

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ РАДОНООПАСНЫХ ЗОН АЛТАЙСКОГО КРАЯ

ЛИТЕРАТУРА

1. Оценка индивидуальных эффективных доз облучения населения за счет природных источников ионизирующего излучения // Методические указания 2.6.1. – Москва, 2001. – 6 с.
2. Защита от радона-222 в жилых зданиях и на рабочих местах // Публикация №65 МКРЗ. – М.: Энергоатомиздат, 1995.
3. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99). СП 2.6.1.758-99 от 02.07.1999 г. Минздрав России, 1999 г.
4. Салдан И.П., Борисов В.П., Маренный А.М. Радон в воздухе помещений в Алтайском крае // IRPA: Доклад на Региональном Конгрессе. – Хорватия, Дубровник, 2001.
5. Белицкий Г.А. Химический канцерогенез // Профилактика, ранняя диагностика и лечение злокачественных новообразований / Под общей редакцией М.И. Давыдова. – М.: Издательская группа РОНЦ, 2005. – С. 76-82.
6. Европейские рекомендации по борьбе против рака и их научное обоснование. Третья версия. – М.: Издательская группа ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2005. – С. 23-24.
7. Гусаров И.И., Иванов С.И. О защитных эффектах действия малых доз ионизирующего излучения (Обзор литературы) // АНРИ. – 2001. – №4. – С. 8-17.
8. Ревич Б.А., Авалиани С.Л., Тихонова Г.И. Экологическая эпидемиология / Под ред. Б.А. Ревича. – М.: Издательский центр "Академия", 2004. – С. 39-88.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В.Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 530 с.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ХРОНИЧЕСКИХ ДОЗ РАДИАЦИИ СЕМИПАЛАТИНСКОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ПОЛИГОНА НА ПОЛИМОРФИЗМ ДНК У КОВЫЛЯ ВОЛОСОВИДНОГО (STIPA CAPILLATA)

К.Н. Сарсенбаев, Р. Зака, М.Т. Миссет, М.У. Сарсембаева

С помощью RAPD-анализа изучался полиморфизм ДНК у популяций ковыля волосовидного, произрастающего на Семипалатинском испытательном полигоне при различных уровнях радиационного загрязнения. С помощью специфических праймеров выявлены достоверные различия между популяциями, которые обусловлены генетическими изменениями, которые наблюдаются в ряду 40 поколений ковыля в условиях хронического воздействия радиации.

Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР, Polymerase chain reaction, PCR) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет. Использование молекулярных ДНК-маркеров [1] позволило идентифицировать гены и выявить генетический полиморфизм различных организмов [2] непосредственно на уровне генов, а не на уровне их продуктов. Явление полиморфизма ДНК делает возможным разрешение спорных вопросов систематики и филогении в разных таксономических группах растений [1-13].

В ряду существующих молекулярно-генетических методов изучения полиморфизма ДНК центральное место занимает ПЦР анализ основанный на применении произвольных олигонуклеотидов, направленных на обращенные повторяющиеся последовательности (Randomly Amplified Polymorphic DNA –

RAPD) [1-13]. RAPD – анализ широко используется для изучения генетического полиморфизма растений. В список растений, исследованных RAPD методом, уже в 2003 году входили представители 150 родов. В настоящее время RAPD-технология отработана на целом ряде сельскохозяйственных культур: капуста, лук, виноград, картофель, томат, морковь, фасоль и ячмень. Она широко используется в изучении растительного генома при конструировании генетических карт, анализе генетической структуры популяции, генотипировании, маркировании признаков, а также в селекционных программах для быстрой идентификации важных для селекции признаков [2, 3]. RAPD-технология является уникальным инструментом, позволяющая проводить экспресс-идентификацию любых организмов. Для этого можно использовать один из универсальных праймеров, который

даёт возможность детально изучать структуру генома отдельных организмов и генетическую структуру популяции и видов любых организмов по локусам, ранее не подлежащих анализу. Выявленный по ряду праймеров ПЦР полиморфизм может быть использован в качестве генетических маркеров сортов, популяций, особей, клонов и других внутривидовых структур. С помощью кластерных методов анализа осуществляют построение дендрограмм, отражающих степень различий или сходства между RAPD – спектрами исследуемых объектов, что важно для изучения меж- или внутривидовых взаимоотношений. Наиболее широко используются методы UPGMA: невзвешенный парногрупповой метод с арифметическим усреднением.[15].

Известно, что действие радиации влияет на генетические особенности растений. Однако до сих пор доказанных фактов, особенно по растениям, произрастающих в зонах с низким хроническим уровнем радиации СИЯП нет. Основной целью работы являлось изучение влияния повышенного уровня радиации на состав ампликонов ДНК листьев доминантного растения степей Казахстана – ковыля волосовидного (*Stipa capillata*), произрастающих на СИП при различном уровне радиации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приведённые выше данные по структуре ДНК были выполнены нами в 1996-1997 годах. Метод этот ещё не был достаточно доработан, отсутствовала технология сравнения генетического родства между таксонами. Эти исследования мы провели в 2004 году на более современном оборудовании и с качественными реактивами. Для RAPD – анализа были взяты листья ковыля: 1 – Дегелен, штольня N511, 2 – контроль Балапан, 3 – 3000 мкр/час, Атомное озеро, 4 – 1500 мкр/час, Атомное озеро.

ДНК выделяли из 100мкг материала по методу Murray [14] с некоторыми модификациями. Качество и чистоту полученных препаратов ДНК проверяли электрофоретическим разделением в 0,8% агарозном геле. Реакционная смесь для ПЦР объемом 15мкл содержала 2,5 ед. Tag-полимеразы (Бион, Россия), 10 мМ трис-HCL pH 8.3; 50 мМ KCL; 0.01% Tween 20; по 100 мМ dATP, dGTP, dCTP и dTTP ("Pharmacia", Швеция); 1 мМ праймера; 4 мМ MgCl и ДНК. Амплификацию проводили в программируемом термостате PCRSprint (Hybaid) в следующих условиях: 1 цикл денатурации при 95° и 35 циклов при

значениях соответствующих процессов 94°, 30сек; 33°, 1 сек и 72°, 30 сек. Электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле и документировали с помощью прибора Gel-Doc фирмы Bio-Rad в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны от 260 до 360 нм. Генетические дистанции RAPD – спектров были рассчитаны по Нею (15) и программным пакетом Quantity One-4.1.1 (GelDoc, BioRad).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении PCR с геномной ДНК исследуемых растений нами были испытаны 20 произвольных десятичных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и GC- составу. Наиболее эффективными оказались праймеры: Micsat1 – CTGACCAGCT; Micsat2 – ACCAGCGTGG; Pr-15 GCCTCGCCCA; Micsat6 – GGGGTGACAC, которые выявляли ДНК полиморфизм у исследуемых образцов. На рисунках 1-4 представлены типичные спектры продуктов амплификации ДНК различных образцов, полученные с помощью этих праймеров. Основная зона разделения фрагментов расположена в диапазоне от 100 до 500 пн. По каждому из 4 праймеров обнаруживается изменчивость между исследуемыми образцами ДНК. Число фрагментов, полученных при амплификации ДНК 4 изучаемых видов с каждым из использованных праймеров, колеблется от 9 до 39. Для каждого образца характерен специфический спектр RAPD – продуктов – фенотип, с определенным количеством фрагментов, их размерами и степенью выраженности. Количество специфичных для каждого образца ампликонов колеблется от 3 до 8. Некоторые фрагменты являются общими для всех или большинства исследуемых видов, выявляя, по-видимому, консервативные участки генома, характеризующие принадлежность этих видов к одному виду. Число таких консервативных фрагментов от 3 до 15.

Для количественной оценки RAPD- полиморфизма и определения уровня дивергенции между популяциями полученные матрицы состояния ампликонов были обработаны программным пакетом Quantity One-4.1.1 (GelDoc, BioRad) и представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в RAPD – спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно и переводилось в процентное соотношение вариации. По матрицам состояний тем же программным пакетом были рассчитаны

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ХРОНИЧЕСКИХ ДОЗ РАДИАЦИИ СЕМИПАЛАТИНСКОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ПОЛИГОНА НА ПОЛИМОРФИЗМ ДНК У КОВЫЛЯ ВОЛОСОВИДНОГО (STIPA CAPILLATA)

матрицы различий. При этом использовался коэффициент Жаккарда $D_j = N_a + N_b / N_a + N_b + N_{ab}$, где N_a – число полос, имеющих в спектре a , но отсутствующих в спектре b , N_b – чис-

ло полос в спектре b , но не в спектре a , и N_{ab} – число полос, общих для обоих спектров.

Соотношения матриц состояний ампликонов полученных с помощью использованных праймеров показаны в таблицах 1-2.

Таблица 1

Генетическое сходство между популяциями ковыля: а - праймер Micsat1; б – праймер Micsat2

а	1	2	3	4	б	1	2	3	4
1	100,0				1	100,0			
2	66,7	100,0			2	50,1	100,0		
3	29,8	58,0	100,0		3	26,4	34,0	100,0	
4	79,3	65,2	59,3	100,0	4	72,1	43,6	29,4	100,0

Таблица 2

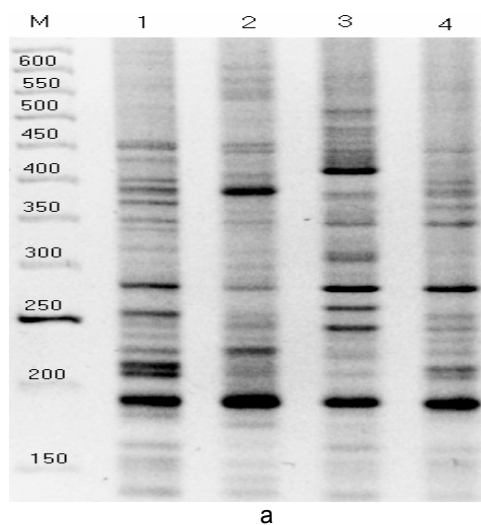
Генетического сходство между популяциями ковыля: а – праймер Micsat3; б – праймер Micsat4

а	1	2	3	4	б	1	2	3	4
1	100,0				1	100,0			
2	47,4	100,0			2	65,8	100,0		
3	36,3	36,2	100,0		3	52,5	47,1	100,0	
4	69,1	50,3	37,4	100,0	4	67,3	44,6	39,6	100,0

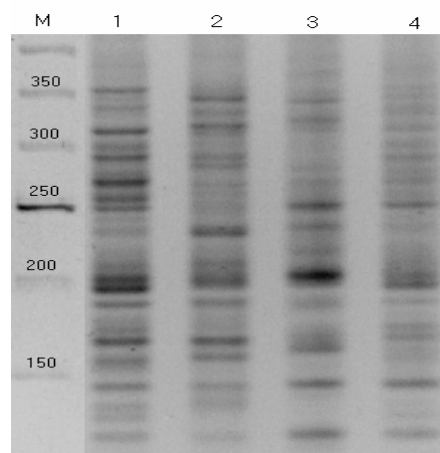
По результатам анализа можно сказать, что все образцы характеризуется относительно высокой генотипической гетерогенностью и подразделяется на секции, где они группируются в генетически однородные серии. Образцы 1 – Дегелен, штольня N 511 и 4 – 1500 мкр/час, Атомное озеро образуют одну группу RAPD типов со значением генетического сходства 0,72. К ним примыкает образец 2 – контроль Балапан, со значением генетического сходства 0,54. Образец 3 – 3000 мкр/час, Атомное озеро отдален от остальных генотипов на расстояние 0,39.

Таким образом, в условиях действия хронических низких доз радиации у растений наблюдаются изменения в составе ДНК. Ко-

выль в этих местах после ядерного экскавационного взрыва произрастает более 50 лет. Вид самоопыляемый. Семена обычно опадают возле растения. Поэтому минимум 40 поколений ковыля росли в местах взятия проб. Выявленные различия между популяциями по составу ампликонов, по-нашему мнению, связаны с генетическими изменениями ковыля. Конечно, у данного метода имеются недостатки. Например, невозможно получить совершенно идентичный спектр несколько раз. Однако при сравнении образцов с одними реактивами и использовании тех же приборов можно получить достаточно точные данные.



а



б

Рисунок 1 – RAPD-спектры полученные с помощью праймеров: а – Micsat1, б – Micsat 2

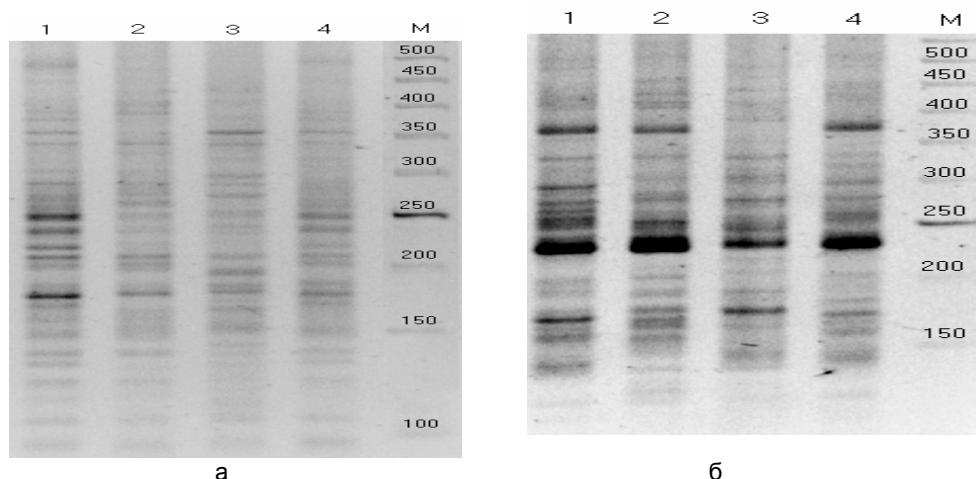


Рисунок 2 – RAPD-спектры полученные с помощью праймеров: а – PR15; б – Micsat6

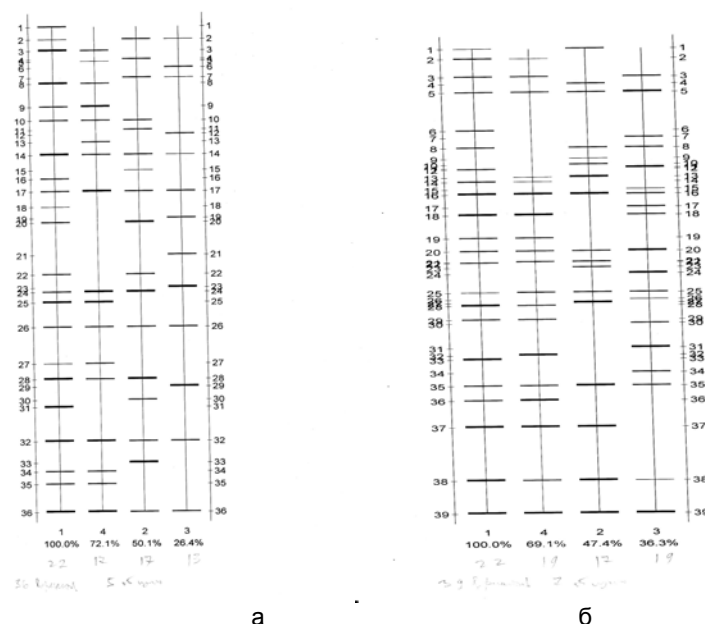


Рисунок 3 – Схема расположения ампликонов ДНК ковыля с праймерами: а – Micsat2; б – PN15

ЛИТЕРАТУРА

1. Schaefer C, Schaffer S, Arnholdt-Schmitt B. Differential RAPD fingerprints in carrot tissues // *Acta Hortic.* – 2000. – 530. P. 437-445.
2. Schaffer S, Arnholdt-Schmitt B. Characterization of genome variation in tissue cultures by RAPD fingerprinting – a methodical comment // *Plant Biosyst.* – 2001. – 135. P. 115-120.
3. Schmidt W. From faith to fate: ethylene signaling in morphogenic responses to P and Fe deficiency // *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* – 2001. – 164. – P. 147-154.
4. Shatters R.G., Schweder M.E., West S.H., Abdelghany A., Smith R.L. Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soy-

bean seed DNA // *Seed. Sci. Res.* 1995. – 5. P. 109-116.

5. Bullita S. Development of RAPD markers of potential taxonomic use in the genus *Trifolium* // *J. Genet. and Breeding.* – 1995. – V. 49, N 4. – P. 313-318.
6. Malusa E. Use of DNA amplified sequences for the genetic analysis of *Prunus* // *Alti Soc. sci. natur. L. Mus. civ. stor. natur. Milano.* – 1994. – V. 135, N 2. – P. 430-436/
7. Wachira F.N., Waugh R., Hackett C.A., Powell W. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers // *Genome.* – 1995. – V. 38, N 2. – P. 201-210/
9. Mitchelson K.R. Molecular markers for genetic diversity in cleavers // *Brighton Crop. Prot. Conf., Weeds, 1995, Int. Conf.* – Farrham, 1995. – P. 451-

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ХРОНИЧЕСКИХ ДОЗ РАДИАЦИИ СЕМИПАЛАТИНСКОГО
ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ПОЛИГОНА НА ПОЛИМОРФИЗМ ДНК У КОВЫЛЯ ВОЛОСОВИДНОГО
(STIPA CAPILLATA)

458.

10. Гостимский С.А. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // Генетика. – 1994. – Т. 35, №11. – С. 1538-1549.

11. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализа растительных геномов // Генетика. – 1996. – 33. – С. 476-480.

12. Оганесян А.С., Кочнева Е.З., Рысков А.П. Маркирование видов и сортов картофеля с помо-

щью метода RAPD PCR // Генетика. – 1996. – 32. – С. 448-451.

13. Кочнева Е.З., Оганесян А.С., Рысков А.П. RAPD-маркеры генома картофеля: клонирование и использование для определения межвидовых и межсортовых различий // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 33, № 5. – С. 893-897.

14. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. – 1980. – V. 8. – P. 4321-4325.

ПРИРОДНО-ТЕХНОГЕННЫЕ ЛИТОХИМИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ В ПОЧВАХ НА ОБЪЕКТАХ ГЕОЛОГОРАЗВЕДОЧНЫХ РАБОТ В ГОРНОМ АЛТАЕ

Ю.В. Робертус, Р.В. Любимов, А.С. Сакладов

Впервые для Горного Алтая установлены и предварительно изучены природно-техногенные литохимические ореолы рассеяния в почвах элементов, содержащихся в отвалах геологоразведочных выработок на месторождениях угля, железных и редкометалльных руд. Выявлена зависимость размеров, формы и интенсивности литохимических аномалий от природных условий их нахождения и факторов миграции.

Известно, что почвы не только наследуют элементный химический состав почвообразующих пород, но и аккумулируют различные виды внешнего загрязнения, выполняя при этом роль буфера, препятствующего его дальнейшему распространению. Уровень накопления экотоксикантов в почвах зависит от многих природных факторов, а также от интенсивности, продолжительности и специфики антропогенеза.

Специфическое антропогенное воздействие на эколого-геохимическое состояние почвенного покрова оказывают отвалы горных выработок – штолен, шахт, канав и пр., пройденных при детальном геологическом изучении месторождений полезных ископаемых (поисково-оценочные и разведочные работы). Масса перемещенного из выработок на дневную поверхность материала горных пород и содержащих тяжелые металлы, токсичные и радиоактивные элементы руд достигает на отдельных месторождениях десятков-сотен тысяч тонн, что с учетом длительности хранения позволяет считать их значимым фактором природно-антропогенного воздействия на окружающую среду.

Поскольку до настоящего времени изучение геохимических особенностей почв на участках размещения разведочных выработок в Горном Алтае не проводилось, цель настоящего пилотного исследования заключалась в выявлении и предварительной характеристике создаваемых их отвалами вторичных литохимических ореолов рассеяния.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами рекогносцировочного изучения явились участки геологоразведочных работ (ГРП), главным образом, на территории Кош-Агачского района Республики Алтай, представленные группой предварительно оцененных и разведанных месторождений каменного и бурого угля, железных и редкометалльных руд. Краткая характеристика изученных в их пределах отвалов горных выработок содержится в таблице 1.

Опробование почвенного покрова проведено через 50-100 м по двум взаимно перпендикулярным профилям длиной 200-800 м, проходящим через отвалы горных выработок и ориентированным вдоль и поперек склона.