

УДК 575.1

## Инструменты генной инженерии в ходе анализа фрагментов ДНК

Г.Г. ГОНЧАРЕНКО

### Ферменты рестрикции и лигирования ДНК

Для того, чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него хотя бы один чужеродный ген. Причем необходимо приготовить (сконструировать) фрагмент чужеродной ДНК, содержащий этот нужный ген.

Осуществляется эта процедура с помощью двух операций "разрезания" и "сшивания". Роль портняжных инструментов играют **ферменты рестриктазы и лигазы**.

**Рестриктазы** (своеобразные молекулярные ножницы), действуя на двухцепочечную ДНК, "узнают" в ней определенную последовательность нуклеотидов. Причем каждая рестриктаза узнает только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, чью ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были **распознаваемые участки**. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим, из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (слепить) друг с другом (Щелкунов, 1987; Watson et al., 1992; Snustad, Simmons, 1999; Griffiths et al., 2000; Nicholl, 2002; Гончаренко, 2005а).

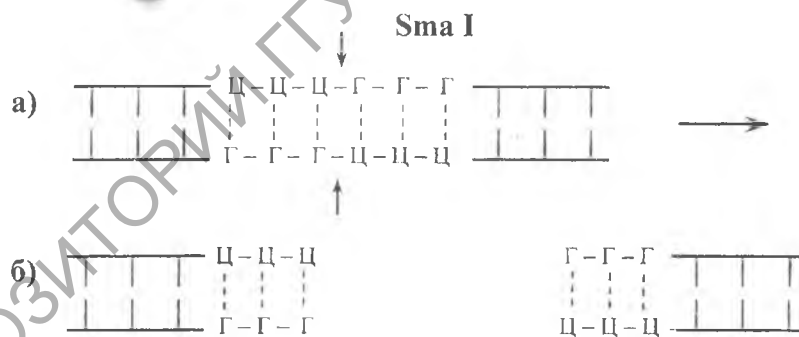
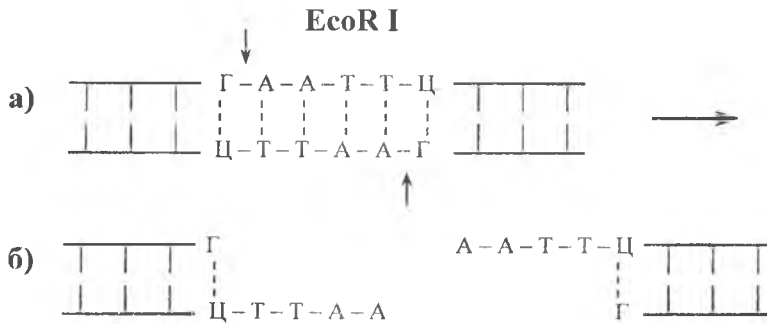


Рис. 1. а) схема действия фермента рестриктазы Sma I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; б) фрагменты ДНК с тупыми концами после разрезания ферментом SmaI.

Обычно рестриктазы распознают в молекулах ДНК очень короткие, но строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4 – 6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с **ровными (тупыми) концами**, как, например, при действии рестриктазы SmaI на рис. 1, а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочечные концы называются **"липкими"**, поскольку они могут как бы слипаться между собой в силу комплементарности.

Ярким примером рестриктазы второго типа является EcoRI, которая узнает фрагмент ДНК из шести нуклеотидов ГААТТЦ, и режет эту последовательность ДНК ассиметрично, «ступенькой» между нуклеотидами Г и А (рис. 2). В результате место разреза в одной цепи смещено по отношению к другой на 4 пары оснований. При таком разрезе образуется два выступающих конца. Эти концы притягиваются друг к другу, желая восстановить свои старые

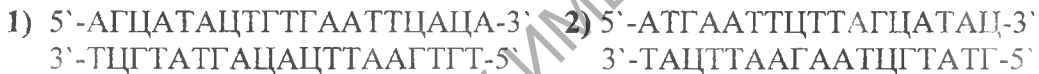


**Рис. 2.** а) схема действия фермента рестриктазы EcoR I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; б) фрагменты ДНК с липкими концами после разрезания ферментом EcoR I.

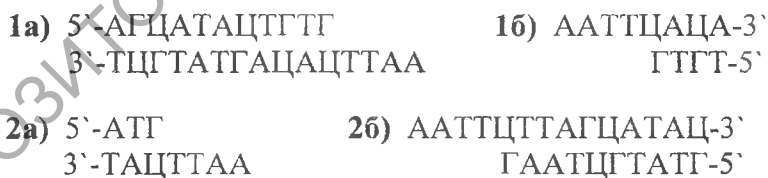
связи и скрепиться, как им и положено, водородными мостиками.

Если с той же EcoR1 получить фрагменты ДНК из различных организмов, то все они будут иметь одинаковые, подходящие друг к другу **“липкие концы” ААТТ и ТТАА**. Скрепить выступающие липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент – **ДНК-лигаза**. Он **лигирует**, то есть “сшивает” между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК. Внешне она ничем не отличается от обычной ДНК.

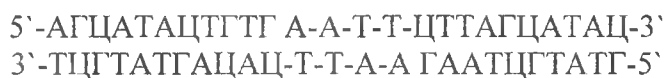
Ниже в качестве примера приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.



Если мы хотим получить гибридную (химерную) молекулу ДНК, то на первом этапе необходимо разрезать представленные фрагменты ДНК разных видов с помощью подходящих рестрикционных ферментов. В данном случае можно использовать рестриктазу EcoR1, которая расщепит ДНК двух видов на четыре новых фрагмента 1а, 1б и 2а, 2б с липкими концами ААТТ и ТТАА:



В ходе второго этапа необходимо смешать нужные нам фрагменты разных видов, допустим, 1а и 2б. В результате выступающие липкие концы скрепятся между собой, как им и положено, водородными связями в силу комплементарности.



Окончательное скрепление фрагментов 1а и 2б двух молекул ДНК производит специализированный фермент ДНК-лигаза, которая “сшивает” между собой сахарофосфатные остовы обоих фрагментов между нуклеотидами Г и А с образованием полной структуры ДНК. Таким образом, получение межвидовой гибридной молекулы ДНК завершено.

Сейчас в арсенале генных инженеров имеется более 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах. Несколько рестриктаз и участки ДНК, которые они могут разрезать, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности ДНК.

Рестриктазы	Участки распознавания и места разреза ДНК
Bam I	5' - Г <sup>↓</sup> Г - А - Т - Ц - Ц - 3' 3' - Ц - Ц - Т - А - Г <sup>↑</sup> Г - 5'
EcoR I	5' - Г <sup>↓</sup> А - А - Т - Т - Ц - 3' 3' - Ц - Т - Т - А - А <sup>↑</sup> Г - 5'
Hind III	5' - А <sup>↓</sup> А - Г - Ц - Т - Т - 3' 3' - Т - Т - Ц - Г - А <sup>↑</sup> А - 5'
Hae III	5' - Г - Г <sup>↓</sup> Ц - Ц - 3' 3' - Ц - Ц <sup>↑</sup> Г - Г - 5'
Hpa II	5' - Ц <sup>↓</sup> Ц - Г - Г - 3' 3' - Г - Г - Ц <sup>↑</sup> Ц - 5'
Sma I	5' - Ц - Ц - Ц <sup>↓</sup> Г - Г - Г - 3' 3' - Г - Г - Г <sup>↑</sup> Ц - Ц - Ц - 5'

С помощью этих и некоторых других ферментов исследователи во многих генетических лабораториях мира начали конструировать и конструируют в настоящее время разнообразные по своим составным частям гибридные (рекомбинантные) ДНК.

### Электрофоретический анализ фрагментов ДНК в агарозном геле

При помощи набора ферментов рестрикции исследователи научились получать фрагменты ДНК разных размеров практически из любых видов. В ходе манипуляций с различными фрагментами ДНК часто необходимо определить размер или выделить конкретный участок ДНК из смеси. Оказалось, что фрагменты ДНК легче всего разделять с помощью метода электрофореза в агарозном геле. ДНК, обработанную одной или несколькими рестриктазами, помещают в лунки застывшего агарозного геля, который помещается в специальную камеру для электрофореза (рис. 3). В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают перемещаться в пористом, похожем на мармелад геле. Скорость продвижения фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные. Это позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно выделить из геля без всяких повреждений и потери биологических свойств.

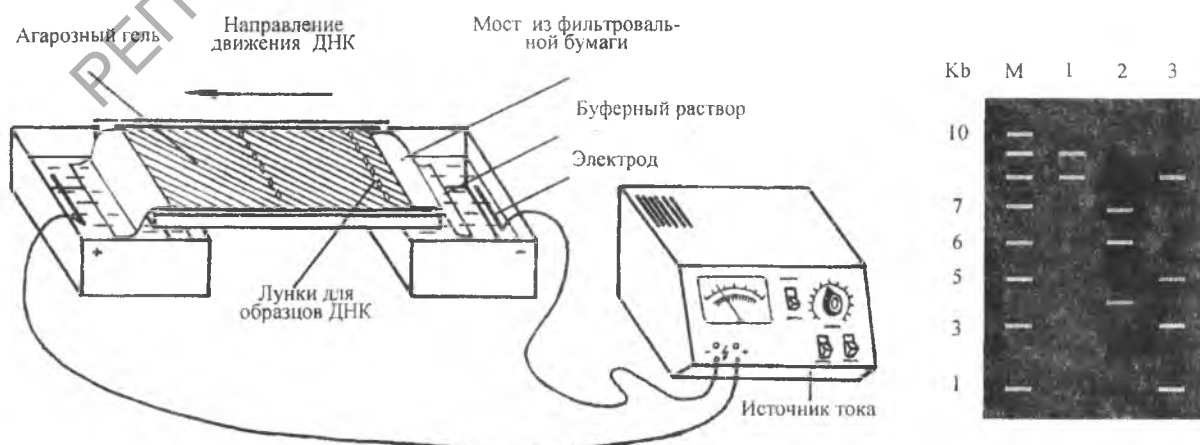


Рис. 3. Схематическое изображение камеры для электрофореза ДНК в агарозном геле. Справа представлена электрофореграмма фрагментов ДНК, величиной 17 кб (17 тысяч нуклеотидных пар) окрашенная этидиум бромидом и помещенная под УФ свет. (М – маркеры ДНК определенной длины; 1,2,3 – образцы одной и той же ДНК, разрезанные различными рестриктазами).

Если после электрофореза окрасить гель специальным красителем **этидиум бромидом**, связывающимся с ДНК, и поместить гель под ультрафиолетовый свет, то на нем будут хорошо видны окрашенные в красный цвет, расположенные на различном расстоянии друг от друга **светящиеся фракции ДНК**. Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК. Следует подчеркнуть, что разные рестриктазы дают разную картину расщепления одной и той же ДНК. Так на электрофореграмме ДНК длиной 17 кб, обработанной тремя различными ферментами рестрикции (рис. 3 справа), видно, что рестриктаза №1 разрешила ДНК на два фрагмента (длиной 8 и 9 кб), рестриктаза №2 – на три (7, 6 и 4 кб), а рестриктаза №3 – даже на четыре фрагмента (8, 5, 3 и 1 кб). Таким образом, электрофорез в агарозном геле позволяет **разделить**, а затем **легко извлечь** рестрикционные фрагменты ДНК нужного размера в чистом виде, для последующего использования.

Кроме того, анализируя электрофоретические **спектры ДНК на геле**, наблюдая за исчезновением одних и появлением других фракций под действием разных рестриктаз, исследователи начали составлять **генетические рестрикционные карты** расположения участков ДНК для разных видов.

Пример построения генетической рестрикционной карты по данным, представленным на электрофореграмме ДНК (рис. 4), приведен ниже.

В этом упрощённом примере исходная молекула ДНК величиной 17 кб разрезается на три фракции рестрикционным ферментом №1 в двух местах, т.е. в этой ДНК имеется два сайта рестрикции для рестриктазы №1. Однако неясно, в середине или с краю исходной ДНК расположен фрагмент величиной 3 кб. Совместное разрезание ферментами №1 и №2 оставляет нетронутыми фракции длиной 8 и 6 кб, но разрезает фрагмент 3 кб на две части длиной 2 и 1 кб, что указывает на наличие сайта рестрикции для рестриктазы №2 в пределах фрагмента рестриктазы №1. Если бы фрагмент 3 кб был на краю исходной молекулы 17 кб, то использование только фермента №2 позволило бы получить фрагмент 2 кб или 1 кб. Но так как это не произошло, то из трёх рестрикционных фрагментов, полученных при помощи фермента №1, фрагмент длиной 3 кб должен быть расположен в середине.

Таким образом, рестрикционная карта исходной ДНК размером 17 кб для рестриктазы №1 (R1) и рестриктазы №2 (R2) будет иметь вид, представленный на рис. 5.

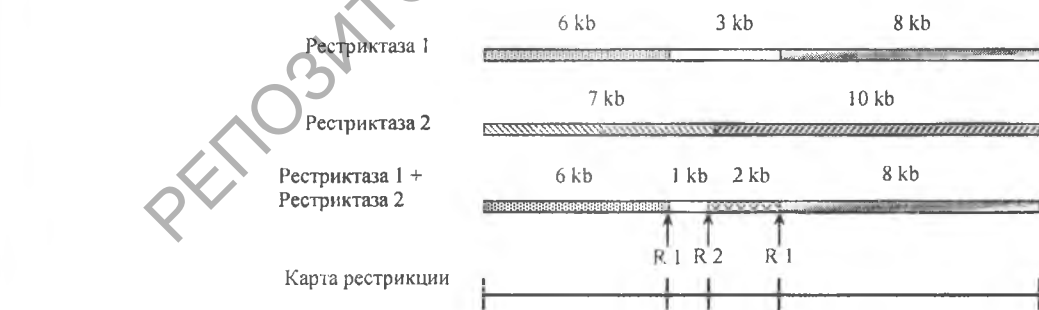


Рис. 4. Электрофореграмма ДНК-фрагментов (R1 и R2 – рестриктазы)

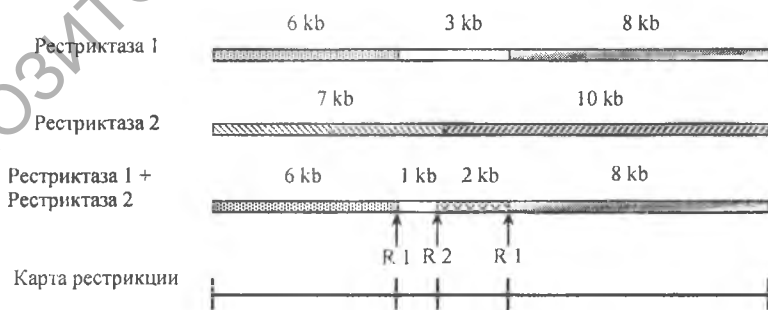


Рис. 5. Рестрикционная карта, построенная на основе анализа электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК, полученных в результате действия двух различных рестриктаз и их смеси на нативную ДНК размером 17 кб.

Тот факт, что сайт R2 расположен ближе к участку длиной 6 кб, следует из величины участков в 7 и 10 кб, полученных при разрезании исходной ДНК только рестриктазой №2.

Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс в 1974 году для ДНК вируса SV-40 (Snustad, Simmons, 1999; Griffiths et al., 2000; Гончаренко, 2005а).

### Метод блот-гибридизация по Саузерну и его применение

В 1975 году был разработан метод, который позволяет **идентифицировать** конкретные **гены** и другие **рестрикционные фрагменты ДНК** после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, **денатурируются** до **одноцепочечных** молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК **отпечатывается (blotting)** за счет капиллярных сил на приложенной к гелю **нитроцеллюлозной мембране (пленке)**, после чего фиксируется при помощи высокой температуры (рис. 6). Далее мембрана помещается в гибридационный буфер, содержащий **специальный радиоактивно меченый ДНК-зонд** – короткую специфическую последовательность ДНК. Зонд способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая **фракции, гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом**, прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (**авторадиограмме**) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Этот метод получил название **Саузерн-блот гибридизации** в честь разработавшего его Эдварда Саузерна. (Watson et al., 1992; Snustad, Simmons, 1999; Nicholl, 2002; Гончаренко, 2005б).

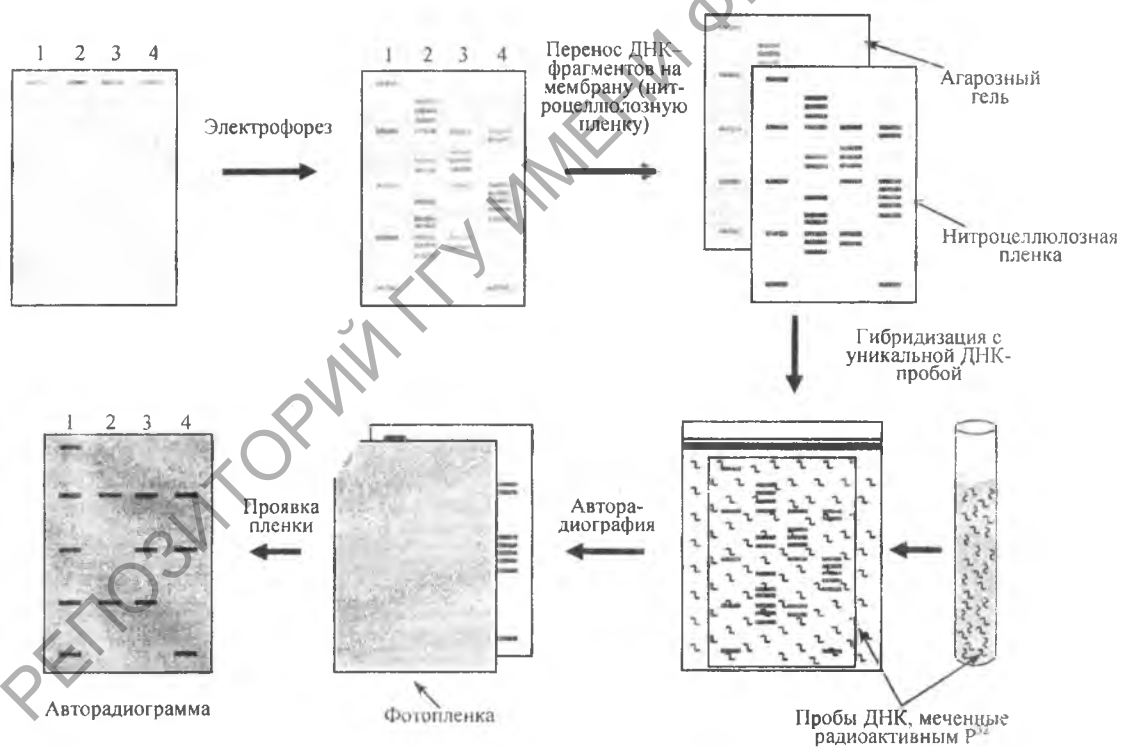


Рис. 6. Схематическое изображение основных этапов Саузерн-блот гибридизации.

К настоящему времени удалось практически полностью расшифровать (прочитать) абсолютное большинство генов даже у таких сложных видов как человек и дрозофила. Для этих и многих других видов получено огромное количество различных **ДНК-зондов (проб)**, которые успешно используются в **Саузерн-блот анализе**. Широкое применение Саузерн-блот получил в диагностике наследственных заболеваний (Snustad, Simmons, 1999; Nicholl, 2002; Hurtwell et al., 2004; Гончаренко, 2005а,б).

Мутация, вызывающая болезнь – серповидно-клеточная анемия, обусловлена заменой всего одного нуклеотида в ДНК  $\beta$ -глобинового гена. Причем в результате этой мутации пропадает сайт рестрикции для фермента MstII, который присутствует в нормальном гене. По-

этому мутацию в  $\beta$ -глобиновом гене, приводящую к заболеванию, можно выявлять, используя Саузерн-блот метод. Для этого необходимо индивидуальные образцы ДНК обработать рестриктазой MstII. Затем полученные рестриктационные фрагменты подвергнуть электрофоретическому фракционированию в агарозном геле с последующей Саузерн-блот гибридизацией, используя в качестве зонда меченый фрагмент  $\beta$ -глобиновой ДНК.

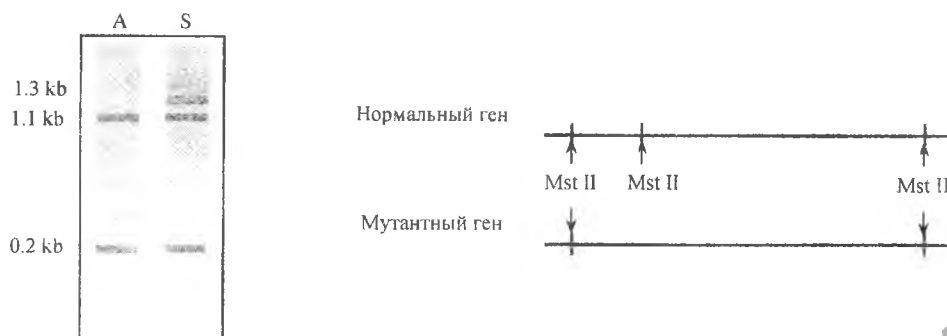


Рис. 7. Авторадиограмма и рестриктационные карты, построенные на основе анализа электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК  $\beta$ -глобинового гена, полученных в результате действия рестриктазы Mst II.

Поскольку в результате мутационной замены нуклеотида в ДНК  $\beta$ -глобинового гена происходит потеря сайта рестрикции для MstII, который присутствует в нормальном гене, то на авторадиограмме (рис. 7) образцов, взятых у здоровых людей (A), будут присутствовать две фракции (размером 1.1 и 0.2 кб), тогда как в образцах, взятых у людей страдающих серповидно-клеточной анемией (S), будет присутствовать дополнительная «тяжелая» (неразрезанная) фракция ДНК (величиной 1.3 кб). Таким образом, для консультации семей, проживающих в районах высокой концентрации мутации, вызывающей серповидно-клеточную анемию, наиболее целесообразно использовать методы рестриктационного и Саузерн-блот анализа, которые дают возможность достаточно легко выявлять носителей данного заболевания.

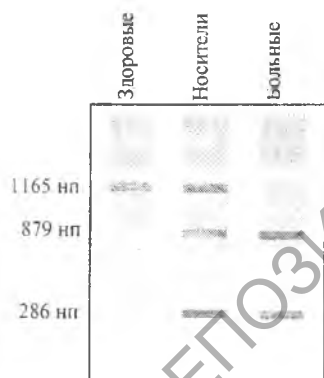


Рис. 8. Электрофореграмма ДНК-фрагментов здоровых людей, гетерозиготных носителей и больных гемофилией А

Одна из мутаций, вызывающая сцепленное с полом рецессивное заболевание гемофилия А, характеризующееся несквертываемостью крови из-за дефицита белкового фактора коагуляции VIII, обусловлена заменой также всего одного нуклеотида. В результате этой мутации во фрагменте гена, величиной 1165 н п, включающем экзоны 17 и 18 появляется сайт рестрикции для рестриктазы BclI, который отсутствует в норме. Эта рестриктаза разрезает фрагмент на две части, равные 879 н п и 286 н п, соответственно.

Электрофоретические спектры после Саузерн-блот анализа фрагмента ДНК, включающего экзоны 17 и 18 гена фактора VIII здоровых людей гетерозиготных носителей и больных гемофилией А представлены слева на рис 8. Абсолютно ясно, что приведенные спектры позволяют без затруднений проводить диагностику данного наследственного заболевания с абсолютной точностью.

Особенно впечатляюще достижения современной генетики в диагностике сложного заболевания хореи Хантингтона. Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором происходит нейродегенеративное расстройство, приводящее к летальному исходу. Поскольку четкие симптомы этой болезни начинают проявляться только в возрасте около 40 лет, потенциальные больные к этому сроку обычно уже имеют детей, часть из которых наследует это заболевание. Установить диагноз болезни Хантингтона в возрасте до 40 лет раньше не представлялось возможным. Однако в последние годы ученые сумели найти и сконструировать специальные ДНК-зонды, позволяющие выяв-

лять полиморфизм ДНК, связанный с данным заболеванием. Ниже приведен конкретный пример, с которым пришлось столкнуться американским врачам генетикам.

Мужчина, страдающий доминантным наследственным заболеванием, болезнью Хантингтона, имеет двоих взрослых детей. Его дети, опасаясь, что могут оказаться носителями наследственного заболевания, решили провести молекулярно-генетическую диагностику родителей, а также супругов и эмбрионов своих будущих детей. В то же время сами от такой диагностики отказались. Саузерн-блот анализ выявил двухаллельную систему (с аллельными фрагментами в 4.9 кб или 3.7 и 1.2 кб) по ДНК-маркеру, который показывает 4 процента рекомбинантов с болезнью Хантингтона. Родословная этой семьи с результатами проведенного Саузерн-блот анализа представлена на рисунке 9. Врачам-генетикам наиболее важно было вычислить какова вероятность наследования аллеля, сцепленного с болезнью Хантингтона именно для зародышей двух супружеских пар. К сожалению, представленные на рис 9. данные не могли вызвать оптимизма.

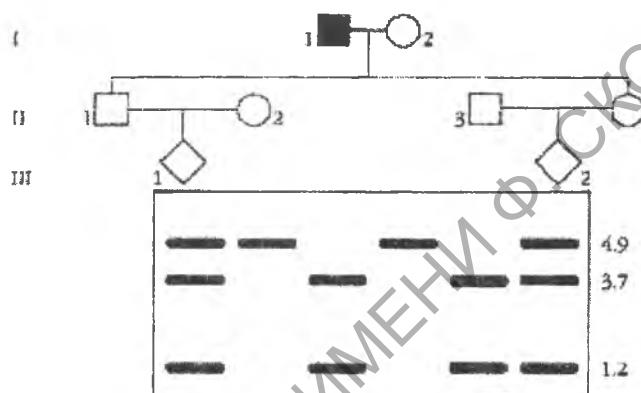


Рис. 9. Родословная семьи трех поколений, в которой распространено заболевание хорей Хантингтона и электрофореграмма спектров ДНК исследованных членов семьи после Саузерн-блот анализа

Первый ребенок (эмбрион) является гетерозиготой и соответственно унаследует аллель ДНК-маркера (3.7, 1.2 кб), сцепленный с болезнью Хантингтона, а, учитывая 4% кроссинговер между геном, определяющим заболевание и сцепленным с ним ДНК-маркером, можно сказать, что только в одном случае из 25 он будет нормальной гомозиготой.

Второй ребенок в любом случае унаследует аллель, несущий болезнь Хантингтона, поскольку поврежденный ген он обязательно получит от отца, который является гомозиготой по гену, обуславливающему заболевание.

Таким образом, достижения ученых в области генной инженерии впервые дали возможность успешно решать широкий круг задач, связанных с точной и своевременной диагностикой сложных наследственных заболеваний.

**Abstract.** The article presents the methods of analysing fragments of DNA molecules by means of gel-electrophoreses and Southern Blot Hybridization. It also considers some examples of using the methods in diagnosing complicated heritable diseases.

### Литература

1. Щелкунов С. Н. *Конструирование гибридных молекул ДНК*. – Новосибирск: Наука, 1987.
2. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J. and Zoller M. *Recombinant DNA/ Second edition*. – Scientific American Books. New York. 1992. – 430 p.
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.
4. Snustad P., Simmons M. *Principles of genetics / Second edition* – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.

5. Nicholl D. *An introduction to genetic engineering* / Second edition – Cambridge university press. 2002. – 292 p.
6. Гончаренко Г.Г. *Основы генетической инженерии*. – Мн: «Вышэйшая школа», 2005а. – 183 с.
7. Гончаренко Г.Г. *Амплификация фрагментов ДНК с помощью метода ПЦР и его использование в диагностике наследственных заболеваний и искусственном мутагенезе* // Известия Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины. – Гомель, 2005б., – №4. – С. 7-12.
8. Hartwell L. et al. *Genetics: from genes to genomes*. – McGraw Hill: Higher education. New York. 2004. – 880 p.

Гомельский государственный  
университет им. Ф. Скорины

Поступило 15.01.05

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ