

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ, АМПЛИФИКАЦИЯ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот

Подобно тому, как в иммунохимических методах наличие определенного антигена в анализируемом образце определяется по взаимодействию с антителом, специфичным к этому антигену, присутствие в образце нуклеиновой кислоты с определенной нуклеотидной последовательностью может быть зарегистрировано с помощью олигонуклеотида, комплементарного анализируемой последовательности, путем регистрации образования дуплекса. Соответствующие олигонуклеотиды обычно называют **олигонуклеотидными зондами (ДНК-зонды или РНК-зонды)**. Зонды представляют собой фрагменты ДНК с известной нуклеотидной последовательностью и несут радиоактивную или флуоресцентную метку. Метод анализа, основанный на гибридизации с такими зондами, называют **гибридизационным анализом**.

Суть гибридизационного анализа заключается в следующем. Анализируемый образец наносят на какую-либо подложку (нитроцеллюлозный фильтр), которую затем прогревают в термостате. В результате находящаяся в образце ДНК, иммобилизуется (закрепляется) на подложке. Подложку помещают в щелочной раствор с целью денатурации иммобилизованной на ней ДНК. Далее промывают подложку в нейтрализующем буфере (рН 8,0), подсушивают и наносят на нее раствор ДНК-зонда. Вновь промывают подложку для удаления избытка зонда. Если образец содержит последовательность ДНК, комплементарную зонду, то последний гибридизуется с ней и не смывается в процессе отмывки. Места гибридизации выявляют с помощью радиоавтографии (в случае использования радиоактивных меток) или облучением ультрафиолетом (если используют флуоресцентные метки).

Гибридизация широко используется для выявления определенных нуклеотидных последовательностей в смеси рестрикционных фрагментов. Такой прием носит название **блоттинг**. С этой целью фрагменты, образующиеся после рестрикции, разделяют по длине методом электрофореза в агарозном геле. Затем гель помещают на лист нитроцеллюлозной бумаги. В результате диффузии фрагменты частично переходят на этот лист. Таким образом получается реплика (отпечаток) с геля. Затем методом радиоавтографии с использованием радиоактивного ДНК-зонда и рентгеновской пленки определяют на реплике положение фрагментов, которые гибридизуются с зондом. Такой прием выявления фрагментов ДНК с использованием ДНК-зондов, приводящий к образованию гибридов ДНК-ДНК, носит название **саузерн-блоттинг**.

Нозерн-блоттингом называют процедуру, при которой ДНК-зонды гибридизуют с репликами геля, в котором электрофоретически фракционируют РНК, что приводит к образованию гибридов ДНК-РНК.

В настоящее время в гибридизационном анализе широкое распространение получило использование **ДНК-чипов**. Чип представляет собой специальное стекло размером в несколько сантиметров, на которое с помощью специальных приборов наносят образцы одноцепочечных последовательностей ДНК в виде множества точек. В каждой точке нанесенный фрагмент ДНК комплементарен определенному гену. На сегодняшний день на поверхность чипа можно нанести до 50 000 точек. Фрагменты ДНК в каждой точке иммобилизуют на стекле. Далее на чип наносят исследуемый образец ДНК, меченный флуоресцентным красителем. Избыток образца смывается. Исследуемая ДНК гибридизуется на чипе в тех точках, где имеются комплементарные ей последовательности. При последующем сканировании поверхности чипа, путем облучения ультрафиолетом, наблюдается флуоресцентное свечение в тех точках, где произошла гибридизация. Свечение демонстрирует наличие определенных генов в исследуемой последовательности ДНК.

Способность ДНК к денатурации-ренатурации используется в одном из самых распространенных в настоящее время методов амплификации фрагментов ДНК *in vitro* – полимеразной цепной реакции.

Эдвин Саузерн (англ. Edwin Southern)

(род. 1938)

Британский молекулярный биолог, заслуженный профессор Оксфордского университета. Предложил метод для выявления определенной последовательности ДНК в образце, названный впоследствии саузерн-блоттингом. Занимался развитием технологии ДНК-чипов.



Механизм полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это осуществляемая *in vitro* специфическая **амплификация** (умножение) фрагментов нуклеиновых кислот, инициируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами. Основные принципы ПЦР были описаны норвежским ученым Хьеллем Клеппе в 1971 году. Но практически данная реакция впервые была осуществлена в 1985 году Кэри Муллисом – сотрудником американской фирмы «Cetus». В дальнейшем ПЦР нашла широкое применение, как в генетической инженерии, так и в молекулярной диагностике. В научно-исследовательских лабораториях ПЦР используют для изучения нуклеиновых кислот и проведения манипуляций с ними. Например, благодаря ПЦР стало возможным быстрое получение исследуемых участков ДНК в чистом виде и в достаточном количестве. В медицине ПЦР применяют при диагностике

инфекционных заболеваний (туберкулез, инфекции передающиеся половым путем, гепатит В, гепатит С, ВИЧ, особо-опасные инфекции и т.д.), наследственных заболеваний, при диагностике рака и иммунных патологий. В судебной медицине ПЦР используют для идентификации личности и определения биологического родства индивидов.

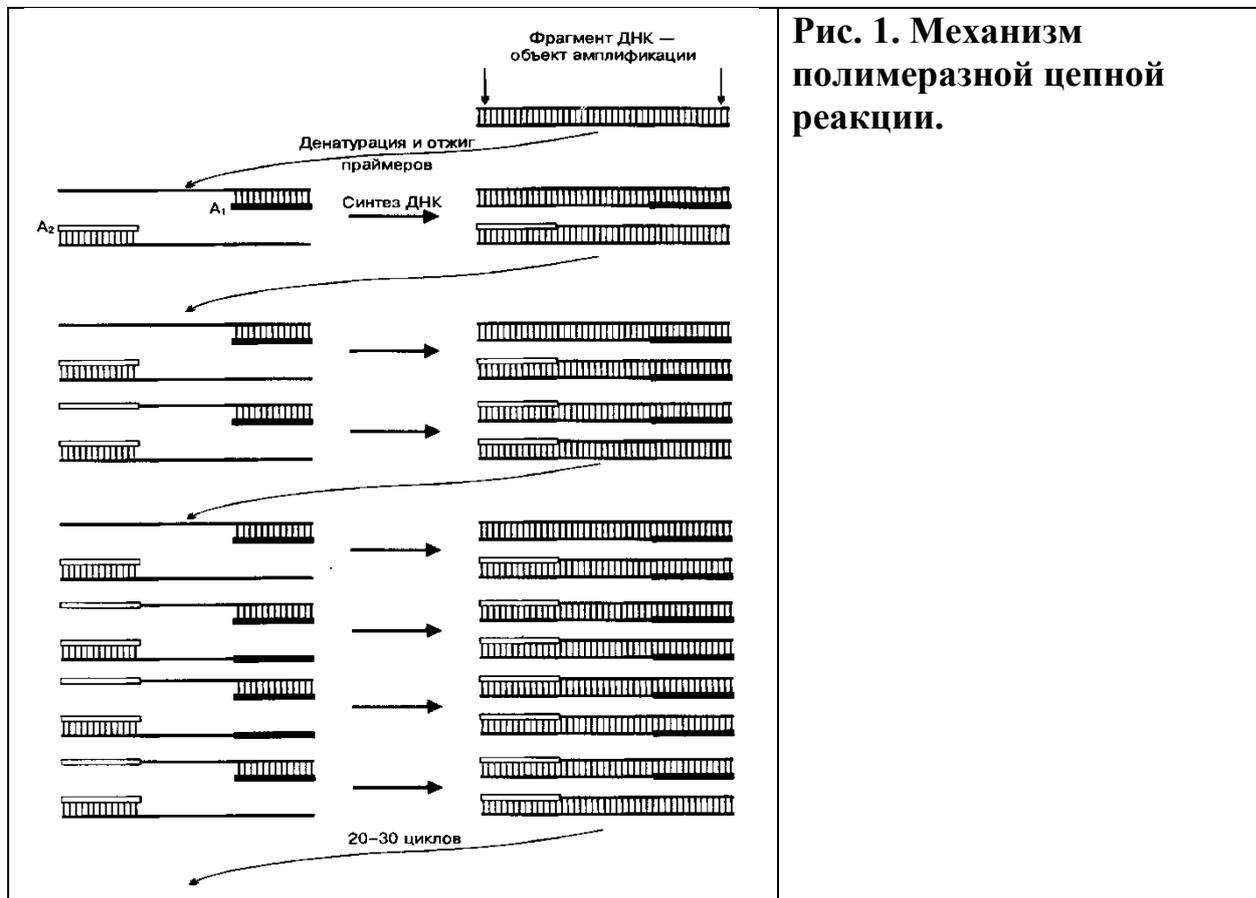


Рис. 1. Механизм полимеразной цепной реакции.

Метод ПЦР позволяет амплифицировать относительно небольшие участки ДНК, длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов. Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области ДНК, т.к. специфический выбор этого участка осуществляют путем гибридизации матричной ДНК с двумя искусственно синтезированными праймерами. Праймеры представляют собой олигонуклеотидные последовательности ДНК длиной от 15 до 30 нуклеотидов, комплементарные 3'-концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК. Таким образом, расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых молекул – **ампиконов**. В качестве матрицы для синтеза может быть использован любой тип ДНК: геномная ДНК различных видов про- и эукариот; ДНК, выделенная из культур клеток, бактериальных клонов, библиотек генов или из других источников. Для проведения специфической

амплификации не требуется больших количеств матричной ДНК и теоретически достаточно даже одной молекулы.

Успех в разработке метода ПЦР связан с использованием в качестве фермента термостабильной ДНК-полимеразы, обеспечивающей синтез ДНК. Данный фермент был выделен из бактерий *Thermus aquaticus*, живущих в горячих источниках, и потому устойчивый к действию высоких температур.

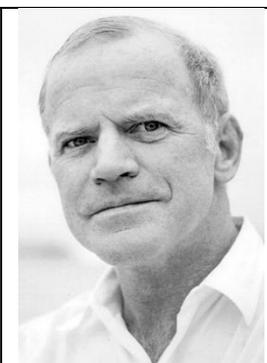
На первом этапе ПЦР исследуемая двухнитевая матричная ДНК переводится в однонитевую форму путем ее нагревания в течение нескольких минут до температуры, превышающей 95-98 °С. Дальнейшая схема проведения ПЦР достаточно проста и заключается в чередовании циклов, каждый из которых состоит из трех стадий:

- 1) гибридизации (отжига) ДНК с праймерами;
- 2) элонгации комплементарной матричной ДНК;
- 3) денатурации образовавшихся двухнитевых структур.

Кэри Муллис (англ. Kary Mullis)

(род. 1944)

Американский биохимик, лауреат Нобелевской премии по химии. Работая в компании «Cetus» разработал метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который революционным образом изменил генетическую инженерию и молекулярную диагностику. В 1993 году он получил за это Нобелевскую премию по химии, которую он разделил с Майклом Смитом.



При гибридизации, достигаемой за счет понижения температуры реакционной смеси до 30-50 °С, происходит образование двухнитевого участка ДНК в строго специфичных областях, комплементарных праймерам. При температуре, оптимальной для работы ДНК-полимеразы (60-70 °С), начинается синтез ДНК в направлении 5'→3' с двухнитевого участка, образованного праймерами. Затем при нагревании реакционной смеси примерно до 80-90 °С синтез прекращается, и двухнитевой участок между матричными и вновь синтезированными молекулами ДНК расплавляется (денатурирует). В первом цикле праймеры гибридизуются с исходной матричной ДНК, а затем (в последующих циклах) и с вновь синтезированными молекулами ДНК – ампликонами по мере их накопления в реакционной смеси. В последнем случае синтез ДНК заканчивается не при изменении температурного режима, а по достижении ДНК-полимеразой границы амплифицированного участка, что и определяет, в конечном счете, размер вновь синтезированного участка ДНК с точностью до одного нуклеотида.

Таким образом, при каждом цикле происходит двукратное увеличение числа синтезированных копий выбранного для амплификации участка ДНК, и содержание продуктов амплификации в реакционной смеси нарастает в геометрической прогрессии. Каждая из процедур цикла определяется двумя параметрами – температурой реакции и ее длительностью, меняющейся в

диапазоне от десятков секунд до 1-3 мин, так что полный цикл длится от одной до нескольких минут. За 25-30 циклов число синтезированных копий ДНК достигает нескольких миллионов.

Стадии ПЦР-исследования

ПЦР-исследование состоит из трех стадий: пробоподготовки, постановки и проведения ПЦР и учета результатов.

Для **подготовки пробы к постановке ПЦР** используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (выделении) ДНК из биологического материала и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации. В качестве биологического материала используются: клинические образцы (цельная кровь, плазма крови, сыворотка крови, ликвор, моча, кал, эякулят, мазки со слизистых оболочек, смывы из полостей органов и т.д.), секционный материал (ткани органов, луковицы корней волос), культуры микроорганизмов, культуры клеток и тканей и объекты внешней среды (почва, вода, одежда).

Иногда для выделения ДНК достаточным бывает кипячение образца в течение 5-10 минут, однако в большинстве случаев требуются более трудоемкие методы.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, предложенная Мармур. Она включает в себя ферментативный протеолиз клеток с последующим удалением примесей. Денатурацию белков осуществляют фенолом, липиды удаляют хлороформной экстракцией, а от низкомолекулярных примесей избавляются переосаждением ДНК спиртом. Однако это метод довольно трудоемкий и предполагает работу с такими токсичными веществами, как фенол и хлороформ.

Популярным в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный Бум с соавторами. Он основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидинизотиоцианата высокой молярности (6 М) с последующей сорбцией ДНК на носителе (SiO_2). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера (TE-буфера). Метод удобен и технологичен для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок, что имеет большое значение при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества гуанидинизотиоцианата могут ингибировать ПЦР, поэтому при использовании этого метода важны правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение методики.

ПЦР обычно проводят в автоматическом режиме, используя для этого специальный прибор – **амплификатор (термоциклер)**. Амплификатор позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные

временные и температурные параметры для каждой процедуры цикла. **Компонентами реакционной смеси** являются: выделенная из биологического материала матричная ДНК, прямой и обратный праймеры, смесь четырех типов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ), термофильная ДНК-полимераза и раствор хлорида магния. Все эти компоненты добавляют в специальный буфер, на который наслаивают небольшой объем вазелинового масла для предотвращения высыхания реакционной смеси в процессе реакции. Затем помещают пробирку с реакционной смесью в амплификатор и выбирают программу циклической смены температуры, а также длительности каждого шага реакции. Общий объем реакционной смеси обычно составляет от 10 до 25 мкл.

На сегодняшний день используется два основных **способа учета результатов ПЦР: электрофоретический и гибридизационно-флуоресцентный.**

Электрофоретический метод основан на разделении молекул ДНК по размеру. В этом случае визуализацию результатов проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия, который встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК.

При заливке расплавленной агарозы с помощью гребенок в геле формируют лунки, в которые после застудневания агарозы вносят продукты амплификации. Пластину геля помещают в камеру для электрофореза, представляющую собой сосуд с буфером, в который погружены возле противоположных краев два электрода. Далее подключают источник постоянного тока. ДНК имеет в своем составе остатки фосфорной кислоты, которые диссоциируют, с образованием положительно заряженных ионов водорода. При этом сами остатки фосфорной кислоты в молекуле ДНК приобретают отрицательный заряд. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле к положительно заряженному электроду, а катионы водорода – к отрицательно заряженному. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют: концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, GC-состав ДНК.

Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне. Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра.

Наличие четкой яркой полосы в геле при его просмотре на трансиллюминаторе после проведения электрофореза продуктов амплификации свидетельствует о положительном результате проведенной ПЦР. Яркость полос продуктов амплификации может быть различной.

Уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

Гибридизационно-флуоресцентный метод позволяет учитывать результаты реакции, не открывая пробирки. В этом случае в реакционной смеси должен присутствовать еще один компонент – специальный одноцепочечный ДНК-зонд: молекула ДНК, комплементарная последовательности амплифицируемого фрагмента, т.е. расположенная между праймерами. При этом к одному концу зонда должен быть химически присоединен флуорофор (флуоресцирующая молекула), а к другому – гаситель флуоресценции (молекула, поглощающая энергию флуорофора и «гасящая» флуоресценцию). Будучи ковалентно связанными с зондом флуорофор и гаситель находятся относительно недалеко друг от друга и при этом флуоресценции не наблюдается: гаситель тушит флуорофор. На этапе отжига праймеров в процессе ПЦР происходит и отжиг зонда на ДНК-мишень. На следующем этапе – элонгации Taq-полимеразы «натывается» в ходе синтеза второй цепи на зонд, и за счет своей 3'-экзонуклеазной активности расщепляет ДНК зонда, синтезируя на ее месте новую цепь. При этом флуорофор и гаситель за счет диффузии удаляются друг от друга. Появляется флуоресценция.

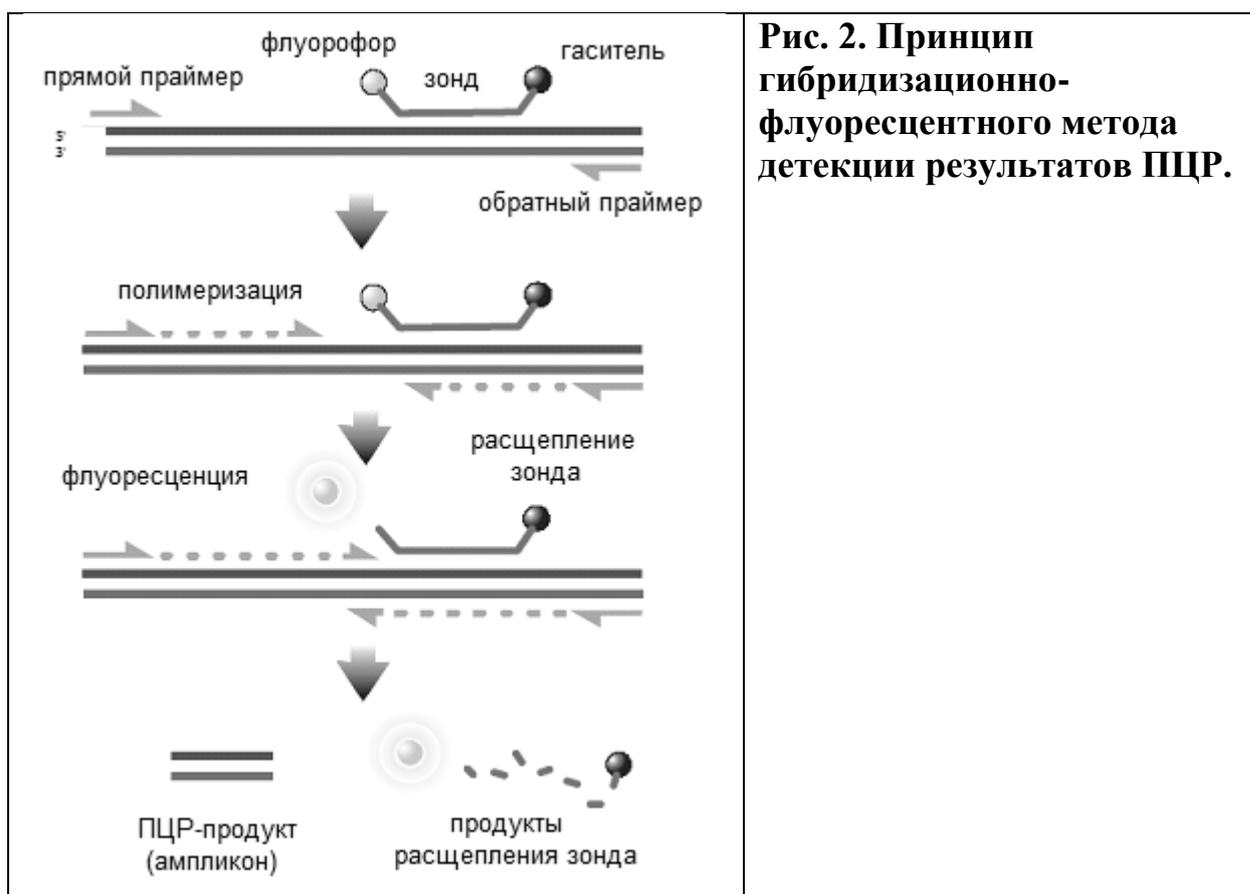


Рис. 2. Принцип гибридационно-флуоресцентного метода детекции результатов ПЦР.

Поскольку число ампликонов в ходе ПЦР растет экспоненциально, также нарастает и флуоресценция. Регистрацию флуоресценции можно осуществить по окончании реакции. В таком случае учет результатов

называют **анализом по конечной точке**. Для этого используют специальный прибор – ПЦР-детектор. Помещенные в такой прибор пробирки после амплификации просвечиваются лучом лазера. Вызванная в результате облучения флуоресценция регистрируется специальной камерой прибора.

Если для проведения ПЦР использовать детектирующий амплификатор, т.е. амплификатор со встроенным детектором, можно проводить **учет результатов в режиме реального времени**. При этом нарастание флуоресцентного сигнала регистрируется прибором на каждом цикле амплификации и выводится на компьютер в виде экспоненциальной кривой. Анализируя графики роста флуоресценции, можно судить о протекании ПЦР, а также узнать, сколько ДНК-матриц было изначально. Это так называемая **количественная ПЦР**.

Интерпретация результатов ПЦР. Контроли реакции

Результат ПЦР можно квалифицировать как положительный или отрицательный в зависимости от того, обнаружена в образце интересующая нас последовательность-мишень или нет. Однако нарушение нормального хода амплификации, недостаточная чувствительность праймеров и непредвиденный полиморфизм последовательности-мишени в области связывания праймеров может дать **ложноотрицательный результат**. В случае загрязнения отрицательных образцов последовательностями-мишенями и случайной гомологии между праймерами и последовательностью, сходной с мишенью, получаются **ложноположительные результаты**.

Очень важным для правильной интерпретации результатов является выбор контролей. В процессе проведения ПЦР нужны как минимум три контроля: **положительный, отрицательный и внутренний**.

Положительный контроль позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Для этого используют препарат ДНК, содержащий сайты для отжига праймеров. Этот препарат вносится в отдельную пробирку с реакционной смесью вместо выделенного образца ДНК.

Отрицательный контроль также ставится в отдельной пробирке и включает в себя все компоненты реакции, но вместо образца выделенной ДНК вносится соответствующее количество деионизованной воды или ПЦР-буфера. Отрицательный контроль необходим для проверки загрязнения компонентов реакции ДНК-мишенями и исключения учета ложноположительных результатов.

Препарат ДНК, выделенный из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, заметно снижающих эффективность реакции, а в некоторых случаях и приводящих к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомой ДНК-мишени. Поэтому становится

необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этой цели в каждую пробирку добавляют дополнительный, так называемый, **внутренний контрольный образец (ВКО)**. Он представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК-мишенью. Для этой цели иногда используют β -глобиновый ген, к концам которого с помощью генно-инженерных манипуляций «пришивают» участки ДНК, гомологичные праймерам.

При отсутствии регистрации внутреннего контроля и выявлении специфической ДНК результат следует считать недостоверным. В этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется перевыделить ДНК.

Если внутренний контроль внести в реакционную смесь, то он станет такой же мишенью для отжига праймеров, как и ДНК-мишень. Размер продукта амплификации внутреннего контроля подбирают таким образом, чтобы он отличался от специфических ампликонов в 2 и более раз.

В результате, если внести ДНК внутреннего контроля в реакционную смесь вместе с испытуемым образцом, то независимо от наличия ДНК-мишени в биологическом образце, внутренний контроль станет причиной образования ампликонов, которые отличаются по размеру от специфических ампликонов, получаемых после постановки ПЦР в присутствии специфической ДНК-мишени.

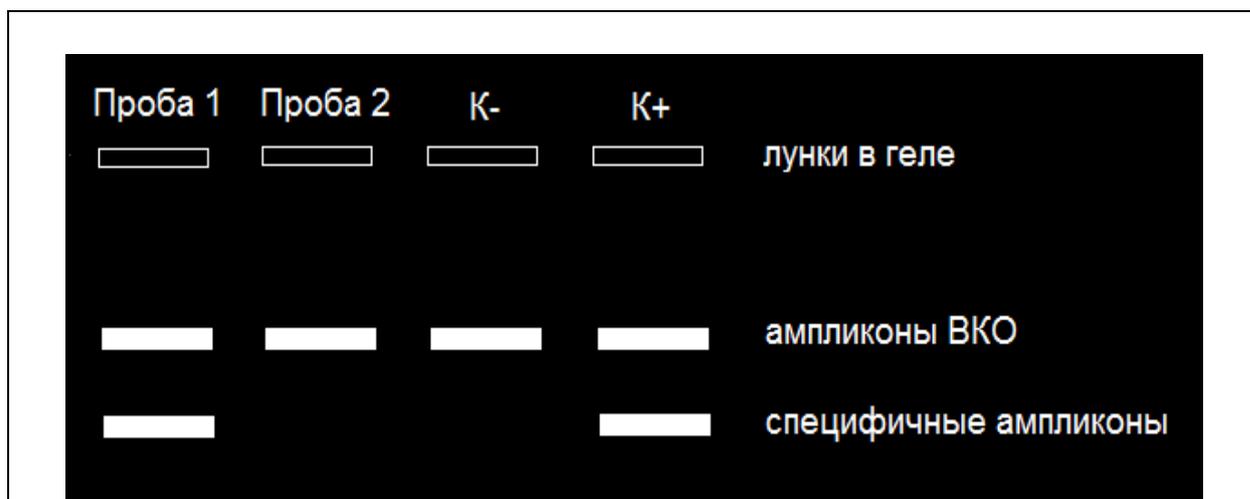


Рис. 3. Схематическое изображение электрофореграммы, полученной при учете результатов корректно проведенной ПЦР. Проба 1 является положительной, т.к. при электрофоретическом разделении продуктов ПЦР, полученных с ее участием, образовалась полоса в геле, соответствующая специфическим ампликонам (нижняя полоса в геле). Аналогичная картина наблюдается для положительного контроля (К+). В образце отрицательного контроля (К-) специфические ампликоны отсутствуют. Отсутствие специфических ампликонов в пробе 2 указывает на отрицательный результат ПЦР. Наличие во всех пробах и контрольных образцах ампликонов внутреннего контроля (верхние полосы) указывает на достоверные результаты исследования.

Наличие ампликонов внутреннего контроля в реакционной смеси будет свидетельством нормального прохождения реакции амплификации и отсутствия ингибиторов. Если ампликоны нужного размера не образовались, но не образовались также и ампликоны внутреннего контроля, можно сделать вывод о возникшей проблеме при прохождении ПЦР как следствие наличия в анализируемом образце нежелательных примесей, от которых следует избавиться, либо технологических нарушений. В любом случае результат реакции следует признать недостоверным.

Важно отметить, что если в реакционной смеси находится нужная ДНК, то эффективность ее амплификации может заметно снижаться из-за конкуренции за праймеры с ДНК ВКО. Это особенно заметно при низких концентрациях ДНК в испытуемом образце и может приводить к ложноотрицательным результатам. Поэтому концентрация внутреннего контроля должна быть такой, чтобы не составлять конкуренции для амплификации даже единичных искомым молекул ДНК.

Виды ПЦР

ПЦР с «горячим» стартом – модификация, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров. Для этого полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами до наступления первой денатурации (проводится при 95 °С в течение 10 минут). ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов реакции.

ПЦР с обратной транскрипцией используется для амплификации известной последовательности РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице РНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто проводят анализ экспрессии генов и диагностику вирусных инфекций.

Асимметричная ПЦР проводится когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. При этом ПЦР проводят как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа.

Количественная ПЦР используется для быстрого измерения количества определенной ДНК, кДНК или РНК в пробе.

Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР – это одновременная амплификация двух и более последовательностей ДНК в одной пробирке. Преимуществом данного метода является возможность выявления ряда

патогенов, генетических модификаций организмов или генотипирования множественных аллелей и т.д., поместив пробу в одну пробирку.

Гнездовая ПЦР – применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

ПЦР длинных фрагментов – вариант ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Для реализации данного подхода используют смесь двух полимераз, одна из которых – Таq-полимераза с высокой процессивностью (способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью (Pfu-полимераза). Она необходима для корректирования ошибок, внесенных Таq-полимеразой, при этом некомплементарные нуклеотиды удаляются с помощью Pfu-полимеразы.

Лигазная цепная реакция проводится по принципу, аналогичному ПЦР, но вместо Таq-полимеразы и дНТФ используется термостабильная ДНК-лигаза и четыре специфических олигонуклеотида, добавляемые в реакционную смесь в избытке. Каждые два олигонуклеотида комплементарны к амплифицируемому фрагменту ДНК-матрицы и непосредственно примыкают друг к другу; одновременно они комплементарны и другой паре олигонуклеотидов. После денатурации ДНК-матрицы при 95 °С олигонуклеотиды связываются с соответствующими (комплементарными) фрагментами цепей ДНК-матрицы и сшиваются лигазой при 50 °С. Далее эти две стадии цикла повторяются много раз, в результате чего экспоненциально увеличивается число соединенных ковалентной связью олигонуклеотидов, и таким образом достигается амплификация определенных участков ДНК.

Секвенирование нуклеиновых кислот по Максаму – Гилберту

Секвенированием называют определение первичной структуры биополимеров, в частности – белков и нуклеиновых кислот. Один из методов секвенирования белков мы уже рассматривали при изучении уровней организации белковых молекул. Теперь подробнее остановимся на определении первичной структуры нуклеиновых кислот.

В середине 70-х годов XX века исследователями Гарвардского университета (США) Алланом Максамом и Уолтером Гилбертом был разработан метод определения последовательности нуклеотидов, основанный на нуклеотид-специфической химической дегградации при обработке ДНК различными химическими агентами. На первом этапе к молекулам ДНК образца, обычно представляющего собой сравнительно короткий (100 – 1000 п.н.) гомогенный фрагмент (полученный, например, вырезанием из геля после электрофоретического разделения расщепленной эндонуклеазами плазмиды), с одного из концов пришивают радиоактивную метку. Затем образец

разделяют на четыре части, после чего каждую из частей обрабатывают своим реагентом, приводящим к гидролизу ДНК по конкретным основаниям (или сочетаниям оснований). Параметры каждой реакции подбирают таким образом, чтобы гидролиз проходил не по всем, а лишь по некоторым основаниям одного типа в каждой молекуле ДНК (в среднем желательно получить один разрыв на отдельную молекулу). В результате получают набор расщепленных фрагментов ДНК, соответствующих по длине местам нахождения нуклеотидов одного типа.

После обработки все четыре образца наносят параллельно в полиакриламидный гель и проводят электрофорез так, чтобы получить разделение фрагментов, отличающихся на один нуклеотид. Далее с помощью рентгеновской пленки получают изображение (электрофореграмму), по которому можно восстановить последовательность нуклеотидов исследуемого фрагмента ДНК, отсчитывая, в какой из четырех дорожек оказался фрагмент, следующий за самым легким продуктом, наиболее удаленным от лунок в геле. Таким образом удастся определить до 200 нуклеотидов за одно прочтение.

Идеализированная схема такого разделения и определяемая последовательность приведены ниже.

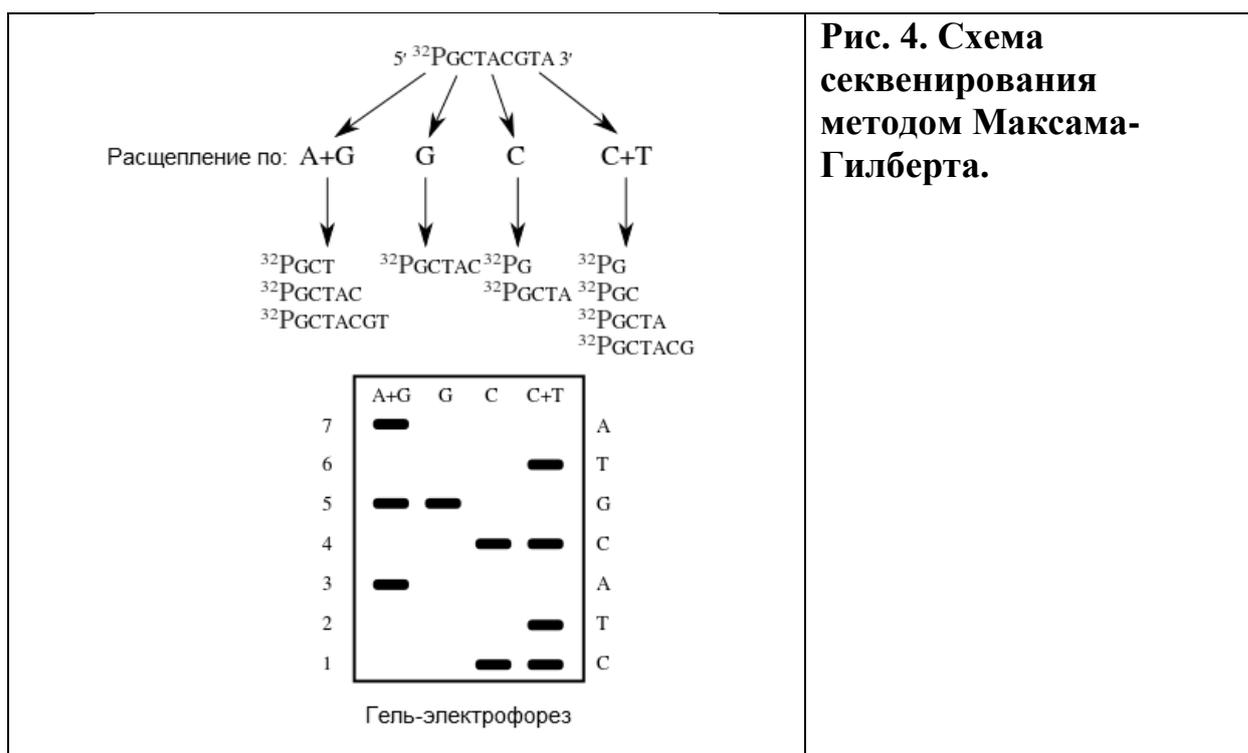


Рис. 4. Схема секвенирования методом Максама-Гилберта.

Как было указано выше, в основе метода Максама-Гилберта лежат реакции расщепления полидезоксирибонуклеотидной цепи. Расщепление происходит по остаткам, лишенным гетероцикла, т.е. по апуриновым и апириимидиновым фрагментам. Для получения апуриновых и апириимидиновых сайтов в ДНК используют три типа превращений – метилирование диметилсульфатом, обработку муравьиной кислотой и реакцию гидразингидратом. Реакция с диметилсульфатом приводит к метилированию

седьмого атома азота остатков гуанина, которые, приобретая положительный заряд, облегчают атаку водой первого атома углерода дезоксирибозы. В результате этого и происходит апуринизация по остаткам гуанина.

В 66%-ной муравьиной кислоте протонируются как остатки гуанина, так и остатки аденина, в результате чего происходит апуринизация по обоим типам гетероциклов. При последующей обработке пиперидином происходит расщепление цепи в первом случае только по остаткам дезоксигуанозина, во втором – по обоим пуриновым нуклеотидам. В итоге при радиоавтографии геля на первой дорожке выявляются все остатки, соответствующие гуанинам, на второй – и гуанинам и аденинам. Очевидно, что этой информации достаточно, чтобы отдельно определить положения в цепи обоих пуриновых нуклеотидов.

Обработка гидразингидратом приводит к образованию апириимидиновых сайтов. Реакция проходит как по остаткам цитозина, так и по остаткам тимина. Однако в щелочной среде (0,1 М КОН в гидразингидрате) реакция по дезокситимициновым фрагментам подавляется и модификация проходит только по остаткам дезоксицитидина. Это позволяет получить картину распределения остатков обоих пириимидиновых нуклеотидов и отдельно – дезоксицитидиновых звеньев. Этой информации достаточно, чтобы определить положение отдельно по каждому из пириимидиновых нуклеотидов.

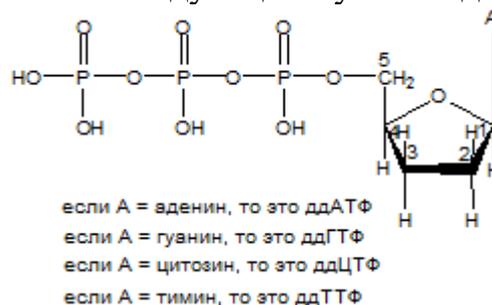
В настоящее время данный метод почти не используется ввиду сложности подготовки образцов ДНК и работы с вредными химическими веществами. Даже несмотря на появление в начале 1990-х годов автоматических секвенаторов, основанных на технологии Максама-Гилберта и существенно упростивших пробоподготовку, этот подход в итоге проиграл методу Сенгера (методу терминаторов). Преимуществами метода Максама-Гилберта по сравнению с методом Сенгера является полная его независимость от вторичных структур и отсутствие необходимости знания небольшого участка последовательности секвенируемой ДНК (для отжига праймера, необходимого ДНК-полимеразе), что позволяет избежать стадии клонирования.

Секвенирование нуклеиновых кислот по Сенгеру (метод терминаторов)

В основе данного метода лежит анализ структуры не самой нуклеиновой кислоты, а продукта, получаемого в ходе ее репликации с помощью ДНК-полимеразы. Аналогично, используя обратную транскрипцию можно анализировать структуру молекул РНК.

Основной идеей метода является использование модифицированных нуклеотидов – дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов (ддНТФ). В отличие от природных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), они не несут ОН-

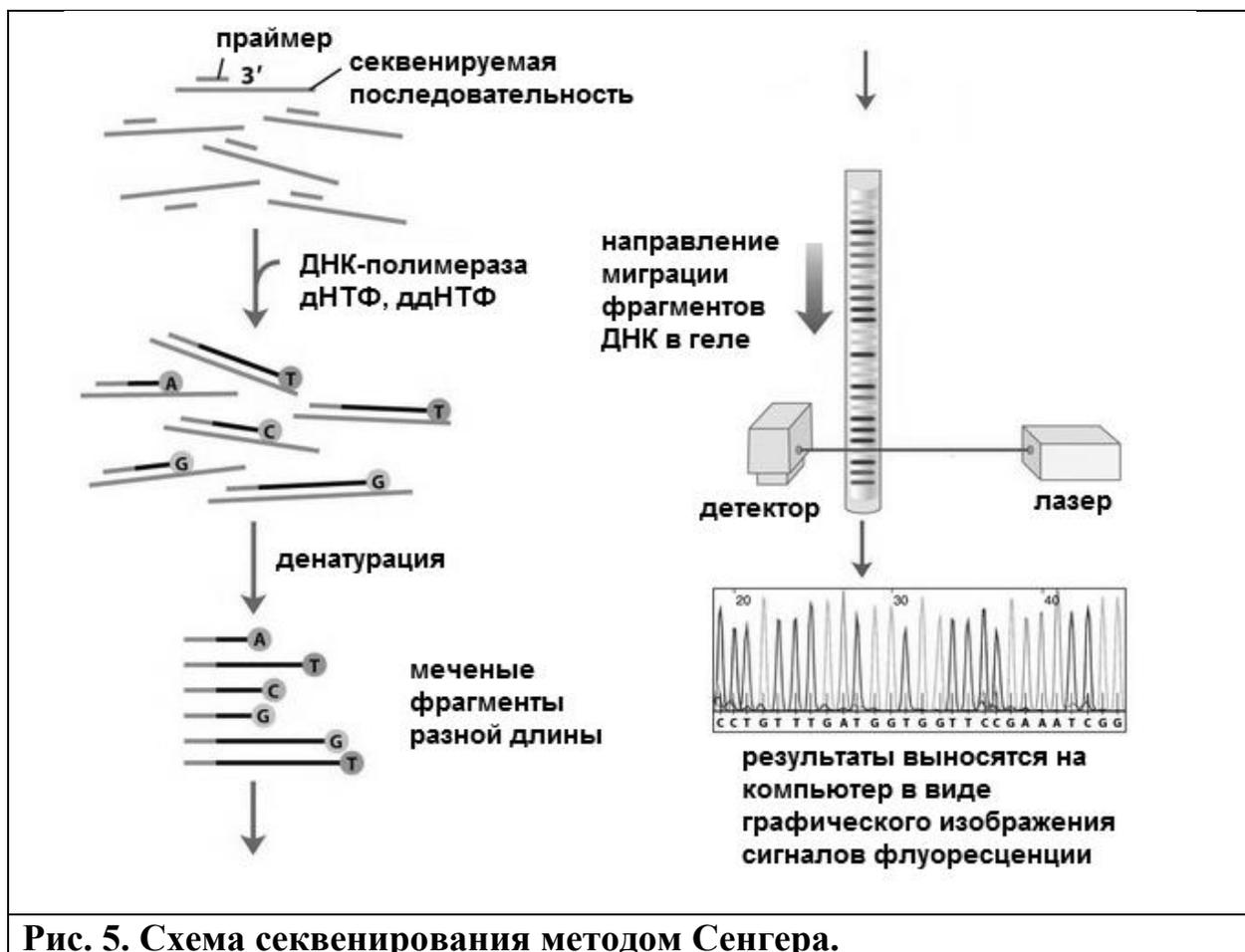
группу в 3'-положении дезоксирибозы и вследствие этого не позволяют полимеразе присоединять к ним следующий нуклеотид.



Участок ДНК, последовательность которого необходимо определить, добавляется в реакцию, похожую на обычную полимеразную цепную реакцию (ПЦР): в пробирке имеются термостабильная ДНК-полимераза (а точнее, так называемый фрагмент Кленова, который получают из ДНК-полимеразы I после протеолитического отщепления домена, ответственного за 5'- и 3'-экзонуклеазную активность), дНТФ всех четырех типов, а также олигонуклеотид, выступающий в качестве затравки для синтеза новой цепи. Структура участка для отжига праймера должна быть заранее установлена. В случае ресеквенирования генома исследуемого организма установление последовательности участка для посадки праймера можно осуществить путем анализа референсной последовательности, имеющейся в генетической базе данных. В случае секвенирования *de novo* установление последовательности участка для посадки праймера можно осуществить химическими методами, в частности секвенированием этого участка методом Максама-Гилберта. Помимо этих компонентов, в концентрации, примерно в двадцать раз меньшей чем дНТФ, присутствуют четыре соответствующих ддНТФ, меченых каждый своим флуоресцентным красителем.

После добавления всех компонентов реакционной смеси (ДНК-матрица, праймер, ДНК-полимераза, хлорид магния, все четыре типа дНТФ и в меньшей концентрации ддНТФ) систему нагревают с целью плавления (расхождения) комплементарных цепей ДНК-матрицы. Затем охлаждают систему до такой температуры, при которой праймер может отжечься на комплементарный участок ДНК-матрицы, но не может произойти отжига комплементарных цепей друг на друга. Эта температура зависит от структуры праймера. После отжига праймера начинается его удлинение, т.е. синтез второй цепи ДНК. Каждый из четырех ддНТФ является близким структурным аналогом соответствующего дНТФ и, несмотря на отсутствие 3'-гидроксильной группы, опознается ДНК-полимеразой и включается в строящуюся полинуклеотидную цепь. Если такое включение произошло, то дальнейший рост цепи прекращается, т.к. присоединившийся дидезоксирибонуклеотидный мономер лишен 3'-гидроксильной группы, необходимой для присоединения следующего звена цепи. Таким образом, ддНТФ играют роль терминаторов репликации. Так как наряду с введенными в реакционную смесь ддНТФ в ней присутствуют в большом избытке аналогичные природные мономеры – дНТФ, то терминация на каждом участке происходит статистически в небольшом

числе случаев, т.е. возникает набор олигомеров разной длины, имеющих на 3'-конце остаток одного из ддНТФ. Длины олигомеров соответствуют порядковым номерам остатков дНМФ в синтезируемой цепи, если вести отсчет от 5'-конца праймера. После мечения проводят разделение полученных одноцепочечных фрагментов методом электрофореза в полиакриламидном геле.



Для проведения секвенирования по Сенгеру в настоящее время используются специальные приборы – капиллярные секвенаторы, в основе работы которых лежит электрофоретическое разделение меченых продуктов терминирующих реакций и их детекция в режиме реального времени. Электрофорез в таких приборах осуществляется не в пластине геля, а в очень тонкой трубке – капилляре, диаметр которого составляет 50 мкм. Во время проведения электрофореза требуется поддержание постоянной температуры по всей длине капилляра. Это достигается посредством встроенного термостата, в основе работы которого лежат элементы Пельтье. В качестве среды для разделения меченых фрагментов ДНК используется полимер – полиакриламидный гель.

Детекция разделенных фрагментов происходит на том конце капилляра, в сторону которого происходит движение фрагментов. Она осуществляется за счет регистрации флуоресценции терминальных ддНТФ у проходящих через

регистрирующее устройство молекул. В зависимости от типа терминального азотистого основания прибор регистрирует определенный спектр флуоресценции. Анализ данных капиллярного секвенирования по сути сводится к «прочтению» последовательных пиков флуоресценции. В настоящее время с использованием современных автоматических секвенаторов длина одного прочтения по методу Сенгера составляет 800-1000 нуклеотидов.

Подход, предложенный Сенгером, положен в основу **технологии секвенирования первого поколения**. В настоящее время уже разработаны и широко внедряются **технологии секвенирования второго поколения: пиросеквенирование, полупроводниковое секвенирование** и др.

Фредерик Сенгер (англ. Frederick Sanger)

(1918 – 2013)

Английский биохимик, единственный ученый в истории, получивший две Нобелевские премии по химии – в 1958 и 1980 гг (совместно с У. Гилбертом и П. Бергом). Основные работы посвящены химии белка и нуклеиновых кислот. В 1977 году предложил метод расшифровки первичной структуры ДНК, основанный на ферментативном синтезе высокорadioактивной комплементарной последовательности ДНК на изучаемой одонитевой ДНК как на матрице.

