

Генная дактилоскопия и сиквенирование (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК

Г. Г. ГОНЧАРЕНКО

В геноме каждого человека имеется так называемая **минисателлитная ДНК**. В основе её строения лежит **строгая последовательность** состоящая из **13 нуклеотидов**. Цепочка одной **минисателлитной ДНК** может насчитывать таких повторяющихся последовательностей от одной до нескольких тысяч. У людей имеется два и более десятков **минисателлитных цепочек** расположенных на разных хромосомах. В совокупности они образуют набор минисателлитных ДНК различающихся по длине. Было обнаружено, что для **каждого человека** характерен свой, присущий только ему **вариант набора** таких **тандемно повторяющихся последовательностей** отличающихся по длине, то есть по числу отдельных звеньев. Иными словами ситуация оказалась сходной с отпечатками пальцев человека у каждого имеется собственная минисателлитная ДНК. Поэтому и метод анализа фрагментов минисателлитной ДНК получил название **генной дактилоскопии (фингерпринт ДНК)**.

Технология генной дактилоскопии включает ряд хорошо разработанных методов (Watson et al, 1992; Snustad, Simmons, 1999; Griffiths et al., 2000; Жимулев, 2002; Гончаренко, 2003). Сначала из каких либо клеток выделяют ДНК и с помощью специальных ферментов рестриктаз разрезают её на фрагменты разной длины. Среди фрагментов естественно будут те, которые содержат **вариабельные минисателлиты**. Далее проводится стандартный Саузерн-блот анализ. Все полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в геле и **фракции**

содержащие минисателлитную ДНК выявляются с помощью специального радиоактивно меченого зонда комплементарного к звену из 13 повторяющихся нуклеотидов. Так как зонд радиоактивен, то он засвечивает, наложенную на гель рентгеновскую плёнку только в определённых местах, давая картину из нескольких десятков чередующихся темных фракций, соответствующих отдельным минисателлитам. Схематическое изображение этапов использования **вариабельного числа тандемных повторов (VNTRs, variable number tandem repeats)** при проведении фингерпринта ДНК, взятой у двух мужчин Василия и Михаила представлена на рис. 1.

Для двух людей картина на автордиограмме существенно отличается как по числу, так и по расположению и интенсивности фракций. Чем более родственны анализируемые особи, тем число совпадающих полос после **фингерпринта ДНК** будет больше и наоборот. Полностью совпадающие спектры **минисателлитной ДНК** выявляются только у одно-

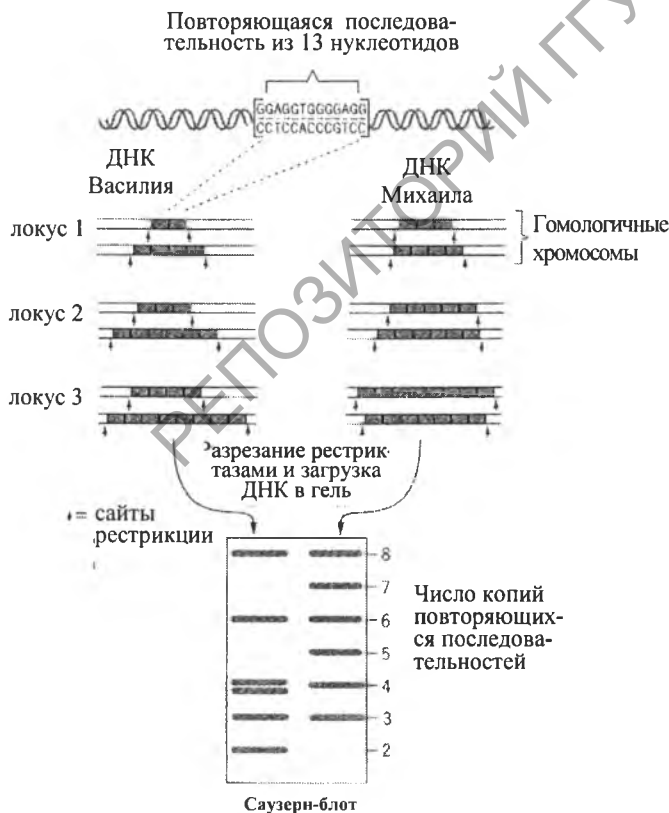


Рис. 1. Упрощенная схема использования вариабельного числа тандемно повторяющихся последовательностей в проведении фингерпринта ДНК.

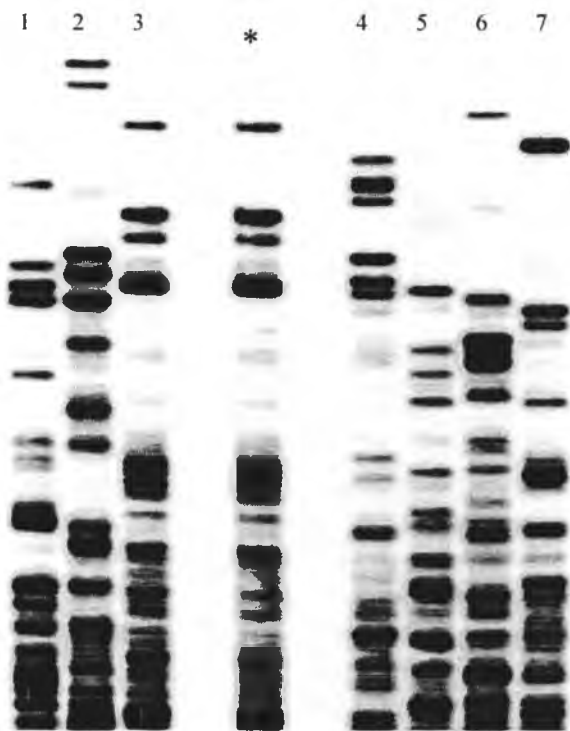


Рис. 2. Фингерпринт спектров минисателлитной ДНК образца капли крови убийцы и семи подозреваемых в преступлении.

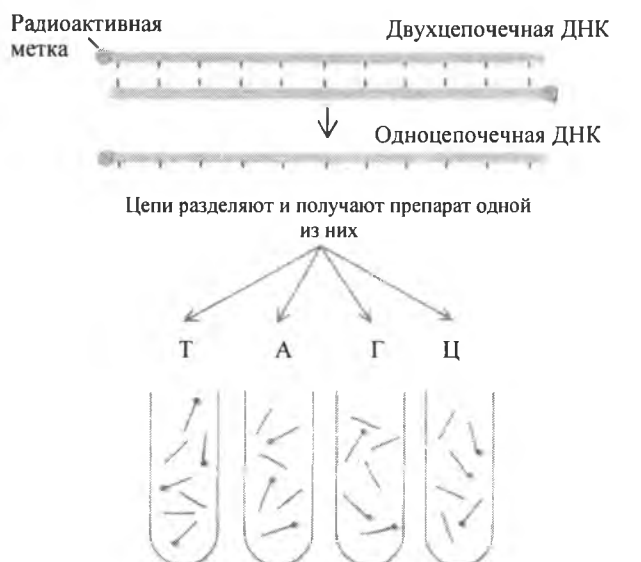
крови предполагаемого преступника, которую удалось обнаружить на месте преступления. В то же время подозрение в совершении преступления с других шести человек на основании полученных молекулярно-генетических данных можно снять.

Фингерпринт, Саузерн блоттинг и другие методы анализа рестриционных фрагментов ДНК дали возможность сделать много важных открытий в генной инженерии, но настоящим успехом стала разработка методов сиквенирования фрагментов ДНК длиной 100-500 нуклеотидных пар (Watson et al., 1992; Snustad, Simmons, 1999; Griffiths et al., 2000; Гончаренко, 2003). Первый прямой метод определения последовательности ДНК был предложен Фредом Сэнгером (F. Sanger) в 1975 г. Он основан на элонгации ДНК при помощи фермента ДНК-полимеразы. Этим способом была быстро сиквенирована короткая ДНК фага φx174, длиной около 5400 нуклеотидных пар (баз) или 5,4 килобазы (кб). Столь же мощный метод сиквенса ДНК был разработан Алланом Максамом (А. Maxam) и Уолтером Гилбертом (W. Gilbert) в 1977 г. в Гарвардском университете. С его помощью менее чем за год удалось установить последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб). Метод сиквенирования ДНК по Максаму-Гилберту заключается в следующем. Один из концов фрагмента ДНК, последовательность которого нужно прочитать (сиквенировать) метят с помощью радиоактивного изотопа фосфора ^{32}P . Препарат меченой ДНК делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается набор меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Например, если остатки Г находятся на расстоянии 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов от меченого конца, как в случае рассмотренном на рисунке 3, то обработка данной цепи ДНК реагентами, разрушающими Г, приведёт к образованию меченых фрагментов длиной 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов (при этом, естественно образуются еще и фрагменты длиной 3 и 4 нуклеотида, но эти фрагменты, рас-

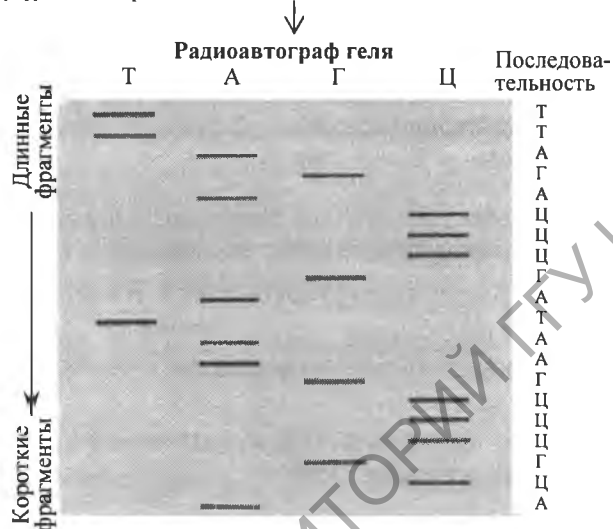
яйцевых близнецов. Следует добавить, что метод фингерпринта минисателлитной ДНК обладает высокой чувствительностью и анализ можно проводить на одной капле крови или нескольких волосных луковиц. Ниже рассмотрен пример успешного применения этого метода в криминалистике.

Так несколько лет назад в ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружена капля крови принадлежащая убийце. Спектры ДНК данной капли крови, а также семи подозреваемых, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 2. Спектр ДНК образцов капли крови, оставленный преступником на радиограмме отмечен звёздочкой, а спектры семи подозреваемых - цифрами.

Исходя из представленных спектров ДНК после фингерпринта легко определить, кто из семи подозреваемых является предполагаемым преступником. Это может быть только человек образцы ДНК которого представлены дорожке № 3, поскольку только здесь все фракции полностью совпадают со спектрами ДНК капли



Химическим путем разрушают одно из четырех оснований, в результате чего происходит расщепление цепи в соответствующих точках. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы в каждой точке расщеплялись только некоторые из цепей; при этом получается набор фрагментов разной длины



С помощью электрофореза в геле фрагменты разделяются по размеру; те из них, которые содержат радиоактивную метку, оставляют «отпечатки» на рентгеновской пленке. По положению этих отпечатков можно определить, какое именно основание было разрушено при образовании каждого из радиоактивных фрагментов

Рис. 3. Этапы подготовки образцов и сиквенирования меченой изотопом фосфора ³²P молекулы ДНК методом Максама-Гилберта

АГТГАААТЦАТТЦТГТГААЦГ.

В последние годы вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК используются флюорисцентное окрашивание. Флюорисцентные красители разного цвета применяются для каждого из четырёх нуклеотидов и четыре смеси электрофорезируются вместе. Флюорисцентный анализ позволяет определять последовательность ДНК автоматически, что даёт возможность прочитывать более 1000 нуклеотидных пар за одну операцию (Snustad, Simmons, 1999; Griffiths et al., 2000).

Часто для анализа используется и митохондриальная ДНК. Известно, что она передаётся потомкам только с яйцеклеткой, т. е. наследуется по материнской линии. Анализ нуклеотидной последовательности

положенные между остатками Г, будут не мечеными). Наборы меченых фрагментов, образующихся при каждой из четырёх реакций, подвергают электрофорезу в соседних дорожках полиакриламидного геля, при этом происходит разделение фрагментов ДНК в соответствии с их размерами. Затем проводят радиоавтографию геля. Набор полос, регистрируемых на рентгеновской плёнке, «читают», определяя таким образом нуклеотидную последовательность ДНК. Так в примере представленном на рисунке 3 последовательность цепочки ДНК от меченого конца будет следующая: АЦГЦЦЦГААТАГЦЦАГАТТ.

Для анализа последовательностей ДНК широко используется также метод Сэнгера основанный на использовании дидезокси нуклеотидов (Watson et al, 1992; Snustad, Simmons, 1999; Griffiths et al., 2000; Гончаренко, 2003).

На рис. 4 приведена радиоавтография полиакриламидного геля, полученного в результате сиквенирования по методу Сэнгера небольшого фрагмента ДНК важного гена человека длиной 50 нуклеотидных пар.

Исходя из электрофоретического спектра ДНК представленного на радиограмме (рис. 4) можно легко определить нуклеотидную последовательность данного фрагмента уже рассмотренным нами способом. Так, просиквенированный фрагмент ДНК важного гена человека будет иметь следующую последовательность своих 50 нуклеотидов: ТАТЦАГАТЦТГЦААЦТЦАТАТГАТЦГАГ-



Рис. 4. Схема радиограммы сиквенса ДНК человека



Рис. 5. Семья последнего российского императора Николая II. Царица Александра Фёдоровна вверху справа, Анастасия и Алексей сидят обнявшись.

мянника Карла Маучера, а также герцога Эдинбургского, который является племянником последней русской царицы Александры – матери Анастасии (Snustad, Simmons, 1999; Гончаренко, 2003).

Если бы Анна Мэнехен действительно была принцессой Анастасией, то её мтДНК была такой же, как у всех родственников последней русской царицы Александры, включая её племянника герцога Эдинбургского. И короткий фрагмент проанализированной мтДНК у неё был бы ТТЦТЦ. Но фрагмент её мтДНК имеет другой состав и полностью совпадает с мтДНК её истинного племянника

Карла Маучера, все предки и родственники которого никогда не имели родственных связей с королевскими семьями Европы, в том числе с семьёй последнего русского царя Николая II.

Следовательно, исходя из полученных молекулярно-генетических данных по сиквенсу короткого фрагмента митохондриальной ДНК можно однозначно утверждать, что Анна Мэнехен не являлась принцессой Анастасией.

Таким образом, в последние годы разработанные технологии и методы генной дактилоскопии и сиквенирования нуклеотидных последовательностей ДНК, рассмотренные выше становятся широко доступными и с успехом применяются не только в молекулярной генетике и других биологических науках, но и в таких практических областях как криминалистика, медицина, санитарная эпидемиология.

Abstract

The article describes such modern molecular and genetic methods as analysis of restriction fragments of DNA molecules by Southern Blot Hybridization, Maxam-Gilbert DNA sequencing, Sanger DNA sequencing (sequencing DNA by 2',3'-deoxynucleoside triphosphate chain-termination procedure). Some examples of using this methods in the criminalistics and medicine have been described.

Литература

1. Гончаренко Г.Г. Основы генетической инженерии Учебное пособие / Отв.ред. Л.В. Хотылева.– Гомель: УО «ГГУ им. Ф.Скорины», 2003. – 118 с.
2. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с.
3. Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H., Lewontin R.C. An introduction to genetic analysis. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

тельности митохондриальной ДНК позволил установить истину в одной почти детективной истории. Долгие годы многие верили, что некая Анна Мэнехен является Анастасией, спасшейся от смерти дочерью русского царя Николая II и его жены Александры (рис. 5). Другие же считали Анну Мэнехен самозванкой. Однако однозначных объективных доказательств своей правоты ни та, ни другая сторона предоставить не могли.

Ниже приведён фрагмент нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) Анны Мэнехен, её племянника Карла Маучера, а также герцога Эдинбургского, который является племянником последней русской царицы Александры – матери Анастасии (Snustad, Simmons, 1999; Гончаренко, 2003).

	Фрагмент митохондриальной ДНК					
Анна Мэнехен	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
Карл Маучер (племянник Мэнехен)	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
герцог Эдинбургский (племянник Александры)	Т	Т	Ц	Ц	Т	Ц

4. Snustad P., Simmons M. Principles of genetics. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.

5. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J. and Zoller M. Recombinant DNA/ Second edition. – Scientific American Books. New York. 1992. – 430 p.

Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины

Поступило 15.01.04

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

