Известия Гомельского государственного университета
имени Ф. Скорины, №4(31), 2005

УДК 575.1

Амплификация фрагментов ДНК с помощью метода ПЦР и его использование в диагностике наследственных заболеваний и искусственном мутагенезе

Г. Г. Гончаренко

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины

Характеристика метода амплификации ДНК

Несмотря на то, что методы исследования наследственного материала (нуклеиновых кислот) все время совершенствовались, тем не менее для анализа структуры ДНК требовалось определенное количество клеточного материала. Например, даже при использовании такого чувствительного метода, как **фингерпринт** (Watson et al, 1992; Snustad, Simmons, 1999; Griffits et al., 2000; Жимулев, 2002; Гончаренко, 2003,2004), требуется наличие капли крови или другого эквивалентного количества образца животной или растительной ткани, содержащих в клетках достаточное для анализа количество копий ДНК.

Ситуация радикально изменилась благодаря появлению метода, который был разработан Кэри Мюллисом. Этот метод получил название **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** и стал неотъемлемой процедурой, освоенной во всех генно-инженерных лабораториях мира (Snustad, Simmons, 1999; Griffits et al., 2000; Nichol, 2002; Hartwell et al., 2004). Использование ПЦР методики позволяет **амплифицировать (размножать)** ДНК или её фрагмент in vitro, увеличивая количество копий **в миллионы раз за несколько часов**. ПЦР осуществляют в пробирке с помощью специального термостабильного фермента ДНК-полимеразы **(Tag-полимеразы)**, набора всех четырех нуклеотидов А (аденин), Т (тимин), Г (гуанин) и Ц (цитозин) и коротких **олигонуклеотидных затравок** – праймеров. **Праймеры** – это короткие, длиной в **20-30 нуклеотидов**, одноцепочечные фрагменты ДНК, комплементарные **3'-концевым последовательностям** копируемой **ДНК-матрицы**. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопирован Tag-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к **3'-концам праймеров** и достраивающей их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рис. 1).

1. ***Денатурация***. Инкубационную смесь, в которой содержится образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90 °С. При этом в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК и из одной двухцепочечной молекулы образуется две одноцепочечные.

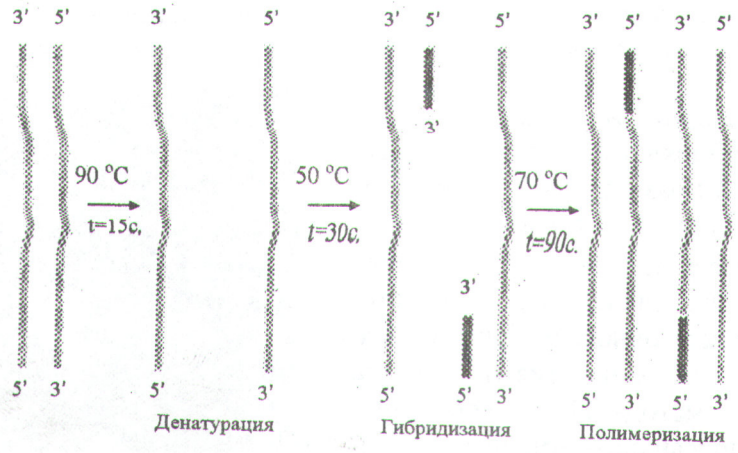


Рис. 1. Последовательные стадии одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ***Гибридизация праймеров.*** Температуру снижают до 50 °С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

3. ***Полимеризация.*** Инкубационную смесь нагревают до температуры 70°С. При этой температуре Tag-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате **количество ДНК удваивается**. Фермент Tag-полимераза был выделен из термофильных бактерий *Thermus aquaticus,* и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Tag-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины 10^6.

В последние годы удалось создать специальный прибор – **амплификатор**, с помощью которого все три стадии размножения ДНК производятся автоматически, что превратило процесс **ПЦР-амплификации** конкретной последовательности ДНК в простую задачу.

За разработку метода полимеразной цепной реакции, ПЦР в 1993 г. Кэри Мюллис (K. Mullis) был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

ПЦР технологии позволили ученым без огромных временных и материальных затрат получать точные данные по структуре генов и фрагментов ДНК при наличии самого минимального количества биологического материала. Одним из важнейших применений ПЦР стала **диагностика наследственных заболеваний** человека, особенно на **пренатальных стадиях развития** при наличии малого количества ДНК из **фетальных клеток** а, в некоторых случаях, даже из одного **бластомера**, выделенного из **зародыша (пре-эмбриона)** на стадии восьми зародышевых клеток. Вторым, не менее важным применением ПЦР технологий стала **дактилоскопия и идентификация индивидуумов**, используя материал ДНК, полученный из нескольких сперматозоидов, одного волоса.

Использование метода ПЦР в диагностике наследственных заболеваний

Наследственная болезнь Тея-Сакса является аутосомно-рецессивным заболеванием, которое характеризуется недостаточностью лизосомального фермента гексозаминидазы-А, в результате чего в нейронах накапливается ганглиозид G_{M2}. Симптомы заболевания начинают проявляться в возрасте 5 месяцев. В терминальной стадии болезни, которая развивается к 3-4 годам, наступает полная обездвиженность, глухота, слепота, трофические нарушения, декортикация и наступает смерть (Маккьюсик 1967; Фогель, Мотульски 1990).

В молодой американской семье первый ребенок (девочка) оказался с заболеванием Тея-Сакса и умер в возрасте 4 лет. Супруги естественно хотели бы иметь здорового ребенка. Проведение молекулярно-генетической диагностики заболевания на эмбриональной стадии путем амниоцитоза для этой семьи не приемлемо по религиозным причинам. Поскольку, если эмбрион окажется вновь с мутантными аллелями, несущими заболевание, супруги не смогут пойти на прерывание беременности, следуя религиозным канонам.

Несмотря на все вышеизложенное благодаря достижениям современной генетики, выход был найден.

Для этого на первом этапе необходимо у жены взять несколько яйцеклеток и оплодотворить спермой мужа. На стадии развития восьми бластомеров из каждого пре-эмбриона можно безболезненно изъять для анализа по одному бластомеру. Фотография процесса извлечения одного бластомера (клетки) из восьмиклеточного эмбриона представлена на рисунке 2. После изъятия из каждого бластомера, на основе метода ПЦР необходимо получить достаточное для анализа количество ДНК и провести Саузерн-блот анализ полученной ДНК с использованием специального ДНК-зонда.

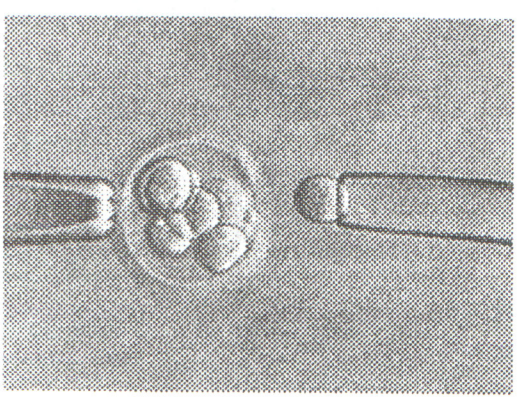


Рис. 2. Фотография процесса извлечения одного бластомера из восьмиклеточного эмбриона

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф. Скорины

По электрофоретическим спектрам ДНК после Саузерн-блот анализа легко установить, имеется ли дефектный ген заболевания Тея-Сакса в гомозиготном и гетерозиготном состоянии в конкретном восьмиклеточном эмбрионе, или этот эмбрион является нормальной гомозиготой. Такие не несущие мутантных алелей эмбрионы и необходимо в первую очередь оставлять для имплантации и дальнейшего эмбрионального развития. В то же время половина эмбрионов окажутся гетерозиготными, и у них также заболевание Тея-Сакса будет отсутствовать и в случае необходимости их можно использовать для имплантации.

Выше названная религиозная американская семья, оба супруга в которой являются гетерозиготными носителями заболевания Тея-Сакса успешно прошли все этапы от зачатия в пробирке in vitro и молекулярно-генетического теста до рождения здорового ребенка. Сейчас их дочери Бритни 8 лет и родители счастливы.

Миотоническая дистрофия (MD) характеризуется прогрессирующей дегенерацией мышц на взрослых стадиях и наследуется по доминантно-аутосомному типу. Этот ген содержит район так называемых расширяющихся (expansed) тринуклеотидных повторов ЦТГ. Нормальные аллели гена MD содержат от 5 до 30 копий ЦТГ, тогда как мутантные от 50 до 2000 копий.

Поскольку в настоящее время известна вся последовательность гена миотонической дистрофии (MD) то можно синтезировать олигонуклеотидные праймеры, комплементарные обеим цепочкам фрагмента ДНК в гене MD и размножить этот фрагмент методом ПЦР. Праймер 1 должен быть комплементарным району нижней (3'-5') цепочки, несущей последовательность ГАЦ, а праймер 2 должен быть комплементарен району верхней (5'-3') цепочки ДНК, несущей ЦТГ. После амплификации размер фрагмента ДНК содержащего ЦТГ повторы определяется электрофорезом. Количество тринуклеотидных повторов ЦТГ легко устано-

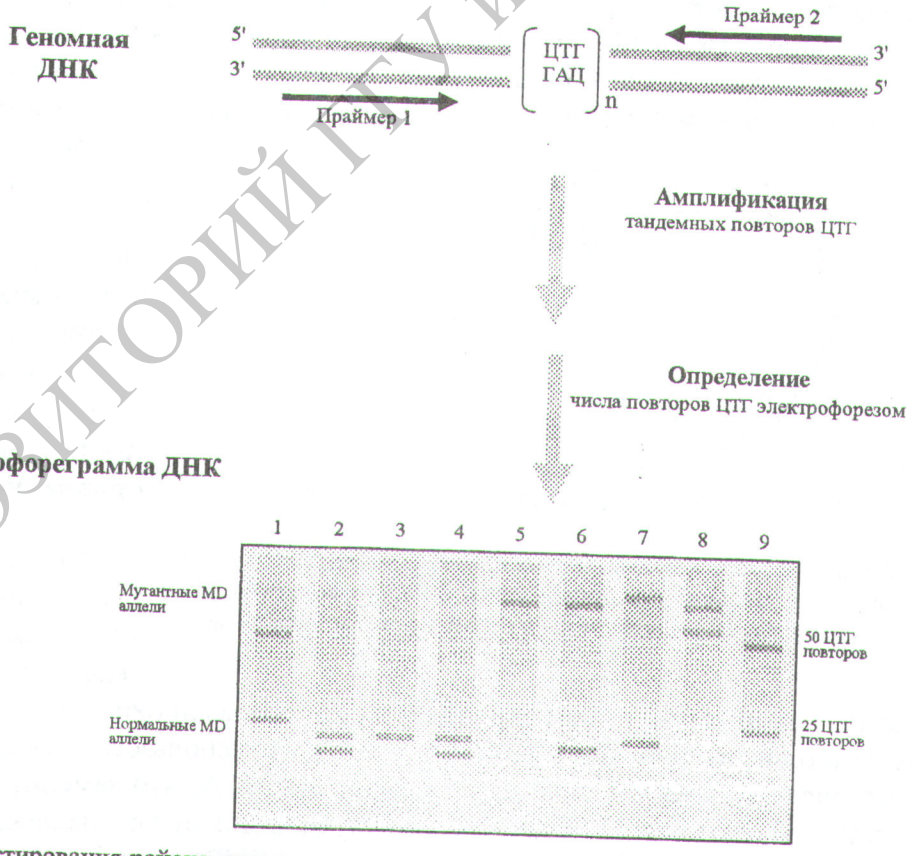


Рис. 3. Этапы тестирования района тринуклеотидных повторов ЦТГ в гене MD, ответственном за заболевание миотоническая дистрофия с использованием метода ПЦР и электрофореза. Образцы 1, 9 – маркеры с 20 и 50 повторами ЦТГ, образцы 2-4 – члены семьи с нормальными аллелями гена MD, 5-8 – образцы несущие мутантные аллели гена MD.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

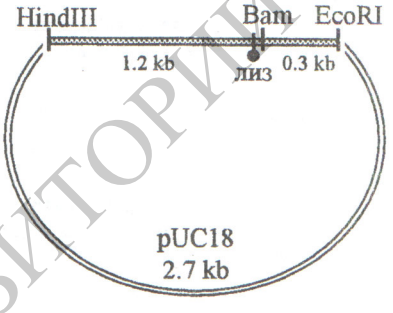
вить включением в гель в качестве маркеров последовательности ДНК с известным количеством повторов ЦТГ.

Все этапы тестирования заболевания миотонической дистрофии по гену MD с использованием методов ПЦР и электрофореза схематически представлены на рисунке 3. Если менее чем 30 копий ЦТГ повтора присутствует в каждой хромосоме, это означает, что ребенок, фетус или бластомер из восьмиклеточного пре-эмбриона является гомозиготным по нормальному MD аллелю (см. Рис. 3, образец 3 на электрофореграмме) или гетерозиготным по двум нормальным аллелям (Рис. 3, образцы 2, 4). Если более чем 50 копий ЦТГ повтора несет каждая гомологичная хромосома, то ребенок, фетус или пре-эмбрион является гомозиготным по доминантному мутантному аллелю MD (образец 5) или гететозиготным по различным мутантным аллелям (образец 8). Если одна хромосома содержит менее чем 30 копий ЦТГ повтора, а другая гомологичная хромосома содержит более чем 50 копий, то новорожденный, фетус или пре-эмбрион являются гетерозиготами несущими один нормальный, а другой мутантный аллели гена MD (образцы 6, 7).

Направленный сайт-специфический мутагенез

Киназы являются переносчиками фосфатных групп от молекулы АТФ к субстрату. В ходе изучения функциональных свойств активного центра одной из киназ понадобилось дезактивировать данный фермент. Ключевой аминокислотой входящей в субстратный карман связывания киназы с АТФ является положительно заряженная аминокислота лизин. Предполагается, что если ее заменить на другую аминокислоту, то связывание с АТФ нарушится и фермент перестанет работать.

Последовательность к-ДНК длиной в 1.5 kb кодирующая белок R-киназу была встроена в плазмиду pUC18 по сайтам рестрикции HindIII и EcoRI. Схема генетического конструкта с рестриктазной картой киназного гена в плазмиде с указанием местоположения триплета, кодирующего аминокислоту лизин, которая располагается в субстратном кармане киназы представлена на рисунке 4. Там же приведена последовательность нуклеотидов, расположенная в начале и в активном центре данного гена.



5'-AAГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ.....ЦЦТГТТТТАААЦГГАТЦЦТТГ.....-3'

Рис. 4. Схема генетического конструкта с рестриктазной картой R-киназного гена в плазмиде с указанием местоположения триплета, кодирующего аминокислоту лизин, которая располагается в субстратном кармане киназы

Заменить одну аминокислоту на другую в белке R-киназа можно путем **направленного введения точковой мутации** в праймер с последующим проведением ПЦР. Так как надо заменить положительно заряженную аминокислоту лизин, кодируемую триплетом ААА, на другую аминокислоту, то нам достаточно будет заменить один из трех А на другой нуклеотид и использовать вместо ААА триплет ААТ, что приведет к замене лизина на аспарагин или ГАА, что заменит лизин на отрицательно заряженный глютомат. Так как в нашем случае триплет лизина лежит непосредственно перед сайтом рестрикции BamI можно при помощи ПЦР амплифицировать часть гена R-киназы длинной 1.2 kb от сайта HindIII до BamI.

При этом, включив при конструкции праймеров сайты рестрикции для HindIII и BamI мы сможем в дальнейшем по этим сайтам проводить клонирование амплифицированного участка гена R-киназы.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф.Скорины

Для удобства конструирования нужных праймеров достроим вторую цепочку для участка гена R-киназы

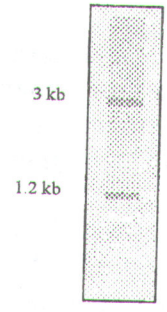
5'-ААГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ.....ЦЦТГТТТТАААЦГГАТЦЦТТГ.....-3'
3'-ТТЦГААТАЦТТАГТАЦАЦГГА.....ГГАЦАААТТТТГЦЦТАГГААЦ.....-5'

и легко построим первый праймер, который будет иметь последовательность 5'-АЛГЦТТАТГАЦТЦАТГТГЦЦТ-3'. Что касается праймера №2, то если бы нам нужно было амплифицировать фрагмент гена без мутации, он бы выглядел следующим образом 5'-ЦАЛГГАТЦЦГТТТТАЛЛЛЦАГГ-3', но поскольку нам нужно заменить лизин на аспартат, то триплет ТТТ в праймере №2 изменится на ТТЦ и наш праймер примет вид 5'-ЦАЛГГАТ-ЦЦГТТЦТАЛЛЛЦАГГ-3'.

Построенные нами праймеры позволят с помощью ПЦР на первом этапе амплифицировать (размножить) фрагмент киназного гена величиной 1.2 kb от сайта HindIII до BamI. Причем в этом фрагменте произойдет полное замещение триплета ААА, кодирующего лизин, на триплет ГАА, кодирующего глютомат.

Так как амплифицированный нами участок R-киназы длинной 1.2 kb будет естественно представлять собой двухцепочечную ДНК, то, обработав его ферментами рестрикции HimdIII и BamI, мы получим молекулу с двумя липкими концами, которую можно использовать в дальнейшем клонировании.

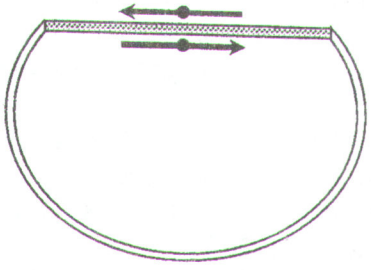
На следующем этапе надо заменить участок исходного R-киназного гена от HindIII до BamI, на полученный нами с помощью ПЦР мутантный. Для этого надо вырезать данный участок из исходного конструкта в плазмиде pUC18 (см. рис. 4), используя рестриктазы HindIII и BamI. Полученную смесь двух молекул - 1.2 kb (фрагмент гена R-киназа) и 3 kb (2.7 kb pUC18 + 0.3 kb остаток гена R-киназа) для разделения необходимо подвергнуть электрофорезу в агарозном геле. Вследствие разной величины два фрагмента в геле легко отделятся друг от друга, что хорошо видно на рисунке справа. Верхнюю более тяжелую фракцию длинной в 3 kb можно вырезать из геля и после очистки (при помощи специальных смол) получим чистый фрагмент ДНК. Причем он будет иметь липкие концы по сайтам HindIII и BamI.



Далее сшиваем при помощи лигазы фрагмент длиной в 3 kb выделенный из геля, и фрагмент с мутацией длиной 1.2 kb полученный нами ранее при помощи ПЦР. В результате у нас будет новая генетическая конструкция с мутантным геном R-киназы, встроенным в pUC18.

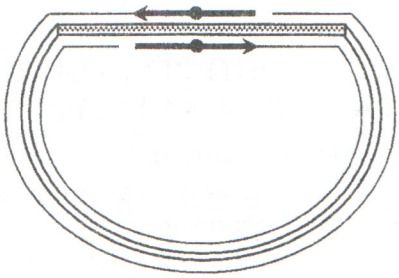
В последнее время для искусственного сайтспецифического мутагенеза используется еще один способ получения нужных точковых мутаций, который рассмотрен ниже.

В кольцевую плазмиду встроен фрагмент гена, кодирующий важный белок. Для того, чтобы заменить в этом белке одну аминокислоту на другую конструируются два комплементарных антипарралельных праймера с точковыми мутациями, изменяющими кодон.

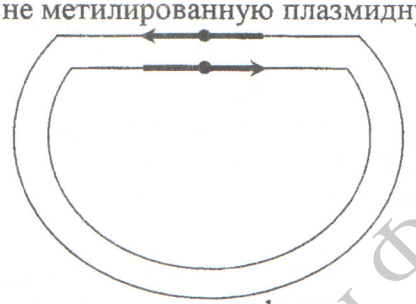


На первом этапе проводится присоединение (отжиг) сконструированных олигонуклеотидных праймеров, содержащих требуемую мутацию к соответствующим комплементарным последовательностям, встроенного в плазмиду участка ДНК. Далее, используя специальный фермент Pfu Turbo ДНК-полимераза производится достраивание кольцевой молекулы ДНК плазмиды и встроенного фрагмента. В результате на обеих материнских матрицах образуются (достроятся) новые кольцевые цепочки ДНК уже с измененной последовательностью, содержащие точковую мутацию.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф.СКОРИНЫ



На втором этапе происходит разрушение только метилированной материнской ДНК с использованием эндонуклеазы DpnI. Данная эндонуклеаза избирательно разрушает метилированную ДНК, которая характерна для всех бактерий, но не затрагивает вновь синтезированную при помощи праймеров не метилированную плазмидную мутантную ДНК.



Плазмидами содержащими мутацию трансформируют XL10-Gold ультрокомпетентные бактериальные клетки. На завершающем этапе культивирование бактериальных клеток позволяет получить достаточно большое количество плазмид, несущих вставку ДНК с нужной мутацией.

Abstract. The article describes such modern molecular and genetic methods as PCR analysis of fragments of DNA. Some examples of using this methods in the diagnostic of hereditary diseases and mutagenesis have been described.

Литература

1. Г. Г. Гончаренко, *Основы генетической инженерии.* Учебное пособие, Отв. ред. Л. В. Хотылева, Гомель, УО «ГГУ им. Ф.Скорины», 2003.

2. Г. Г. Гончаренко, *Генная дактилоскопия и сиквенирование (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК,* Известия Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины, Гомель, № 3 (2004), 13–17.

3. И. Ф. Жимулев, *Общая и молекулярная генетика*: Учебное пособие, Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 2002.

4. В. Маккьюсик, *Генетика человека*, Пер. с англ., Москва, Мир, 1967.

5. Ф. Фогель, А. Мотульски, *Генетика человека: В 3-х т.*, **1-2**: Пер. с англ., Москва, Мир, 1990.

6. D. Nicholl, *An introduction to genetic engineering*, Second edition, Cambridge university press, 2002.

7. L. Hartwell, L. Hood, M. Coldbers, L. Sylvir, R. Vercs, *Genetics: from genes to genomes*, McGraw Hill: Higher education, New York, 2004.

8. A. J. F. Griffiths, W. M. Gelbart, J. H. Miller, R. C. Lewontin, *An introduction to genetic analysis*, Freeman and company, New York, 2000.

9. P. Snustad, M. Simmons, *Principles of genetics,* Second edition, John Wiley & Sons, New York, 1999.

10. J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller, *Recombinant DNA*, Second edition, Scientific American Books, New York, 1992.

Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины

Поступило 15.03.05

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ имени Ф.Скорины