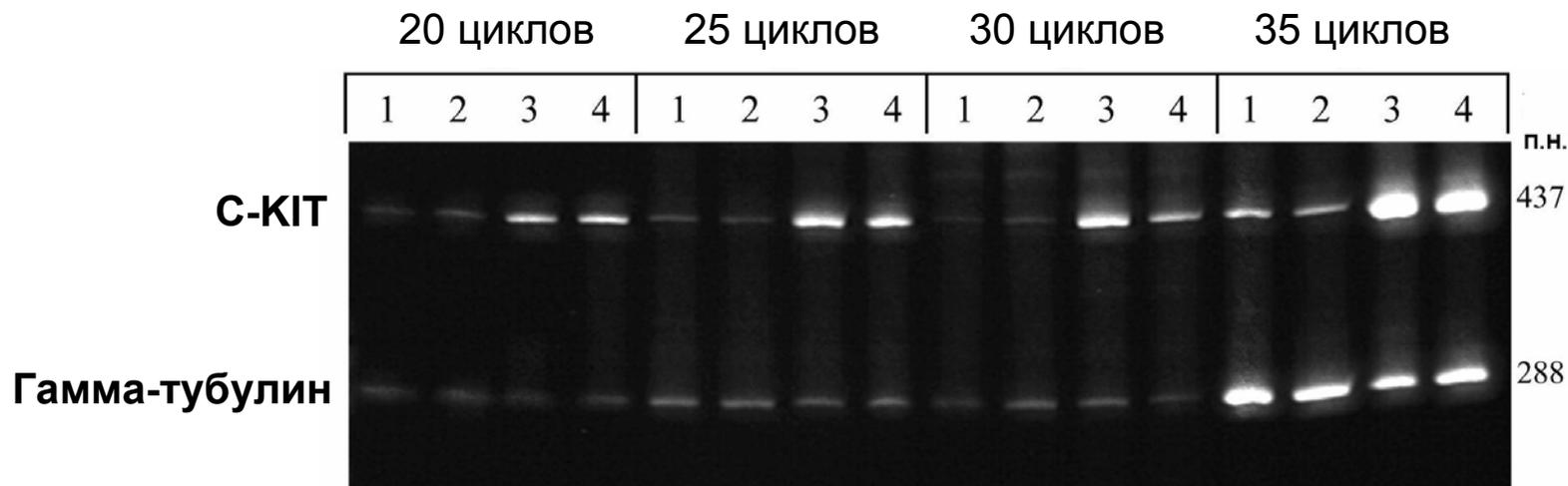


Дот-гибридизация интрона 3 гена С-KIT с различными количествами геномной ДНК енотовидной собаки с тремя В-хромосомами (А), лисицы с 7 В-хромосомами (В), лисицы с 1 В-хромосомой (С) и собаки (D).

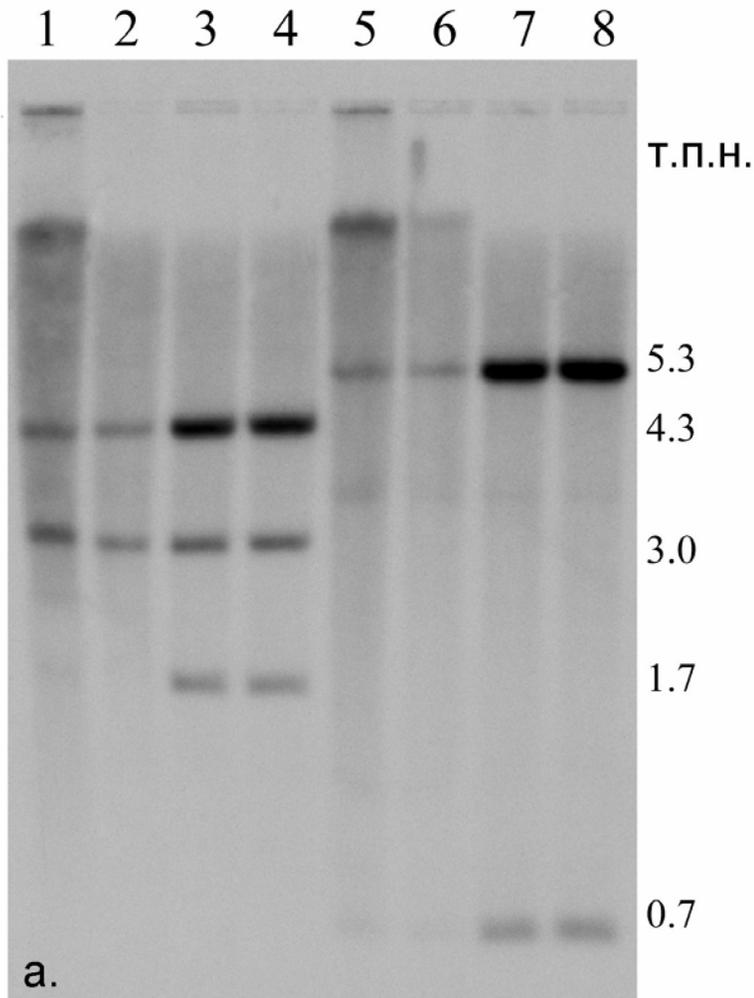


Результат полуколичественной ПЦР.

1. ДНК собаки
2. ДНК лисицы с 0-1 В-хромосомой
3. ДНК лисицы с 4 В-хромосомами
4. ДНК лисицы с 3-7 В-хромосомами



# Результат Саузерн-блот гибридизации геномной ДНК с интроном 20 гена С- KIT собаки.



**1-4** EcoRI гидролизат

**5-8** HindIII гидролизат

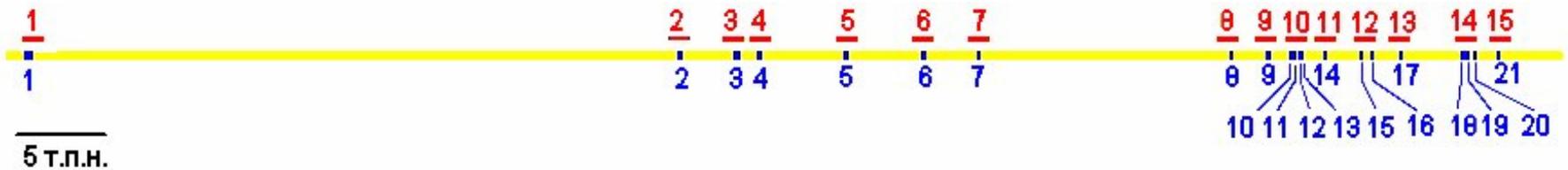
**1,5** геномная ДНК собаки

**2,6** – лисицы с 0-1 В-  
хромосомой

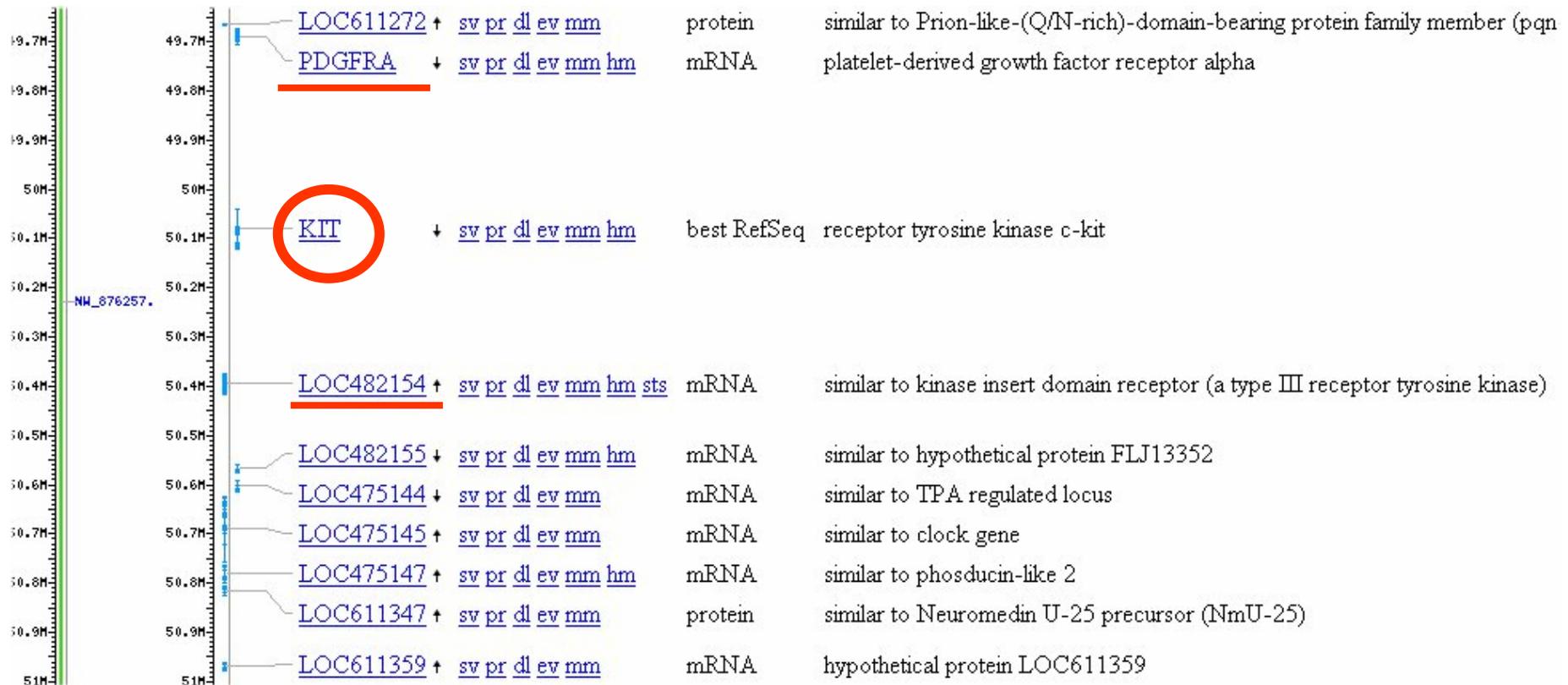
**3,7** – лисицы с 4 В-  
хромосомами

**4,8** – лисицы с 3-7 В-  
хромосомами

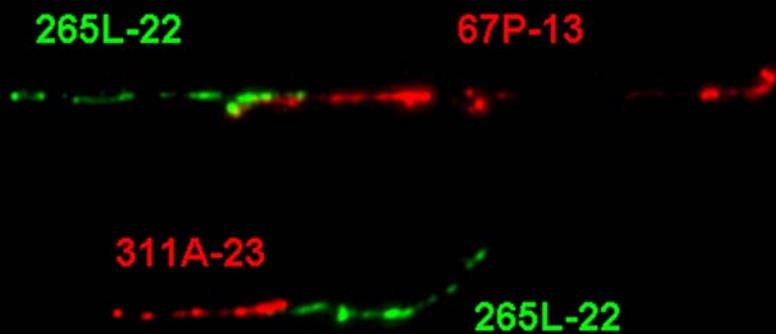
Экзон-интронная структура гена С-KIT собаки. Синим цветом обозначены экзоны и их номера. Красным цветом обозначены места локализации фрагментов, нарабатываемых с помощью праймеров



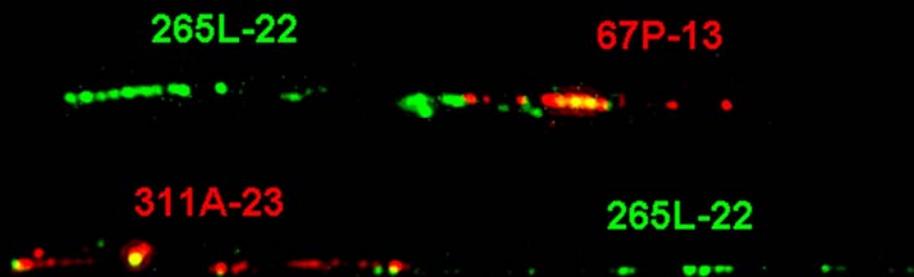
# Фрагмент карты хромосомы 13 собаки (NCBI Map Viewer, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



а.



б.



в.

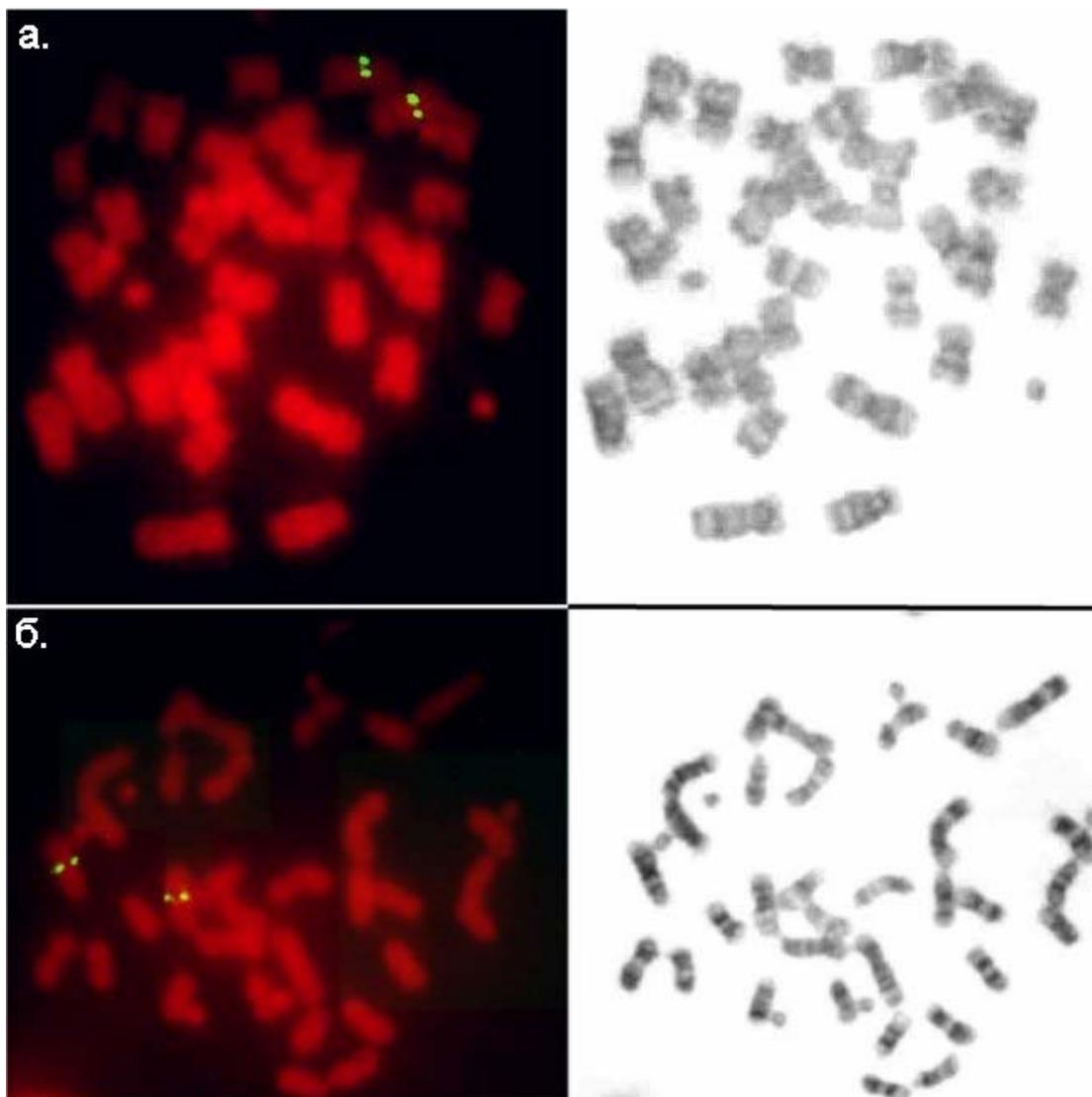


Fiber-FISH трех ВАС на релаксированной ДНК китайской енотовидной собаки (а) и лисицы (б).

Взаимное расположение ВАС на аутосоме лисицы и енотовидной собаки (в).

265L-22 содержит C-KIT  
311A-23 содержит PDGFRA  
67P-13 содержит KDR

Локализация генов PDGFRA (а) и KDR (б) на метафазных хромосомах  
ЛИСИЦЫ

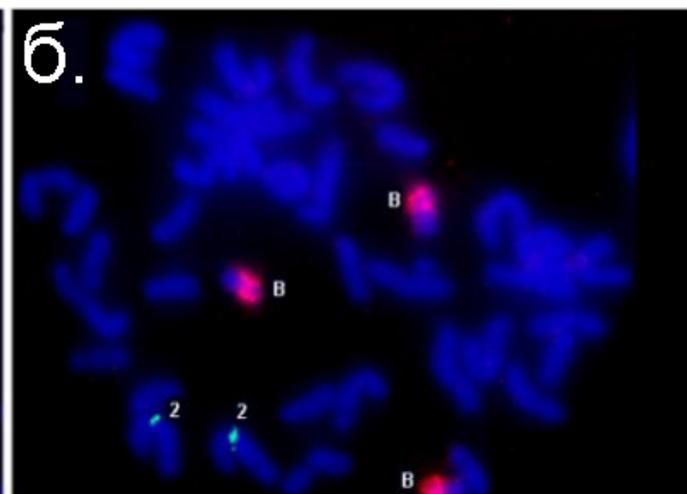
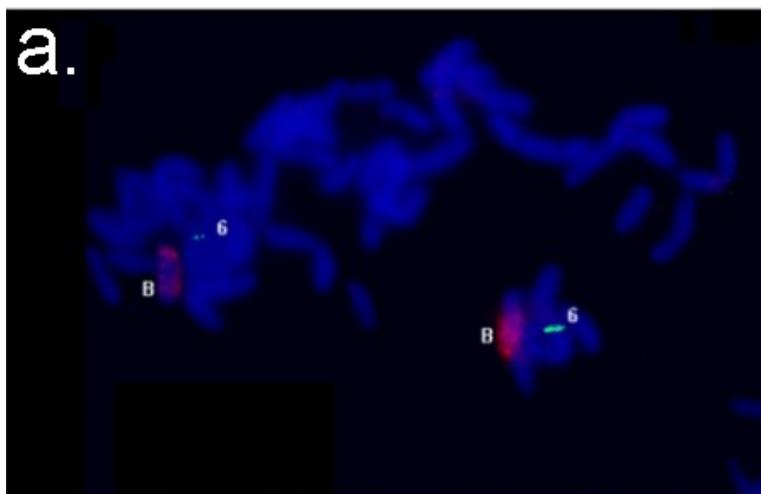


# Локализация PDGFRA и KDR на хромосомах енотовидных собак

китайской

японской

PDGFRA



KDR

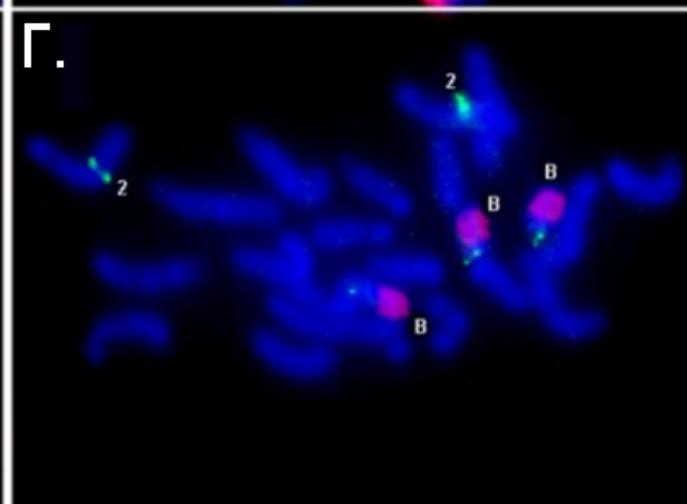
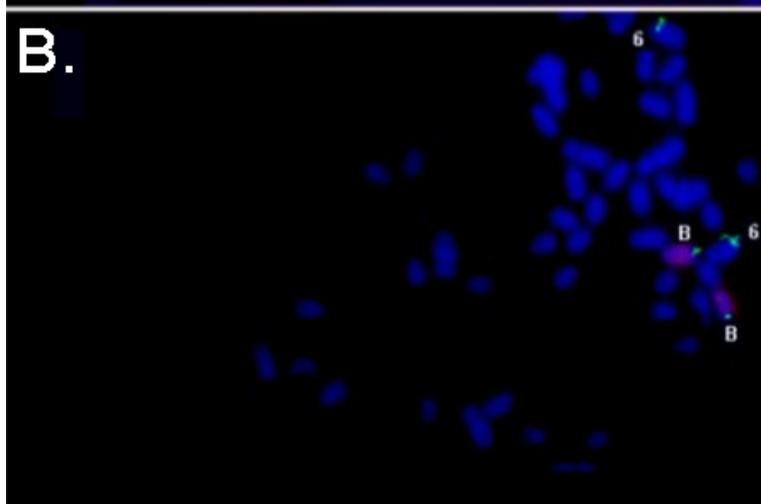


Схема фрагмента Sfa13. Номера указывают позиции пар праймеров.

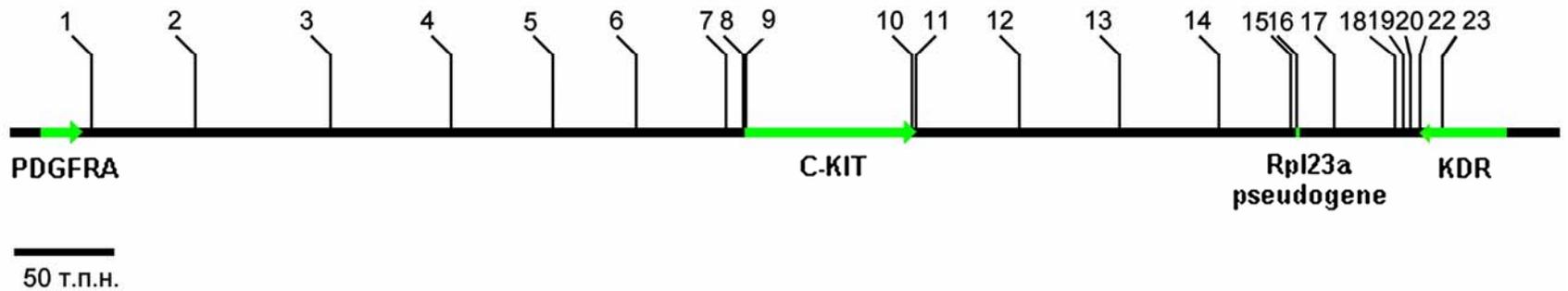
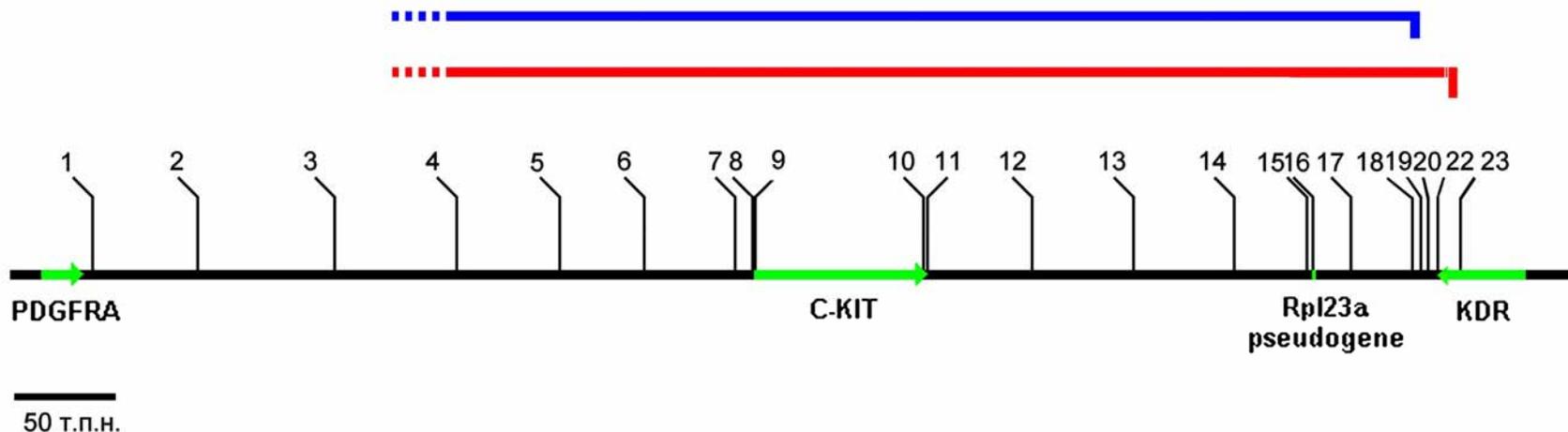
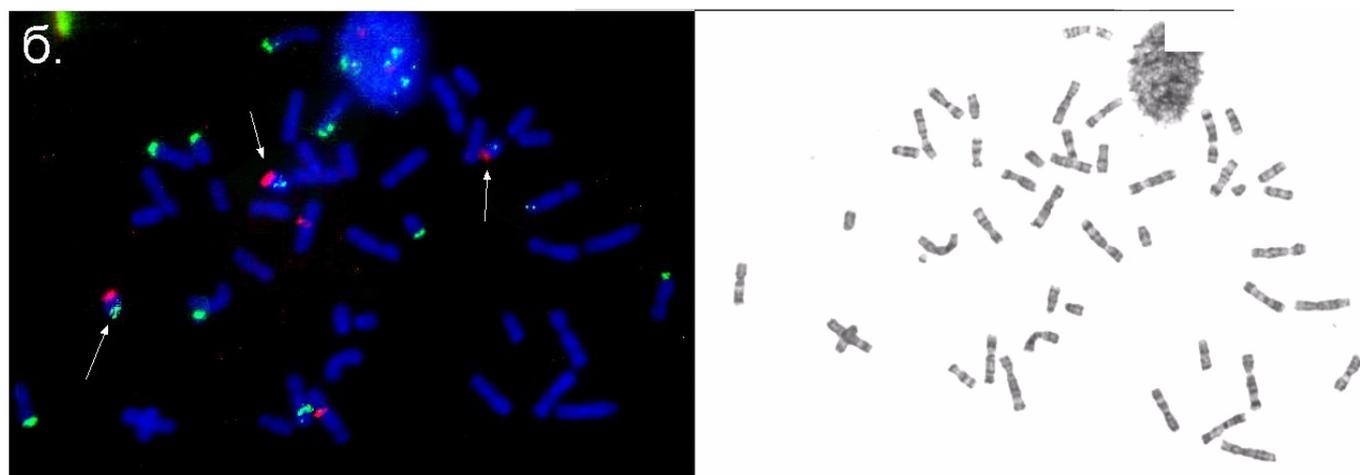
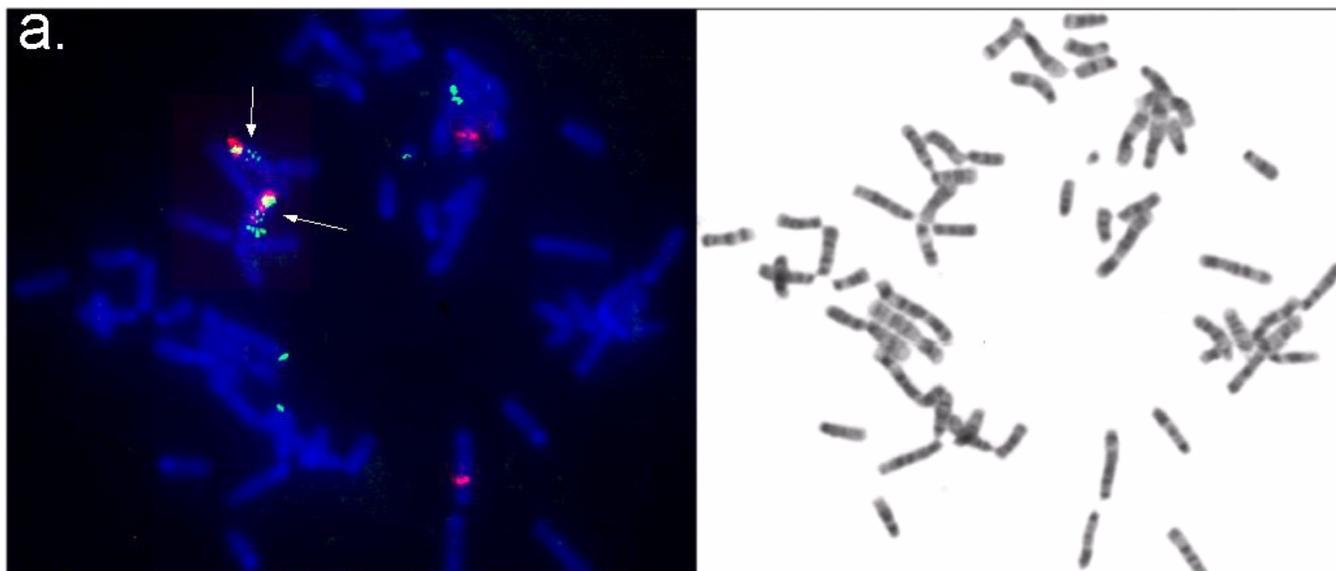


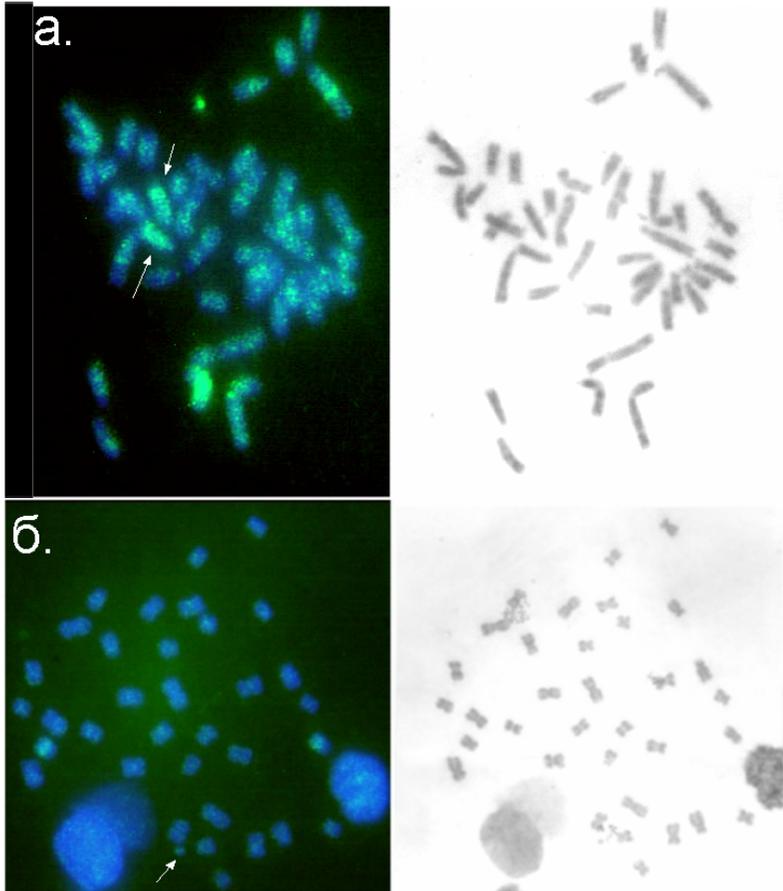
Схема фрагмента Sfa13. Номера указывают позиции пар праймеров. Синяя линия указывает границы аутосомного фрагмента в добавочных хромосомах лисицы, красная – в добавочных хромосомах китайской енотовидной собаки.



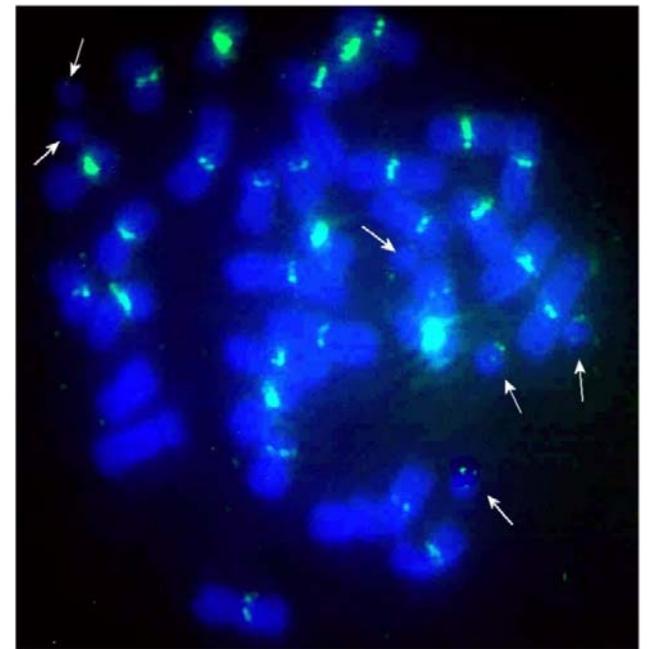
Локализация С-KIT (красный) и генов рРНК (зеленый) на хромосомах китайской (а) и японской (б) енотовидных собак

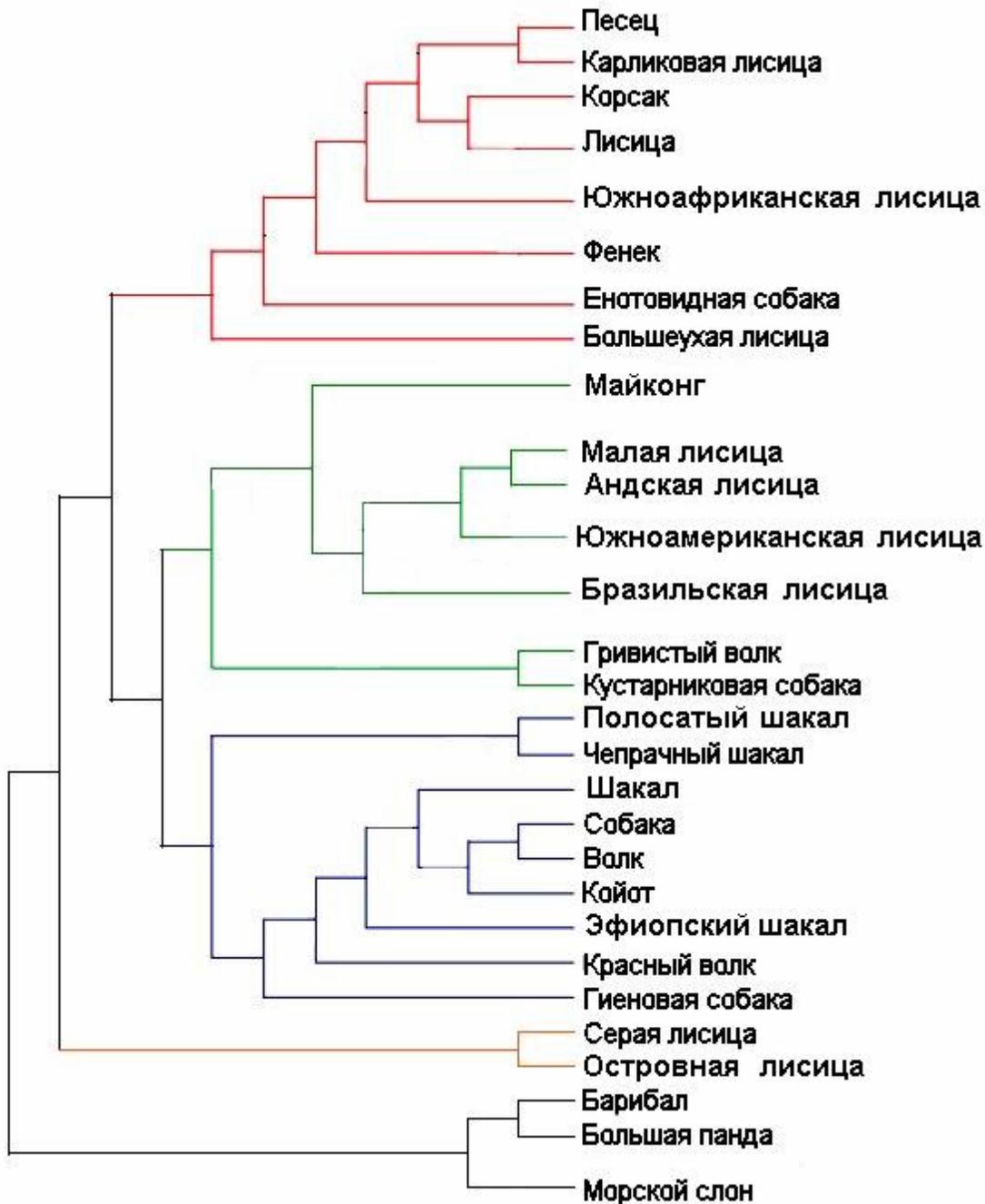


Локализация LINE-1 на  
хромосомах енотовидной  
собаки (а) и лисицы (б)



Локализация Vsp-повтора на  
хромосомах лисицы





Филогенетические отношения в семействе Canidae, на основе данных секвенирования (По Lindblad-Toh et al., 2005).

# Выводы

1. С использованием методов молекулярной цитогенетики изучена организация добавочных, или В-, хромосом у видов Canidae.
2. С помощью FISH ген C-KIT впервые локализован на всех В-хромосомах лисицы, китайской и японской енотовидных собак. Показано, что число копий гена у лисицы и енотовидной собаки положительно коррелирует с числом добавочных хромосом.
3. Показано, что В-хромосомы лисицы содержат полноразмерную копию гена C-KIT. Секвенирование 10 экзонов гена выявило сохранение экзон/интронных границ и высокую консервативность В-хромосомной копии (найденно две замены отличающие ее от гена собаки).
4. Ген C-KIT впервые локализован на хромосомах лисицы в районе 2p12, песца в районе 11p13, собаки в районе 13q22-23, японской енотовидной собаки в районе 2qcen и китайской енотовидной собаки в районе 6qproх. Все места локализации этого гена на аутосомах, по данным сравнительного пэинтинга, являются гомологичными. Гены KDR и PDGFRA впервые локализованы на хромосомах лисицы в районе 2p12, китайской енотовидной собаки в районе 6qproх и японской енотовидной собаки в районе 2qcen.

5. Определены размеры В-хромосомных фрагментов, гомологичных аутосомам. Аутосомный фрагмент в В-хромосомах лисицы составляет минимум 480 т.п.н. и включает ген C-KIT, псевдоген Rpl23a и большой межгенный участок с 5' и 3' концов от C-KIT. Аутосомный фрагмент в В-хромосомах енотовидной собаки составляет минимум 490 т.п.н. и включает ген C-KIT, псевдоген Rpl23a, часть гена KDR и большой межгенный участок с 5' конца от гена C-KIT.
6. Исследовано распределение различных видов повторов в В-хромосомах лисицы и енотовидной собаки. Показано, что в отличие от высококонсервативной аутосомной вставки, по составу повторенных последовательностей добавочные элементы этих видов сильно отличаются. Более того, два подвида енотовидной собаки, китайская и японская, отличаются между собой по локализациям в В-хромосомах генов рРНК.