

УДК: 575.116:577.34

МЕТОДЫ КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2004 г. Э. Р. Рахманалиев, Е. А. Климов, Г. Е. Сулимова

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Рассмотрены основные методы картирования геномов млекопитающих, их развитие и методические особенности. Предложена классификация методов картирования на генетические, цитогенетические и физические на основании методических подходов, используемых для построения генетических карт. Детально описан метод картирования с помощью радиационных гибридов соматических клеток (RH-картирование) как наиболее эффективный метод картирования крупных геномов.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день не существует четкой классификации методов картирования: одни авторы относят цитогенетические методы (FISH, PRINS и т.п.) к генетическим методам, другие – к физическим. Однако следует помнить, что по сути все методы являются генетическими, так как конечный результат картирования – получение максимально подробной карты взаимного расположения структурных, функциональных и полиморфных последовательностей генома и определение расстояний между ними. Разделение методов картирования на генетические, цитогенетические и физические, предложенное в данной статье, основано исключительно на методических подходах, используемых для построения генетических карт.

Генетическое картирование – это картирование, основанное на методах классической генетики – определении групп сцепления, частоты рекомбинации и построении генетических карт, где единицей измерения служат проценты рекомбинации, или сантиморганы (сМ). *Цитогенетическое картирование* осуществляется с применением методов цитогенетики, когда для локализации каких-либо нуклеотидных последовательностей и определения их взаимного расположения используются цитологические препараты. И, наконец, *физическое картирование* – это обширная группа методов, позволяющих строить карты генома (обычно их называют физическими) высокого уровня разрешения и определять расстояния между локализуемыми нуклеотидными последовательностями с точностью от нескольких десятков тысяч п.н. до одной нуклеотидной пары.

В настоящее время выделяют три основных подхода к картированию геномов, различающихся временем появления, необходимой методической базой и спектром возможностей: (функциональный, кандидатный и позиционный) [31, 63] (рис. 1).

Вплоть до последнего времени в картировании доминировал *функциональный* подход, основанный на априорном наличии некоторой информации о биохимическом полиморфизме, лежащем в основе того или иного наследственного признака. Методически такое картирование начинается с выделения в чистом виде белкового продукта гена. Далее к нему по аминокислотной последовательности подбирают вырожденные праймеры и проводят ПЦР-скрининг геномных библиотек. Однако список генов, для которых эта информация была достаточно полной к настоящему времени практически исчерпан и большинство генов, функция которых была известна, уже клонированы и локализованы.

Близко к функциональному и *кандидатное* картирование. В этом случае информация о функциональном изменении недостаточно полна, чтобы точно указать ген, однако, могут быть выдвинуты более или менее обоснованные предположения о возможных кандидатах либо по их функции, либо по положению на хромосоме. Важно отметить, что и при функциональном, и при кандидатном подходе клонирование гена, как правило, предшествует его точной локализации в геноме, т.е. картированию. В рамках этих подхо-

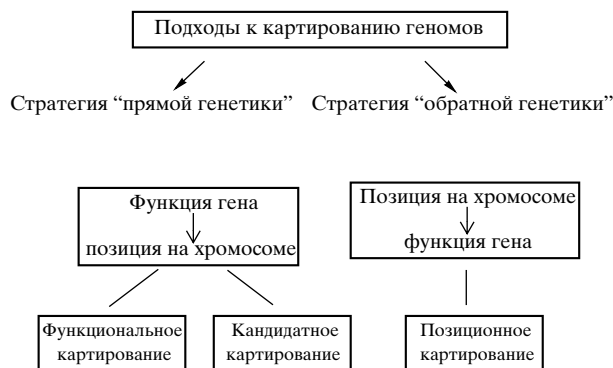


Рис. 1. Стратегические подходы к картированию генома человека.

дов локализовать ген означает пройти путь от его функции к локализации на хромосоме (позиции). Такой путь принято считать выражением стратегии “прямой генетики”, он характерен и для традиционных методов генетического и цитогенетического картирования [31]. До недавнего времени он был практически безальтернативным.

Появление в конце 80-х годов множества высокополиморфных ДНК-маркеров дало возможность пойти в обратном направлении – от хромосомной карты к функции. Стратегия “обратной генетики” применительно к поиску генов получила воплощение в *позиционном* картировании, подразумевающим локализацию гена при отсутствии всякой функциональной информации о нем [60]. При этом место гена на карте устанавливают по результатам анализа его сцепления с ранее локализованными генетическими маркерами и далее детально исследуют уже область генома рядом с маркером.

Основное ограничение позиционного подхода – низкая разрешающая способность генетических карт: интервал между двумя соседними маркерами, в котором локализован ген, может оказаться слишком велик и недоступен физическому картированию.

Для большинства генов, которые были локализованы, характерны структурные аномалии (как правило, это гены, ответственные за наследственные заболевания человека). Это существенно облегчает заключительную стадию поиска гена – его выделение и локализацию.

Способом, который позволяет преодолеть ограничения позиционного картирования, является объединение стратегии “обратной генетики” с преимуществами кандидатного подхода. Такой способ картирования, называемый *позиционно-кандидатным*, постепенно приходит на смену позиционному. Он заключается в поиске на выявленном участке генома подходящих кандидатных генов [31].

Важным условием успешного позиционного картирования является создание генетических карт высокого разрешения и подробной транскрипционной карты. Такие карты создаются методами физического картирования, которые будут описаны ниже.

Методы картирования геномов млекопитающих разрабатывались и применялись в первую очередь для изучения генома человека. Позже они были использованы для картирования геномов других млекопитающих. Поэтому в данном обзоре большинство методов построения генетических карт будет описано на примере картирования генома человека.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ

До недавнего времени изучение геномов как человека, так и других млекопитающих было возможно только путем генетического анализа – построения генетических карт или карт сцепления (linkage map). Генетической картой хромосомы называют относительное положение генов, находящихся в одной группе сцепления [8]. Первым шагом на пути построения генетических карт является формирование групп сцепления генов и исследование их взаимного расположения. Основным методом построения карт сцепления – классический генетический анализ, т.е. анализ наследования признаков в родословной, а также изучение частоты рекомбинации генных локусов в мейозе. Карты сцепления показывают порядок линейного расположения генов и маркеров на хромосоме и генетическое расстояние между ними, выраженное в процентах рекомбинации – сантиморганах (сМ). Считается, что два гена на хромосоме находятся на расстоянии 1 сМ, если вероятность рекомбинации между ними в процессе мейоза составляет 1%. Карта генетического сцепления составляет около 2809 сМ для мужчин и 4782 сМ для женщин [72]. Меньший “размер” мужского генома объясняется тем, что частота рекомбинации в сперматогенезе меньше, чем в оогенезе. Средняя длина генома человека в единицах генетического расстояния составляет около 3300 сМ. Сопоставив эту величину с размером гаплоидного генома человека, оцениваемым примерно в 2.91 млрд. п.н. [54, 104], можно заключить, что на 1 сМ генетической карты приходится в среднем немногим менее 1 млн.п.н. ДНК на физической карте генома.

Однако ввиду того, что частота рекомбинации в разных точках генома различна (“горячие точки” рекомбинации, районы генома, где рекомбинация подавлена – центромерные и теломерные участки хромосом, блоки конститутивного гетерохроматина и др.), эта величина может существенно варьировать, и в результате карты сцеплений не будут отражать реальных физических расстояний между маркерами и генами на хромосомах.

До начала 70-х годов XX века построение генетических карт человека продвигалось очень медленно. Небольшой размер семей, длительный период одного поколения, ограниченное число информативных родословных и отсутствие методов эффективного цитогенетического анализа всех пар хромосом затрудняло целенаправленное картирование хромосом человека. Так, первый ген человека был локализован на X-хромосоме в 1911 г., а первый аутосомный ген – только в 1968 г. К середине 70-х годов на хромосомах человека было локализовано менее 100 генов, значительная часть которых была локализована в X-хромосоме [2, 6].

Важная роль в прогрессе картирования генома человека принадлежит мутантным генетическим линиям животных (в большинстве случаев это мутантные линии мышей), моделирующим различные наследственные заболевания человека. Хорошо разработаны экспериментальные основы целенаправленного конструирования генетических моделей на базе культивирования эмбриональных стволовых клеток, сайт-специфического разрушения генов или введения в них определенных мутантных аллелей *in vitro*, отбора клонов с генетическими модификациями и пересадки их в ранние зародыши. В результате подобных манипуляций удается получить линии животных, в частности мышей, с мутациями в определенных генах. В настоящее время разработаны достаточно эффективные подходы для локализации и идентификации генов экспериментальных животных. Высокий процент сходства по нуклеотидным последовательностям между кодирующими областями гомологичных генов млекопитающих и человека, а также большое число консервативных групп сцепления с идентичным расположением генов (так называемых синтенных групп сцепления) позволяет проводить параллельные исследования на модельных объектах, значительно ускоряющие эффективность картирования и молекулярного анализа индивидуальных генов человека.

Дальнейший прогресс в области генетического картирования в значительной мере связан с деятельностью крупных научно-исследовательских центров по созданию банков клеточных культур, представляющих наиболее интересные и обширные родословные. Так, в Центре по Изучению Полиморфизма Человека – CEPH (от фр. Centre d'Etudes du Polymorphisme Humain) – создана уникальная коллекция перевиваемых клеточных культур, полученных от членов семей, многоступенчатые родословные которых насчитывают десятки и даже сотни индивидуумов. Перевиваемые линии клеток получали путем трансформации их вирусом Эпштейн-Барра. Такие лимфобластные линии клеток способны к неограниченному росту в условиях культивирования [28, 30].

CEPH-коллекции родословных представляют собой идеальные системы для генетического анализа наследственных признаков. Эти коллекции были использованы исследователями во всем мире для локализации генов человека и различных типов маркеров. В результате исследования этих клеточных линий определены генотипы членов CEPH-семей одновременно по тысячам полиморфных локусов и построены соответствующие генетические карты. Материал таких линий в виде клеточных клонов или образцов ДНК используется, в частности, для анализа сцепления сегрегирующих генов друг с другом или с вновь описанными полиморфными локусами.

Огромный вклад в систематизацию и обобщение информации о генетических картах хромосом человека, о локализации и функциях отдельных генов и структуре генома в целом вносят исследования, проводимые на протяжении последних 30 лет в Университете Джона Хопкинса в Балтиморе под руководством профессора Виктора МакКьюсика. Результатом этих исследований является систематическое, с двухгодичным интервалом между последними шестью публикациями, издание энциклопедий под названием: “Менделевское наследование у человека: каталог генов человека и генетических болезней” (“Mendelian Inheritance in Men. Catalog of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-linked Phenotypes”). Эти издания содержат сводные данные обо всех картированных генах человека и связанных с ними наследственных болезнях. В настоящее время все эти данные доступны в Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>). Появление и развитие компьютерных баз данных, возможность совмещения различных типов карт позволило перейти на качественно новый уровень анализа картированных последовательностей.

В настоящее время построены генетические карты хромосом человека, мыши, сельскохозяйственных животных и многих других организмов [6, 7, 80, 91, 111; компьютерные базы данных: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>), Genethon (carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/phys_map), CEPH-Genethon (www.cephb.fr/bio/ceph-genethon-map.html), GDB (Genome Data Base) (<http://www.gdb.org/>), и др.].

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ

Одновременно, в эти же годы, были достигнуты большие успехи в области цитогенетики, обусловленные возможностью дифференциального окрашивания метафазных хромосом [25, 35, 48, 90, 102, 121]. Методы дифференциального окрашивания позволяют идентифицировать на препарате как отдельную хромосому, так и любой ее участок, выявляя так называемые бэнды. На метафазных хромосомах малой степени спирализации идентифицируются около 750 бэндов, на прометафазных – 2500 – 3000. На сегодняшний день разработаны методы многоцветной окраски – multicolor banding (до 25 цветов) интерфазных и метафазных хромосом [73].

Цитогенетические карты показывают локализацию маркера с точностью до определенной хромосомы, плеча или хромосомного сегмента. Карты такого типа показывают линейный порядок маркеров в хромосоме. По своей разрешающей способности они занимают промежуточное положение между генетическими картами и собственно физическими картами (ряд авторов относит цитогенетическое картирование к методам физи-

ческого картирования геномов). Цитогенетические карты основаны на расположении генов без определения их варибельности, тогда как возможность построения генетических карт определяется наличием аллельного полиморфизма локусов. Построение цитогенетической карты облегчает разработку других типов физических карт, а именно – дает “скелет”, на котором помещаются маркеры или контиги перекрывающихся клонов.

Для построения цитогенетических карт млекопитающих в настоящее время используется ряд методов. Определение хромосомной, а в большинстве случаев и субхромосомной локализации маркеров проводят с использованием гибридов соматических клеток между различными видами млекопитающих или непосредственной гибридизацией *in situ* уникальных молекулярных зондов на митотические хромосомы. К основным методам формирования цитогенетических карт относятся также хромосомный сортинг (проточная цитометрия), микродиссекции и микроклонирование определенных геномных фрагментов и сравнительное генетическое картирование (сравнительная цитогенетика).

В 90-е годы метод гибридизации *in situ* получил развитие в модификациях: FISH (гибридизация *in situ* с использованием флюоресцентной метки) [40, 50, 100] и PRINS (метод, сочетающий гибридизацию *in situ* на метафазных хромосомах специфических праймеров с последующей ПЦР, включающей меченый биотином нуклеотид в продукт амплификации) [59, 101]. Такой подход стал основным методом для построения цитогенетических карт.

Разрешение этого метода составляет от 1 до 3 млн.п.н., т.е. гибридизация *in situ* является методом картирования с низким уровнем разрешения.

Среди цитогенетических методов широкое распространение получил метод картирования геномов млекопитающих с помощью гибридов соматических клеток – с ним связан первый прорыв на пути построения карт генома человека и успехи клеточной биологии. К 70-ым годам была разработана техника экспериментального конструирования способных к размножению межвидовых клеточных гибридов [15]. Гибридные клоны получали путем искусственного слияния культивируемых соматических клеток разных видов, в частности клеток человека и различных грызунов: китайского хомячка, мыши, крысы. Гибридные клетки, значительно превосходящие по своим размерам исходные родительские клетки, оказывались способными не только переживать в условиях культивирования, но и размножаться. Однако размножение этих тетраплоидных гибридов, как оказалось, сопровождалось утратой хро-

мосом, причем в первую очередь элиминировались хромосомы человека.

Так были получены панели гибридных клеточных клонов, содержащих всего одну или несколько хромосом человека и полный набор хромосом другого вида [93, 113]. Обнаружение белков человека, специфических мРНК или последовательностей ДНК в таких клонах позволяет определить хромосомную принадлежность соответствующих генов [21, 43, 87, 89, 112, 115, 118]. Техника соматической гибридизации явилась одним из наиболее мощных инструментов для нахождения связей между группами сцепления и цитогенетически идентифицируемыми хромосомами и даже их отдельными сегментами. Таким способом удалось локализовать сотни аутосомных генов.

Соматические гибриды спонтанного происхождения были получены в 1960 году, с тех пор развитие работ по гибридам соматических клеток шло по следующим направлениям: 1) поиск безопасных, удобных и эффективных агентов для слияния клеток; 2) создание селективных систем, позволяющих выделять гибриды соматических клеток; 3) изучение феномена сегрегации хромосом, направления и степени, а также возможности направленной сегрегации в соматических гибридах; 4) использование гибридов соматических клеток для создания хромосомных карт млекопитающих [15].

Для тонкого картирования разработаны два метода: перенос генов, опосредованный хромосомой, (CMGT) и перенос генов в процессе слияния облученной клетки-донора с необлученным реципиентом (IFGT, от англ. irradiation and fusion gene transfer). Первый метод предполагает инкубацию очищенных митотических хромосом с клетками реципиента в присутствии фосфата кальция. При этом происходит встраивание фрагментов донорных хромосом в хромосомы клетки-реципиента. Для идентификации гибридов, содержащих нужные фрагменты ДНК донора, применяют соответствующие методы селекции.

Наиболее широко распространенный пример такого подхода – НАТ-селекция (от англ. hypoxanthine, aminopterin, thymidine) [69]. В присутствии аминоптерина (или сходного с ним метатрексата) ингибируется синтез новых предшественников ДНК. Клетки, лишенные фермента тимидинкиназы (ТК), не могут утилизировать экзогенный тимидин и гибнут в присутствии аминоптерина. Аналогично, клетки, лишенные гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRТ), не могут усваивать гипоксантин и также не жизнеспособны в присутствии аминоптерина [15].

К сожалению, встроенные фрагменты хромосом зачастую претерпевают реорганизацию. Кроме того, есть достоверные данные о предпочтительном проникновении в клетку последова-

тельностей из центромерных областей. Эти недостатки не позволяют использовать SMGT для тотального картирования, хотя данный метод весьма эффективен для обогащения специфическими фрагментами хромосом – составной части стратегии клонирования, называемой “обратной генетикой”.

ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ

В отличие от генетических карт, построенных на основе групп сцепления и дающих статистические расстояния между ДНК-маркерами и генами, физическое картирование позволяет определять физические расстояния между маркерами в каждой хромосоме.

К методам физического картирования относят рестрикционное картирование, RH-картирование, клонирование в YAC (от англ. yeast artificial chromosome), BAC (от англ. bacterial artificial chromosome), космидах, плаزمидях и других векторах и контиг-картирование на их основе, а также секвенирование ДНК. Использование искусственных хромосом создает базу для проведения физического картирования как на хромосомном, так и на субхромосомном уровне.

Физическое картирование генома основано на построении физических карт, т.е. определении порядка расположения физических маркеров вдоль молекулы ДНК. В качестве физических маркеров могут выступать сами гены, анонимные фрагменты ДНК (D-сегменты), точки расщепления ДНК рестриктазами и т.п.

Однако при совмещении данных по картированию геномов млекопитающих исследователи столкнулись с трудностями, для преодоления которых в 1989 г. было предложено стандартизовать все обозначения меченных последовательностей ДНК в геноме, включая все типы картированных последовательностей, будь то просто картированный сегмент ДНК с неизвестной функцией (D-сегменты), последовательность с необычными сайтами рестрикции, проба, выявляющая полиморфизм, последовательность, гибридизирующаяся с определенным “бэндом” при гибридизации *in situ* или STS-маркеры (от англ. “sequenced tagged site”) [83].

Основная отличительная черта STS-маркеров – их уникальность в геноме. Они облегчают перевод различной информации по картированию на единый “язык” STS для анализа и хранения генетической и молекулярной информации, а также оптимизируют процесс насыщения физической карты генома человека маркерами. Созданные на сегодняшний день электронные молекулярно-генетические базы данных значительно облегчают поиск информации по картированию и секвенированию последовательностей любого изучаемо-

го вида, позволяют оценивать степень гомологии и эволюционной связи между геномами различных видов. В настоящее время одно из основных направлений в данной области исследований – перевод всех STS-маркеров на основу ПЦР для более удобного использования. К исходному секвенированному участку ДНК подбирается пара праймеров, как правило, с учетом того, чтобы расстояние между ними не превышало 1 т.п.н. для удобства проведения ПЦР. Если участок и праймеры к нему не имеют аналогов в базе данных, содержащих секвенированные на данный момент последовательности ДНК, праймеры синтезируют и с ними проводят ПЦР, с использованием тотальной ДНК генома в качестве матрицы. Если полученный амплификат представляет собой единственный фрагмент на геном, эта последовательность может считаться уникальной и быть использована как STS. Информация, по каждому маркеру, хранится в базах данных (NCBI, EMBL, DDBJ, GDB и др.) и включает сведения о нуклеотидной последовательности праймеров, условия реакции ПЦР, длину продукта амплификации и его нуклеотидную последовательность. Одним из результатов международной программы “Геном человека” явилось создание такого количества STS-маркеров, которое позволило покрыть ими весь геном человека через каждые 50 т.п.н. вдоль каждой хромосомы (на сегодняшний день в базах данных зарегистрировано более 60000 STS-маркеров).

Совмещение карт стало возможным благодаря локализации многих клонированных генетических маркеров на физических картах с помощью гибридизации *in situ*, т.е. привязке к определенным хромосомным сегментам. Эти локусы позволяют определить соотношения между генетическими расстояниями в сантиморганах и физическими расстояниями, выраженными в тысячах пар нуклеотидов.

Контиг-карты хромосом человека на основе перекрывающихся клонов геномной ДНК человека

Одним из методов высокого разрешения является построение контиговых карт перекрывающихся клонов. Контиговая карта или контиг (от *contiguous* – протяженный) включает набор перекрывающихся клонированных фрагментов геномной ДНК в комплексе с информацией о порядке их перекрывания. Локализовать клонированный фрагмент можно, применяя методы гибридизации с пробами ДНК, локализация которых известна, ПЦР-анализ, секвенирование. В настоящее время создание контигов – общепринятый подход к построению физической карты генома человека. Картирование по этому методу позволяет получить не только информацию об

относительном расположении маркеров и расстоянии между ними (выраженном в парах нуклеотидов), но и обеспечивает непосредственную доступность каждого картированного фрагмента ДНК для последующих структурных исследований, вплоть до расшифровки нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК и выявления их функциональной роли.

В 1987 г. был описан метод получения так называемых искусственных дрожжевых хромосом (YAC), способных включать крупные фрагменты чужеродной ДНК, например ДНК человека, и репродуцировать эти фрагменты в процессе размножения дрожжевых клеток. Фрагменты, которые можно было бы таким образом клонировать, составляли 0.2–0.3 млн.п.н. При размере генома человека примерно 3.5 млрд.п.н. около 10000 YAC-клонов могли “перекрыть” весь геном человека, что резко упростило бы задачу картирования этих фрагментов [27].

В работе [46] была усовершенствована процедура получения YAC-клонов, способных нести в себе фрагменты чужеродной ДНК размером до 1.2 млн.п.н. [46]. Это позволило сократить число клонов, покрывающих геном человека, до нескольких тысяч.

Упорядоченное расположение клонов вдоль хромосомы представляет хотя и трудоемкую, но реальную задачу, так как чем крупнее клонированные фрагменты ДНК человека, тем меньше требуется усилий и времени для установления их взаимного расположения. С начала 90-х годов пользуются едиными эталонными YAC-клонотекми: CEPH [29], ICRF [66].

Основу YAC составляет челночный плазмидный вектор на основе плазмиды pBR322, содержащий все элементы дрожжевой хромосомы: центромеру (CEN4), две теломерные последовательности (TEL), автономно-реплицирующуюся последовательность (ARS1) и маркерные дрожжевые гены URA3 и TRP1, участвующие в биосинтезе урацила и триптофана. Тем не менее, необходимо учитывать тот факт, что техника клонирования в YAC-клонах, несмотря на многочисленные преимущества, имеет ряд слабых сторон. Это в первую очередь касается подверженности YAC-клонов физической нестабильности (перестройкам, делециям) и химеризму. Известно, что до 50% клонов большинства мега-YAC-клонотек являются химерными, т.е. содержат ДНК из двух и более несмежных областей генома [19, 30].

Помимо этого, контиговая карта, состоящая только из YAC-клонов, не обеспечивает доступности клонированных фрагментов ДНК, пригодных для тонкого структурного анализа и секвенирования. Вследствие этого для более детального картирования специфических объектов: CpG ост-

ровков, генов, областей хромосомных перестроек, горячих точек рекомбинации, а также для секвенирования генома необходимы контиги, построенные из относительно небольших перекрывающихся клонов, например, космид. С этой целью объединяют две контиговые карты – YAC и космидную – путем гибридизации YAC-зондов с космидами представительных хромосомспецифических библиотек. Это позволяет создать физическую карту в виде групп космид, расположенных в известном порядке [29, 49, 81].

Основным достоинством использования контигов YAC-клонов как базы для построения космидных контигов является необходимость картирования лишь ограниченного числа космид в пределах каждого YAC-клона, уже привязанного к определенному расположению на карте.

Порядок и ориентация отдельных космидных контигов (как друг относительно друга, так и всех вместе вдоль хромосомы) определяется последовательной гибридизацией с несколькими YAC-клонами, по-разному их перекрывающимися. Потенциальная разрешающая способность такой карты зависит от количества интервалов между концами YAC-клонов, приходящимися на исследуемый участок хромосомы. В этой связи в последнее время в построение первичного YAC-контига вовлекаются библиотеки YAC-клонов с относительно малыми и средними размерами вставки – мини- и миди-YAC-клоны (средний размер вставки 0.2–0.4 и 0.4–0.6 млн.п.н.), что позволяет увеличить количество интервалов перекрывания. Для проверки соответствия построенного YAC-контига истинному расположению участков генома применяется “Bottom Up”-подход с использованием гибридизации *in situ*, или, чаще, полимеразной цепной реакции для сверки с последовательностью известных физических маркеров на хромосоме. При локализации какого-либо маркера скрининг YAC-клонотек проводится в два этапа.

Позже для устранения недостатков, связанных с клонированием в YAC, были созданы менее емкие, но более надежные векторы с использованием прокариотических хозяев: BAC, PAC (от англ. P1 artificial chromosome), NAC (от англ. N15 artificial chromosome) и другие, позволяющие клонировать фрагменты генома разной длины.

Существенное преимущество BAC-клонирования по сравнению с YAC-клонированием – структурная стабильность вставок, а также повышенная в 10–100 раз частота трансформации, что позволяет экономить геномную ДНК. В последнее время при построении контигов генома человека используют BAC-клоны [70].

Картирование методом дробовика (ShotGun) и картирование с использованием случайных STS

Данная стратегия картирования предполагает секвенирование коротких случайных фрагментов генома человека и подбор ПЦР-праймеров к этим фрагментам, т.е. создание STS [45, 83]. Используя радиационные гибриды клеток или иные системы, в том числе соматические гибриды и семьи полиморфных маркеров СЕРН, можно определить положение STS на физической и генетической карте генома человека. Недостатком данного подхода является невозможность оценить истинное расстояние между STS-маркерами, что сильно снижает разрешающую способность получаемых карт. Например, известны 20 STS-маркеров для участка генома размером 10 млн.п.н. Можно считать, что разрешение полученной карты составит 0.5 млн.п.н., однако, вряд ли это окажется истиной. Десять маркеров действительно могут находиться весьма близко друг к другу, предположим, на участке длиной 10 т.п.н., и тогда разрешенные карты составят всего лишь 1 млн.п.н.

Важно отметить, что определить расстояние между двумя STS крайне сложно – никто не может однозначно сказать, десятки или миллионы пар нуклеотидов разделяют два маркера. Это обусловило необходимость создания избыточного количества STS для относительно плотного покрытия участка генома.

Опираясь на карту STS, клоны, содержащие векторы с крупными вставками (YAC, BAC, PAC, космиды), анализируют с помощью ПЦР и определяют минимальное количество перекрывающихся клонов, достаточное для покрытия исследуемого участка генома. Затем методом ShotGun секвенируют ДНК клонов, несущих крупные вставки – получают клонотек, содержащие небольшие (до 2 т.п.н.) случайные субфрагменты исходных крупных вставок, и секвенируют их концевые участки.

Не так давно была разработана стратегия секвенирования целых геномов методом ShotGun (the whole genome sequencing strategy, WGS), использующая частичное секвенирование как крупных вставок BAC- и PAC-клонов, так и клонов с относительно небольшими вставками (от 2 до 10 т.п.н.) [77]. BAC- и PAC-клоны, перекрывающие весь геном, должны быть тщательно картированы. Небольшие фрагменты ДНК для клонирования получают путем случайной физической фрагментации суммарной геномной ДНК. Такой подход применялся при секвенировании геномов *Drosophila melanogaster* – около 120 млн.п.н. [77] и человека [104]. В данном методе необходимо получить последовательности, перекрывающие весь геном 10 – 15 раз. Так, для 15-кратного перекрытия среднего бактериального генома (около 4 млн.п.н.), подобного *Escherichia coli*, при сред-

ней длине одного секвенированного фрагмента 500 п.н. необходимо определить нуклеотидные последовательности примерно 120000 клонов. Таким образом, несмотря на впечатляющие достижения, картирование и секвенирование даже небольших геномов – трудоемкий и дорогой процесс.

Рестрикционное картирование геномов. Рестрикционное картирование генома человека с использованием рестриктазы NotI

Рестрикционная карта – вид физической карты, на которой указаны расстояния между соседними сайтами расщепления ДНК определенной рестриктазой, а также порядок следования сайтов рестрикции для одной или нескольких рестриктаз. При анализе крупных геномов или отдельных хромосом строят макрорестрикционные карты, с указанием порядка следования сайтов рестрикции редкощеляющих рестриктаз.

К крупномасштабным подходам относится картирование генома человека с использованием *NotI*-прыжковых и связующих клонотек [32, 84, 94, 122, 125]. Один из наиболее известных примеров этого подхода – метод связующих и прыжковых клонотек *NotI* [34]. В 1987 г. Коллинс и соавт. сформулировали принцип картирования, основанный на получении двух типов клонотек – “прыжковых” (jumping) и “связующих” (linking) [33].

Рестриктаза *NotI* (сайт узнавания – 5'-GCGGC-CGC-3') для построения макрорестрикционных карт хромосом человека была выбрана не случайно. Поскольку *NotI*-сайты относительно равномерно распределены в хромосомах человека [5, 17, 124], рестриктаза *NotI* очень удобна для физического картирования геномов млекопитающих.

Помимо этого, рестриктаза *NotI* имеет для рестрикционного картирования особое значение, так как более 90% STS, полученных секвенированием прилегающих к сайтам рестрикции участков (400 – 500 п.н.), полностью или частично гомологичны известным генам человека или других организмов, что свидетельствует об очень высоком уровне ассоциации сайта *NotI* с 5'-областями генов [17, 41, 97].

К преимуществам картирования с помощью *NotI* прыжковых и связующих клонотек относятся небольшой размер вставки в векторе клонирования и возможность полной автоматизации всех этих этапов картирования.

Основной принцип “прыжков” по хромосоме – клонирование только концов крупных фрагментов ДНК, а не целых сегментов. ДНК, расположенная между двумя концами, делетируется с помощью различных методов, после чего проводится биохимическое картирование.

мический или генетический отбор клонов, содержащих только искомые концевые фрагменты.

Прыжковые клоны содержат фрагменты ДНК, которые прилегают к соседним сайтам узнавания рестриктазой *NotI*, а связующие – фрагменты, расположенные около одного и того же сайта узнавания данной рестриктазой.

Прыжковая клонотека *NotI* представляет собой набор клонированных концевых фрагментов больших участков генома, полученных при обработке суммарной хромосомной ДНК рестриктазой *NotI*. Связующая клонотека *NotI* содержит набор фрагментов ДНК, фланкирующих сайты узнавания *NotI*. Анализ связующей клонотеки в сочетании с гель-электрофорезом в пульсирующем поле (PFGE) в принципе позволяет построить физическую карту хромосомы. В случае, когда вставки клонов из связующей клонотеки используются в качестве зондов при PFGE-блотинге генома, каждый зонд должен выявить два соседствующих в геноме фрагмента ДНК. Теоретически одной клонотеки и одной обработки рестриктазой достаточно, чтобы установить порядок расположения сайтов узнавания редкощеплящих эндонуклеаз на физической карте хромосомы, однако, практически это невозможно, поскольку многие рестрикционные фрагменты имеют одинаковую длину. Для разрешения возникающих неопределенностей необходимо использовать связующие клонотеки, созданные при помощи других редкощеплящих рестриктаз, и с их помощью строить физические карты исследуемых хромосом, как в случае обыкновенного рестриктазного картирования [4].

“Прыжки” по хромосоме могут осуществляться с помощью клонок со вставками крупного и среднего размера без использования связующих клонок. Однако применение связующих клонок в дополнение к прыжковым упрощает задачу. При последовательном скрининге двух клонок можно “прыгать” от одного клон к другому (прыжковый клон – связующий клон – прыжковый клон и т.д.) и получать упорядоченные карты генома без использования геномного PFGE-блотинга. Совместное применение этих двух типов клонок позволяет быстро продвигаться по хромосоме человека, так как геном человека содержит ограниченное число сайтов, узнаваемых рестриктазой *NotI* (<10000).

Таким образом, ДНК *NotI*-прыжковых и *NotI*-связующих клонок, перекрывающих весь геном человека, может быть упорядочена на одном фильтре с высокой плотностью. В этом случае скрининг клонок может быть выполнен очень быстро. Однако использование гибридационного подхода для установления порядка расположения связующих и прыжковых клонок имеет некоторые ограничения вследствие высокой степе-

ни фоновой гибридизации между различными *NotI*-клонами. Другим способом определения порядка клонок является секвенирование прыжковых и связующих клонок *NotI* [4].

Картирование целых геномов методом случайного секвенирования с использованием интегрированного подхода было предложено для *NotI*-связующих и прыжковых клонок в векторах λ SK15 и λ SK22 [5, 123, 125]. Эта стратегия основана на том, что клонотеки конструируют в одних и тех же векторах и по одной схеме (т.е. два типа клонок содержат фрагменты ДНК одинаковой физической структуры, но по-разному упорядоченные), а сайты *NotI* в этих клонотеках доступны для секвенирования со стандартными праймерами (т.е. информацию о последовательности 800–1000 т.п.н., окружающих *NotI*-сайт, можно легко получить путем автоматического секвенирования). Выделение плазмидной ДНК, как и секвенирование тысяч клонок, может быть автоматизировано. Линейный порядок *NotI*-клонок на хромосоме можно установить с помощью компьютерного анализа.

В упрощенной версии данного подхода достаточно секвенировать только ДНК *NotI*-связующих клонок, а затем картировать уникальные сайты рестрикции *NotI*.

В обоих вариантах уникальные сайты *NotI* представляют собой STS-маркеры, распределенные по всему геному, и физическое расстояние между этими сайтами может быть определено посредством PFGE-блотинга и *in situ* гибридизации с метафазными хромосомами. Важно, что каждой области хромосомы может соответствовать только ограниченное число уникальных *NotI*-STS, в отличие от результатов исследований с использованием случайных STS, согласно которым область хромосомы может быть представлена неизвестным числом STS-маркеров.

Присутствие многочисленных повторяющихся последовательностей в геноме млекопитающих не должно сильно затруднять исследование, поскольку для идентификации уникального *NotI*-клона достаточно фрагмента длиной 500 п.н. Более подробная карта (разрешение порядка 100 – 300 т.п.н.) может быть получена с использованием данного подхода и частощеплящих рестриктаз (*XmaIII*, *SalI*, *XhoI*) или других ферментов, расщепляющих ДНК в области CpG-островков [4].

Использование *NotI*-STS-маркеров (или в общем случае CpG-специфичных STS) позволяет упорядочить клоны с большими вставками и установить последовательность перекрывающихся клонок.

В настоящее время на основе *NotI*-STS-маркеров построены рестрикционные карты хромосомы 3 и других хромосом человека [5, 41, 53, 97, 108, 124].

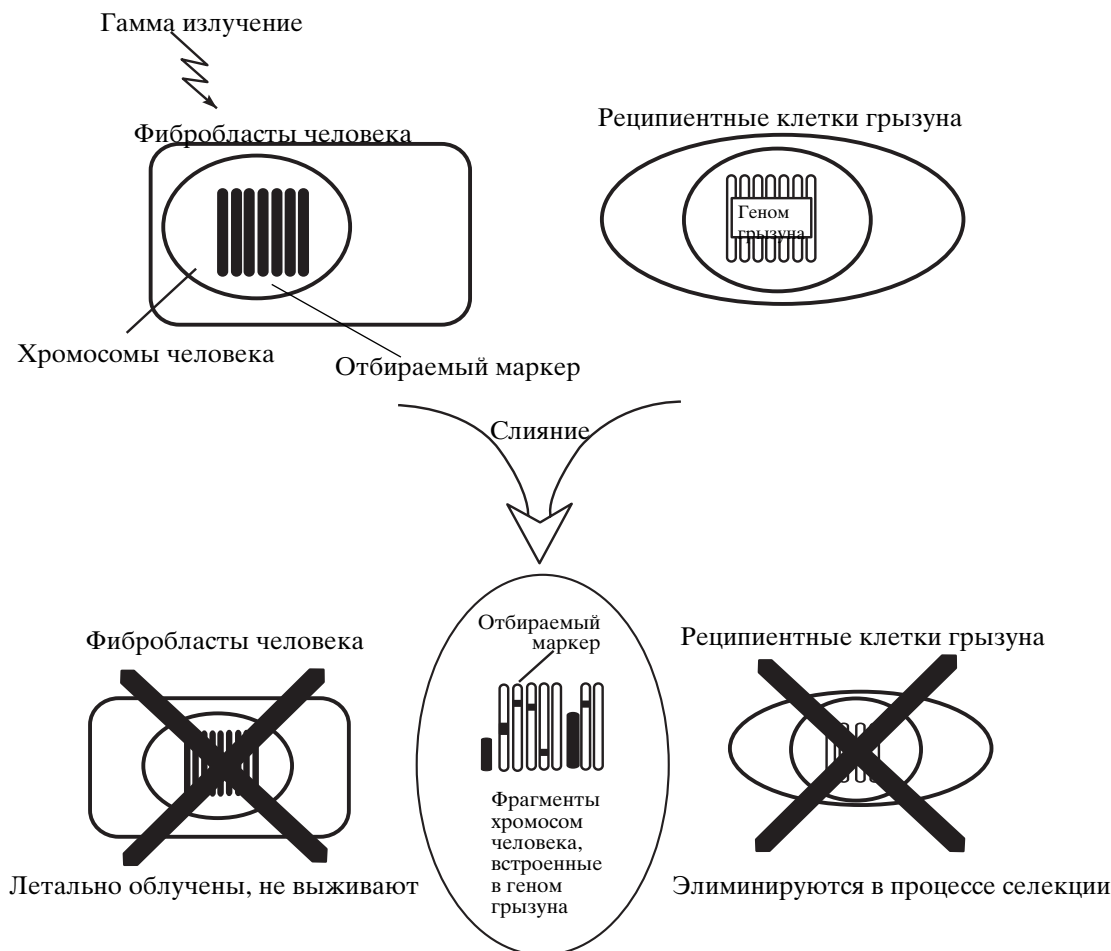


Рис. 2. Схема получения радиационных гибридов соматических клеток.

На сегодняшний день наиболее удачной стратегией картирования как генома человека, так и геномов других млекопитающих, по-видимому, является построение макрорестрикционных карт с использованием редкощепящих рестриктаз (например, *NotI*) и применение RH-картирования для локализации ДНК-маркеров.

Картирование с использованием панелей радиационных гибридов соматических клеток (RH-картирование)

Создание и свойства RH-панелей. Для получения карт высокого уровня разрешения используется стратегия картирования с помощью радиационных гибридов (RH-картирование, radiation hybrids mapping). Идея использования для картирования совместной сегрегации генов в облученных клеточных гибридах принадлежит Госсу и Харрису [44, см. также 6]. Метод заключается в том, что на донорные клетки фибробластов воздействуют высокими дозами гамма-излучения, способными вызывать разрывы хромосом и при-

водить к различным хромосомным перестройкам (рис. 2). Затем их сливают с реципиентными клетками грызуна. Селекция способствует элиминации всех негибридных клеток грызуна. Прощедшие селекцию гибриды несут в составе генома грызуна не только селективный маркер, но и любые другие последовательности генома человека. Вероятность разрыва между двумя сцепленными генами тем выше, чем больше расстояние между ними. В качестве облучаемого партнера используют как диплоидные клетки человека, так и гибридные клетки, содержащие отдельные хромосомы человека. После летального облучения клетки донора гибридизуют с нормальной необлученной клеточной линией грызуна, в образовавшихся гибридах фрагменты хромосом человека оказываются встроенными в хромосомы грызуна, что обеспечивает стабильную сегрегацию гибридных хромосом в митозе и сохранение встроенных фрагментов. Количество встроенных фрагментов может составлять до 30% генома клетки реципиента. Для формирования панели радиационных гибридов соматических клеток (RH-панели)

отбирается минимальное количество клонов, в которых представлены все последовательности генома человека с 6–7-кратным перекрытием генома. Затем методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводится скрининг RH-панели с использованием маркеров с уже известной локализацией и на их основе формируется так называемая рабочая рамка маркеров. Локализация новых детектируемых маркеров устанавливается относительно маркеров рабочей рамки.

ДНК, изолированная из панели независимых клонов радиационных гибридов, обеспечивает картирование STS-маркеров и анализ расстояния между ними в геноме человека. Частота вызванных радиацией разрывов между двумя маркерами принимается за меру расстояния, и положение маркера определяется тем же способом, что и при построении карт сцепления.

Вероятность возникновения разрывов и других перестроек хромосом в живых клетках под воздействием ионизирующей радиации описывается распределением Пуассона – частным случаем биномиального распределения, при котором вероятность возникновения каждого конкретного события (p) очень мала, в то время как общее число наблюдаемых событий (k) очень велико и стремится к бесконечности. Метод RH-картирования основывается на следующих предпосылках: 1) согласно распределению Пуассона разрывы хромосом происходят случайным образом и независимо друг от друга; 2) встраивание фрагментов хромосом реципиента в хромосомы клеток донора также происходит случайным образом и независимо друг от друга, что обеспечивает присутствие в панели гибридных клеток всех последовательностей генома реципиента; 3) вероятность образования разрывов между двумя маркерами зависит только от расстояния между ними и дозы облучения, что позволяет оценивать физические расстояния между маркерами [24, 36, 64, 65, 79, 106, 107]. Существенным является также то, что типирование панели радиационных гибридов соматических клеток проводится только по принципу наличия или отсутствия конкретных маркеров, независимо от числа их копий в гибридных клетках.

Для анализа радиационных гибридов создан специальный статистический аппарат, позволяющий с помощью вероятностных моделей описывать процессы разрыва хромосом и сохранения фрагментов в гибридных клетках [1, 9, 10, 24, 36]. В основе этого статистического аппарата – традиционный гибринологический метод, разработанный для картирования генома человека с использованием популяционно-генеалогических данных. Суть метода, называемого методом lod score (lod – аббревиатура от *logarithm of the odds ratio*) [6], или методом максимального правдоподобия

[1, 3, 24], – в статистическом анализе результатов скрещивания особей и оценках истинных вероятностей рекомбинации между исследуемыми локусами.

Значение lod score для группы родословных, случайно выбранных из популяции, может быть вычислено по формуле:

$$\text{lod score} = \sum_i \log \frac{P(F_i/r)}{P(F_i/r = 0.5)},$$

где $P(F_i/r)$ – априорная вероятность сочетания фенотипов, детерминированных рассматриваемой парой генов, которое наблюдается в i -й родословной выборке, при условии, что истинный коэффициент рекомбинации между этими генами равен r [цит. по: 7].

Данный статистический метод позволяет использовать уже имеющиеся неполные карты: специфические радиационные гибриды отбираются по точкам разрывов, обозначенным уже известными маркерами. Идентификация хромосомных фрагментов картируемого вида в исследуемых гибридах позволяет ориентировать синтенную группу относительно хромосомы и определять точное положение маркеров в хромосоме. Создание таких мультимегабазных хромосомных фрагментов (от 5×10^2 до 2×10^3 т.п.н.), по крайней мере, в 10 раз больших, чем фрагменты в YAC-клонах, открывает новые возможности для физического картирования хромосом высокого уровня разрешения.

Для построения RH-карт генома человека было сконструировано три панели радиационных гибридов с разным уровнем разрешения и отличающихся по количеству клонов: GeneBridge 4 [106, 107], Stanford G3 panel [96], и TNG4 [20] (таблица). Все три панели созданы методом облучения диплоидных клеток человека с последующим их сливанием с нормальными клетками китайского хомячка.

Статистическая обработка результатов скрининга RH-панелей проводилась с помощью программ, расположенных на серверах учреждений, создавших соответствующую RH-панель. Так, например, для получения результатов скрининга RH-панели GeneBridge4 и информации о локализации маркера на RH-карте, данные скрининга необходимо отправить по Internet на сервер Whitehead Institute в соответствии с принятыми формами. При этом необходимо указать значения lod score, представляющее собой логарифм отношения шанса (правдоподобия) сцепления двух локусов к шансу (правдоподобию) отсутствия сцепления. Значение lod score при ответе не должно превышать 3, так как эта величина составляет вероятность 1:1000 того, что между двумя исследуемыми локусами не произошел разрыв. Величина lod score < 3

Свойства панелей радиационных гибридов, созданных для картирования геномов позвоночных (прочерк – нет данных)

Название RH-панели	Вид	Учреждение	Число клонов	Доза облучения, Rad	Уровень разрешения, т.п.н.	Средний размер фрагмента, млн.п.н.	Ссылка
GeneBridge4	Homo sapiens	Whitehead Institute	93	3000	1000	10	[47]
Stanford G3	Homo sapiens	Stanford Human Genome Center	83	10000	500	4	[96]
Stanford TNG4	Homo sapiens	Stanford Human Genome Center	90	50000	50	0.8	[20]
Goodfellow T31	Mus musculus	Cambridge University	100	3000	–	9.8	[71]
Goodfellow T55	Rattus norvegicus	Cambridge University	106	3000	–	–	–
Womack-5000	Bos taurus	–	90	5000	–	–	[114]
Womack-12000	Bos taurus	–	180	12000	–	–	–
Roslin/Cambridge TM112	Bos taurus	Roslin, Cambridge University	94	3000	–	–	–
IMpRH	Sus scrofa	University of Minnesota	118	7000	–	–	[120]
IMNpRH2	Sus scrofa	University of Minnesota	90	12000	–	–	[119]
Goodfellow TM99	Equus caballus	–	94	3000	–	–	[57]
RHDF5000	Canis familiaris	Universite de Rennes1	126	5000	600	–	[105]
RHDF-5000.2	Canis familiaris	Universite de Rennes1	118	5000	600	–	[27]
Cat-5000, NCI	Felis catus	–	93	5000	–	–	[75]
Goodfellow T25	Papio cynocephalus lestes	–	93	3000	–	–	–
Macaque-5000, NCI	Macaca mulatta	–	93	5000	–	–	[76]
Goodfellow T51	Danio rerio	–	94	3000	–	6.1	[61]
Ekker LN54	Danio rerio	–	93	5000	–	–	[52]

считается достаточной для доказательства сцепления маркеров, lod score > 3 означает, что вероятность разрыва между исследуемым маркером и маркером рабочей рамки больше 10^{-3} . Такой результат считается недостоверным. Обработка результатов ведется с учетом всех маркеров, ранее локализованных на RH-картах, и каждый из них проверяется на возможность сцепления с исследуемым маркером.

На сервер Whitehead Institute необходимо отправлять результаты по всем 93 клонам (положительный – 1; отрицательный – 0; сомнительный – 2). Ответ о локализации из Whitehead Institute приходит в течение 1–2 часов на адрес электронной почты, указанный при отправлении. В случае единичной локализации также присылается карта радиационных гибридов с включенными в нее

локализованными исследуемыми маркерами. В ответе также указываются хромосома, на которой программа обработки результатов скрининга RHMAPPER (разработана Whitehead Institute) локализовала маркер, маркеры рабочей рамки (framework), с которыми сцеплен исследуемый маркер, а также расстояние до них и до ближайших маркеров, выраженное в centiRay (cR). cR – это мера расстояния, соответствующая частоте разрывов между двумя маркерами, вызванных радиацией. Для каждой хромосомы соотношение между cR и cM варьирует. Помимо этого, в электронном письме указывается значение lod score, т.е. вероятность сцепления картированного маркера с маркерами рабочей рамки.

В настоящее время RH-картирование эффективно используется для построения физических

карт геномов и других млекопитающих: крупного рогатого скота [88], собаки [85], мыши [103], крысы [22, 110] и других видов, для которых созданы RH-панели (таблица). При создании RH-панелей других видов, также как и при создании RH-панелей человека, в качестве реципиентных клеток выступали диплоидные клетки китайского хомячка. В последние годы технику создания RH-панелей и RH-картирования начали применять для картирования геномов растений, в частности, ячменя [109].

Использование и преимущества RH-картирования. На сегодняшний день RH-картирование получило очень широкое распространение и применяется исследователями для тотального картирования [37, 47, 91, 96], составления карт индивидуальных хромосом или участков хромосом человека на основе хромосом-специфичных RH-панелей [26, 42, 78, 92], установления мест локализации конкретных генов [14, 16, 56, 58, 96, 117] или STS, EST и других типов маркеров [11, 12, 13, 55, 97]. Это обусловлено тем, что радиационные гибриды не имеют недостатков, характерных для YAC-клонов, для которых описано большое количество перестроек в клонируемых фрагментах генома. В клетках радиационных гибридов не происходит делетирования или перестроек клонируемого материала, так как размножение фрагментов генома человека протекает в клетках млекопитающего (китайского хомячка). Кроме того, RH-панели более репрезентативны, поскольку в них представлены все последовательности генома, в том числе и те, которые не могли быть клонированы в мега-YAC-клонах. Наконец, RH-картирование – менее трудоемкий метод, поскольку весь геном человека представлен в панели ДНК из 83 – 180 клеточных линий радиационных гибридов, являющихся коммерческим препаратом. Необходимо также подчеркнуть, что метод с использованием радиационных гибридов для картирования STS-маркеров позволяет намного ускорить процесс получения конечного результата, так как скрининг всей панели гибридов ведется в один этап (в отличие от двухэтапного скрининга YAC-клонотеки), а данные о локализации по пробам RH-гибридов через Internet можно получить в течение 1–2 часов.

Ценность RH-карт также в том, что они являются связующими между цитогенетическими и физическими картами, между картами контигов и STS-картами [37, 47, 51, 91, 96]. Возможно также совмещение метода RH-картирования с другими методами картирования. Так, нами была построена интегрированная RH-карта хромосомы 3 человека, включающая 60 *NotI*-STS-маркеров [97] (рис. 3). *NotI*-STS-маркеры – это STS-маркеры, созданные на основе нуклеотидных последовательностей, прилегающих к сайтам рестрикции *NotI*. Более 90% *NotI*-сайтов расположены в 5'-не-

транслируемых областях генов, т.е. *NotI*-STS-маркеры являются универсальными маркерами генов. Таким образом, совмещение рестрикционного и RH-картирования позволило построить генную карту хромосомы 3 человека.

Преимуществом картирования с использованием радиационных гибридов соматических клеток является также возможность конструировать панели радиационных гибридов разного уровня разрешения с использованием различных доз гамма-облучения и создавать панели, содержащие фрагменты индивидуальных хромосом [36, 107]. В отличие от других стратегий картирования, подразумевающих определение положения основных или каркасных маркеров и распределение всех остальных маркеров относительно этих локусов, метод RH-картирования основан на определении наиболее вероятного порядка всех маркеров на хромосоме с последующим рассмотрением 20 – 35 групп сцепления маркеров и одновременным установлением наиболее вероятного порядка маркеров в пределах каждой группы сцепления. Полученный порядок сравнивают с порядком уже охарактеризованных маркеров на карте сцепления. Сравнение карт сцепления и карт, построенных с помощью YAC-клонов, с картами радиационных гибридов свидетельствует, что ошибка при их совмещении составляет не более 5%. Анализ 322 случайных кДНК показал, что RH-карта покрывает большую часть генома человека [96].

С появлением RH-панелей для других видов млекопитающих (таблица) получило распространение сравнительное картирование, при котором маркеры к одним и тем же генам локализуют в геномах разных видов, выявляя таким образом консервативные области геномов, изучая эволюцию геномов и устанавливая филогенетические связи между геномами различных видов млекопитающих. Так, построены RH-карты гомологичных участков хромосом человека и мыши [95, 116], человека и коровы [18], человека и свиньи [38, 62, 98, 99], человека и лошади [86], человека и собаки [67].

Необходимо также отметить, что RH-картирование можно эффективно использовать для поиска и локализации псевдогенов и генов-гомологов, ранее локализованных на других хромосомах методами генетического или цитогенетического картирования [74, 97].

Несмотря на появление в базах данных черновой последовательности генома человека (база данных HTGS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)) [54, 104], значение RH-картирования по-прежнему велико. Это обусловлено тем что геном человека был секвенирован не полностью: не секвенированы прицентроммерные и при-

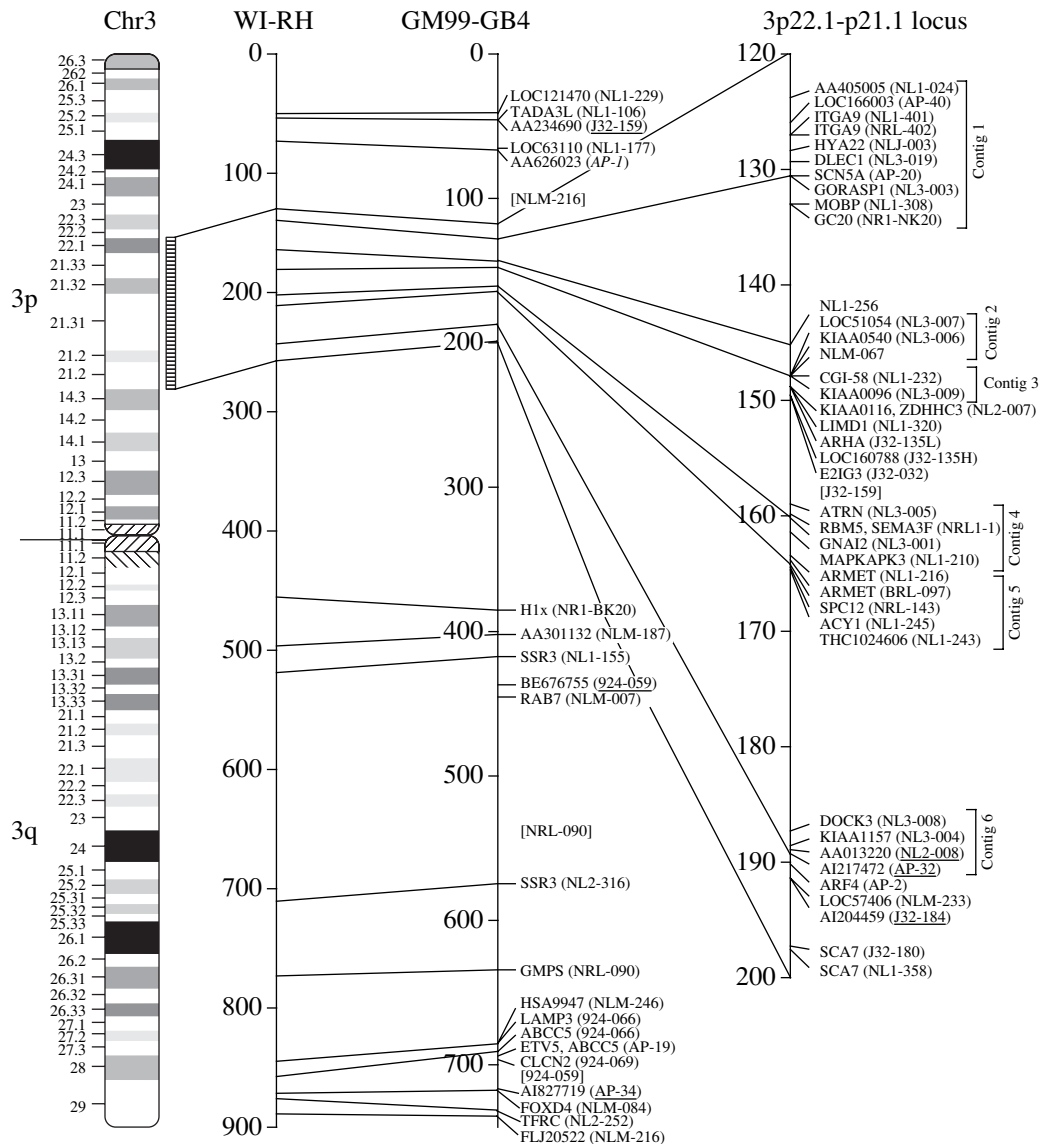


Рис. 3. Интегрированная RH-карта хромосомы 3 человека. Слева направо: идеограмма (G-бандинг), WI-RH-карта, карта GM99-GB4 (расстояния выражены в cR). Жирным выделены гены (в скобках приведено название *NotI*-STS-маркера); маркеры имеющие гомологии с мРНК и кДНК, подчеркнуты.

теломерные участки хромосом, многие повторяющиеся последовательности. Кроме того, далеко не все секвенированные фрагменты генома человека аннотированы, осталось много разрывов и неправильно состыкованных контигов. Так из 36678 STS-маркеров, локализованных в геноме человека с помощью RH-панели TNG4, 3604 (9.8%) отсутствовали в последовательностях, полученных Celera Genomics, а локализация 36% STS-маркеров не совпадала с локализацией соответствующих участков на черновой последовательности генома человека [82]. В этой связи RH-картирование представляется также и эффективным методом уточнения локализации и

взаимного расположения секвенированных последовательностей.

RH-картирование на сегодняшний день – один из самых эффективных, многоцелевых и точных методов картирования. Однако он не способен полностью заменить другие методы, поскольку создание рабочих рамок маркеров, относительно которых локализуются все исследуемые маркеры, возможно только на основе маркеров, локализованных другими методами. Помимо этого стремление достичь наибольшей эффективности зачастую требует применения одновременно нескольких методов картирования.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и технологии (программа “Поддержка научных школ”, грант НШ–827.2003.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гинзбург Э.Х., Свищева Г.Р., Юданин А.Я., Нестерова Т.Б., Закиян С.М. // Генетика. 1993. Т. 29. С. 1921.
2. Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. СПб.: Интермедика, 1999. 212 с.
3. Жданова Н.С. // Генетика. 2002. Т. 38. № 5. С. 581.
4. Забаровский Е.Р. // Молекулярн. биология. 2001. Т. 35. № 2. С. 224.
5. Забаровский Е.Р., Домнинский Д.А., Киселев Л.Л. // Молекулярн. биология. 1994. Т. 28. В. 6. С. 1231.
6. Захаров И.А. Генетические карты высших организмов. Л.: Наука, 1979. 158 с.
7. Захаров И.А., Никифоров В.С., Степанюк Е.В. // Успехи соврем. генетики. 1993. Вып. 18. С. 36.
8. Лобаишев М.Е. Генетика. Курс лекций. Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1967. 489 с.
9. Свищева Г.Р. // Генетика. 1999. Т. 35. № 1. С. 95.
10. Свищева Г.Р., Аксенович Т.И. // Генетика. 2000. Т. 36. № 2. С. 283.
11. Сулимова Г.Е., Компанийцев А.А., Кунижева С.С., Климов Е.А., Рахманалиев Э.Р., Удина И.Г. // Генетика. 2000. Т. 36. № 7. С. 900.
12. Сулимова Г.Е., Компанийцев А.А., Мойсяк Е.В., Рахманалиев Э.Р., Климов Е.А., Удина И.Г., Захаров И.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. № 5. С. 520.
13. Сулимова Г.Е., Удина И.Г., Кунижева С.С., Компанийцев А.А. // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. № 5. С. 791.
14. Удина И.Г., Баранова А.В., Компанийцев А.А., Сулимова Г.Е. // Генетика. 2001. Т. 37. № 1. С. 120.
15. Эфрусс Б. Гибридизация соматических клеток. М.: Мир, 1976. 195 с.
16. Albertin G., Rossi G.P., Majone F., Tiso N., Mattara A., Danieli G.A., Pessina A.C., Palu G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 221. P. 682.
17. Allikmets R., Kashuba V.I., Huebner K., LaForgia S., Kisselev L.L., Klein G., Dean M., Zabarovsky E.R. // Chromosome Research. 1996. V. 4. P. 33.
18. Band M.R., Larson J.H., Rebeiz M., Green C.A., Heyen D.W., Donovan J., Windish R., Steining C., Mahyuddin P., Womack J.E., Lewin H.A. // Genome Res. 2000. V. 9. P. 1359.
19. Barillot E., Dausset J., Cohen D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 3917.
20. Beasley E.M., Stewart E.A., McKusick K.B. Genome Mapping and sequencing. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, 1997. 295 p.
21. Bender V., Buschlen S., Cassio D. // J. Cel. Sci. 1998. V. 111. P. 3437.
22. Bihoreau M.T., Sebag-Montefiore L., Godfrey R.F., Wallis R.H., Brown J.H., Danoy P.A., Collins S.C., Rouard M., Kaisaki P.J., Lathrop M., Gauguier D. // Genomics. 2001. V. 75. P. 57.
23. Breen M., Jouquand S., Renier C., Mellersh C.S., Hite C., Holmes N.G., Cheron A., Suter N., Vignaux F., Bristow A.E., Priat C., McCann E., Andre C., Boundy S., Gitsham P., Thomas R., Bridge W.L., Spriggs H.F., Ryder E.J., Curson A., Sampson J., Ostrander E.A., Binns M.M., Galibert F. // Genome Res. 2001. V. 10. P. 1784.
24. Boehnke M., Lange K., Cox D.R. // Am. J. Hum. Genet. 1991. V. 49. P. 1174.
25. Bosman F.T., Schaberg A. // Nat. New. Biol. 1973. V. 241. P. 216.
26. Bouzyk M., Bryant S.P., Schmitt K., Goodfellow P.N., Ekong R., Spurr N.K. // Genomics. 1996. V. 34. P. 187.
27. Burke D.T., Carle G.F., Olson M.V. // Science. 1987. V. 236. P. 806.
28. Chumakov I., Bellanne-Chantelot C., LeGall I., Cohen D. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1993. V. 58. P. 377.
29. Chumakov I., LeGall I., Billaut A. // Nature Genet. 1992. V. 1. P. 222.
30. Cohen D., Chumakov I., Weissenbach J.A. // Nature. 1993. V. 366. P. 698.
31. Collins A., Morton N.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 1741.
32. Collins F.S. // Genome Analysis: A Practical Approach / Ed. Davis K.E. Oxford: IRL Press, 1988. P. 73.
33. Collins F.S., Drumm M.L., Cole J.L., Lockwood W.K., Vande Woude G.F., Iannuzzi M.C. // Science. 1987. V. 235. P. 1046.
34. Collins F., Weissman S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6812.
35. Comings D.E., Avelino E., Okada T.A., Wyandt H.E. // Exp. Cell. Res. 1973. V. 77. P. 469.
36. Cox D.R., Burmeister M., Price E.R., Kim S., Myers R.M. // Science. 1990. V. 250. P. 245.
37. Deloukas P., Schuler G.D., Gyapay G., Beasley E.M., Soderlund C., Rodriguez-Tome P., Hui L., Matisse T.C., McKusick K.B., Beckmann J.S., Bentolila S., Bihoreau M., Birren B.B., Browne J., Butler A., Castle A.B., Chiannikulchai N., Clee C., Day P.J., Dehejia A., Dibling T., Drouot N., Duprat S., Fizames C., Fox S., Gelling S., Green L., Harrison P., Hocking R., Holloway E., Hunt S., Keil S., Lijnzaad P., Louis-Dit-Sully C., Ma J., Mendis A., Miller J., Morissette J., Muselet D., Nusbaum H.C., Peck A., Rozen S., Simon D., Slonim D.K., Staples R., Stein L.D., Stewart E.A., Suchard M.A., Thangarajah T., Vega-Czarny N., Webber C., Wu X., Hudson J., Auffray C., Nomura N., Sikela J.M., Polymeropoulos M.H., James M.R., Lander E.S., Hudson T.J., Myers R.M., Cox D.R., Weissenbach J., Boguski M.S., Bentley D.R. // Science. 1998. V. 282. P. 744.
38. Demeure O., Renard C., Yerle M., Faraut T., Riquet J., Robic A., Schiex T., Rink A., Milan D. // Mamm. Genome. 2003. V. 1. P. 71.
39. Escayg A., Jones J.M., Kearney J.A., Hitchcock P.F., Meisler M.H. // Genomics. 1998. V. 50. P. 14.
40. Fan Y., Davis L.M., Shows T.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1990. V. 87. P. 6223.
41. Fedorova L., Kost-Alimova M., Gizatullin R.Z., Alimov A., Zabarovska V.I., Szeles A., Protopopov A.I., Vorobieva N.V., Kashuba V.I., Klein G., Zelenin A.V.,

- Sheer D., Zabarovsky E.R.* // Eur. J. Hum. Genet. 1997. V. 5. P. 110.
42. *Giacalone J., Li X., Lehrach H., Francke U.* // Genomics. 1996. V. 37. P. 9.
43. *Goodfellow P.N., Banting G., Wiles M.V., Tunnac-liffe A., Parkar M., Solomon E., Dalchau R., Fabre J.W.* // Eur. J. Immunol. 1982. V. 12. P. 659.
44. *Goss S.J., Harris H.* // Nature. 1975. V. 255. P. 680.
45. *Green E.D., Green P.* // PCR Methods Appl. 1991. V. 2. P. 77.
46. *Green E.D., Olson M.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 1213.
47. *Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillett D., Muselet D., Prud'Homme J.F., Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach J., Goodfellow P.N.* // Hum. Mol. Genet. 1996. V. 5. P. 339.
48. *Hageltorn M., Gustavsson I., Zech L.* // Hereditas. 1973. V. 75. P. 147.
49. *Holland J., Coffey A.J., Giannelli F., Bentley D.R.* // Genomics. 1993. V. 15. P. 297.
50. *Hozier J.C., Davis M.* // Anal. Biochem. 1992. V. 200. P. 205.
51. *Hudson T.J., Stein L.D., Gerety S.S., Ma J., Castle A.B., Silva J., Slonim D.K., Baptista R., Kruglyak L., Xu S.H., Hu X., Colbert A.M.E., Rosenberg C., Reeve-Daly M.P., Rozen S., Hui L., Wu X., Vestergaard C., Wilson K.M., Bae J.S., Maitra S., Ganiatsas S., Evans C.A., DeAngelis M.M., Ingalls K.A.* // Science. 1995. V. 270. P. 1945.
52. *Hukriede N.A., Joly L., Tsang M., Miles J., Tellis P., Epstein J.A., Barbazuk W.B., Li F.N., Paw B., Postlethwait J.H., Hudson T.J., Zon L.I., McPherson J.D., Chevrette M., Dawid I.B., Johnson S.L., Ekker M.* // PNAS USA. 1999. V. 96. P. 9745.
53. *Ichikawa H., Hosoda F., Arai Y., Shimizu K., Ohira M., Ohki M.* // Nature Genet. 1993. V. 4. P. 361.
54. International Human Genome Sequencing Consortium // Nature. 2001. V. 409. P. 860.
55. *Jacquemin P., Depetris D., Mattei M.G., Martial J.A., Davidson I.* // Genomics. 1999. V. 55. P. 127.
56. *Karnovsky A.M., Gotow L.F., McKinley D.D., Piechan J.L., Ruble C.L., Mills C.J., Schellin K.A., Slightom J.L., Fitzgerald L.R., Benjamin C.W., Roberds S.L.* // Gene. 2003. V. 319. P. 137.
57. *Kiguwa S.L., Hextall P., Smith A.L., Critcher R., Swinburne J., Millon L., Binns M.M., Goodfellow P.N., McCarthy L.C., Farr C.J., Oakenfull E.A.* // Mamm. Genome. 2000. V. 9. P. 803.
58. *Kim do K., Kanai Y., Matsuo H., Kim J.Y., Chairoungdua A., Kobayashi Y., Enomoto A., Cha S.H., Goya T., Endou H.* // Genomics. 2002. V. 79. P. 95.
59. *Koch J.E., Kolvraa S., Petersen K.B., Gregersen N., Bolund L.* // Chromosoma. 1989. V. 98. P. 259.
60. *Kruglyak L., Lander E.S.* // Am. J. Hum. Genet. 1995. V. 56. P. 1212.
61. *Kwok C., Critcher R., Schmitt K.* // Methods Cell Biol. 1999. V. 60. P. 287.
62. *Lahbib-Mansais Y., Leroux S., Milan D., Yerle M., Robic A., Jiang Z., Andre C., Gellin J.* // Mamm. Genome. 2000. V. 12. P. 1098.
63. *Lander E.S., Schork N.J.* // Science. 1994. V. 265. P. 2037.
64. *Lange K., Boehnke M.* // Ann. Hum. Genet. 1992. V. 56. P. 119.
65. *Lange K., Boehnke M., Cox D.R., Lunetta K.L.* // Genome Res. 1995. V. 5. P. 136.
66. *Larin Z., Monaco A.P., Lehrach H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 4123.
67. *Li R., Faraco J.H., Lin L., Lin X., Hinton L., Rogers W., Lowe J.K., Ostrander E.A., Mignot E.* // Genomics. 2001. V. 73. P. 299.
68. *Lingaas F., Comstock K.E., Kirkness E.F., Sorensen A., Aarskaug T., Hitte C., Nickerson M.L., Moe L., Schmidt L.S., Thomas R., Breen M., Galibert F., Zbar B., Ostrander E.A.* // Hum. Mol. Genet. 2003. V. 23. P. 3043.
69. *Littlefield J.W.* // Nature. 1964. V. 256. P. 495.
70. *Mahairas G.G., Wallace J.C., Smith K., Swartzell S., Holzman T., Keller A., Shaker R., Furlong J., Young J., Zhao S., Adams M.D., Hood L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 9739.
71. *McCarthy L.C., Terrett J., Davis M.E., Knights C.J., Smith A.L., Critcher R., Schmitt K., Hudson J., Spurr N.K., Goodfellow P.N.* // Genome Res. 1997. V. 12. P. 1153.
72. *Morton M.E.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 7474.
73. *Mrasek K., Heller A., Rubtsov N., Trifonov V., Starke H., Rocchi M., Claussen U., Liehr T.* // Cytogenet. Cell Genet. 2001. V. 93. P. 242.
74. *Muneer S., Ramalingam V., Wyatt R., Schultz R.A., Minna J.D., Kamibayashi C.* // Genomics. 2002. V. 79. P. 344.
75. *Murphy W.J., Menotti-Raymond M., Lyons L.A., Thompson M.A., O'Brien S.J.* // Genomics. 1999. V. 57. P. 1.
76. *Murphy W.J., Page J.E., Smith C. Jr., Desrosiers R.C., O'Brien S.J.* // J. Hered. 2001. V. 92. P. 516.
77. *Myers E.W., Sutton G.G., Delcher A.L., Dew I.M., Fasulo D.P., Flanigan M.J., Kravitz S.A., Mobarry C.M., Reinert K.H., Remington K.A., Anson E.L., Bolanos R.A., Chou H.H., Jordan C.M., Halpern A.L., Lonardi S., Beasley E.M., Brandon R.C., Chen L., Dunn P.J., Lai Z., Liang Y., Nusskern D.R., Zhan M., Zhang Q., Zheng X., Rubin G.M., Adams M.D., Venter J.C.* // Science. 2000. V. 287. P. 2196.
78. *Naylor S.L., Buys C.H.C.M., Carritt B.* // Cytogenet. Cell Genet. 1994. V. 65. P. 2.
79. *Newell W., Beck S., Lehrach H., Lyall A.* // Genome Res. 1998. V. 8. P. 493.
80. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. // Science. 1992. V. 258. P. 67.
81. *Nizetic D., Gellen L., Hamvas R., Mott R., Grigoriev A., Vatcheva R., Zehetner G., Yaspo M.L., Dutriaux A., Lopes C.* // Hum. Mol. Genet. 1994. V. 3. P. 759.
82. *Olivier M., Aggarwal A., Allen J., Almendras A.A., Bajorek E.S., Beasley E.M., Brady S.D., Bushard J.M., Bustos V.I., Chu A., Chung T.R., De Witte A., Denys M.E., Dominguez R., Fang N.Y., Foster B.D., Freudenberg R.W., Hadley D., Hamilton L.R., Jeffrey T.J., Kelly L., Lazzeroni L., Levy M.R., Lewis S.C.,*

- Liu X., Lopez F.J., Louie B., Marquis J.P., Martinez R.A., Matsuura M.K., Mishnerghy N.S., Norton J.A., Olshen A., Perkins S.M., Perou A.J., Piercy C., Piercy M., Qin F., Reif T., Sheppard K., Shokoohi V., Smick G.A., Sun W.L., Stewart E.A., Fernando J., Tejada, Tran N.M., Trejo T., Vo N.T., Yan S.C., Zierten D.L., Zhao S., Sachidanandam R., Trask B.J., Myers R.M., Cox D.R. // *Science*. 2001. V. 291. P. 1298.
83. Olson M., Hood L., Carton C., Botstein D. // *Science*. 1989. V. 245. P. 1434.
84. Poustka A. // *Methods Enzymol.* 1993. V. 217. P. 347.
85. Priat C., Hitte C., Vignaux F., Hitte C., Jiang Z., Cheron A., Renier C., Andre C., Galibert F. // *Genomics*. 1998. V. 54. P. 361.
86. Raudsepp T., Kata S.R., Piumi F., Swinburne J., Womack J.E., Skow L.C., Chowdhary B.P. // *Genomics*. 2002. V. 79. P. 451.
87. Rettig W.J., Dracopoli N.C., Goetzger T.A., Spengler B.A., Biedler J.L., Oettgen H.F., Old L.J. // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984. V. 81. P. 6437.
88. Rexroad C.E., Schlapfer J.C., Yang Y., Harlizius B., Womack J.E. // *Animal Genet.* 1999. V. 30. P. 325.
89. Roussel M.F., Sherr C.J., Barker P.E., Ruddle F.H. // *J. Virol.* 1983. V. 48. P. 770.
90. Sanchez O., Escobar J.I., Yunis J.J. // *Lancet*. 1973. V. 2. P. 269.
91. Schuler G.D., Boguski M.S., Stewart E.A., Stein L.D., Gyapay G., Rice K., White R.E., Rodriguez-Tome P., Aggarwal A., Bajorek E., Bentolila S., Birren B.B., Butler A., Castle A.B., Chiannikulchai N., Chu A., Clee C., Cowles S., Day P.J., Dibling T., Drouot N., Dunham I. et al. // *Science*. 1996. V. 274. P. 540.
92. Shaw S.H., Farr J.E., Thiel B.A., Matise T.C., Weissenbach J., Chakaravarti A., Richard C.W. // *Genomics*. 1995. V. 27. P. 502.
93. Shimizu N., Giles R.E., Kucherlapati R.S., Shimizu Y., Ruddle F.H. // *Somatic Cell Genet.* 1977. V. 3. P. 47.
94. Smith C.L., Lawrence S.K., Gillespie G.A., Cantor C.R., Weissman S.M., Collins F.S. // *Methods Enzymol.* 1987. V. 151. P. 461.
95. Steidl C., Leimeister C., Klamt B., Maier M., Nanda I., Dixon M., Clarke R., Schmid M., Gessler M. // *Genomics*. 2000. V. 66. P. 195.
96. Stewart E.A., McKusick K.B., Aggarwal A., Bajorek E., Brady S., Chu A., Fang N., Hadley D., Harris M., Husain S., Lee R., Maratukulam A., O'Connor K., Perkins S., Piercy M., Qin F., Reif T., Sanders C., She X., Sun W.L., Tabar P., Voyticky S., Cowles S., Fan J.B., Mader C., Quackenbush J., Myers R.M., Cox D.R. // *Genome Res.* 1997. V. 7. P. 422.
97. Sulimova G.E., Kutsenko A.S., Rakhmanaliev E.R., Udina I.G., Kompaniytsev A.A., Protopopov A.I., Mojsjak E.V., Klimov E.A., Muravenko O.V., Zelenin A.V., Braga E.A., Kashuba V.I., Zabarovsky E.R., Kisselev L.L. // *Cytogenet Genome Res.* 2002. V. 98. P.177.
98. Tanaka M., Matsumoto T., Yanai S., Domukai M., Toki D., Hayashi T., Kiuchi S., Yasue H., Uenishi H., Kobayashi E., Awata T. // *Anim. Genet.* 2003. V. 4. P.255.
99. Tiuchi S., Chen Y.Z., Uenishi H., Hayashi T., Soeda E., Yasue H. // *Cytogenet. Genome Res.* 2002. V. 98 P. 67.
100. Trask B., Pinkel D. // *Methods Cell Biol.* 1990. V. 33. P. 383.
101. Troyer D.L., Goad D.W., Xie H., Rohrer G.A., Alexander L.J., Beattie C.W. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1994. V. 67. P. 199.
102. Unakul W., Hsu T.C. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1972. V. 49. P. 1425.
103. Van Etten W.J., Steen R.G., Nguyen H., Nguyen H., Castle A.B., Slonim D.K., Ge B., Nusbaum C., Schuler G.D., Lander E.S., Hudson T.J. // *Nat. Genet.* 1999. V. 22. P. 93.
104. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A., Gocayne J.D., Amanatides P., Ballew R.M., Huson D.H., Wortman J.R., Zhang Q. et al. // *Science*. 2001. V. 291. P. 1304.
105. Vignaux F., Hitte C., Priat C., Chuat J.C., Andre C., Galibert F. // *Mamm. Genome.* 1999. V. 9. P. 888.
106. Walter M.A., Goodfellow P.N. // *Trends Genet.* 1993. V. 9. P. 352.
107. Walter M.A., Spillett D.J., Thomas P., Weissenbach J., Goodfellow P.N. // *Nature Genetics.* 1994. V. 7. P. 22.
108. Wang Ji-Yi, Zabarovsky E.R., Talmadge C., Berglund P., Chan K.W., Pokrovskaya E.S., Kashuba V.I., Zhen D.K., Boldog F., Zabarovskaya V.I., Kisselev L.L., Stanbridge E.J., Klein G., Sumegi J. // *Genomic.* 1994. V. 20. P. 105.
109. Wardrop J., Snape J., Powell W., Machray G.C. // *Plant J.* 2002. V. 2. P. 223.
110. Watanabe T.K., Bihoreau M.T., McCarthy L.C., Kigawa S.L., Hishigaki H., Tsuji A., Browne J., Yamasaki Y., Mizoguchi-Miyakita A., Oga K., Ono T., Okuno S., Kanemoto N., Takahashi E., Tomita K., Hayashi H., Adachi M., Webber C., Davis M., Kiel S., Knights C, Smith A., Critcher R., Miller J., Thangarajah T., Day P.J.R., Hudson J.R. Jr, Irie Y., Takagi T., Nakamura Y., Goodfellow P.N., Lathrop G.M., Tanigami A., James M.R. // *Nat. Genet.* 1999. V. 22. P. 27.
111. Weissenbach J., Gyapay G., Dib C., Vignal A., Morissette J., Millasseau P., Vaysseix G., Lathrop M. // *Nature.* 1992. V. 359. P. 794.
112. Werner P., Neuenschwander S., Stranzinger G. // *Anim. Genet.* 1999. V. 3. P. 221.
113. Wijnen L.M., Grzeschik K.H., Pearson P.L., Meera Khan P. // *Hum. Genet.* 1977. V. 37. P. 271.
114. Womack J.E., Johnson J.S., Owens E.K., Rexroad C.E. 3rd, Schlapfer J., Yang Y.P. // *Mamm. Genome.* 1997. V. 11. P. 854.
115. Woodroffe M.N., Tunnacliffe A., Pym B., Goodfellow P.N., Walsh F.S. // *Somat. Cell Mol. Genet.* 1984. V. 10. P. 535.
116. Xin Y., Yu L., Chen Z., Zheng L., Fu Q., Jiang J., Zhang P., Gong R., Zhao S. // *Genomics.* 2001. V. 74. P. 408.
117. Yamazaki K., Kusano K., Tadano K., Tanaka I. // *Genomics.* 1997. V. 44. P. 248.
118. Yen P.H., Marsh B., Mohandas T.K., Shapiro L.J. // *Somat. Cell Mol. Genet.* 1984. V. 10. P. 561.
119. Yerle M., Pinton P., Delcros C., Amal N., Milan D., Robic A. // *Cytogenet. Genome Res.* 2002. V. 97. P.219.

120. Yerle M., Pinton P., Robic A., Alfonso A., Palvadeau Y., Delcros C., Hawken R., Alexander L., Beattie L.B., Milan D., Gellin J. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1998. V. 82. P. 182.
121. Yunis J.J., Sanchez O. // *Chromosoma.* 1973. V. 44. P. 15.
122. Zabarovsky E.R. // *Mol. Biol. Biotechnol.*/Ed. Meyers R.A. N.Y.: VHS Publishers Inc., 1995. P. 228.
123. Zabarovsky E.R., Boldog F., Erlandsson R., Kashuba V., Allikmets R., Marcsek Z., Kisselev L., Stanbridge E., Klein G., Sumegi J., Winberg G. // *Genomics.* 1991. V. 11. P. 1030.
124. Zabarovsky E.R., Boldog F., Thompson T., Scanlon D., Winberg G., Marcsek Z., Erlansson R., Stanbridge E., Klein G., Sumegi J. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6319.
125. Zabarovsky E.R., Kashuba V.I., Gizatullin R.Z., Winberg G., Zabarovska V.I., Erlandsson R., Dominisky D.A., Bannikov V.M., Pokrovskaya E., Kholodnyuk I., Petrov N., Zakharyev V.M., Kisselev L.L., Klein G. // *Cancer Detect. Prev.* 1996. V. 20. P. 1.

Methods for Mapping of Mammalian Genomes

E. R. Rakhmanaliev, E. A. Klimov, G. E. Sulimova

Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The main methods of mapping mammalian genomes, their development and features are described. A classification of mapping methods is proposed. Their division into genetic, cytogenetic, and physical methods is based on methodological approaches using for the compilation of genetic maps. The method of mapping with the use of radiation hybrids of somatic cells (RH-mapping) is described in more details as the most efficient method for mapping of large genomes. The RH-mapping method has some advantages as compared to other methods. It is more precise, universal, and less laborious than other types of mapping.