***Анализ генов и геномов***

**Геномная библиотека** (банк генов) – это клонированный в составе векторов полный набор последовательностей ДНК данного организма. Такая фрагментация генома облегчает все генно-инженерные манипуляции, позволяет анализировать отдельные последовательности, выделять и работать с индивидуальными генами. Фрагменты геномной ДНК получают при помощи рестриктаз. Фрагменты ДНК связывают с плечами фага и упаковывают в головки фаговых частиц. Получается геномная библиотека, которая может храниться десятки лет под хлороформом, при температур – 70 ºС Поиск нужного гена проводят, заражая фаговой библиотекой бактериальные клетки и, высевая их на чашки Петра с агаризованной средой.

Кроме геномных библиотек создают ***библиотеки кДНК***, которые представляют не все последовательности генома и не все гены, а только ту их часть, которая экспрессируется в данном организме. Можно получить библиотеки кДНК отдельных органов и тканей, характерных для различных стадий онтогенеза.

При скрининге кДНК, геномных библиотек и для анализа геномной ДНК используют ***метод блот-гибридизации***. С помощью этого метода определяют чужеродный ген в геноме трансгенных растений, копийность гена, изменения в нуклеотидной последовательности гена и т.д.

*Метод блот-гибридизации включает следующие этапы:*рестрикция ДНК; перенос рестрикцированных фрагментов из геля на нейлоновый фильтр и их иммобилизация; гибридизация с меченым зондом.

Для выполнения этого метода фрагменты разрезанной рестриктазами ДНК разделяет электрофоретически в агарозном геле. Затем гель денатурируют 0,4 М раствором NaOH и покрывают его листом нейлонового фильтра. Фильтр покрывают слоями фильтровальной бумаги. Под действием капиллярных сил ДНК-фрагменты перпендикулярно переносятся на фильтр и связываются с ним, т.е. иммобилизуются. Такой перенос называется ***блоттинг*** (от англ. *blot* – промокать). При этом на фильтре получается реплика с геля. Фильтр помещают в раствор с радиоактивно меченым одноцепочным зондом и гибридизуют с находящимися на фильтре фрагментами ДНК. Зонд гибридизуется только с теми фрагментами, которые содержат комплементарную ему последовательность ДНК. Затем фрагменты, с которыми связался меченый зонд, выявляют радиоавтографией. По радиоавтографу судят о присутствии нужного фрагмента в геноме, изменениях нуклеотидной последовательности, о числе копий гена в геноме.

Геномные библиотеки обычно создают с помощью векторов, сконструированных на основе бактериофага λ или космиды.

*Геномная библиотека****.*** Если геном какого-либо организма разрезать, вставить в плазмидные или вирусные вектора и ввести в клетку, то в таком виде его можно сохранить. При разрезании плазмидной или фаговой ДНК вероятность выпадения целых и неизмененных кусков генома довольно высока.

Такой способ получения геномной библиотеки получил название «*метод дробовика*», так как геном в данном случае представлен отдельными фрагментами.

В составе векторов, можно клонировать фрагменты ДНКразмером до 23 тпн, что обусловило их исполь-

зование при создании так ***называемых библио-тек генов, или клонотек (геномных библиотек***).

Для формирования библиотеки генов какого-либо организма в векторные ДНК встраивают полученные случайным образом крупные фраг-менты изучаемого генома. Расщепление препа-рата высокомолекулярной ДНК на большие вза-

имно перекрывающиеся фрагменты осуществ-ляют чаще всего *путем частичного гидролиза мелкощепящей рестриктазой*. Фрагментация также возможна с по-мощью *физических м*етодов. Для избавления от неспецифического фона (встройка в вектор двухили более несоседних на геноме фрагментов)гидролизат ДНК подвергают фракционирова-нию по размеру и в реакцию лигирования вво-дят фрагменты протяженностью 15-20 тпн,с тем чтобы в векторную ДНК фага Я мог встроиться только один фрагмент. При встройке двухи более фрагментов размер гибридной ДНК бу-дет превышать предельно допустимый. Важнымсвойством этой экспериментальной системы является то, что при упаковке в капсид in vitroпроисходит отбор гибридных молекул фаговойДНК определенного размера (от 38 до 51 тпн).

Другой подход предполагает *дефосфорилиро-вание* фрагментированной геномной ДНК с кон-цов с помощью фосфатазы. Такие фрагменты не способны лигироваться между собой, но встраи-ваются в векторную ДНК, имеющую нормаль-ные фосфорилированные 5'-концы. В этом слу-чае нет необходимости во фракционированиипрепарата клонируемой ДНК по размерам.При создании библиотеки генов определен-ного организма важно, чтобы каждый сегментизучаемого генома был представлен среди гиб-ридных молекул ДНК. Необходимое количест-во клонов в библиотеке определяется соотно-шением размера генома и среднего размеравставок по формулеизучаемой хромосоме. Последовательно выяв-ляя «соседей», клоны гибридов можно иденти-фицировать и расположить в таком порядке, что-бы их вставки в целом последовательно покры-вали весь геном. Такой набор клонов называют *энциклопедией генов*. -Космидные библиотеки генов состоят из меньшего числа клонов, чем библиотеки на ос-нове векторных фагов Я . Однако последние все же предпочтительнее в тех случа-ях, когда не требуются фрагменты размером бо-лее 20 тпн.

Банк генов (gene bank) — набор генов данного организма, полученныйна основе рекомбинантных ДНК.

Библиотека генов (gene library) — коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК организма или специальный набор фрагментов ДНК, представляющих, напр., коллекцию иРНК (см. РНК информационная, кДНК), экспрессирующуюся в клетке в

определенное время. В таких библиотеках фрагменты инсерцируются (включаются) в подходящие вектора, напр, космидные (см. Космида) или бакте-риальные векторы, и трансформируются (см. Трансформация) в подходящего хозяина. В идеале геномная библиотека должна содержать практически весь геном вида, из которого она происходит, а библиотека кДНК — все различные молекулы иРНК данной клетки на одной и той же стадии развития. Сейчас сконструировано множество типов генных библиотек для различных целей исследования.

Геномная библиотека (genomic library) — набор клонированных фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (видовой) геном. У млекопитающих (в т. ч. у человека)

геномы крупные, поэтому для них обычно создают хромосомные библиотеки .

Существует несколько методов скрининга, т. е. поиска в геномной библиотеке или в банке кДНК тех клонов (бактериальных или фаговых), которые содержат рекДНК с заданным геном. Из них основные — гибридизационный, иммунологический, генетический и рекомбинационный. Выбор метода во многом зависит от использованной системы клонирования. В случае клонирования эукариотической ДНК в клетках Е. сок единственным "паспортом" чужДНК служит ее нуклеотидная последовательность. Этот "паспорт" присутствует при всех способах клонирования, поэтому общий метод скрининга — гибридизация рекДНК с зондами, т. е. с нуклеотидными последовательностями (олигонуклеотидами, од-нонитевыми кДНК или мРНК), которые комплементарны отыскиваемому гену. На практике для этого пользуются методом гибридизации колоний (Gnmstein, Hogness, 1975). Если клонируемые гены экспрессируются (некоторые банки кДНК; клонированные в Е. coli геномные банки клеток кишечной группы, их фагов и плаз-мид), то для скрининга применяют иммунологические и другие методы, регистрирующие присутствие специфического белка.

Возможен направленный поиск в банке кДНК только тех генов, которые участвуют в определенном процессе, например, индуцируются действием какого-либо гормона. В этом методе, носящем название вычитательная гибридизация, сначала синтезируют первые нити кДНК суммарной мРНК, выделенной из индуцированных клеток. Затем образовавшуюся однонитевую кДНК гибридизуют с суммарной мРНК, выделенной из неинду-цированных клеток. Сформировавшиеся дуплексы мРНК:кДНК удаляют, а негибридизовавшиеся кДНК используют для синтеза двунитевых кДНК, которые и являются целью поиска (см. обзор Свердлов, 1993). Иммунологические методы. Эти методы применяют для выявления определенных клонов с рекДНК, если клонируемые гены экспрессируются. Напомним, что молекулы белков имеют по несколько антигенных детерминант (эпитопов), на каждый из которых в организме животных вырабатывается свое антитело (специфический иммуноглобулин). Сыворотки, получаемые стандартными методами, поликлональны, т. е. содержат антитела ко многим эпи-топам данного белка. возможен немедленный скрининг банка без его амплификации, для чего инфицированные бактерии высевают сразу на гибридизационные фильтры (см. с. 280). Банк кДНК. кДНК играют важную роль в исследованиях по молекулярной биологии эукариот. Они представляют собой гены без интронов, необходимые для экспрессии эукариотических генов в бактериях, а также для получения информации о кодирующей части гена (напомним, что кДНК не содержит регуляторных элементов генов). Анализ кДНК применяют для изучения клеток, по какой-либо причине меняющих активность своих генов. Зачастую кДНК служат также зондами. Например, если в геномном банке нужно найти методом гибридизации клон с заданным геном, а специфическая мРНК представлена в малом количестве, то сначала синтезируют кДНК, клонируют ее, метят и используют для скрининга.

**Физическое картирование ДНК по участкам узнавания эндонуклеаз рестрикции**

Ферменты рестрикции стали эффективным инструментом исследования ДНК. Они позволяют превращать молекулы ДНК очень большого размера в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. Обработка образца ДНК определенной эндонуклеазой рестрикции всегда дает один и тот же набор фрагментов — при условии, что расщепление происходит по всем сайтам узнавания. Если использовать несколько ферментов рестрикции и сначала обработать ДНК каждой из выбранных ферментов в отдельности, а затем их комбинациями, можно построить физическую карту данной ДНК, т. е. установить порядок расположения сайтов рестрикции вдоль молекулы. Определив размер полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза, можно найти положение рестрикционных сайтов.

С помощью метода электрофореза в агарозном геле фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно (рис 3).

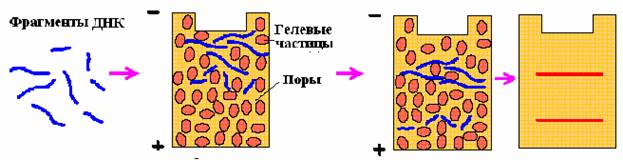
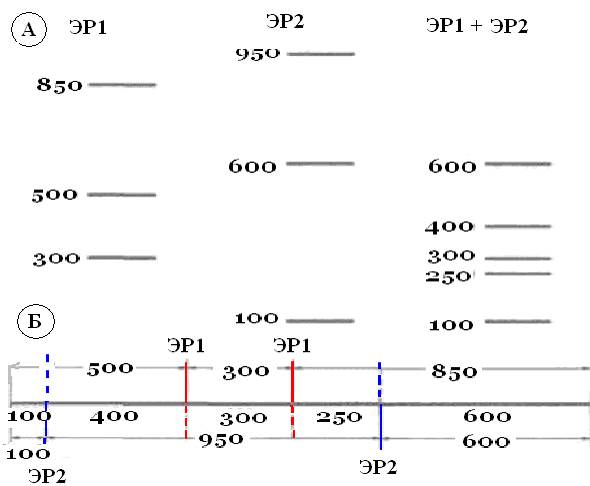


Рис. 3. Схема фракционирования фрагментов ДНК по размерам методом гельэлектрофореза

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты вообще не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно элюировать (вымывать) в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами.

*Пример.* На рисунке 4А приведена схема распределения в геле фрагментов рестрикции и указаны размеры фрагментов, полученных в результате расщепления линейного участка какой-то условной ДНК эндонуклеазами ЭР1, ЭР2 и их смесью. Исходя из числа фрагментов ДНК, представленных на дорожках ЭР1 и ЭР2 видно, что данный участок ДНК имеет по два сайта рестрикции для каждой из них*.*Чтобы построить карту взаимного расположения этих сайтов на данном участке ДНК, следует сравнить размеры фрагментов, полученных при раздельной рестрикции и при рестрикции смесью ферментов. Результат такого сравнения представлен на рис. 4Б*.*

Если при гидролизе ДНК каждой из двух эндонуклеаз (ЭР1 и ЭР2*)*образуются три фрагмента, значит, в исходном фрагменте ДНК было два сайта узнавания для каждой из них. Фрагмент размером 300 п. н,, который образуется в результате гидролиза ЭР1*,*не расщепляется при гидролизе смесью ЭР1 и ЭР2в отличие от ЭР1-фрагментов размером 850 и 500 п. н. Значит, два ЭР1-сайта находятся на расстоянии 300 п. н. друг от друга и между ними нет ЭР2*-*сайта, а в ЭР1-фрагментах длиной 850 и 500 п.н. есть по одному ЭР2-сайту. Фрагмент размером 950 п. н., который образуется при обработке ДНК рестриктазой ЭР2*,*при двойном гидролизе расщепляется ЭР1 на три фрагмента (250+300+400 - 900 п.н.). Значит, два ЭР2*-*сайта находятся на расстоянии 250 и 400 п. н. по разные стороны от сайтов для ЭР1*.*ЭР2расщепляет ЭР1-фрагмент длиной 850 п. н. на фрагменты длиной 250 и 600 п, н., а один из сайтов для ЭР1находится на расстоянии 250 п. н. от сайта для ЭР2,значит, фрагмент 600 п. н. должен содержать один из концов исходной молекулы ДНК. Далее, видно, что ЭР2расщепляет ЭР1-фрагмент длиной 500 п. н. на два фрагмента размером 100 и 400 п. н. и что один из ЭР1-сайтов отделен от ЭР2-caйтa 400 п. н.; значит, фрагмент длиной 100 п. н, должен располагаться на другом конце исходной молекулы. Таким образом, на рисунке 4Б представлена физическая карта линейного участка условной ДНК по участкам рестрикции ЭР1 и ЭР2.



Рис*.*4. Картирование сайтов рестрикции.

**А**Схема распределения фрагментов ДНК, полученных при гидролизе эндонуклеазами рестрикции. Очищенную ДНК гидролизовали рестриктазами ЭР1и ЭР2раздельно, а затем их смесью, проводили гель-электрофорез и визуализировали продукты окрашиванием бромистым этидиемРазмер фрагментов ДНК указан в парах нуклеотидов.

**Б**Рестрикционная карта, построенная по электрофоретическим данным.

Повторив подобные эксперименты на одной и той же ДНК, но с другими эндонуклеазами рестрикции, можно получить более подробную карту, где отмечено много сайтов рестрикции, а, значит, существует реальная возможность направленно работать с определенными участками молекул исследуемых ДНК. Таким образом, рестрикционные карты способствуют функциональному картированию ДНК

Располагая такой информацией, можно идентифицировать на ДНК биологически важные участки. Поскольку рестрикционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке, сравнение таких карт для двух или более родственных генов позволяет оценить гомологию между ними. Анализируя рестрикционные карты, можно сравнивать определенные участки ДНК разных видов животных без определения их нуклеотидной последовательности. Таким образом, например, было установлено, что хромосомные участки, кодирующие цепи гемоглобина у человека, орангутанга и шимпанзе сохранились в практически неизменном виде в течение последних 5 - 10 млн. лет (с тех пор как виды дивергировали).

Метод рестрикционного картирования позволяет увидеть крупные генетические изменения, такие как делеции или инсерции. При этом происходит уменьшение или увеличение рестрикционных фрагментов, а также исчезновение или возникновение сайтов рестрикции.

Один из приемов картирования – фингерпринт (“метод отпечатков пальцев” или DNA-fingerprint). Он подразумевает использование неупорядоченных и неполных наборов фрагментов, которые являются характеристикой генома, хотя описывает его не полностью.

Необходимо также отметить, что рестрикционный анализ ДНК и рестрикционные карты взаиморасположения сайтов узнавания и рестрикции для разных эндонуклеаз лежат в основе одного из самых распространенных методических подходов молекулярной генетики: исследование полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Этот вид анализа последовательностей ДНК используется как в фундаментальных исследованиях различных геномов так и для прикладных целей: например в ДНК-диагностике наследственных болезней человека.

И, наконец, расщепление рестрицирующими эндонуклеазами имеет еще одно применение. Когда два разных образца ДНК обрабатывают одной и той же эндонуклеазой рестрикции с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы, то благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов могут образовываться новые комбинации генов - рекомбинантные ДНК (рис. 5).

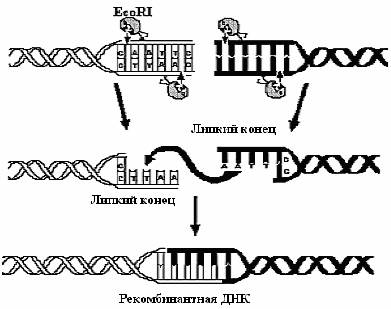


Рис. 5. Применение эндонуклеазы рестрикции EcoRI для создания рекомбинантной ДНК

Следует отметить, что рекомбинантные ДНК можно получать также и при объединении фрагментов ДНК с тупыми концами, что будет рассмотрено в другом разделе пособия. Однако, для осуществления молекулярного клонирования недостаточно одних только ферментов рестрикции.

**Фосфомоноэстеразы.**Эти ферменты относятся к фосфатазам и отщепляют как 5’-, так и 3’-концевые фосфомоноэфирные группы в ДНК и РНК.

**Полинуклеотидкиназа.**Это еще один фермент, модифицирующий полинуклеотидные цепи. Он является фосфотрансферазой, которая специфически фосфорилирует 5’–концевые гидроксильные группы молекул ДНК и РНК. Полинуклеотидкиназу используют для получения радиоактивномеченых зондов. Фермент обеспечивает введение радиоактивной метки с 5’-конца полинуклеотидной цепи с помощью изотопа P32 в составе АТФ, меченой по γ–фосфату. Последовательное действие фосфатазы и полинуклеотидкиназы приводит к замещению немеченого 5’–концевого фосфомоноэфира на радиоактивный без каких-либо других изменений в цепи.

**Лигазы**

Лигазы (лат. ligare – сшивать, соединять) – это ферменты, катализирующие соединение двух молекул с образованием новой химической связи (лигирование). В молекулярной биологии лигазы разделяют на две большие группы: ДНК-лигазы и РНК-лигазы.

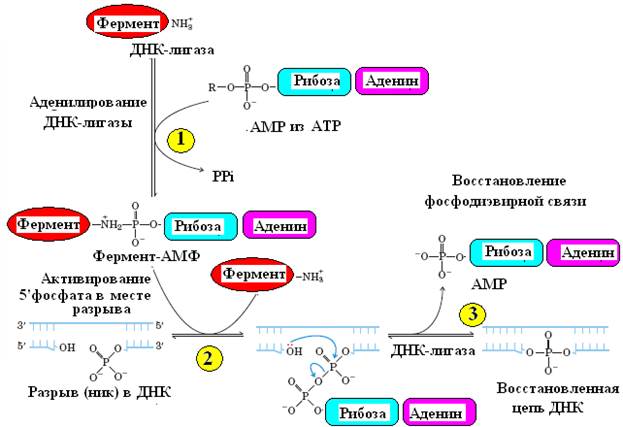


Рис. 6. Схема механизма действия ДНК-лигазы

ДНК-лигазы катализируют ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе (рис. 6). Они образуют фосфодиэфирные мостики между 5’-фосфатной и 3’- гидроксильной группами соседних дезоксинуклеотидов в местах разрывов ДНК или между двумя молекулами ДНК. Для образования этих связей лигазы используют энергию гидролиза АТФ.

В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага l показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 году такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. В биологических системах *in vtvo* ДНК-лигазы абсолютно необходимы в процессах репликации, репарации и рекомбинации.

В генной инженерии используют два типа ДНК-лигаз, отличающихся по потребностям в кофакторах и способу действия. ДНК-лигаза E. coli в качестве кофактора использует дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага Т4 - АТФ в присутствии Mg2+. Лигаза фага Т4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. Она используется чаще.