

Genome
analysis

A PRACTICAL APPROACH

Edited by K. E. Davies

Molecular Genetics Group, Nuffield
Department of Clinical Medicine, John
Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK

IRL Press

Oxford. Washington DC

Анализ генома. Методы

Под редакцией
К. ДЕИВИСА

Перевод с английского
А. В. РУДИНА,
канд. биол. наук Т. Л. ИВАНОВОЙ,
С. А. БУШАРЫ

под редакцией
канд. биол. наук П. Л. ИВАНОВ



Москва «Мир» 1990

ББК 28.04
А64
УДК 577.212

Авторы: Бантинг Г., Кантор Ч., Коллинз Ф., Колсон А., Кокс Д., Эрлих Г., Гудфеллоу П., Гиленстен У., Клко С., Ландер Э., Майерс Р., Притчард К., Саики Р., Шеффилд В., Смит К., Салстон Дж., Уэллс Р.

Анализ генома. Методы: Пер. с англ./Под. ред. К. Дей-
А64 виси. — М.: Мир, 1990. — 246 с., ил.

ISBN 5-03-001846-8

Сборник молекулярно-биологических методов, используемых при изучении генома человека, написанный коллективом авторов из США и Великобритании. Изложению каждого метода предшествует краткое теоретическое введение, что делает книгу доступной для начинающих исследователей.

Описаны методы трансфекции эукариотических клеток; рестрикционное картирование; технология больших молекул ДНК; выявление единичных замен нуклеотидов в ДНК; проведение полимеразной цепной реакции получения ДНК; генная дактилоскопия.

Для молекулярных биологов и генетиков.

A 1902000000—035
056(01)—90 —90

ББК 28.04

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001846-8 (русск.)

© IRL Press Limited, 1988
This book was originally published in the English language by IRL Press Limited, which is now part of Oxford University Press, Oxford, England

ISBN 1-85-221-109-1 (англ.)

© перевод на русский язык, Рудин А. В., Иванова Т. Л., Бушара С. А., 1990

ОТ РЕДАКЦИИ

Предлагаемый вниманию читателей сборник «Анализ генома» под редакцией К. Дейвиса — еще одна книга из прекрасно зарекомендовавшей себя серии «A Practical Approach». В ней описаны новейшие молекулярно-биологические методы переноса генов в клетках млекопитающих, рестрикционного картирования, конструирования библиотек «прыжков», полимеразной цепной реакции и др. Иными словами, в эту книгу включены те методы, которые позволяют существенно продвинуться в понимании структуры и функционирования генома, разобраться в механизмах наследственных болезней человека. Особого внимания заслуживает материал, изложенный в двух последних главах. Одна из них (гл. 7) посвящена геномной дактилоскопии, методу, перевернувшему представления о возможностях судебно-медицинской экспертизы; в другой (гл. 8) речь идет о картировании генов, ответственных за некоторые наследственные болезни человека, с помощью анализа ПДРФ-маркеров. Как всегда в книгах этой серии непосредственному описанию каждой методики предшествует краткое теоретическое введение, делающее ее понятной и начинающему аспиранту, и опытному исследователю.

Книга рекомендована для перевода Научным советом по государственной программе «Геном человека»; ее издание частично субсидировано Институтом молекулярной биологии АН СССР.

Книгу переводили: А. В. Рудин (предисловие и гл. 1—3), Г. Л. Иванова (гл. 4, 5), С. А. Бушара (гл. 6, 7, 8). Глава 8 отредактирована д. б. н. В. М. Гиндилисом.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Быстрое развитие методической базы структурных исследований генома сделало очевидным разрыв между информацией, которую мы получаем при микроскопировании и с помощью молекулярно-биологических подходов. Несомненно, выяснение полной нуклеотидной последовательности какого-то конкретного генома — важный этап его изучения, но и это знание не позволяет нам ответить на все вопросы о механизмах контроля экспрессии генов.

Цель настоящей книги — рассказать читателям об имеющихся на сегодняшний день успехах в методических подходах, которые применяются для построения физической карты генома различных организмов. Такие карты необходимы для анализа структуры и выяснения механизмов функционирования генома. Определенные успехи в выявлении локусов, кодирующих наследственные патологии, обусловлены существенным повышением чувствительности тестов, используемых в анализе человеческих мутаций. Мы старались изложить описываемые методы в такой форме, чтобы они были доступны любому сотруднику из исследовательской или диагностической лаборатории. Кроме того, в книгу включены две главы, посвященные описанию новых зондов и методических приемов, используемых для геномной локализации наследственных заболеваний человека, анализ которых до сих пор проводился без участия молекулярных генетиков.

К. Дейвис

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА	— бычий сывороточный альбумин
ДМСО	— диметилсульфоксид
ДСН	— додецилсульфат натрия (SDS)
ДТТ	— дитиотрейтол
ИПТГ	— изопропил-1-тио- β -D-галактозид
ПДРФ	— полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
ПЭГ	— полиэтиленгликоль
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ТЕМЕД	— (N,N,N',N')-тетраметилендиамин
ЭДТА	— этилендиаминотetraацетат
AMV	— вирус миелобластоza птиц
CMGT	— перенос генов, опосредованный хромосомой
DMEM	— среда Игла в модификации Дульбекко
НАТ	— гипоксантин, аминоптерин, тимидин
HPRT	— гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза
HVR	— гипервариабельная область
IFGT	— (от англ. irradiation and fusion gene transfer) перенос генов в процессе слияния облученной клетки донора и необлученной клетки реципиента
MMGT	— (от англ. microcell-mediated gene transfer) перенос генов с помощью мини-клеток
SSC	— стандартный солевой буфер с цитратом

МЕТОДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

П. Гудфеллоу, К. Притчард, Г. Бантинг¹

1. Введение

Все эксперименты по переносу генетического материала состоят из двух отдельных этапов: переноса ДНК от донора к реципиенту и отбора реципиентных клеток, которые включили генетический материал донора. Большинство соответствующих методов позволяют ввести чужеродный материал в одну клетку из тысячи, а то и десятки миллионов (10^{-7} — 10^{-3}), поэтому для отбора нужны весьма эффективные средства. Именно эта стадия зачастую является лимитирующей в ходе эксперимента.

Первые опыты по переносу генетического материала осуществляли с помощью слияния целых клеток [1]. Такая техника нашла применение при изучении процессов дифференцировки и канцерогенеза, однако наиболее успешно ее использовали при картировании генов человека [2] и получении моноклональных антител [3]. Известно, что сформировавшийся при слиянии клеток грызуна и человека межвидовой гибрид спонтанно теряет человеческие хромосомы [4]. Как правило, утрата хромосом происходит случайным образом, и это позволяет конструировать гибридные линии клеток, в которых содержатся разные хромосомы человека. Корреляция между присутствием конкретной хромосомы человека и экспрессией генетического маркера является основой для отнесения соответствующего гена к определенной группе сцепления. Из 1300 генов человека, картированных на сегодняшний день, примерно треть локализована на конкретных хромосомах с помощью методов генетики соматических клеток [5]. Процесс утраты хромосом у внутривидовых гибридов происходит не так быстро, как у гибридов межвидовых [6]. При слиянии клеток мышинной миеломы с клетками селезенки формируются стабильные линии гибридных клеток. Их характеризует иммортальность (способность к неограниченному делению), унаследованная от миелом-

¹ P. N. Goodfellow, C. A. Pritchard, G. S. Banting. Human Molecular Genetics Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK.

ных клеток, и способность продуцировать антитела (свойство, полученное от клеток селезенки).

Хромосомная нестабильность межвидовых гибридов, сложности при кариотипировании тетраплоидных внутривидовых гибридов ограничивали применение методов генетики соматических клеток для генетического анализа сложных фенотипов. Необходимо было научиться переносить отдельные хромосомы между соматическими клетками [7]. Это удалось сделать с помощью мини-клеток. Несмотря на технические трудности, метод ММGT (от англ. microcell-mediated gene transfer) с успехом использовали для создания гибридов и последующего картирования генов, для анализа процессов дифференцировки и развития опухоли. Такие эксперименты позволили с уверенностью говорить о существовании специфических *trans*-действующих регуляторов, участвующих в формировании фенотипа дифференцированной клетки [8]; кроме того, был подтвержден рецессивный характер гена опухоли Вильмса [9].

Методы слияния целых клеток и ММGT эффективны для хромосомной локализации гена, возможность более тонкого картирования этими методами ограничена, так как оно требует наличия хромосом с транслокациями и делециями. Для решения этой задачи разработаны два метода: перенос генов, опосредованный хромосомой (СМGT) [10], и перенос генов в процессе слияния облученной клетки-донора с необлученным реципиентом (IFGT, от англ. irradiation and fusion gene transfer) [11]. Первый способ предполагает инкубацию очищенных митотических хромосом с клетками-реципиентами в присутствии фосфата кальция. При этом происходит встраивание фрагментов донорных хромосом в хромосомы клетки-реципиента. Для идентификации гибридов, содержащих нужные фрагменты ДНК донора, применяют соответствующие методы селекции. К сожалению, встроенные фрагменты хромосом зачастую претерпевают реорганизацию, кроме того, есть достоверные данные о предпочтительном проникновении в клетку и последовательностей из центромерных областей [12]. Эти недостатки не позволяют использовать СМGT для картирования, хотя данный метод весьма эффективен для обогащения специфическими фрагментами хромосом — составной части стратегии клонирования, называемой «обратной генетикой». Госс и Харис [11] впервые показали, что фрагменты X-хромосомы человека, появляющиеся в его гамма-облученной клетке, можно сохранить при слиянии этой клетки с клеткой грызуна. Углубленный анализ метода IFGT показал, что полученные фрагменты реорганизованы и для них характерна та же тенденция представлять центромерные области, что и при СМGT (неопубликованные данные).

Геномную ДНК можно ввести, добавляя ее очищенный препарат к реципиентным клеткам (DMGT, от англ. DNA-mediated gene transfer). Эта процедура также очень важна для анализа функционирования генов в клетках млекопитающих. Разработаны три способа введения ДНК: преципитация с фосфатом кальция [13], с помощью ретровирусного вектора [14, 15] и микроинъекция [16]. Вероятно, для каждого из них существует предельный размер фрагментов ДНК, которые переносятся без повреждения. Хотя эту гипотезу не подвергали тщательной проверке, скорее всего дело обстоит именно так. Фрагменты длиной более 100 тысяч пар оснований вряд ли можно перенести без потерь, если это вообще возможно. Метод DMGT кроме функциональных исследований используют для случайного встраивания в геном селектируемых генов [17] и для клонирования генов, при селекции которых необходима экспрессия [18].

В данной главе мы опишем методы слияния клеток, MMTG, CMGT и DMGT. В обзорах [19—24] можно найти описание их биологических основ, а также примеры применения.

2. Общие положения

2.1. Необходимые условия

Условия культивирования клеток должны обеспечивать их максимальную жизнеспособность. Это особенно важно для клеток, используемых в эксперименте по переносу, поскольку данная процедура предполагает использование потенциально токсичных веществ, таких, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Успех экспериментов по генетическому переносу во многом определяется эффективностью посева клеток-реципиентов. Следовательно, эффективность посева всех клеточных линий, которые будут использованы в качестве реципиентов, должна быть проверена в условиях, аналогичных экспериментальным. Линии, демонстрирующие эффективность посева менее 10%, не годятся на роль реципиента.

Все манипуляции, описываемые в этой главе, необходимо проводить в стерильных условиях и со стерильными реагентами. Растворы следует готовить только из реактивов, предназначенных для культивирования клеток, обязательно использовать для этого бидистиллированную воду. Важно, чтобы читатель был хорошо знаком со стандартной техникой культивирования и клонирования клеток.

2.2. Селекция

Подробное описание методов селекции выходит за рамки этой главы; однако без достаточного представления о них попытки осуществить трансфекцию могут оказаться безуспешными. Цель селекции — предоставление определенных преимуществ клеткам, необходимым экспериментатору. Существуют четыре группы методов селекции.

2.2.1. Биохимическая селекция, основанная на эндогенных генах

Наиболее широко распространенный пример такого подхода — НАТ-селекция (от англ. hypoxanthine, aminopterin, thymidine) [25]. В присутствии аминоптерина (или схожего с ним метотрексата) ингибируется синтез *de novo* предшественников ДНК. Клетки, лишённые фермента тимидинкиназы (ТК), не могут утилизировать экзогенный тимидин и гибнут в присутствии аминоптерина. Аналогично, клетки, лишённые гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), не могут усваивать гипоксантин и также нежизнеспособны в присутствии аминоптерина. Соматические гибриды, полученные при слиянии ТК⁻, HPRT⁺-клеток с клетками ТК⁺, HPRT⁻, могут оказаться одновременно ТК⁺, HPRT⁺. Гибридные клетки с таким генотипом способны расти в присутствии аминоптерина, если гипоксантин и тимидин добавлены в среду (среда НАТ). Распространен вариант НАТ-метода (полуселекция), когда один партнер по гибридизации не может размножаться *in vitro*, а другой — является дефицитным по ТК или HPRT [26]. Для исследований в области генетики соматических клеток разработано большое количество систем комплементации. Многие из них основаны на исполь-

Таблица 1. Приготовление среды НАТ

Для приготовления среды НАТ к 98 мл среды для роста клеток необходимо добавить по 1 мл раствора 1 и раствора 2.

Раствор 1: метотрексат (известен также как аметоптерин).

1. Внесите 45 мг метотрексата в 10 мл бидистиллированной воды.
2. Добавляйте 1 М NaOH до полного растворения метотрексата.
3. Добавьте 10 мл бидистиллированной воды.
4. Доведите pH до 7,5—7,8 с помощью 1 М HCl.
5. Доведите объем до 100 мл и простерилизуйте с помощью фильтрации
6. Храните замороженным (–20 °C).

Раствор 2: гипоксантин и тимидин.

1. Внесите 140 мг гипоксантина в 30 мл бидистиллированной воды.
2. Добавляйте 1 М NaOH до полного растворения гипоксантина.
3. Доведите pH до 10 с помощью 1 М HCl.
4. Внесите 39 мг тимидина в 35 мл бидистиллированной воды.
5. Объедините растворы гипоксантина и тимидина и доведите объем до 100 мл, используя бидистиллированную воду.
6. Простерилизуйте с помощью фильтрации и храните замороженным (–20 °C).

зовании различных ауксотрофных и прототрофных клеточных линий хомячков [27]. Этот подход требует создания подходящих мутантных клеток-реципиентов.

Учитывая важность НАТ-селекции, мы предлагаем вниманию читателей руководство по приготовлению соответствующей среды (табл. 1).

2.2.2. Биохимическая селекция, основанная на экзогенных генах

Этот подход избавляет нас от необходимости выделять специфический мутант, поскольку он подразумевает использование бактериальных генов, которые дают селективные преимущества при их экспрессии в клетках млекопитающих [28]. Для этого конструируют плазмидные и ретровирусные векторы, в которых бактериальные гены сочетаются с промоторами, местами сплайсинга и сигналами полиаденилирования млекопитающих. Введение бактериальных генов в клетки млекопитающих с помощью трансфекции или инфекции приводит к их случайному распределению в геноме реципиента. В качестве примера бактериальных генов, способных обеспечивать селективные преимущества клеток млекопитающих, можно назвать ген *E. coli* *gpt* (он позволяет клеткам-реципиентам утилизировать ксантин в качестве предшественника для биосинтеза пуринов) и ген *neo* (он обуславливает устойчивость клеток млекопитающих к антибиотик G418) [29]. Основной недостаток этого метода — случайное распределение сайтов интеграции; однако последние исследования позволяют надеяться, что с помощью гомологичной рекомбинации удастся осуществлять направленную интеграцию.

2.2.3. Антигены клеточной поверхности

В роли селективного фактора могут выступать антитела. При этом мы получаем возможность выделять клетки с определенным набором антигенов клеточной поверхности [31]. Применение антител лежит в основе ряда методов, среди них отбор клеток с помощью клеточного сортера, розеткообразование с эритроцитами, связанными антителами, избирательное прикрепление клеток к поверхности с иммобилизованными на ней антителами. Хотя эффективность селекции клеток с помощью антител недостаточно высока (и более правильным было бы назвать этот метод обогащением), тем не менее селекция с использованием антител применяется во всех методах переноса генов, описываемых здесь, за исключением MMGT.

2.2.4. Активированные онкогены

Мутировавшие протоонкогены, особенно члены семейства *ras*-генов, обеспечивают преимущества в росте клеток млекопитающих и, следовательно, могут быть использованы для селекции [22].

3. Слияние целых клеток

3.1. Введение

Известно, что при смешивании клеток они могут спонтанно сливаться, однако событие это чрезвычайно редкое [1]. Эффективность слияния может быть существенно увеличена с помощью специфических антигенов. Первоначально для этой цели использовали инактивированный вирус Сендай [32], однако биологическая неоднородность различных партий инактивированного вируса и громоздкость процедуры слияния, индуцированного вирусом, привели к широкому использованию химического индуктора — полиэтиленгликоля (ПЭГ) [33]. Метод, представленный ниже, пригоден для слияния клеток как одного, так и разных видов животных. Внутривидовые гибриды формируются с частотой 10^{-5} — 10^{-3} . Частота слияния клеток разных видов варьирует от 10^{-7} до 10^{-5} . Клетки, имеющие сходные фенотипы и близкие параметры роста, сливаются с более высокой частотой.

3.2. Получение клеточных гибридов с помощью слияния, индуцированного ПЭГ (основная методика)

1. Приготовьте растворы, указанные в табл. 2.

Таблица 2. Основные растворы, необходимые для слияния клеток

Среда для роста клеток

Обычно мы используем среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10%), однако состав культуральной среды напрямую на процесс слияния не влияет

Среда для роста клеток без эмбриональной телячьей сыворотки (или других белков)

Селективная среда

Культуральная среда, пригодная для селекции гибридных клеток (например, среда HAT для получения гибридов между ТК⁻ и HPRT⁻)

50%-ный раствор ПЭГ (об/об), приготовленный в бессывороточной среде

5,5 г ПЭГ 4000 (Waker) в 5 мл бессывороточной среды смешивают и автоклавируют. Конечный pH доводят до 8,2, раствор нагревают до 37 °C непосредственно перед использованием

2. Соберите 5×10^6 клеток каждой из родительских линий, поместите их в стерильную центрифужную пробирку, перемешайте и осадите смесь, центрифугируя при 1500 g 5 мин при комнатной температуре. Осадок отмойте один раз, ресуспендируя и центрифугируя в аналогичных условиях в бессывороточной среде.
3. Удалите супернатант и разрыхлите осадок, постукивая пальцами по центрифужной пробирке.
4. Медленно добавьте заранее нагретый до 37 °С 50%-ный раствор ПЭГ, одновременно осторожно ресуспендируя осадок кончиком пипетки, используемой для добавления ПЭГ.
5. Инкубируйте 90 с при 37 °С.
6. Медленно, в течение 1—2 мин добавляйте по каплям 1 мл бессывороточной среды. Перемешайте содержимое пробирки пипеткой.
7. Медленно, в течение 1—2 мин добавляйте 5 мл бессывороточной среды. Перемешайте содержимое пробирки пипеткой.
8. Медленно, в течение 1—2 мин внесите 10 мл среды с сывороткой. Перемешайте содержимое пробирки пипеткой.
9. Центрифугируйте клетки при 1500 g 5 мин при комнатной температуре, удалите супернатант, осторожно ресуспендируйте клетки в среде для роста, постукивая по пробирке. Не пипетируйте клетки вверх и вниз для ресуспендирования осадка. Посейте клетки на 10 культуральных чашек диаметром 9 см.
10. Через 24 ч замените среду для роста клеток на селективную. Меняйте среду каждые 3—4 дня.
11. Колонии внутривидовых гибридов могут быть визуализированы через 14—21 день; для межвидовых гибридов срок увеличивается до 21—28 дней. Иногда гибриды могут появиться и позже, поэтому рекомендуем наблюдать за чашками вплоть до 45-го дня.

3.3. Возможные ошибки и варианты методики

Некоторые линии клеток сливаются с трудом, если же все-таки необходимы именно такие комбинации, попытайтесь сделать следующее.

1. Варьируйте соотношение родительских клеток в диапазоне 1:10—10:1.
2. Попробуйте разный ПЭГ:
 - а) поменяйте партию ПЭГ. В наших экспериментах та партия ПЭГ, которая давала хорошие результаты при слиянии одного типа клеток, эффективно работала и с другими. Хорошо зарекомендовавший себя препарат необходи-

мо отделить и аккуратно хранить. По некоторым данным свойства ПЭГ могут быть улучшены использованием растворов, не содержащих солей кальция [34];

- б) варьируйте молекулярный вес. Как правило, повышение молекулярного веса влечет за собой увеличение способности индуцировать слияние. Однако раствор ПЭГ с большим молекулярным весом обладает большей вязкостью, что затрудняет отмывку клеток. Так как ПЭГ является токсичным для клеток, задержка отмывки может вызывать гибель клеток и уменьшать количество получаемых гибридов. В наших опытах наиболее приемлемым оказался ПЭГ с молекулярным весом в диапазоне 1000—6000;
 - в) варьируйте концентрацию ПЭГ. Понижение концентрации ПЭГ уменьшает токсичность раствора, но одновременно снижает и эффективность слияния.
3. Вместо инкубации клеток в ПЭГ в течение 90 с при 37 °С (п. 5 основной методики слияния) можно центрифугировать клетки в ПЭГ 2 мин при 1500 g при комнатной температуре; после этого продолжить процедуры по пп. 6—11.

Если это изменение в методике не повышает выход гибридных клеток, более успешной может оказаться альтернативная методика слияния, пригодная для растущих на подложке прикрепленных клеток (табл. 3).

Таблица 3. Методика слияния для прикрепленных клеток

1. Приготовьте растворы, перечисленные в табл. 2.
2. Высейте $2,5 \times 10^5$ родительских клеток каждой линии в одну чашку Петри диаметром 9 см (используйте столько чашек, сколько необходимо).
3. Культивируйте клетки до образования монослоя (1—2 дня).
4. Удалите среду и промойте дважды бессывороточной средой.
5. Добавьте 1,5 мл раствора ПЭГ и наклоните чашку так, чтобы раствор ПЭГ покрыл равномерно всю поверхность.
6. Инкубируйте 90 с при 37 °С.
7. Удалите раствор ПЭГ и осторожно дважды промойте клетки бессывороточной средой.
8. Промойте средой, содержащей сыворотку.
9. Далее повторите пп. 10 и 11 основной методики.

Этот метод может быть также модифицирован для слияния клеток, растущих на подложке, с клетками, культивируемыми в жидкой среде. Прикрепленные клетки выращивают до образования монослоя и затем обрабатывают ПЭГ (табл. 3, п. 1—4), суспензионные клетки добавляют в небольшом объеме (1,0 мл) бессывороточной среды. Чашки центрифугируют при 1000 g 2 мин, используя специальный ротор. Последующую обработку проводят, как указано в пп. 6—8 табл. 3. Альтернативой центрифугированию может служить использование лектинов для

агглютинации прикрепленных и некрепленных клеток. Если применение этих приемов не приведет к желаемому результату, то следует сменить агент, индуцирующий слияние. Им может быть вирус Сендай, можно применить и электропробой. Опыта использования последней технологии мы не имеем, что касается слияния под действием вируса Сендай, любому желающему по первому требованию мы можем представить протоколы соответствующих экспериментов.

4. Перенос генов с помощью мини-клеток (MMGT)

4.1. Введение

Стратегия MMGT схематично представлена на рис. 1. Донорные клетки блокируются в митозе колцемидом. После продолжительной обработки в них формируется новая ядерная мембрана вокруг отдельных хромосом или их групп. В резуль-

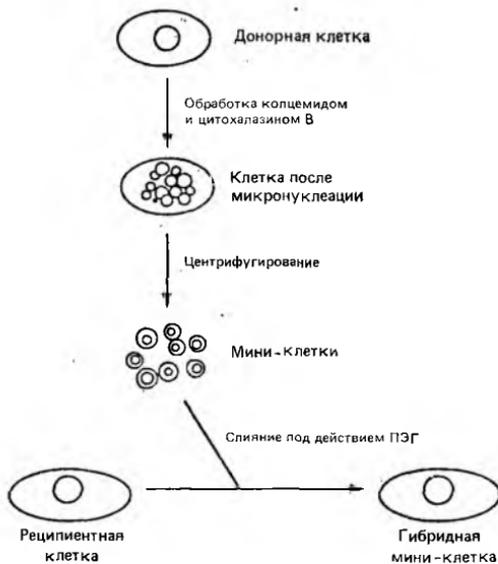


Рис. 1. Перенос генов (трансфекция) с помощью мини-клеток.

тате образуются клетки, содержащие множество микроядер. Энуклеация клеток после обработки цитохалазином В и центрифугирования приводит к образованию мини-клеток (микроядер, инкапсулированных в цитоплазматическую мембрану). Полученные мини-клетки чрезвычайно чувствительны к любым

видам воздействия, для слияния их с клетками-реципиентами следует подобрать специальные мягкие условия. Начальные эксперименты предполагали, что только клетки грызунов способны образовывать микроядра, однако, варьируя концентрацию коллемеида и время экспозиции, удалось этого достичь для большинства клеток.

Метод MMGT технически труден, «капризен», отнимает у исследователя много времени. В наших экспериментах мини-клеточные межвидовые гибриды получались только с частотой 10^{-7} — 10^{-6} .

4.2. Метод MMGT

Первый день

1. Приготовьте исходные растворы (табл. 2, 4 и 5).

Таблица 4. Исходные растворы, необходимые для MMGT

1. 50%-ный раствор фикола (об/об) на бидистиллированной воде. Этот раствор готовится в течение 12 ч (до полного растворения). Стерилизация автоклавированием.
2. 1 мг/мл цитохалазина В (Sigma) в диметилсульфоксиде (ДМСО).
3. 10-кратный раствор Хэнкса (Gibco).
4. 10-кратный раствор бикарбоната натрия: 3,5 г/л на бидистиллированной воде.
5. Бидистиллированная вода.
6. Растворы, перечисленные в табл. 2.
7. 10 мг/мл коллемеида (Difco) на дистиллированной воде.
8. 10 мг/мл фитогемагглютинаина (FGA A—P, Difco) на дистиллированной воде.

Таблица 5. Приготовление градиентного раствора фикола для MMGT

Конечная концентрация фикола, %	50%-ный фикола (мл)	10× Ф—р Хэнкса (мл)	10× Ф—р бикарбоната (мл)	Вода (мл)	Цитохалазин В (мкл)
25	5,0	1,0	1,0	3,0	50
17	3,4	1,0	1,0	4,6	50
16	3,2	1,0	1,0	4,8	50
15	3,0	1,0	1,0	5,0	50
12,5	2,5	1,0	1,0	5,5	50
10	10,0	5,0	5,0	20,0	250
0	0	3,0	3,0	24,0	150

Градиентные растворы хранят при 4 °С; для их приготовления используют растворы, перечисленные в табл. 4.

2. Подготовьте донорные клетки для получения из них мини-клеток. Нарастите 2×10^7 клеток до образования 50% монослоя и инкубируйте в течение ночи в ростовой среде, содержащей 0,05 мкг/мл коллемеида. Это индуцирует образование мини-клеток [7]. Для каждой конкретной клеточной линии необходимо подобрать оптимальную концентрацию коллемеида (от 0,02 до 0,10 мкг/мл) и время экспозиции (от 12 до 48 ч). Образование мини-клеток легко контролируется под фазово-контрастным микроскопом. В удачных экспериментах около 50% всех клеток образуют мини-клетки. Эта частота увеличивается после обработки цитохалазином В.

Второй день

3. Спустя 16 ч замените среду на среду, содержащую цитохалазин В в концентрации 2 мкг/мл; инкубируйте в течение ночи.
4. Исходные градиентные растворы (табл. 5) поместите в сосуды с неплотно завинченными крышками и инкубируйте в атмосфере 5% CO_2 при 37 °C в течение ночи.
5. Заранее нагрейте ротор SW41 (37 °C в течение ночи).

Третий день

6. Приготовление ступенчатого градиента фиколла. Тщательно промойте необходимое количество центрифужных пробирок для ротора SW41 абсолютным спиртом, высушите в перевернутом положении в ламинарном боксе. Приготовьте градиент фиколла, используя уравновешенные исходные растворы (рис. 2).
7. Соберите обработанные коллемеидом и цитохалазином клетки и осадите их центрифугированием (1500 g 5 мин при комнатной температуре). Ресуспандируйте в 3 мл 10%-ного фиколла (табл. 5) и мягко наложите на градиент. Заполните центрифужные пробирки раствором без фиколла.
8. Поместите пробирки, содержащие градиент, в нагретый ротор SW41 и поставьте ротор в заранее нагретую до 37 °C ультрацентрифугу.
9. Центрифугируйте 1 ч при 25 000 об/мин (80 000 g) при 37 °C; используйте минимальное ускорение при разгоне и минимальное торможение, чтобы предотвратить разрушение градиента.
10. Выньте пробирки из центрифуги. Мини-клетки образуют рыхлые полоски в градиенте между 15:16% и 16:17% фиколло. Осторожно отберите эти полоски, используя стерильную пастеровскую пипетку, вводя ее через верх гради-

ента; поместите мини-клетки в новую, стерильную центрифужную пробирку от ротора SW41 и заполните ее средой для роста клеток. Загрязнение фрагментами цитоплазмы, ядрами и целыми клетками можно контролировать под фазово-контрастным микроскопом.



Рис. 2. Градиент фикола для ММГТ.

11. Центрифугируйте при 20 000 об/мин (50 000 g) при комнатной температуре в роторе SW41 10 мин при максимальном ускорении и торможении. Эта процедура осаждает мини-клетки и отделяет их от фикола.
12. Для дальнейшей очистки мини-клеток мы предлагаем три различных приема. Очистка не нужна, лишь когда в распоряжении исследователей имеется четкая система селекции. В этом случае они могут сразу использовать мини-клетки для слияния с клетками-реципиентами.
13. Слияние мини-клеток с целыми клетками. Соберите клетки-реципиенты и отмойте их бессывороточной средой. Добавьте приблизительно 10^7 клеток-реципиентов к осадку мини-клеток в 2 мл бессывороточной ростовой среды, содержащей 100 мкг/мл фитогемагглютинаина. Поместите в пластиковый сосуд с коническим дном и инкубируйте 10 мин при 37 °С.
14. Осадите центрифугированием (1500 g 5 мин при комнатной температуре).

15. Процедуру слияния мини-клеток с целыми клетками проводите с помощью ПЭГ, как указано в соответствующей методике.

4.3. Очистка мини-клеток

4.3.1. Метод А [7]

1. Соберите и объедините фракции градиента фикола, содержащие мини-клетки.
2. Ресуспендируйте и доведите объем до 22 мл фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7,2, содержащим 0,5% бычьего сывороточного альбумина.
3. Осадите центрифугированием при 50 000 g 10 мин при комнатной температуре.
4. Ресуспендируйте осадок в 2 мл PBS с 0,5% БСА и наложите на 50 мл линейного градиента БСА (1—3%) в PBS (pH 7,3). Градиент готовят из 25 мл 1%-ного БСА и 25 мл 3%-ного БСА с помощью градиент-формера. После наложения выдержите пробирку 3,5 ч при комнатной температуре. Целые клетки осядут на дно пробирки, а мини-клетки останутся в верхней части градиента.
5. Соберите 20 мл верхней части градиента, исключая зону нанесения образца, и осадите центрифугированием при 1500 g в течение 5 мин при комнатной температуре.
6. Используйте полученный осадок мини-клеток для слияния с реципиентными клетками с помощью ПЭГ.

4.3.2. Метод Б [35]

1. Соберите и объедините фракции градиента фикола, содержащие мини-клетки.
2. Ресуспендируйте и доведите объем до 20 мл средой для роста клеток.
3. Осадите центрифугированием при 50 000 g 10 мин при комнатной температуре.
4. Ресуспендируйте осадок в 20 мл ростовой среды и внесите суспензию в две культуральные чашки диаметром 9 см. Выдержите 90 мин при 37 °С.
5. Отберите суспензию из чашек и перенесите в новые чашки. Выдержите 90 мин при 37 °С.
6. Отберите среду, содержащую мини-клетки, и отцентрифугируйте ее совместно с клетками, предназначенными для слияния (1500 g 5 мин при комнатной температуре).
7. Сливайте мини-клетки с реципиентными клетками согласно методике слияния с помощью ПЭГ.

4.3.3. Метод В [36]

1. Соберите и объедините фракции градиента фиколла, содержащие мини-клетки.
2. Ресуспендируйте и доведите объем до 20 мл средой для роста клеток.
3. Осадите центрифугированием при 50 000 *g* в течение 10 мин при комнатной температуре. Ресуспендируйте осадок в 10 мл ростовой среды и пропустите через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,8 мкм (Nucleopore). Фильтр монтируется в круглый заворачивающийся держатель и стерилизуется автоклавированием. Может возникнуть необходимость приготовить несколько фильтров. Суспендированные мини-клетки нельзя пропускать через фильтр под большим давлением.
4. Пропустите полученный фильтрат через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,3 мкм (Nucleopore).
5. Осадите мини-клетки центрифугированием фильтрата (1500 *g* 5 мин при комнатной температуре).
6. Сливайте мини-клетки с реципиентными клетками согласно методике слияния с помощью ПЭГ.

4.4. Возможные ошибки и варианты методики

Продолжительная обработка клеток колцемидом с последующим воздействием цитохалазином В — один из наиболее простых способов индуцировать микронуклеацию [20]. Однако для каждого случая необходимо подобрать концентрацию реагентов и время экспозиции. Если этот метод окажется неудовлетворительным, можно воспользоваться двумя другими вариантами. Один из них — создание промежуточной донорной клетки «человек—грызун» и использовать их в качестве донора человеческих хромосом [37]. Гибридные клетки формируют мини-клетки в тех же условиях, что и используемые в качестве родительских клетки грызуна.

Второй путь — это использование для микронуклеации окиси азота [38].

Процедура энуклеации, описанная выше, основывается на методе, предложенном Виглером и Вайнштейном [39]. Мы использовали этот метод, поскольку он подходит для клеток, растущих на подложке, и для суспензионных культур. Большинство наших коллег предпочитали следовать другой методике, которая была предложена Прескоттом [40]. В этом случае клетки культивируют прикрепленными к покровным стеклам или к пластиковой подложке. Ее помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют в среде, содержащей цитохалазин В.

Иногда центрифугируют при 20 000 g целые культуральные флаконы. Утверждают, что при этом способе обработки препараты содержат меньше целых клеток.

Низкая эффективность метода MMGT означает, что загрязнение целыми клетками является серьезной проблемой даже в том случае, когда система селекции предусматривает подавление их роста. В некоторых экспериментах мы обнаружили гибриды целых клеток и даже ревертанты донорных клеток, которые смогли избежать элиминации. Конечно, процедура очистки мини-клеток в какой-то степени решает проблему, но ценой уменьшения выхода мини-клеток и, как следствие, последующего уменьшения выхода гибридов. Один из способов разрешить это противоречие — использовать реципиентные и донорные клетки с различной морфологией. Например, в наших опытах в роли реципиентов выступали клетки эмбриональной карциномы мыши (ЭК). Их морфология является рецессивным признаком по отношению к морфологии L-клеток. В экспериментах, где гибридные клетки «человек—грызун» с морфологией L-клеток используются в качестве доноров человеческого хромосом, а ЭК-клетки — в качестве реципиентов, гибриды целых клеток могут быть легко выявлены по их морфологии.

И последнее замечание: 30% наших MMGT-клонов содержат реорганизованные хромосомы и 30% — содержат более чем одну донорскую хромосому.

5. Перенос генов, опосредованный хромосомами (SMGT)

5.1. Введение

Метод SMGT может быть использован для переноса фрагментов хромосом из ядер клеток одного типа в ядра клеток другого типа. Теоретически клетки любого типа могут быть использованы как в качестве доноров, так и в качестве реципиентов хромосом. Однако на практике возможность применения метода определяется наличием подходящих реципиентных линий, обладающих повышенной способностью акцептировать чужеродную ДНК.

Высокая частота трансфекции может быть достигнута при использовании в качестве реципиентов иммортализованных мышинных клеток. Клеткам хомячка и иммортализованным человеческим клеткам обычно присуща более низкая частота трансфекции. Правда, недавно полученные результаты свидетельствуют о том, что человеческие клетки линии EJ (карцинома мочевого пузыря) способны трансфицироваться с высокой частотой (сравнимой с частотой трансфекции мышинных L-клеток). В роли донора с одинаковым успехом могут выступать самые

разнообразные клеточные линии — как суспензионные, так и субстрат-зависимые. Предпочтительнее использовать в качестве донорных те линии, клетки которых легче культивировать и получать в больших количествах. Ниже описываются общие процедуры, обеспечивающие выделение донорных хромосом и перенос фрагментов этих хромосом в реципиентные клетки путем CMGT.

5.2. Выделение хромосом

В ходе описываемых процедур для предотвращения потерь и поломок хромосом, для обеспечения температурного режима (+4 °C) необходимо использовать пластиковые пипетки и пробирки. Клетки блокируют на стадии митоза, митотические хромосомы высвобождают воздействием гипотонического шока и гомогенизацией. Хромосомы очищают дифференциальным центрифугированием.

1. Приготовьте исходные растворы (табл. 6).

Таблица 6. Исходные растворы на CMGT

Среда для роста клеток и селективная среда	NB. Трансфекцию необходимо проводить в средах с небольшим содержанием фосфатов, таких, как DMEM. Клетки, растущие в средах, обогащенных фосфатами, непосредственно перед проведением трансфекции пересейте на среду, бедную фосфатами. Среда, обогащенная фосфатами, можно использовать при глицериновом шоке	
Гипотонический раствор (pH 7,1)	10	мМ Нерес 3 мМ хлорида кальция
Раствор для трансфекции (pH 7,1)	25 134 5 0,7 5	мМ Нерес мМ хлорида натрия мМ хлорида калия мМ дигидрофосфата натрия мМ глюкозы
1,25 М хлорида кальция Раствор для отмывки (pH 7,1)	25 134 5 0,7	мМ Нерес мМ хлорида натрия мМ хлорида калия мМ дигидрофосфата натрия

2. Нарастите донорные клетки до монослоя. Это обеспечивает частичную синхронизацию культуры.
3. Выдержите клетки 16—24 ч перед трансфекцией. Пересейте клетки в плотности 30% от монослоя в среду, содержащую 20% эмбриональной телячьей сыворотки и 0,1 мг/л колленида.
4. На следующий день соберите клетки и отмойте их дважды средой без сыворотки (или других белков).

5. Ресуспенсируйте клетки в гипотоническом растворе до концентрации 10^7 клеток в 1 мл. Инкубируйте 20—30 мин при 4°C . Затем пропустите клеточную суспензию 10 раз через иглу 21-го калибра, держа пробирку с суспензией во льду в течение всей процедуры.
6. Центрифугируйте разрушенные клетки при 700 g в течение 7 мин при 4°C для удаления интактных клеток и ядер.
7. Соберите супернатант и осадите хромосомы центрифугированием при 2500 g в течение 25 мин при 4°C .
8. Ресуспенсируйте осадок в подходящем объеме гипотонического раствора и повторите пп. 6 и 7. Осажденные хромосомы готовы для трансфекции и должны быть использованы немедленно.

Выход хромосом можно контролировать окрашиванием аликвоты хромосомного препарата красителем Гимза и просчитыванием хромосом под микроскопом.

Описанный нами метод позволяет выделить десять процентов от всех обрабатываемых донорных хромосом.

5.3. Перенос хромосом

Процесс переноса хромосом в этом случае очень напоминает описываемый в методе DMGT. Хромосомы осаждают на поверхности клеток хлоридом кальция, и спустя несколько часов клетки обрабатывают реагентом, способным перфорировать мембраны. Здесь тоже важно использовать пластиковые пробирки и пипетки. Последовательность действий, которая приведена ниже, разработана Нельсоном [41].

1. За день перед проведением трансфекции высейте по 5×10^5 клеток на 10 чашек диаметром 9 см. Используйте низкофосфатную среду, например DMEM.
2. Ресуспенсируйте 10^8 хромосом в 9 мл раствора для трансфекции.
3. Медленно добавляйте к хромосомам 1 мл 1,25 M раствора CaCl_2 , одновременно продувая воздух через суспензию хромосом.
4. Инкубируйте 20—30 мин при комнатной температуре для образования смеси фосфат кальция — ДНК.
5. Добавьте по 1 мл этой смеси к среде в каждую чашку с реципиентными клетками. Инкубируйте клетки с хромосомами 4—6 ч в увлажняющем инкубаторе при 37°C .
6. Удалите среду и добавьте 10 мл отмывочного раствора.
7. Удалите отмывочный раствор и обработайте клетки 1 мл среды для глицеринового шока в течение 4 мин при комнатной температуре.

8. Отмойте клетки 3 раза промывочным раствором и инкубируйте в течение ночи в неселективной среде для роста клеток.
9. Через 24 ч поменяйте среду на селективную. Меняйте среду на свежую каждые 3—4 дня.
10. Колонии появятся на 14—21-й день.

5.4. Предварительная селекция

При использовании DMGT донорная геномная ДНК обычно переносится вместе с плазмидой, кодирующей доминантный селективный маркер. Предварительная селекция, выявляющая включение плазмидной ДНК, позволяет получить 100-кратное обогащение клетками, содержащими интересующий нас клеточный ген. Аналогичный прием может быть использован и в SMGT. Для проведения котрансфекции необходимое количество плазмидной ДНК добавляют к суспензии хромосом (п. 2) перед преципитацией хлоридом кальция (п. 3). Обычно мы добавляем плазмидную ДНК в количестве, достаточном для достижения соотношения 20:1 (по весу; клеточная ДНК:плазмидная ДНК). Селекцию проводим спустя 24 ч после хромосомной трансфекции.

5.5. Возможные ошибки и варианты методики

В литературе описано множество методов выделения хромосом из клеток, блокированных в метафазе. Процедуры очистки тоже разнообразны. Одни из них позволяют получить высокоочищенные препараты, другие — грубую фракцию хромосом, загрязненную разными компонентами клетки. Мы предпочитаем использовать для проведения трансфекции именно такие грубые препараты, во-первых, потому что их получение занимает мало времени, а во-вторых, потому что хромосомы при этом оказываются наименее разрушенными.

Анализ, проведенный Льюисом [42], показал, что существует линейная зависимость частоты SMGT-трансфекции от дозы донорных хромосом. В большинстве последующих экспериментов исследователи старались ввести в клетку как можно больше хромосом. Однако на практике количество хромосом, которое можно получить, ограничено. Основное препятствие в использовании очень большого количества донорных клеток — это высокая вязкость суспензии хромосом, которая способствует их агглютинации. Вот почему мы добавляем не более 20 хромосом на одну реципиентную клетку. Помимо механического воздействия для получения препарата хромосом можно применять

и химическую обработку, включая использование мягких детергентов, таких, как дигитонин [43].

Исходя из нашего опыта, можно заключить, что результаты трансфекции воспроизводимы. В некоторых случаях может оказаться необходимым оптимизировать условия «шока», варьируя концентрацию глицерина и время инкубации. Обсуждение способа трансфекции с помощью осаждения фосфатом кальция приводится в разд. 6.

При использовании метода SMGT образуются реципиентные клетки, содержащие фрагменты донорных хромосом: в некоторых случаях они встраиваются в геном реципиента, иногда реплицируются самостоятельно. Невозможно выделить параметр, контролирующий размеры передаваемого фрагмента, и в большинстве экспериментов получаются клоны, содержащие донорный материал в широком диапазоне. Мы детально анализировали введенные фрагменты во всех случаях. В них наблюдались перестройки: это либо внутренние делеции, либо переобогащение альфоидными последовательностями из области центромеры [12, 21]. Внутренние делеции описаны также другими авторами [22].

6. Перенос генов, опосредованный ДНК

6.1. Введение

В настоящее время разработано большое количество методов для введения клонированных последовательностей ДНК в клетки млекопитающих. Среди них преципитация фосфатом кальция или DEAE-декстраном, электропробой, использование инактивированных вирусов и слияние прокариотических и дрожжевых протопластов с клетками млекопитающих. Наиболее широкое распространение получила преципитация фосфатом кальция. Точный механизм захвата ДНК, ее включения в реципиентную клетку непонятен, однако известно, что лишь небольшое количество клеток в культуре реципиентов включают ДНК. По аналогии с бактериальной генетикой эти клетки получили название «компетентных». Количество включаемой ДНК — важная характеристика используемой клеточной линии. Мышиные L-клетки включают несколько миллионов пар оснований экзогенной ДНК, человеческие фибробласты — только часть этого количества [44]. Было проведено несколько экспериментов по выявлению максимальных размеров ДНК, передаваемой неповрежденной. Обычно не удается перенести интактную ДНК, размеры которой превышают 100 т. п. н. Неизвестно, зависит ли это от свойств клеток-реципиентов или определяется трудностями в получении таких больших фраг-

ментов ДНК интактными. Недавние успехи в получении высокомолекулярных фрагментов ДНК позволяют проанализировать оба этих варианта.

6.2. Трансфекция ДНК с использованием фосфата кальция

1. Приготовьте растворы, перечисленные в табл. 7.

Таблица 7. Растворы для DMGT

Среда для роста клеток	Используйте низкофосфатную среду для роста клеток, такую, как DMEM
Селективная среда 2×Нерес-буфер (2×HBS) рН 7,1±0,05	рН очень важен и должен быть проверен, если раствор длительно хранился 50 мМ Нерес 290 мМ хлорида натрия 1,5 мМ фосфата натрия (равное количество гидро- и дигидрофосфата)
1×HBS	25 мМ Нерес 145 мМ хлорида натрия 0,75 мМ фосфата натрия (равное количество гидро- и дигидрофосфата)
1,25 М хлорид кальция Раствор для глицирино- вого шока	15% глицерина в 1×HBS

- Высейте клетки в чашки Петри диаметром 9 см (5×10⁵ клеток на одну чашку) за день до эксперимента.
- Приготовьте ДНК для трансфекции, добавляя 20 мкг ДНК к 0,5 мл двукратного Нерес-буфера (HBS) (для одной чашки), и добавьте дистиллированную воду до конечного объема 0,9 мл.
- Медленно добавьте 0,1 мл 1,25 М раствора СаCl₂ к раствору ДНК, одновременно осторожно продувая воздух через смесь. Этим достигается хорошее перемешивание и предотвращается образование больших агрегатов.
- Инкубируйте при комнатной температуре 20—30 мин до тех пор, пока раствор не станет мутным и не приобретет «молочный» оттенок.
- Добавьте полученную смесь ДНК непосредственно к клеткам, не удаляя ростовую среду, инкубируйте при 37 °С в течение 4 ч.
- Промойте один раз чашки 1×HBS.
- Добавьте 1 мл раствора для глициринового шока и инкубируйте 4 мин при комнатной температуре.
- Отмойте 2—3 раза раствором HBS.
- Добавьте свежую неселективную среду.

11. Через 24 ч удалите неселективную среду и добавьте селективную. Меняйте среду каждые 3—4 дня. Колонии клеток, включивших ДНК, начнут появляться через 14—21 день.

6.3. Совместный перенос (котрансфекция) и предварительная селекция

Известно, что компетентные клетки способны включать большое количество донорной ДНК, причем одна реципиентная клетка может включать несколько разных молекул донорной ДНК в один геномный сайт. Этот феномен позволяет выделять компетентные субпопуляции из общей массы реципиентных клеток и маркировать геном млекопитающих. Если донорная ДНК смешана с плазмидной, кодирующей селективный для клеток млекопитающих маркер, селекция по плазмидному гену после трансфекции позволяет выделить популяцию трансфицированных клеток. Такое обогащение облегчает дальнейшую очистку реципиентных клеток. Этот прием оказался успешным при клонировании генов, кодирующих клеточные поверхностные антигены. В данном случае для обогащения использовали антитела, а для разделения субпопуляций клеток флуоресцентный сортер (FACS) [46].

В реципиентных клетках ДНК плазмиды, содержащей селективный маркер, лигируется с донорной геномной ДНК. Это приводит к «маркированию» последовательности ДНК клетки млекопитающего и может упростить выделение донорного гена после нескольких повторных трансфекций [47].

В опытах по котрансфекции мы использовали смесь из 1 мкг плазмидной и 20 мкг геномной ДНК. Смесь готовили непосредственно перед добавлением хлорида кальция.

6.4. Возможные ошибки и варианты методики

Не все клетки способны к трансфекции геномной ДНК с высокой частотой. Одни клетки вообще не трансфицируются, другие, например человеческие фибробласты, способны эффективно включать плазмидную ДНК и почти не включать геномную ДНК. Мышиные L-клетки обладают способностью к трансфекции геномной ДНК с высокой частотой и могут быть использованы в качестве положительного контроля в экспериментах по трансфекции ДНК новыми клеточными линиями. Возможно, что альтернативные способы прямого включения геномной ДНК, такие, как электропробой или липосомный перенос, смогут расширить список клеточных линий, способных к трансфекции. В противовес общепринятому мнению мы получали хорошие результаты по трансфекции L-клеток, используя реципи-

тацию (п. 4), при которой образовывался осадок как в виде слабо опалесцирующей суспензии, так и в форме агрегатов. Тем не менее, конечно, предпочтительнее соблюдать условия, при которых формируется гомогенный осадок.

Глицериновый шок увеличивает частоту трансфекции в 2—5 раз. Оптимальные условия проведения шока для разных клеток варьируют. В каждом новом случае необходимо подбирать как концентрацию глицерина, так и время инкубации.

7. Заключение

Надеемся, что материалы, представленные в этой главе, смогут послужить отправной точкой для исследователей, желающих овладеть методами трансфекции клеток млекопитающих. Однако не следует относиться к приведенным данным догматически. Если какой-то метод у вас не работает, то, во-первых, проверьте эффективность клонирования клеток-реципиентов при используемых условиях эксперимента, во-вторых, проконсультируйтесь в лаборатории, где этот метод отработан, и, в-третьих, поварьируйте условия. Желаем удачи!

Благодарности

П. Гудфеллоу выражает особую благодарность В. Ван-Хейнингену за помощь в овладении методами культивирования и слияния клеток. Мы признательны всем нашим коллегам из лаборатории молекулярной генетики человека за те усилия, которые были предприняты ими при получении гибридных клеток и трансфектантов. Благодарим С. Мидлмисс за редакторскую помощь.

Литература

1. Barski G., Sorieul S., Cornefert F. (1960) C. R. Acad. Sci., **251**, 1825.
2. Ruddle F. H. (1972) Adv. Hum. Genet., **3**, 173.
3. Köhler G., Milstein C. (1975) Nature, **256**, 495.
4. Weiss M., Green H. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 1103.
5. Human Gene Mapping 9 (1988) Cytogenet. Cell Genet., **46**, 1.
6. Bengtsson B. O., Nabholz M., Kennett R., Bodmer W. F., Povey S., Swallow D. (1975) Somat. Cell. Genet., **1**, 41.
7. Fournier R. E. K., Ruddle F. H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 219.
8. Petit C., Leveilliers J., Ohm C., Weiss M. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 2561.
9. Weissman B. E., Saxon P. J., Pasquale S. P., Jones G. R., Geiser A. G., Stanbridge E. J. (1987) Science, **236**, 175.
10. McBride O. W., Ozer H. L. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 1258.
11. Goss S. J., Harris H. (1975) Nature, **255**, 680.
12. Pritchard C. A., Goodfellow P. N. (1987) Genet. Dev., **1**, 172.
13. Graham F. L., van der Eb A. J. (1973) Virology, **52**, 456.

14. Neumann E. M., Schafer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. (1982) *EMBO J.*, **1**, 841.
15. Mann R., Mulligan R. C., Baltimore D. (1983) *Cell*, **33**, 153.
16. Capecchi M. R. (1980) *Cell*, **22**, 479.
17. Tunnacliffe A., Parkar M., Povey S., Bengtsson B. O., Stanley K., Solomon E., Goodfellow P. (1983) *EMBO J.*, **2**, 1577.
18. Lowy I., Pellicer A., Jackson J. F., Sim G. K., Silverstein S., Axel R. (1980) *Cell*, **22**, 817.
19. De Jonge A. J. R., Bootsma D. (1984) *Int. Rev. Cytol.*, **92**, 133
20. Fournier R. E. K. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6349.
21. Goodfellow P. N., Pritchard C. A. (1988) *Cancer Surveys*, in press.
22. Porteous D. J. (1987) *Trends Genet.*, **3**, 171.
23. Ringertz N. R., Savage R. E. (1976) *Cell Hybrids*. Academic Press, New York.
24. Shay J. W. (1982) *Techniques in Somatic Cell Genetics*. Plenum Press, New York.
25. Szybalski W., Szybalska E. H., Ragni G. (1962) *Natl. Cancer Inst. Mongr.*, **7A**, 75.
26. Nabholtz M., Miggiano V., Bodmer W. F. (1969) *Nature*, **223**, 358.
27. Puck T. T., Kao F. T. (1982) *Annu. Rev. Genet.*, **16**, 225.
28. Mulligan R. C., Berg P. (1980) *Science*, **209**, 1422.
29. Southern P. J., Berg P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 327.
30. Smithies O., Gregg R. G., Boggs S. S., Koralewski M. A., Kucherlapati R. S. (1985) *Nature*, **317**, 230.
31. Tunnacliffe A., Jones C., Goodfellow P. N. (1983) *Immunol. Today*, **4**, 230.
32. Harris H., Watkins J. (1965) *Nature*, **205**, 640.
33. Pontecorvo G. (1975) *Somat. Cell Genet.*, **1**, 397.
34. Schneiderman S., Farber J. L., Baserga R. (1979) *Somat. Cell. Genet.*, **51**, 263.
35. Zorn G. A., Lucas J. L., Kates J. R. (1979) *Cell*, **18**, 659.
36. McNeill C. A., Brown R. L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5394.
37. Goodfellow P. N., Banting G., Trowsdale J., Chambers S., Solomon E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1190.
38. Mullinger A. M., Johnson R. T. (1976) *J. Cell. Sci.*, **22**, 243.
39. Wigler M. H., Weinstein I. B. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 669.
40. Prescott D. M., Myerson D., Wallace J. (1972) *Exp. Cell Res.*, **71**, 480.
41. Nelson D. L., Weis J. H., Przyborski M. J., Mulligan R. C., Seidman J. G., Houseman D. E. (1984) *J. Mol. Appl. Genet.*, **2**, 563.
42. Lewis W. H., Srinivasan W. H., Stokoe N., Siminovitich L. (1980) *Somat. Cell. Genet.*, **6**, 333.
43. Porteous D. J., Boyd P. A., Christie S., Cranston G., Fletcher J. M., Gosden J. R., van Heyningen V., Rout D., Seawright A., Simola K. O. J., Hastie N. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5355.
44. Hoijmakers J. H. J., Odijk H., Westerveld A. (1987) *Exp. Cell Res.*, **169**, 11.
45. Wigler M., Sweet R., Sim G.-K., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R. (1979) *Cell*, **16**, 777.
46. Kuhn L. C., McClelland A., Ruddle F. H. (1984) *Cell*, **37**, 95.
47. Westerveld A., Hoijmakers J. H. J., van Duin M., de Wit J., Odijk H., Pastin K. A., Wood R., Bootsma D. (1984) *Nature*, **310**, 425.

РЕСТРИКЦИОННОЕ КАРТИРОВАНИЕ

*А. Колсон, Дж. Салстон*¹

1. Введение

Картирование генома — быстро развивающаяся область исследований. Для ученых, избравших ее своей специальностью, это одновременно и хорошо, и плохо. Хорошо, поскольку это освобождает нас от необходимости соблюдать узкую направленность в своей работе, а плохо, поскольку мы пока не знаем, какой способ картирования дает наиболее реальную картину структуры генома и, следовательно, какие данные больше соответствуют истине. Оглядываясь на путь, пройденный нами в исследованиях по картированию, мы с сожалением должны констатировать: если бы пришлось начинать все сначала, мы вряд ли бы двигались в том же направлении.

Картирование генома подразумевает создание систематизированной библиотеки клонов, которая полностью представляет геном (или определенную его часть) и содержит набор генетических маркеров, достаточный, чтобы строить физическую и генетическую карты. По ходу исследований мы постепенно приближаемся к истинной структуре. В идеале карты, полученные разными способами, должны быть идентичными. Изучение структуры генома не требует обязательного построения рестрикционной карты, однако некоторые способы картирования автоматически приводят к ее получению.

Цель картирования — облегчить процедуру клонирования известных генов и способствовать поиску в геноме интересующих клонов. Наличие карты позволяет легко соотносить друг с другом результаты разрозненных экспериментов по локализации в геноме различных клонов.

2. Стратегия

2.1. Сравнение клонов

В любом методе картирования генома центральной процедурой является сравнение клонов, позволяющее выявить частичные перекрытия. Наиболее просто перекрытия можно

¹ *A. Coulson, J. Sulston*. Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK.

обнаружить с помощью гибридизации. Однако саму по себе гибридизацию нельзя считать удовлетворительным критерием взаимного соответствия клонов, так как имеющиеся в геноме, особенно у эукариот, диспергированные повторы могут давать ложноположительные ответы. Кроме того, прямое сравнение пар — процедура слишком трудоемкая, чтобы использовать ее для реализации программы, требующей сопоставления большого количества клонов. Более приемлемым представляется такой подход, который позволяет постепенно накапливать информацию о каждом клоне, а затем анализировать ее.

Большинство методов картирования в настоящее время основано на обработке ДНК генома одной или несколькими рестриктазами с последующим определением размеров образующихся фрагментов. Для этой цели предложен ряд методик.

Вначале мы бы хотели коснуться приема, использованного нами при анализе структуры генома нематоды *Caenorhabditis elegans* (80×10^6 пар оснований) [1]. Он получил название «метод отпечатков пальцев» (фингерпринт) и подразумевает использование неупорядоченных и неполных наборов фрагментов, которые являются характеристикой клона, хотя и описывают его неполностью: фрагменты разделяют с помощью электрофореза в тонкослойном полиакриламидном геле.

2.2. Векторы

Стратегия картирования основывается на анализе случайно отобранных клонов. Совершенно ясно поэтому, что при картировании необходимо иметь как можно более обширную библиотеку клонов. Желательно также, чтобы размер клонированных вставок позволял их использовать в дальнейшем в биохимической генетике.

Первоначально мы выбрали для экспериментов космиды из-за сравнительно крупных размеров акцептируемой ДНК (40 т. п. н.). С тех пор как более 10 лет назад Коллинс и Хон ввели в практику первый космидный вектор [2], было сконструировано большое количество новых векторов такого рода. Среди них используемый в картировании *Caenorhabditis* [3], векторы серии Lorist (особенно Lorist2 и Lorist6), разработанные Литлом и Кроссом [6]. Последние два имеют интересные структурные особенности, в частности наличие постоянного числа копий и, что еще более важно для описываемых здесь методов, присутствие элементов, увеличивающих представительность клональных библиотек: терминаторов транскрипции, предотвращающих влияние векторных генов, возможное при транскрипции клонированных вставок. Эти векторы содержат также промоторные последовательности фагов SP6 и T7, об-

легчающие считывание. Методы конструирования, расщепления и дефосфорилирования векторных ДНК описаны Маниатисом [7].

λ 2001 [8] — единственный λ -вектор, использованный при картировании *Caenorhabditis*. И хотя в этом случае вставка составляет только половину последовательности космидной вставки, клоны оказываются более стабильными. Наконец, для некоторых областей генома отмечено более полное представительство именно в λ -библиотеке (А. Spence, частное сообщение).

Недавно был получен вектор, с помощью которого можно конструировать искусственные дрожжевые хромосомы (YAC) [9]. Это открытие сулит переворот в картировании: появляется возможность клонировать фрагменты ДНК, на порядок превышающие по размерам космидные вставки. Вероятно также, что соответствующие геномные библиотеки окажутся более представительными. Метод «отпечатков пальцев» (фингерпринт) пока пригоден лишь для маленьких YAC, но, используя гибридизацию, можно будет присоединять к космидам и большие фрагменты. Скорее всего в будущем для картирования генома будет применяться техника подбора пар, специально разработанная для YAC.

2.3. Селекция клонов

Если создан банк клонов и разработана техника подбора пар, остается только выбрать стратегию селекции для дальнейшего анализа клонов. Для небольших геномов более эффективно первоначально подбирать клоны случайным образом. Затем, когда эта возможность исчерпывается, необходимо заполнить оставшиеся пробелы в карте с помощью гибридизационных или других методов.

3. Экспериментальная часть

Список используемых реагентов представлен в разд. 5.

3.1. Создание библиотеки

3.1.1. Космиды

Поскольку именно космидная библиотека является основой нашей работы, мы решили подробно описать здесь ее создание.

Выделение геномной ДНК

Представленный здесь пример — экстракция ДНК из нематод. Этот метод универсален и включает минимум необходимых манипуляций.

Червей выращивают в жидкой питательной среде [10], отмывают, быстро замораживают и хранят в жидком азоте, в аликвотах по 1 г.

1. Размельчите одну аликвоту до порошкообразного состояния в ступке, охлажденной в жидком азоте, затем осторожно смешайте ее с 30 мл раствора, содержащего 100 мМ этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТА), рН 8,0, 0,5% додецилсульфата натрия (ДСН) и 50 мкг/мл протеиназы К.
2. Инкубируйте 2 ч при 50 °С.
3. Охладите на льду, добавьте равный объем фенола и экстрагируйте 15 мин при 4 °С, медленно перемешивая. Отцентрифугируйте и осторожно удалите водный слой пипеткой с широким носиком.
4. Добавьте два объема 95%-ного спирта и осторожно наматывайте ДНК на толстую стеклянную палочку. Отмойте три раза 70%-ным спиртом, высушите на воздухе и суспендируйте в 3 мл раствора, содержащего 10 мМ трис-НСl рН 7,4, 0,1 мМ ЭДТА (раствор ТЕ).

Для последующего эффективного получения космид не обязательно использование градиента CsCl.

Приготовление фрагментов

Чтобы избежать ошибок в процессе картирования путем подбора пар по методу «отпечатков пальцев», важно не использовать при приготовлении фрагментов лигазную обработку. Мы предпочитаем двумерную электрофоретическую очистку выделению в градиенте плотности сахарозы, так как это дает более ясную картину распределения по размерам и достаточный выход эффективно клонируемых фрагментов.

Для предотвращения ошибок, связанных с «концевыми эффектами», желательнее при анализе библиотеки, полученной на основе частичного гидролиза геномной ДНК, вводить ту же рестриктазу и в анализирующую рестрикционную систему. Так, например, частичная *Sau3A1*-библиотека, анализируемая с помощью *HindIII* и *Sau3A1*, не будет давать артефактов. Что касается космидных клонов, у которых фингерпринтные картины могут состоять из 20—30 полос, это требование необязательно, однако при картировании клонов концевые эффекты вызывают серьезные затруднения.

1. Подберите необходимые условия для частичного гидролиза [7]. Выберите четыре варианта усиления жесткости обработки так, чтобы получались фрагменты требуемого размера (около 40 т. п. н.).
2. Гидролизуйте 4 аликвоты по 40 мкг свежеекстрагированной ДНК. Образцы заморозьте.

3. Перед проведением препаративного электрофореза сравните небольшое количество образца (около 50 нг) с λ /*Hind*III-маркерами, проведя электрофорез в 150 мл 0,3%-ного агарозного геля HGT TAE (см. разд. 6) (17×17^2), 1 В/см в течение 16 ч. Для корректного измерения размеров фрагментов все последующие определения должны быть проведены в тех же условиях.
4. После требуемого гидролиза объедините аликвоты ДНК, проведите фенольную экстракцию и спиртовое осаждение.
5. Растворите в 180 мкл раствора TE. Добавьте 60 мкл неденатурирующего красителя, нанесите в 16 лунок (0,5 см) 0,4%-ного агарозного геля LGT TAE (250 мл). (Когда вносите большое количество частично гидролизованной ДНК, будьте осторожны и не вытяните следы ДНК на поверхность электродного буфера вынимая пипетку из лунки после нанесения образца.)
6. Нанесите в качестве маркеров λ /*Hind*III и интактную λ ДНК. В препаративном геле это не укажет вам точно размеры фрагментов, но поможет аккуратно отрезать полоски геля. Проведите электрофорез в течение 20 ч при 1 В/см и окрасьте гель бромидом этидия. (Краситель может быть добавлен прямо в буфер в концентрации 0,2 мкг/мл.)
7. Результат электрофореза вы можете увидеть, поместив гель под длинноволновую ультрафиолетовую лампу (избегайте экспозиции ДНК под коротковолновым ультрафиолетом). Отрежьте полоски по 2 мм шириной от всех 16 дорожек для отделения гидролизованного материала.
8. Расплавьте агарозный гель, нагревая в течение 10 мин требуемые образцы при 68°C в пластиковых пробирках (Falcon 2063). Проведите фенольную экстракцию, сконцентрируйте изобутанолом до 0,3 мл, переосадите спиртом и проанализируйте фрагменты, как указано выше.
9. Проведите повторно препаративный LGT-гель-электрофорез для очистки выбранной вами фракции, экстрагируйте ее из требуемой полоски геля и окончательно проанализируйте минимальную аликвоту в аналитическом варианте. Ожидаемый выход — 2—4 мкг ДНК из 160 мкг материала.
10. Растворите в 20 мкл TE.

Смеси для упаковки космид

В продаже имеется большое количество упаковочных смесей, но из соображений экономии можно готовить их самим. Для этих целей мы с успехом использовали штаммы *Escherichia coli*: NS428 и NS433 [11]. Упаковочные смеси, полученные нами, позволяли получить до 10^6 космидных рекомбинантов на 1 мкг вставочной ДНК.

Получены сведения, что *EcoK*-активность в упаковочных смесях может влиять на репрезентативность λ -библиотек [12], однако нет данных, что это возможно и для космидных. Имеются в продаже коммерческие *EcoK*-упаковочные смеси (например, GigaPack).

Соединение фрагментов с вектором

Предлагаемый метод пригоден для лигирования частичных гидролизатов *Sau3AI* в вектор *Lorist2*.

1. Добавьте вместе 1 мкл (0,2 мкг) *BamHI*-обработанного дефосфорилированного *Lorist2*; 2 мкл (0,3 мкг) приготовленных *Sau3AI*-фрагментов; 2 мкл $10\times$ лигазного буферного раствора; 2 мкл 10 мМ АТР, рН 7,4; 2 мкл 0,1 М дитиотрейтола; 10 мкл воды и 1 мкл лигазы (Boehringer, 1 ед. акт. Вейса). Для достижения максимально возможного лигирования поместите смесь в закрытый капилляр.
2. Инкубируйте 16 ч при 14 °С.
3. Осторожно упакуйте, руководствуясь соответствующей методикой.
4. Храните библиотеку при 4 °С под хлороформом.
5. Разведите 5 мкл упакованной библиотеки в 0,1 мл раствора для разведения (см. разд. 5).

Добавьте 0,2 мл стационарной культуры клеток. Мы используем для этих целей линию 1046 [13]. Ее следует регулярно пересевать через отдельные колонии, контролируя признак *gcsA* (утрата способности к УФ-индуцированной рекомбинации).

Инкубируйте 20 мин при 37 °С. Добавьте 0,5 мл раствора *SU* и проинкубируйте дополнительно 50 мин. Высейте разные объемы на чашки с канамицином (50 мкг/мл).

Ожидаемый выход — 10^5 — 10^6 рекомбинантов на 1 мкг вставочной ДНК.

3.1.2. λ -библиотеки

Библиотеки в λ -фагах конструируют аналогично космидным, но используемая для этого ДНК имеет размеры 15—20 т. п. н. Для удобства и большей эффективности мы отделяли «плечи» λ 2001-вектора от остального материала, чтобы получаемые клоны высевать непосредственно из Q358. Используя упаковочную смесь GigaPack, нам удалось получить 5×10^6 рекомбинантов на 1 мкг вставочной ДНК.

3.1.3. Дрожжевая искусственная хромосома (YAC)

Этот метод был предложен Робертом Уотерстоном. Приготовьте ДНК по способу Олсона [23] в модификации [14]. В случае *S. elegans* (дефицитного по эндонуклеазе штамма *nuc-1*)

лизируйте молодые экземпляры, используя длительную протеиназную обработку. После очистки в сахарозном градиенте экстрагируйте фенол-хлороформной смесью. Лигируйте и трансформируйте препарат [9], но после лигирования для фракционирования ДНК по размеру используйте градиент плотности сахарозы.

3.2. Анализ клонов

3.2.1. Выделение ДНК из космид

Мы проводили выделение двумя способами — оба основаны на щелочном лизисе [15]. В первом случае это была миниэкстракция из 2 мл с выходом 1—3 мкг космидной ДНК; во втором случае миниэкстракцию вели в стандартных 96-ячеечных планшетах с объемом ячеек 250 мкл.

По последней методике, используя пробирки Эппендорф с центрифужными держателями (Eppendorf 5413), можно одновременно обработать 96 образцов. Система Micronic (Flow) позволяет экстрагировать в два или в четыре раза большее количество образцов. Она включает пробирки объемом 1 мл, штатив, микротитровальный планшет (микротест) для выращивания и хранения, многоканальную пипетку (8-канальную, Titer-tek) и круглодонные микротесты (Corning) для экстракции ДНК.

Миниэкстракция космидной ДНК

1. С помощью зубочистки внесите достаточное количество (примерно 2 мкл) материала отдельной колонии с 4 мл двукратной среды TY, содержащей 50 мкг/мл канамицина или 120 мкг/мл ампициллина, в 15-мл пробирку для культивирования.
2. Культивируйте 16 ч при 37 °С на качалке.
3. Для хранения аликвот перенесите 0,75 мл бактериальной суспензии в завинчивающуюся 2-мл ампулу, содержащую 0,75 мл стерильного 50%-ного глицерина. Перемешайте и немедленно заморозьте при -70 °С. Быстрое замораживание гарантирует гомогенность замороженного образца и позволяет отбирать пробу, просто откалывая кусочек, не размораживая при этом всей суспензии.
4. Для экстракции космидной ДНК перенесите 2 мл культуры в 2,2-мл пробирку. Центрифугируйте в течение 45 с в центрифуге Eppendorf. Отберите и удалите супернатант.
5. Ресуспандируйте осадок, встряхивая его 15 с в 250 мкл смеси 50 мМ глюкозы, 10 мМ ЭДТА, 25 мМ трис-НСl, рН 8,0.
6. Выдержите 5 мин в ледяной бане.

7. Добавьте 250 мкл 0,2 н NaOH, 1% ДСН; перемешайте, переворачивая пробирку примерно 15 раз (не используйте встряхиватель).
8. Выдержите 5 мин в ледяной бане.
9. Добавьте 200 мкл 3М ацетата натрия, рН 4,8; перемешайте, переворачивая пробирку примерно 15 раз (не используйте встряхиватель).
10. Выдержите 60 мин при 0 °С.
11. Мягко переверните пробирку несколько раз; центрифугируйте 4 мин при комнатной температуре.
12. Перенесите супернатант в 1,5-мл пробирку Эппендорф, добавьте примерно 0,9 мл холодного 95%-ного спирта и перемешайте.
13. Выдержите 20 мин при —20 °С.
14. Отцентрифугируйте 2 мин, удалите спирт и подсушите.
15. Ресуспенсируйте осадок в 200 мкл 0,3 М ацетата натрия, рН 7,1 mM ЭДТА.
16. Перемешайте, выдержите 15 мин при комнатной температуре и опять перемешайте. Добавьте 400 мкл спирта и перемешайте.
17. Выдержите 20 мин при —20 °С и центрифугируйте 2 мин.
18. Вылейте супернатант, промойте осадок 95%-ным спиртом, высушите 5 мин под вакуумом и ресуспенсируйте в 30 мкл раствора ТЕ.

Ожидаемый выход 1—3 мкг космидной ДНК.

Микроэкстракция космидной ДНК [16]

1. Проавтоклавируйте Micropip-штатив с пробирками, надпишите их в случае необходимости.
2. Налейте в каждую пробирку 0,6 мл двукратной среды TY с 50 мкг/мл канамицина (или 120 мкг/мл ампициллина). Это можно сделать достаточно быстро, если использовать диспенсор VCL8000.
3. С помощью зубочистки внесите в каждую пробирку материал отдельной колонии. Оставляйте зубочистки в пробирках до тех пор, пока все пробирки в штативе не будут заполнены.
4. Закройте штатив крышкой и закрепите его под наклоном на ротационной качалке. Инкубируйте с аэрацией при 37°, 300 об/мин в течение 12—16 ч.
5. Для длительного хранения добавьте к образцам после отбора аликвот для экстракции ДНК по 0,3 мл 50%-ного глицерина. Закройте пробирки Micropip-крышкой.
6. Для всех последующих переносов используйте многоканальную пипетку (например, Titertek). Перенесите по 250 мкл культуры в ячейки микротеста.

7. Закрепите микротест на пенопластовой подушке и осадите клетки, центрифугируя при 2500 об/мин 2 мин в специальной центрифуге, имеющей вставки для микротестов (Сентга 4X или 7R).
8. Удалите среду и высушите (перевернув) микротест, затем разрыхлите осадок, используя встряхиватель (20 с).
9. Добавьте 25 мкл 50 мМ глюкозы, 10 мМ ЭДТА, 25 мМ трис-HCl pH 8,0. Покачайте микротест для суспендирования клеток.
10. Добавьте 25 мкл 0,2 н NaOH и 1 % ДСН и перемешайте покачиванием. Инкубируйте при комнатной температуре 5 мин, пока образцы не станут прозрачными.
11. Добавьте 25 мкл 3 М ацетата натрия pH 4,8. Закройте Micropip-крышкой. Осторожно перемешайте (переворачивая), постепенно увеличивая интенсивность перемешивания.
12. Инкубируйте при комнатной температуре 5 мин, затем мягко встряхивайте 1 мин и центрифугируйте 5 мин при 3000 об/мин.
13. Перенесите по 70 мкл супернатанта в новый микротест, содержащий по 100 мкл изопропанола в каждой ячейке, закройте, перемешайте и выдержите при -20°C 30—60 мин.
14. Центрифугируйте при 3000 об/мин 5 мин, удалите супернатант и подсушите осадок, используя несколько смен фильтровальной бумаги и постукивая по микротесту.
15. Добавьте 25 мкл воды и ресуспендируйте осадок. Внесите 25 мкл 4,4 М LiCl, закройте, перемешайте и выдержите по крайней мере 1 ч при 4°C .
16. Центрифугируйте при 3000 об/мин 5 мин, отберите 50 мкл супернатанта, наклонив микротест, и перенесите в новый, содержащий по 100 мкл изопропанола в каждой ячейке.
17. Закройте, перемешайте и выдержите 1 ч при -20°C , затем центрифугируйте при 3000 об/мин 5 мин, удалите супернатант и высушите ячейки.
18. Добавьте 200 мкл 95%-ного спирта, отцентрифугируйте и тщательно высушите ячейки (более 10 мин), постукивая по перевернутому микротесту на фильтровальной бумаге.
19. Высушите под вакуумом и ресуспендируйте осадок в 5—20 мкл TE. Закройте ячейки парафилмом, храните микротест при -20°C .

Запомните некоторые методические тонкости, которые могут значительно улучшить ваши результаты.

1. Перед первым центрифугированием оставьте клетки в микротесте при 4°C примерно на два часа.
2. Используйте микротесты, не прошедшие обработку «для клеточных культур».
3. В конце отмойте спиртом дважды.

3.2.2. Выделение ДНК из λ -клонов

Этот удобный и надежный метод был разработан Тоби Гибсоном в лаборатории молекулярной биологии.

1. Посейте штрихом фаг на бактериальный газон (50 мкл насыщенной бактериальной суспензии в 4 мл верхнего слоя агар). Инкубируйте чашки в течение ночи.
2. С каждого штриха с помощью зубочистки перенести фаговый материал в пробирку с 2 мл среды СУ, содержащей 10 мМ $MgCl_2$ и клетки в разведении 1/200.
3. Инкубируйте на качалке при 37 °С до полного лизиса (обычно 10 ч).
4. Центрифугируйте 5 мин в 2-мл пробирках Эппендорф.
5. Перенесите супернатант в новые 2-мл пробирки Эппендорф, содержащие 2 мкг/мл ДНКазы/РНКазы (20 мг/мл каждой).
6. Выдержите при комнатной температуре 30 мин или более.
7. Добавьте 400 мкл 25%-ного полиэтиленгликоля (ПЭГ) в 3 М NaCl. Перемешайте и оставьте при 4 °С на срок от 30 мин до нескольких часов.
8. Центрифугируйте 5 мин и удалите супернатант, повторите еще раз.
9. Добавьте 200 мкл 10 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-ацетата рН 8; встряхните и добавьте 100 мкл фенола. Встряхните, оставьте на 5 мин во льду, встряхните еще раз и центрифугируйте 15 с.
10. Перенесите водную фазу в 1,5-мл пробирки Эппендорф, содержащие 20 мкл 3 М ацетата натрия, добавьте 200 мкл изопропанола, встряхните и оставьте при $-20^{\circ}C$ по крайней мере на 30 мин.
11. Центрифугируйте 5 мин, удалите супернатант и высушите, отмойте 95%-ным спиртом, затем центрифугируйте 5 мин, высушите на бумаге, высушите под вакуумом и ресуспендируйте в 30 мкл ТЕ.

3.2.3. Получение фингерпринтов

Данная процедура сводится к получению требуемого количества меченых фрагментов, разделяемых с помощью ПААГ-электрофореза высокого разрешения (в диапазоне 40—2000 п.н.). При этом перекрывающиеся на 1/2—1/3 своей суммарной длины фрагменты однозначно считаются составляющими пару. Описано достаточное количество экспериментальных схем, позволяющих осуществить это.

Метод двойного расщепления

Процедура фингерпринта, использованная при картировании *S. elegans*, была предложена Сиднеем Бреннером и Джонатаном Карном (рис. 1). Она подразумевает гидролиз ДНК

рестриктазой *Hind*III, радиоактивное мечение фрагментов и их дополнительный гидролиз *Sau*3AI; выход в среднем составляет около 23 полос на космиду с 36% GC-пар. Такая схема может быть легко модифицирована для генома с другим GC-составом (см. разд. 4.2).



Рис. 1. Картирование с помощью метода двойного разрезания. Зигзагообразная линия — вектор; прямая линия — вставка. H — сайт для рестриктазы *Hind*III. S — сайт для рестриктазы *Sau*3AI (по Coulson et al. [1] с изменениями).

1. Отберите по 2 мкл ДНК (50—100 нг) в ячейки круглодонного микротеста (не культурального), расположенного на льду. Используйте многоканальную пипетку для переноса материала из микротеста, в котором проводилась микроэкстракция.
2. С помощью микрошприца (Hamilton РВ600-1) с одноразовыми наконечниками добавьте в ячейки микротеста по 2 мкл смеси, приготовленной следующим образом:
 - а) высушите 40 мкл (40 мкКи) спиртового раствора ^{32}P dATP (400 Ки/мМ) [или добавьте 8 мкл (80 мкКи) водного раствора ^{32}P dATP (800 Ки/мМ)];
 - б) добавьте 160 мкл воды, 40 мкл 10× средне-солевого буфера, 4 мкл РНКазы (10 мг/мл; см. разд. 5), 10 мкл 0,5 мМ ddGTP (чтобы провести реакцию заполнения до конца), 4 мкл (40 единиц) *Hind*III и 4 мкл (40 единиц) обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц (AMV).
3. Быстро отцентрифугируйте (доведите до 2000 об/мин и остановите), затем закройте микротест парафилмом (воздушное пространство можно уменьшить, вставив другой микротест в опытный).

4. Инкубируйте 45 мин при 37 °С и затем 25 мин при 68 °С (для инактивации обратной транскриптазы). Охладите на льду перед открыванием.
5. Добавьте по 2 мкл следующей смеси в каждую ячейку: 200 мкл воды; 20 мкл 10× средне-солевого буфера; примерно 80 единиц *Sau3AI* (уд. активность должна быть более 30 ед./мкл) для предотвращения потери ферментативной активности из-за избытка глицерина в реакционной смеси.
6. Быстро отцентрифугируйте, закройте и инкубируйте 2 ч при 37 °С.
7. Добавьте 4 мкл формамида/красителя/ЭДТА в каждую ячейку (разд. 5) и денатурируйте при 80 °С 10 мин перед нанесением на гель (рис. 2).

*Методы одиночного расщепления с использованием *HinI**

Метод 1, предложенный Браунли и Кноттом [24]

1. В каждую ячейку 96-ячеечного микротеста (во льду) внесите по 4 мкл рестрикционной смеси: 10 мМ трис-НСl pH 7,4, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 250 ед./мл *HinI*.
2. Добавьте по 1 мкл ДНК (4—20 мкг).
3. Заклейте ячейки (клеякая лента, Titertek, Flow) и инкубируйте 60 мин при 37 °С.
4. В каждую ячейку добавьте по 2 мкл раствора для мечения: 10 мМ трис-НСl pH 7,4, 10 мМ MgCl₂, 6 мМ дитиотрейтола, по 0,1 мМ dATP, dGTP и dTTP каждого, 0,2—0,4 мкКи [³²P]dCTP (3000 Ки/мМ), 0,1 ед. ДНК-полимеразы (фрагмент Кленова).
5. Инкубируйте 10 мин при комнатной температуре, затем добавьте по 7 мкл смеси формамид/краситель.
6. Инкубируйте в открытом состоянии 20 мин при 80 °С перед нанесением на гель.
7. Проводите электрофорез, как описано ниже, но в 6%-ном полиакриламидном геле (38:2). После радиоавтографии анализируйте полосы между 25 и 220 т. п. н.

Этот метод позволяет получить более просто интерпретируемые результаты, чем в методе 2, так как метится только четверть сайтов и анализируются только низкомолекулярные фрагменты. Итак, этот метод пригоден для вставок размером от 20 до 200 т. п. н. Полученную с его помощью информацию можно обрабатывать вручную.

Метод 2, предложенный Гибсоном.

1. Внесите по 2 мкл ДНК (0,1—0,2 мкг) в каждую ячейку 96-ячеечного микротеста, добавьте по 2 мкл рестрикционной смеси на стенку каждой ячейки: 3 ед./мкл *HinI*, 0,2 мкг/мл РНКазы, 20 мМ трис-НСl pH 8,0, 7 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрейтола.

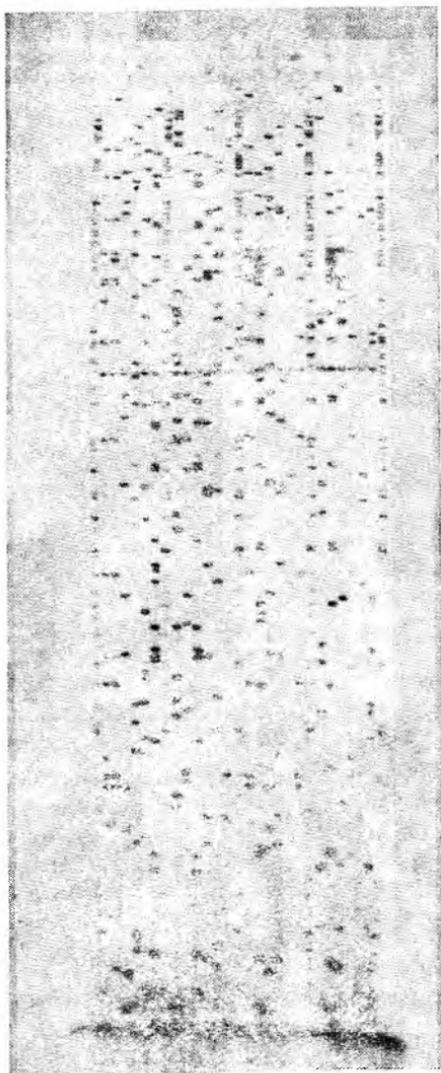


Рис. 2. Радиоавтограф фингерпринт-геля *HindIII/Sau3AI*. Пять треков с плотно расположенными полосами — это маркеры. Полосы, присутствующие во всех образцах, — производные вектора. Видно несколько частичных перекрытий, так как клоны не были отобраны случайным образом, но прошли предварительную селекцию путем гибридизации со смесью зондов.

2. Быстро отцентрифугируйте (до 1000 об/мин), заклейте парафином и инкубируйте при 37 °С 1 ч.
3. Смешайте с 2 мкл раствора для мечения: 0,2 ед./мкл обратной транскриптазы, 80 нКи/мкл [³⁵S]thiodATP, по 40 мкМ dCTP, dGTP и dTTP каждого и инкубируйте 15 мин при 37 °С.
4. Смешайте с 4 мкл смеси формамид/краситель.
5. Денатурируйте при 80 °С 20 мин перед нанесением на гель (см. рис. 3).

При этой процедуре получается в несколько раз больше полос, чем при двойном разрезании, и, следовательно, для обработки данных необходимо сканирование. Этот метод хорош для вставок размером 5—50 т. п. н. Размер вставки может быть оценен по сумме размеров полос (оценка затруднена в случае близкого расположения полос в геле), однако поскольку *Hinf*I не используется для получения банка клонов, то появляются аномальные объединенные фрагменты.

3.2.4. Электрофорез в полиакриламидном геле

Фракционирование фрагментов проводят в денатурирующих условиях, так как это позволяет добиться лучшего разрешения по сравнению с неденатурирующими условиями (аналогично секвенированию ДНК). Для предотвращения ошибок необходимо соблюдать некоторые предосторожности. Гель наносится на стекло, предварительно обработанное метакрилоксипропилтриметоксисилоном [17]; чтобы предупредить искривление 4%-ного геля, перед нанесением образцов к этому стеклу прикрепляется алюминиевая пластина (толщиной 3 мм) для отвода тепла и предотвращения «улыбки».

Гель готовят следующим образом.

1. Добавьте 5 мкл метакрилоксипропилтриметоксисилана и 50 мкл уксусной кислоты к 3 мл спирта и протрите тканью, смоченной в этом растворе, ровное стекло площадью 20×40 см.
2. После высушивания тщательно промойте спиртом.
3. Обработайте помеченное стекло силаном «Repelcotex»; соедините оба стекла в сэндвич, разделив их 0,35-мм спейсером (при этом образуется камера для геля).
4. Возьмите 40 мл раствора геля, добавьте 40 мкл ТЕМЕДа, 0,35 мл 10%-ного персульфата аммония (по нашему мнению, его совершенно необязательно готовить каждый раз свежий или даже делать достаточно часто) и осторожно залейте в камеру.
5. Закрепите пластину-теплоотвод и вставьте гребенку для формирования лунок (ширина лунок—2 мм, интервал между ними—1 мм). Выдержите не менее 30 мин.

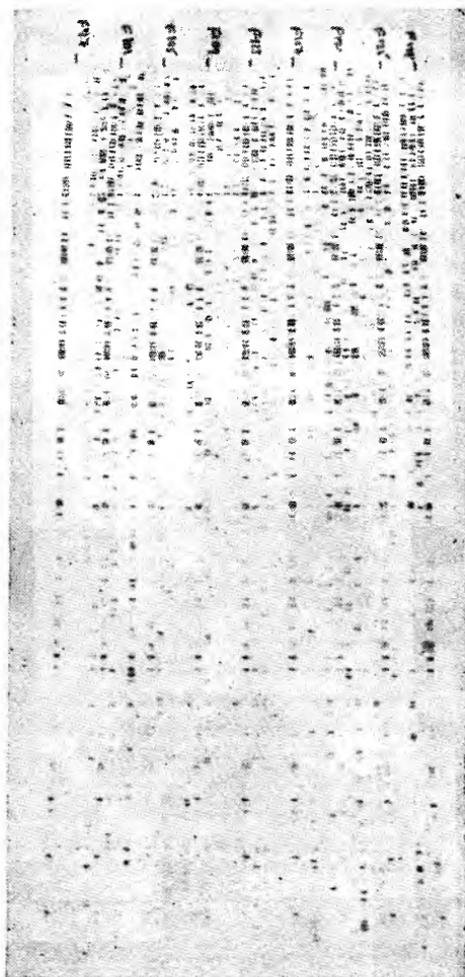


Рис. 3. Радиоавтограф фингерпринт-геля *HinfI*. В треке 1 и в каждом последующем пятом треке — маркеры (*HinfI*-гидролизат λ ДНК). Общие полосы во всех образцах — фрагменты этого вектора. Клоны происходят из библиотеки, полученной частичным гидролизом *FnuDII* ДНК *E. coli*, «тупые вставки» введены в *ScaI*-сайты *LoriSt6*. Клоны наращивали в 0,2 мл культуральной среды (см. разд. 3.2.1.); для электрофореза использовали 1/7 часть ДНК. Экспозиция — 2 дня.

6. Денатурируйте образцы при 80 °С 10 мин, одновременно с образцами подготовьте 3 мкл маркерного гидролизата ДНК для каждого геля (см. ниже).
7. По 3 мкл каждого образца наложите в отдельную лунку, при этом через каждые 6 образцов наносите 1 мкл маркерного гидролизата.
8. Проводите электрофорез 1,75 ч при 30 Вт (ограничение по току) до тех пор, пока бромфеноловый синий не достигнет 1 см от конца геля.
9. Разделите стекла (гель должен прочно прикрепляться к той пластине, которая обработана акрилоксианом, в случае избыточной обработки может прикрепиться к обеим) и зафиксируйте 15 мин в 10%-ной уксусной кислоте; отмойте водопроводной водой 30 мин и высушите при нагревании (80 °С) в течение 30 мин. Двухдневная радиоавтография без экрана может оказаться достаточной.
10. Отделите высушенный гель от пластины, погрузив его в кювету с 20%-ным Десоп на 2 дня. Пластины перед повторным использованием промойте водопроводной водой.

Маркерный гидролизат ДНК готовится следующим образом.

1. Смешайте 35 мкл воды, 5 мкл 10× средне-солевого буфера, 2,5 мкл ДНК λ/S7, 10 ед.
2. Инкубируйте при 37 °С 60 мин.
3. Добавьте 4 мкл [³⁵S]dATP (800 Ки/мМ), 2 мкл 10 мМ dGTP, 2,5 мкл 10 мМ ddTTP, 10 ед. обратной транскриптазы AMV и инкубируйте 30 мин при 37 °С.

3.3. Обработка результатов

Мы можем только весьма коротко описать здесь принципы обработки данных, желающим познакомиться с этим подробнее предлагаем обратиться к обзору Салстона [18].

3.3.1. Ввод данных

Ввод данных можно произвести как вручную (используя графопостроитель), так и полуавтоматически (с помощью сканирующего денситометра и преобразователя визуальных данных).
Ручной способ

Сначала приготовьте сетку с линиями, проведенными перпендикулярно направлению фореа, соединяя этими линиями опорные маркерные полосы. Перед введением каждой серии данных поместите сетку на цифровую панель и зафиксируйте ее позицию. Приложите радиоавтограф к сетке и по очереди вводите данные о локализации полос в образцах, проставляя цифровую индикацию линий сетки по имеющимся маркерам.

Сканирование и преобразование визуальных данных

Для сканирования радиоавтографической пленки введите соответствующую программу в компьютер и расположите пленку требуемым образом в денситометре. В нашем случае сканирование занимало 3,5 мин, а преобразование визуальных данных с пленки 17×40 см — еще 2 мин. Для оценки и ввода визуальных данных необходим АЕД-процессор. Используйте TAPS-программу для ввода картинки и затем с помощью программы TARD наложите на картинку стандартные полосы, как их расположил компьютер. Если в полученной сетке данных появились несоответствия или сбои (это не случится, если экспозиция пленки была достаточна и на ней отсутствуют пятна), сканируйте пленку вновь или проведите ручную коррекцию более детально (см. обзор [18]). Если полученная сетка вас удовлетворяет, запустите редактирующую программу (TAR). С помощью движущегося курсора элиминируйте нежелательные полосы (например, тусклые, артефактные или не входящие в интересующую вас область). Если таких тусклых полос достаточно много, поставьте нужную чувствительность для последующего сканирования. Программа TAR затем приведет полученные данные в соответствие с предыдущими.

3.3.2. Подбор пар

Запишите первый и последний клоны новой серии в командный файл MAP.COM. Включите файл в программу перебора (если в серии несколько десятков клонов, то эта работа запускается на ночь). Результаты распечатываются в таблицу, показанную на рис. 4.

3.3.3. Анализ

Суть анализа — в построении непрерывной цепочки клонов, которые частично перекрываются в быстром переборе избытка клонов, в регистрации характеристических черт, таких, как генетическая локализация и примечательные области в исследуемом районе. Это множество сопоставляемых клонов изображается графически на дисплее с помощью аналитической программы CONTIG9 (рис. 5). На начальных этапах работы не следует тратить время на особенно сложные случаи. Такие комбинации можно записать в PSS-файл, если необходимо освободить процессор, но в любом случае большинство из них будут подтверждаться или пересматриваться позже при поступлении информации о новых клонах. По мере продвижения вперед целесообразно переходить на вариант CONTIG9. Этот вариант мы и будем здесь описывать.

Вызовите подпрограмму AUT в программе CONTIG9. В слу-

1000-F59C6 (19b, 0)	888-ZK227 (10b, 545)	0.5E-07	0	11d	C27B11
	127-C27B11 (23b, 545)	0.2E-05	0	2	canon
	59-C06D11 (18b, 545)	0.3E-04	1	1	
	470-T22G2 (20b, 545)	0.6E-04	0	1	C27B11
	663-F25F11 (21b, 732)	0.9E-04	0	3	K04H8
	211-AD4 (25b, 755)	0.2E-02	0	8	canon
	217-BC8 (24b, 755)	0.1E-02	0	7	AD4
	272-R03F7 (29b, 755)	0.8E-03	0	7	canon
	473-T23E7 (20b, 803)	0.3E-02	11	6	AF2
	659-F23F6 (21b, 680)	0.4E-02	5	6	C25E3
1000-F59C7 (18b, 0)	540-E01F12 (20b, 483)	0.5E-15	109	2d	CE8
	670-F27D9 (19b, 483)	0.7E-12	109	1	CE8
	216-BF1 (13b, 483)	0.1E-08	109	1	CE8
	777-F53F9 (13b, 483)	0.1E-08	109	0	CE8
	308-C51E9 (13b, 483)	0.3E-07	109	1	CE8
	1000-F59C3 (19b, 0)	0.1E-07	0	1	
	706-F36D1 (26b, 714)	0.3E-05	9	1	canon

Рис. 4. Данные, полученные с помощью программы MAPSUB. Начало каждой секции данных (слева) — стандартная форма записи вводимого клона: номер геля, название клона, количество полос на радиоавтографе, номер составляемой цепочки. Последующие столбцы показывают подбор клонов, расположенных в порядке убывания их значимости: номер подбора; подобранный клон (стандартный формат); вероятность случайного совпадения; наименьшее расстояние (количество фрагментов) от конца подбираемого клона до конца составляемой цепочки; число полос в вводимом клоне, не обнаруженных в подбираемом клоне (индекс d), или число различных полос, обнаруживаемых в последующих подбираемых клонах; общепринятый канонический статус подбираемого клона, или название его канонической формы. Если количество различных полос в парах превышает расстояние до конца цепочки, дальнейший анализ проводится с помощью программы DIFMAP. Как правило, данные, получаемые с помощью CONTIG9 в варианте AUT, и внутренние клоны обрабатываются быстро. При анализе представленного здесь фрагмента было выявлено, что F59C6 тянется от цепочки 545 до 755-й; в свою очередь F59C7 оказался внутренним в цепочке 483 и немедленно был элиминирован (Reprinted, with permission, from Sulston et al. [18]).

чае проверки каждого клона введите T (для испытательного варианта программы), тогда вновь прибывающий клон будет автоматически высвечиваться на дисплее в наиболее вероятном месте в цепочке клонов. Если клон внутренний и не принадлежит области, нуждающейся в дополнительном обследовании, то он, как правило, «прячется», т. е. регистрируется в ассоциации с клоном, максимально ему соответствующим. Если клон не внутренний, проверьте степень его перекрытия с уже существующими клонами путем визуального контроля пленки и затем подберите ему нужную позицию с помощью графического курсора. Если не выявляется место стыковки этого клона с другими по данным программ MAPSUB, прибегните к помощи программы DIFMAP перед введением следующего клона. Для облегчения дальнейшего поиска перекрывающиеся части двух исследуемых фингерпринтов могут быть помечены спирторастворимыми чернилами прямо на пленке различными символами (например, точка указывает точное соответствие, «>» — полюсу, присутствующую только в одном из составляющих пару клонов, «O» — полюсу, присутствующую только в маркирован-

907-ZK575 (18b, 417) p

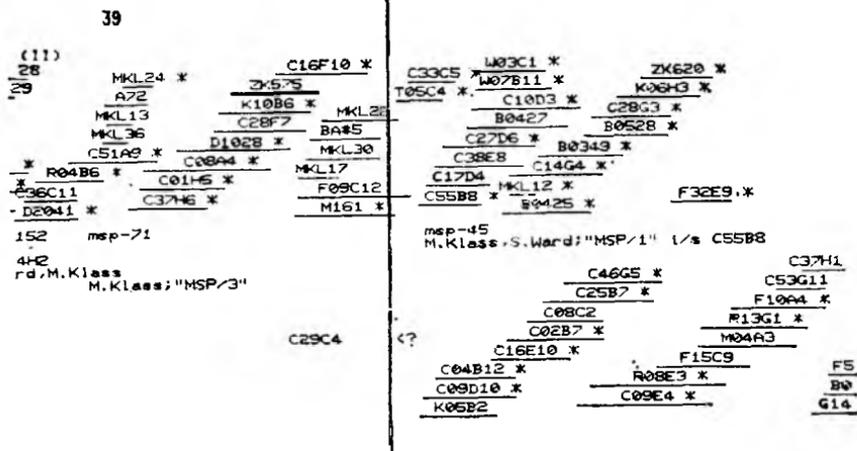


Рис. 5. Рабочая картинка на дисплее для программы CONTIG9. Экран разделен на две половины: текущая цепочка, изображена наверху, предыдущая — внизу. В верхней левой части — текущий клон в стандартной записи (номер геля, название, число полос, номер цепочки). Индекс «р» указывает, что для этого клона место выбрано автоматически с использованием POS алгоритма. Номер под названием клона — счетчик полос для курсора. Каждый клон подчеркнут линией. Для текущего клона линия утолщается. Звездочки указывают клоны уже обработанные («спрятанные»). Верхняя левая цепочка имеет римскую цифру, обозначающую номер хромосомы, если он известен. Место непосредственно под клоном оставляется для названия гена (например, msp-45); еще ниже — место для примечаний, появляющихся по мере необходимости. Курсор используется для промежуточных манипуляций с верхней цепочкой и клонами и для измерений; один шаг курсора соответствует одной полосе геля. Символ «<?» в нижней цепочке означает возможную стыковку с C29C4 (Reprinted, with permission, from Sulston et al. [18]).

ном клоне). Таким образом, когда подходит очередь следующего клона, выбор его позиции может логически вытекать из расположения предыдущих.

3.3.4. Успехи в программном обеспечении

В последнее время разработаны разнообразные программы, позволяющие создавать полные карты и анализировать отдельные наборы клонов. Эти результаты можно сравнивать с аналогичными, но полученными на моделях, основывающихся на случайном подборе. Например, в программу RANCL5 можно ввести размер генома, размер вставки и минимальное перекрытие двух клонов, служащее основанием для их стыковки; это позволит определить положение на карте любого выбранного числа клонов,

3.4. Окончательное заполнение карты (закрытие карты)

Не следует рассчитывать, что, прибегая только к методам случайного перебора, удастся составить полную карту. В некоторых случаях может оказаться необходимым прибегнуть к предварительной селекции клонов. В зависимости от особенностей рассматриваемого случая отобранные после этой процедуры клоны могут быть как идентичными, так и отличными от клонов в исходном банке.

3.4.1. Различные зонды и векторы

Осуществляя картирование *C. elegans*, мы испробовали разнообразные способы, пытаясь заполнить пропуски.

1. Сначала мы воспользовались банком, полученным на основе рJB8. Когда появились Lorist-векторы, мы прибегли к ним, так как с их помощью можно получать клоны «более случайные» или более комплементарные по сравнению с рJB8. И в этом случае мы не продвинулись вперед в решении проблемы, но стало ясно, что требуются более сильные методы.
2. Тогда мы сконструировали зонды из конечных участков уже существующих цепочек, используя SP6- или T7-промоторы Lorist-вектора для получения рибозондов или рестриктазную обработку для получения фрагментов ДНК. Мы приготовили фильтры-реплики, несущие Lorist-космиды. Хотя это усовершенствование позволило получить некоторые новые варианты стыковки клонов, оно страдало тем недостатком, что космиды, которые мы пытались выявить, были недопредставлены. Это не позволило до конца заполнить пробелы.
3. Наши нынешние надежды связаны с перекрестным зондированием с помощью Lorist-клонов из концов цепочек и дрожжевыми искусственными хромосомами (YAC). Такой подход позволяет обойти недостатки каждого метода и при этом сохранить их преимущества. Выяснилось, что по сравнению с космидами метод YAC детерминирует большее разнообразие в распределении фрагментов, и мы надеемся, что именно этот путь окажется более эффективным для соединения цепочек друг с другом.
4. В случае необходимости в качестве средства для закрытия карты можно прибегнуть к λ -клонам. Поскольку λ -клоны характеризуются литическим путем развития, мы ожидаем, что они окажутся менее чувствительны, чем космиды, к неблагоприятному биологическому воздействию некоторых вставочных последовательностей. Из работ Эндрю Спенса известно, что пропуск в 50 т. п. н. в космидной карте можно заполнить путем «прогулки» с помощью λ -клонов (личное сообщение). Однако для завершения таким способом карты,

имеющей большое количество пробелов, понадобилось бы очень много времени, так что это усовершенствование необходимо использовать избирательно.

3.4.2. Скрининг

Описанные в этом разделе методики применимы как для случайно, так и для не случайно расположенных клонов. Из 5000 космидных клонов, случайно расположенных на 14-см фильтре, можно аккуратно отобрать единичные колонии с помощью специального приспособления. Расположение 1000 космидных или YAC-клонов может быть зафиксировано в прямогольнике 10×8 см, выбранные колонии переносятся на поверхность чашки в места, соответствующие позициям клонов в прямогольнике.

Подготовка фильтров

В настоящее время мы пользуемся нейлоновыми фильтрами Nubond-N (Amersham) и нитроцеллюлозными фильтрами BA85 (S&S). Перед началом цикла переноса и приготовления реплик проавтоклавируйте фильтры BA85, проложенные квадратиками бумаги ЗММ и бархотками, несколько меньшими по размеру, чем фильтры.

1. Дорастите до пригодных размеров требуемое количество отдельных колоний или выбранных клонов на чашке с подходящей агаровой средой (для космидных Lorigist-колоний для этого необходимо 13 ч инкубации при 37 °С; для дрожжевых колоний — 12 ч при 30 °С). Затем последовательно перенесите колонии на фильтры (BA85 — для бактерий, Nubond-N — для дрожжей).
2. Промаркируйте фильтр шариковой ручкой. Поднесите фильтр к агаровой чашке, совместив маркированные средние линии, изогнув фильтр U-образно, до контакта с колониями. Оставьте фильтр в контакте с колониями на несколько секунд, поднимите и опустите в новую чашку колониями наверх. Чашки, на которые осуществляется перенос, должны быть обязательно сухими. Для этого предварительно выдержите их при комнатной температуре 2 дня перед хранением при 4 °С. Инкубируйте 2 ч.
3. Приготовление реплик на нейлоновых фильтрах:
 - а) промаркируйте фильтр шариковой ручкой и поместите его лицевой стороной вниз на влажную чашку, в которой он в дальнейшем будет инкубироваться. Сделайте реплику на фильтре, приготовив следующую стопку (направление от дна): стеклянная чашка, квадратика сухой бумаги ЗММ (можно использовать несколько раз), исходный

- фильтр с колониями («лицом» вверх), фильтр-реплика («лицом» вниз, контакт с исходным — совместив маркерные линии, как и в случае переноса с чашек), бархотка и вторая стеклянная чашка. Быстро надавите руками (с силой примерно 5 кг), затем снимите по очереди покровные материалы и верните оба фильтра в соответствующие чашки, колониями наверх;
- б) когда вы делаете несколько фильтров-реплик с каждого из исходных фильтров, через каждые пять копий возвращайте фильтр в чашку для регидратации (обычно на 20 мин). Таким способом нам удавалось получать до 100 копий исходного фильтра как для космидных, так и для дрожжевых колоний без потерь в качестве;
- в) окончательно перенесите исходный фильтр в глицериновую чашку (для космид: 15 г агара, 8 г NaCl, 750 мл воды, 250 мл глицерина и нужное количество антибиотика; для дрожжей: 2% агара, 20% глицерина);
- г) инкубируйте при 4 °С несколько часов, выньте фильтр, поместите в пустую чашку. Храните стопкой в пластиковой коробке при —70 °С.
4. Инкубируйте реплики до тех пор, пока не сформируются небольшие колонии (10—12 ч при 37 °С для бактерий, 15—20 ч при 30 °С для дрожжей). Дальнейшие процедуры можете провести на следующий день, оставив фильтры при 4 °С на ночь.
5. Разрушение и денатурацию бактериальных клонов проводите на полосках 3ММ бумаги [7] или в пластиковых коробках для небольшого количества фильтров (25 мл раствора для каждой полоски 3ММ размером 22×22 см), или прямо на горизонтальном столике для большого количества фильтров (150 мл раствора для каждой полоски 3ММ 46×57 см).
6. Вымочите фильтры по 5—10 мин в каждом из перечисленных растворов по очереди:
- а) 10%-ный ДСН,
- б) 0,5 М NaOH, 1,5 М NaCl (меняйте через каждые 4 цикла),
- в) 0,5 М трис-HCl pH 7,4, 1,5 М NaCl,
- г) 0,5 М трис-HCl pH 7,4, 1,5 М NaCl,
- д) 2×SSPE.
7. Сушите при комнатной температуре несколько часов и экспонируйте под ультрафиолетовой лампой для «пришивки» ДНК к фильтру. Рекомендуем 5-мин экспозицию в экранированной УФ-камере (Biogard).

При обработке дрожжевых клонов инкубацию следует проводить при 30 °С, кроме того, добавляется следующая предварительная процедура. Поместите фильтры на несколько минут

на 22×22-см полоски 3ММ, вымоченные в 25 мл 0,8%-ного дитиотрейтола в СОЭ (36 г сорбитола, 8 мл 0,5 М ЭДТА рН 9,0, 2 мл 1 М трис-НСl рН 8, вода до 200 мл). Удалите агар из чашек, в которых фильтры инкубировались, протрите эти чашки и добавьте 5 мл 0,5 мг/мл зимолиазы 20Т (Seikagaku Kogyo) и 1% β-меркаптоэтанола в СОЭ. Положите туда 13-см кружочек 3ММ, дайте ему намокнуть, затем поместите на него фильтр, избегая попадания пузырьков воздуха между ними. Инкубируйте в течение ночи в закрытой пластиковой коробке при 37 °С.

Зондирование

Обычно мы готовим радиоактивные зонды из целых космид λ-клонов или очищенных фрагментов с помощью процедуры «олигомечения» [19, 20].

1. Не отмывайте сильно, оставьте некоторый фон гибридизации для визуализации всех колоний. Перед введением в употребление новой серии фильтров преднамеренно передержите первый радиоавтограф так, чтобы он мог быть использован вами в дальнейшем в качестве образца-матрицы.
2. Тщательно высушите фильтры (сушите на воздухе более 2 ч и экспонируйте фильтры с рентгеновской пленкой). Чтобы избежать повреждения фильтров, обращайтесь с ними осторожно или оберните их в защитный слой из бумаги, заклеив ее по краям.
3. Если необходимо снять метку с использованных фильтров, отмойте их по 10 мин в каждом из растворов: 0,2 М NaOH, 0,5 М NaCl; 0,5 М трис-НСl рН 7,4, 0,5 М NaCl; 1× SSPE.

Отбор колоний при случайном распределении

Готовясь отобрать нужные вам колонии, совместите экспонированную пленку с матрицей и пометьте каждую колонию тонким фломастером. Поскольку разрешение камеры-люсиды очень высокое, стоит пометить позиции колоний как можно точнее. Лучше обозначить их точкой, обведенной большим кружком.

1. Перенесите чашки Петри с «глицериновыми» фильтрами из -70°C на -20°C .
2. Установите под платформой камеры-люсиды (рис. 6) контейнер с сухим льдом.
2. Поместите чашку Петри на платформу до открывания крышки во избежание конденсирования влаги на фильтре.
4. Выберите легко узнаваемый или разреженный участок. Совместите фильтр с пленкой; установите осветитель так, чтобы колонии, кажущиеся светящимися точками, наложились на изображение на пленке. Совместив один раз пленку и

фильтр, будет значительно легче в дальнейшем сканировать их сопряженно, регистрируя по очереди необходимые колонии.

5. Для отбора колоний намочите стерильную зубочистку в агаровой чашке, плотно коснитесь колонии и расseyте ее штрихом на небольшой площади агара.

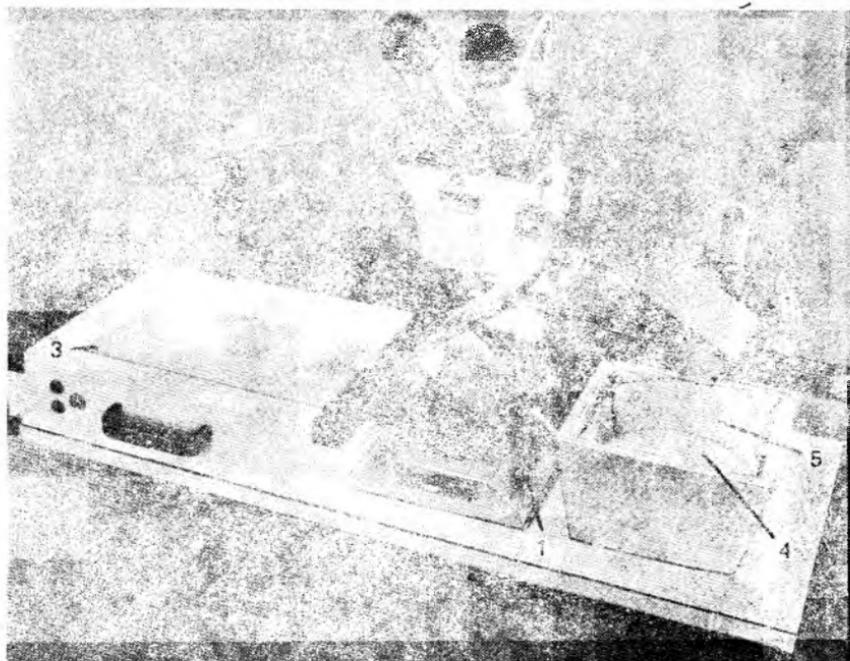


Рис. 6. Камера-люсида для отбора клонов. Полностью отражающее зеркало (1) (серебрение по передней плоскости); расщепляющее луч зеркало (2) (наполовину серебрянное спереди и затемненное сзади); для наблюдений достаточно увеличения $\times 2$ на расстоянии 50 см; мы использовали или самодельный монокуляр, или цейсовский аналитический микроскоп SR с 500-мм линзами (как на рисунке). Для построения изображения фильтр освещается небольшим осветителем, расположенным рядом с правым зеркалом; в поздних модификациях освещающий пучок падает на фильтр под таким углом, что его оптический путь совпадает с наблюдаемым. Все зеркала могут двигаться и наклоняться так, чтобы световой путь к пленке (3) и к фильтру (4) мог быть идентичен. Во время работы поддон обязательно заполняют сухим льдом до уровня пластиковой платформы, на которой стоит чашка Петри с исследуемым фильтром. Охлажденная фольга (5) защищает фильтр от атмосферной влаги.

6. Новой зубочисткой дотроньтесь до первого штриха и сделайте ею новый штрих (посев на отдельные колонии). Удобно пересеивать на одну 80-мм чашку не более 10 колоний.

4. Заключение

4.1. Карта *C. elegans*

В настоящее время около 90% генома *C. elegans* клонировано в космидах. Количество клонов, благодаря космидным стыковкам упало с 900 до 700 и снизилось еще (до 389) при использовании YAC-стыковок. Одна треть кажущихся разрывов между космидными цепочками на самом деле представляет собой еще невыявленные небольшие петли; существует большое количество реальных разрывов, для которых космидные клоны очень редки или недоступны для получения. В этом случае многие исследователи надеются решить проблему с помощью больших цепочек (свыше 95 из которых имеют более 200 т. п. н., что составляет около 60% генома, и 9— более 1000 т. п. н.). Мы осознаем всю важность и актуальность скорейшего заполнения разрывов.

Наш опыт подсказывает, что использование космид для картирования геномов эукариот не лишено недостатков, хотя этот метод оказался очень удачным, по крайней мере для одного прокариота (см. ниже). Весьма вероятно, что быстрое заполнение разрывов в карте будет обеспечено методом YAC. Скорее всего удастся получить λ -клоны, необходимые для более точного заполнения брешей в космидной карте.

4.2. Картирование других организмов

Мы не можем подробно описать в этой книге картирование других организмов, однако краткие сведения, изложенные нами, могут помочь в применении методов, о которых шла речь выше.

4.2.1. *Escherichia coli*

4×10^6 нуклеотидных пар [21] λ -клоны; частичный гидролиз восемью различными ферментами; анализ в агарозе с прямым концевым мечением. Полная рестрикционная карта для всего генома.

4.2.2. *Rhodobacter capsulatus*

3×10^6 нуклеотидных пар. Вильямс, Бреннер (частное сообщение). Космидные клоны; техника фингерпринта, как для *C. elegans*, но с использованием *Bam*HI вместо *Hind*III для повышения содержания GC-пар. Карта закрыта.

4.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

12×10^6 нуклеотидных пар [22]. λ -клоны; одновременный гидролиз *Hind*III и *Eco*RI, анализ в агарозе. Клонировано почти 100% генома, несколько сот цепей (Олсон, частное сообщение).

4.2.4. *Arabidopsis thaliana*

70×10^6 нуклеотидных пар. Хауг, Гудман (частное сообщение). Космидные клоны; техника фингерпринта, как для *C. elegans*.

5. Прописи растворов

1. ТЕ:
10 мМ трис-НСl рН 7,4, 0,1 мМ ЭДТА.
2. $10 \times$ лигазный буфер:
0,5 М трис-НСl рН 7,4, 0,1 М $MgCl_2$.
3. $10 \times$ средне-солевой рестрикционный буфер:
500 мМ NaCl, 100 мМ трис-НСl рН 7,4, 100 мМ $MgCl_2$,
10 мМ дитиотрейтола.
4. $10 \times$ ТВЕ в г/л:
108 г трис-основания, 55 г борной кислоты, 9,3 г ЭДТА.
5. $50 \times$ ТАЕ:
242 г трис-основания, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты,
100 мл 0,5 М ЭДТА рН 8,0, вода до 1 л.
6. 4%-ный денатурирующий гель:
480 г мочевины, 38 г акриламида, 2 г бисакриламида, воды
примерно 800 мл. Растворить при незначительном нагревании.
Добавить 20 г смолы Амберлит МВ-3, медленно перемешивать 1 ч.
Профильровать через стеклянный фильтр N2. Добавить 100 мл $10 \times$ ТВЕ
и воды до 1 л.
7. Краситель с формамидом (денатурирующая смесь с красителем):
100 мл деионизованного формамида, 0,1 г ксиленцианола FF,
0,1 г бромфенолового синего, 0,3 г ЭДТА.
8. Прокипяченная РНКазы:
100 мг РНКазы А, 10 мл 10 мМ трис-НСl рН 7,4, 15 мМ NaCl.
Инкубировать при 100 °С 15 мин. Охладить, разлить по пробиркам,
хранить образцы при -20 °С.
9. $2 \times$ ТУ-среда в г/л:
16 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl. Довести рН до 7,4
(около 2 мл 4 М NaOH).
10. СУ-среда в г/л:
10 г казаминокислот, 5 г дрожжевого экстракта, 3 г NaCl,
2 г KCl. Довести рН до 7,0.

11. 20× SSPE:
104 г NaCl, 15,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 3,7 г $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \times 2\text{H}_2\text{O}$;
25 мл 4 М NaOH и воды до 500 мл.
12. Буфер для разведения фага λ :
10 мл 1 М трис-HCl pH 7,4, 5 мл 1 М MgSO_4 , 11,7 г NaCl,
1 г желатины, воды до 1 л.

Благодарности

Над окончательным вариантом текста работали Роберт Уотерсон, Тоби Гибсон, Джордж Браунли и Врони Кнотт. Роберт Уотерсон и Юджи Кохора вместе с нами трудились над картированием *C. elegans*. Мы благодарим Хумайра Амира, Джейн Киф и Кетрин Рэндолф за помощь в работе. Выражаем признательность всем коллегам за практическую поддержку. Донна Албертсон, Сидни Бреннер, Ива Гринволд, Джонатан Карн, Питер Литл, Мэйнард Олсон делились с нами своими клонами и результатами.

Литература

1. Coulson A., Sulston J., Brenner S., Karn J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 7821.
2. Collins J., Hohn B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 4242.
3. Ish-Horowitz D., Burke J. F. (1981) Nucleic Acids Res., **9**, 2989.
4. Gibson T., Coulson A., Sulston J., Little P. F. R. (1987) Gene, **53**, 275.
5. Gibson T., Rosenthal A., Waterstorn R. (1987) Gene, **53**, 283.
6. Little P. F. R., Cross S. H. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 3159.
7. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
8. Karn J., Matthes H. W. D., Gait M. J., Brenner S. (1984) Gene, **32**, 217.
9. Burke D. T., Carle F. G., Olson M. V. (1987) Science, **236**, 806.
10. Sulston J. E., Brenner S. (1973) Genetics, **77**, 95.
11. Sternberg N., Tiemeier D., Enquist L. (1977) Gene, **1**, 255.
12. Rosenberg S. M. (1985) Gene, **39**, 313.
13. Cami B., Kourilsky P. (1978) Nucleic Acids Res., **5**, 2381.
14. Carle G. F., Olson M. V. (1984) Nucleic Acids Res., **12**, 5647.
15. Birnboim H. C., Doly J. (1979) Nucleic Acids Res., **7**, 1513.
16. Gibson T. J., Sulston J. E. (1987) Gene Anal. Technol., **4**, 41.
17. Garrof H., Ansorge W. (1981) Anal. Biochem., **115**, 450.
18. Sulston J., Mallett F., Staden R., Durbin R., Horsnell T., Coulson A. (1988) Cabios, **4**, 125.
19. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1983) Anal. Biochem., **132**, 6.
20. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1984) Anal. Biochem., **137**, 266.
21. Kohara Y., Akiyama K., Isono K. (1987) Cell, **50**, 495.
22. Olson M. V., Dutchik J. E., Graham M. Y., Brodeur G. M., Helms C., Frank M., MacCollin M., Scheinman R., Frank T. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 7826.
23. Olson M. V., Loughney K., Hall B. D. (1979) J. Mol. Biol., **132**, 387.
24. Knott V., Rees D. J. G., Cheng Z., Brownlee G. G. (1988) Nucleic Acids Res., **16**, 2601.

ПУЛЬС-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ И МЕТОДЫ РАБОТЫ С БОЛЬШИМИ МОЛЕКУЛАМИ ДНК

К. Смит, С. Клко, Ч. Кантор¹

1. Введение

Метод пульс-электрофореза (ПЭФ) [1] дает возможность разделять ДНК индивидуальных хромосом дрожжей и простейших [2, 3]. Размеры этих молекул варьируют от 0,2 до 10×10^6 нуклеотидных пар. В настоящее время создана технология выделения и обработки ДНК таких больших размеров как для эукариот, так и для прокариот [4—7]. Таким образом, теперь существует возможность изучать целые хромосомы (практически из любых организмов), последовательности ДНК которых насчитывают несколько миллионов оснований. Получены физические карты больших районов некоторых хромосом млекопитающих [8] и целой хромосомы *Esherichia coli* [9]. Цель этой главы — рассказать читателям о биохимических методах, используемых при выделении больших молекул ДНК, и методах ПЭФ, применяемых для их анализа. Пульс-электрофорезу посвящено значительное количество обзоров [10, 11, 12].

2. Приготовление образцов ДНК

Препараты ДНК с очень большой молекулярной массой невозможно получить, используя традиционные методы растворения, поскольку такие молекулы очень чувствительны к сдвиговым усилиям. В основе их — огромное осевое отношение молекул ДНК. Например, человеческая хромосома 21 — самая маленькая в геноме. Ее ДНК насчитывает 50×10^6 п. н. и представляет собой единственную молекулу длиной 15 мм. Между тем диаметр этой молекулы всего 20 нм. Таким образом, осевое отношение составляет 10^6 .

¹ C. L. Smith. Departments of Microbiology and Psychiatry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York City NY 10032, USA.

S. R. Kico C. R. Cantor. Department of Genetics and Development, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York City, NY 10032, USA.

Для предотвращения разрушительного воздействия сдвиговых сил процедуру экстракции ДНК из клеток проводят в присутствии агарозы. Этот прием достаточно прост, и получаемые таким способом образцы можно затем использовать в традиционных электрофоретических опытах и экспериментах по клонированию. Живые клетки суспендируют в расплавленной низкоплавкой агарозе. Затем агарозе дают застыть в формочках

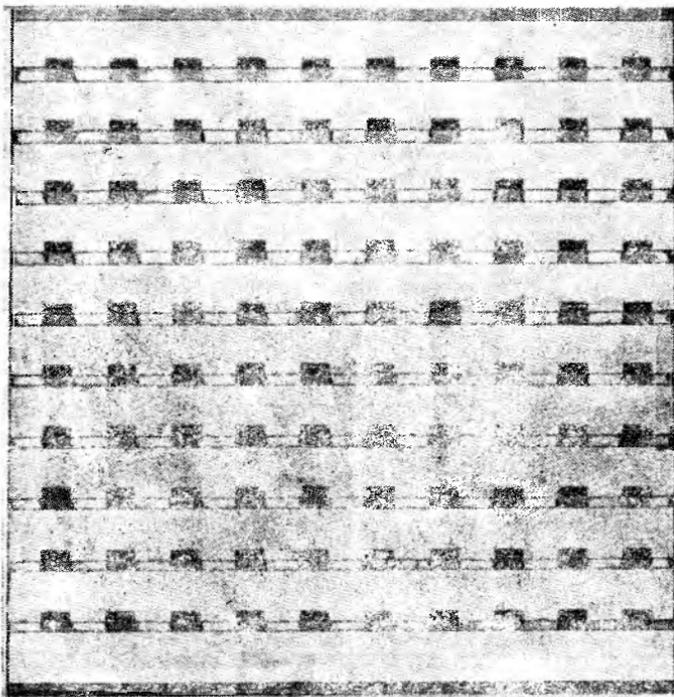


Рис. 1. Пластиковая формочка, используемая для приготовления 100-мкл агарозных блок-вставок, содержащих ДНК.

объемом 100 мкл для формирования блоков, называемых вставками (рис. 1). Формочки можно приобрести у фирмы Pharmacia-LKB или сделать самим, соединив вместе «хвост к голове» обычные гребенки для электрофореза нужных размеров. Все манипуляции с формочками следует проводить так, чтобы предотвратить их загрязнение нуклеазами. Перед употреблением формочки необходимо тщательно промыть дистиллированной водой и вытереть, одев перчатки. Затем одна сторона формочки заклеивается лентой, используемой в качестве доньшка.

В качестве альтернативы агарозным блок-вставкам могут выступить агарозные гранулы. Для их получения клеточную суспензию в агарозе по каплям добавляют в масло с одновременным перемешиванием (встряхиванием) [13]. Размеры гранул контролируются скоростью перемешивания. С образцами ДНК в гранулах можно обращаться так же, как с растворенными. Однако мы предпочитаем использовать агарозные вставки, так как с ними проще работать (см. ниже).

Для выделения ДНК из клеток, лишенных клеточной стенки, поместите запolyмеризовавшиеся агарозные вставки в раствор ESP (см. табл. 1) и инкубируйте 2 дня при 50 °С (табл. 2 и 3). В этом растворе происходит лизис клеток и отделение белков и других молекул от ДНК. Интактную хромосомную ДНК можно анализировать с помощью ПЭФ непосредственно из раствора ESP. Образцы ДНК в растворе ESP хранятся неопределенно долго при +4 °С или даже при комнатной температуре прямо в пробирках Эппендорф.

При наличии клеточной стенки ее необходимо удалить перед экстракцией ДНК, поместив клетки в раствор ESP. Методики выделения ДНК из клеток с интактной стенкой представлены в табл. 4—6. Состав клеточной стенки значительно варьирует для различных организмов. В некоторых случаях может оказаться необходимым подбор различных ферментов, расщепляющих полисахариды клеточной стенки. Многие из этих ферментов не требуют для своей работы присутствия двухвалентных катионов. Таким образом, обработка этими ферментами может проводиться в присутствии большого количества ЭДТА для предотвращения дегградации хромосомной ДНК.

Все образцы должны быть обязательно проинкубированы в растворе ESP в течение 2 дней при 50 °С. Вставки станут прозрачными гораздо раньше окончания инкубации (это будет свидетельствовать о лизисе клеток). Однако инкубацию следует продолжить, чтобы добиться полного отделения от ДНК связанных с ней различных молекул. Белки, связанные с ДНК, могут изменять ее электрофоретическую подвижность. Кроме того, образцы, проинкубированные более короткое время, оказываются устойчивыми к воздействию некоторых рестриктаз.

Наиболее общая проблема, возникающая при использовании описанной ниже техники получения ДНК из новых организмов, — это измерение конечной концентрации ДНК. Надо стремиться к тому, чтобы концентрация ДНК в агарозной блок-вставке была «удобна» для нанесения на форезный гель. Такая концентрация должна быть определена эмпирически. Возможное число клеток и количество ДНК предложены в прилагаемых протоколах опытов. Эти цифры можно использовать как предварительные и менять в зависимости от условий куль-

Таблица 1. Растворы для приготовления образцов и проведения ПЭФ

- 1. 50× исходный раствор Денхардта**
 Этот раствор — один из компонентов смеси для прегибридизации и гибридизации
 На 500 мл раствора:

поливинилпирролидон (Sigma PVP-40)	5 г,
фиколл (Sigma F-9378)	5 г,
БСА, фракция V (Sigma A-4503)	5 г.

Простерилизуйте фильтрацией через однократный фильтр (Nalgene) и храните в аликвотах по 30 мл при -20°C .
- 2. Раствор для лизиса клеток *E. coli***
 Раствор можно использовать для приготовления сферопластов из различных бактерий

Конечные концентрации	На 1 л	
6 мМ трис-HCl (pH 7,6)	6 мл	1 М раствора
1 М NaCl	58,4 г	
100 мМ ЭДТА (pH 7,5)	100 мл	0,5 М раствора
0,5% бридж-58 (Sigma P5884)	60 мл	10%-ного раствора (или 5 г)
0,2% дезоксихолата (Sigma D6750)	50 мл	4%-ного раствора
0,5% саркозила (Ciba Geigy NL30)	5 мл	100%-ного раствора
Провактоклавируйте		1 мг/мл лизоцима яичного белка
Добавьте свежими:		20 мкл/мл бычьей панкреатической РНКазы ¹⁾ (2 мкл из раствора для лизиса клеток <i>E. coli</i> 10 мг/мл)
- 3. ESP (от англ. EDTA, sarcosine, proteinase K)**
 Этот раствор используется для выделения любых больших молекул ДНК. Он имеет еще одно название — NDS.
 Конечные концентрации

0,5 М ЭДТА (pH 9,0—9,5)	
-------------------------	--

Автоклавируйте
 1% лаурилсаркозин (Sigma L-5125)
 Тщательно перемешайте до полного растворения 1 мг/мл протеиназы K
 Инкубируйте 2 ч при 37°C
 Храните в аликвотах замороженным
 Для работы: смешайте с равным объемом образца и инкубируйте 1—2 дня при 50°C .
- 4. Смесь для прегибридизации и гибридизации**

Конечные концентрации	На 1 л	
3× SSC	100 мл	30× раствора
0,1% SDS	5 мл	20%-ного раствора
10× раствор Денхардта	200 мл	50× раствора
10% декстрансульфат ²⁾	200 мл	50%-ного раствора
ДНК спермы лосося ³⁾		5 мг/мл

Смесь храните замороженной в аликвотах по 30 мл для прегибридизационного раствора (1 аликвота на 1 фильтр 20×20 см) и в аликвотах по 20 мл для гибридизационного раствора (1 аликвота на 1 фильтр 20×20 см).
- 5. 1×M9**

На 1 л:	50 г	Na_2HPO_4
	30 г	KH_2PO_4
	5 г	NaCl
	10 г	NH_4Cl

Разведите до однократной концентрации (1×) и проавтоклавируйте,
После автоклавирувания добавьте

Конечные концентрации	На 1 л	
1 мМ MgSO ₄	1 мл	1 М раствора
0,1 М CaCl ₂	0,2 мл	0,5 М раствора
0,4% глюкоза	10 мл	40%-ного раствора
0,5% казаминокислот ⁴⁾	25 мл	20%-ного раствора
Необязательные добавки		
50 мкл/мл аминокислот	10 мл	раствора 5 мг/мл
10 мкг/мл витаминов	10 мл	раствора 1 мг/мл
50 мкг/мл оснований	25 мл	раствора 2 мг/мл

6. Pett IV

Этот раствор предназначен для отмывки бактериальных клеток перед выделением сферопластов

Конечные концентрации	На 1 л	
10 мМ трис-HCl (рН 7,6)	10 мл	1 М раствора
1 М NaCl	58,44 г	

Проавтоклавируйте.

7. 0,1 М (PMSF) ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид)

Раствор используется для инактивации протеиназы К.
Ресуспенсируйте 17,5 мг ФМСФ в 1 мл изопропанола.

Помните, что раствор нестабилен, поэтому его надо использовать свежим и готовить перед употреблением. ФМСФ очень токсичен.

8. PSG (ФСГ) (от англ. phosphate, saline, glucose)

Этот раствор используется для отмывки простейших перед лизисом.

Конечные концентрации	На 1 л	
75 мМ Na-фосфатный буфер	75 мл	1 М раствора
65 мМ NaCl	13 мл	3 М раствора
10% глюкоза	100 г	

Проавтоклавируйте.

9. RBC (лизирующий буфер)

Этот раствор используется при выделении больших молекул ДНК из свежей цельной крови.

	На 1 л
1 мМ NH ₄ HCO ₃	79 мг
114 мМ NH ₄ Cl	7,6 г

10. SSC (от англ. standart saline citrate)

Раствор используется при блотинге и гибридизации.

20× SSC	На 1 л
3 М	1051,8 г
0,3 М Na ₃ цитрат×2H ₂ O	529,2 г

Доведите рН до 7,0 концентрированной HCl.

11. TE (от англ. Tris, EDTA)

Раствор используется при выделении ДНК.

Конечные концентрации	На 1 л	
10 мМ трис-HCl (рН 7,4)	10 мл	1 М раствора
0,1 мМ ЭДТА	0,2 мл	0,5 М раствора

12. TBE (от англ. Tris, borate, EDTA)

Раствор используется в качестве электродного буфера при электрофорезе.
Обратите внимание, что концентрация ЭДТА в 10 раз ниже описанной.

Конечные концентрации 1×	На 6 л 10× раствора
0,1 М трис-основание	726,6 г
0,1 М борная кислота	370,8 г
0,2 мМ Na ₂ ЭДТА×2H ₂ O	
(м. в. 372,2)	4,47 г

13. YPD (от англ. yeast, peptone, dextrose)

Этот раствор используется для выращивания *S. cerevisiae* и *S. pombe*.

Конечные концентрации	На 1 л
1% бакто-дрожжевой экстракт	10 г
2% бакто-пептон	20 г
2% декстроза	20 г
2% бакто-агар	20 г

14. Зимбуферный раствор

Раствор используется для получения дрожжевых сферопластов.

Конечные концентрации	На 1 л	
20 мМ цитрат-фосфатный буфер pH 5,6	10 мл	0,2 М раствора
50 мМ ЭДТА; pH 5,6	10 мл	0,5 М раствора
0,9 М сорбитол	164 г	

0,2 М цитрат-фосфатный буфер

Смешайте

11,6 мл 0,4 М Na_2HPO_4

8,4 мл 0,2 М лимонной кислоты.

15. 2 мг/мл зимолиазы 100 T (Calbiochem)

Этот раствор используется для получения дрожжевых сферопластов.

Приготовьте в указанной концентрации раствор зимолиазы в стерильном 10 мМ Na_2HPO_4 (pH 7,5) + 50%-ый глицерин.

Храните при -20°C .

¹⁾ Перед хранением при -20°C проинкубируйте исходный раствор РНКазы 20 мин при 80°C .

²⁾ Sigma D-0768 средний м. в. — 5000.

³⁾ Предварительно обработайте ДНК ультразвуком так, чтобы фрагменты составляли 1×10^6 пар оснований. Прокипятите 10 мин, быстро охладите в ледяной бане, затем добавьте к смеси. Добавляйте 20 мл раствора на 1 л гибридизационной смеси и 50 мл — на 1 л прегибридизационной смеси для получения концентраций 100 и 250 мг/мл соответственно.

⁴⁾ Раствор 1XМ9 можно автоклавировать прямо с казаминсовыми кислотами. Вместо этого препарата можно добавить смесь индивидуальных аминокислот (см. необходимые добавки). Реактив «казаминные кислоты» почти не содержит ароматических аминокислот, таких, как триптофан. Эту аминокислоту необходимо добавлять, если в ней нуждается используемый в работе штамм.

Таблица 2. Приготовление блок-вставок с образцами ДНК из клеток простейших

1. Суспендируйте клетки в PBS.
2. Добавьте равный объем 1%-ной жидкой низкоплавкой агарозы.
3. Осторожно перемешайте.
4. Разлейте пастеровской пипеткой или диспенсором в формочки, закрытые с одной стороны лентой. Избегайте появления воздушных пузырей.
5. Поместите формочки с клетками в холодильник (-20°C) на 5 мин (точно выдержите это время) или на 15—20 мин при 4°C .
6. Удалите ленту.
7. Промойте блок-вставки с помощью пастеровской пипетки (используя ее в качестве держателя) по крайней мере в двух объемах раствора ESP. Вставки должны хорошо держать форму и не деформироваться при манипуляциях. В противном случае охладите их еще несколько минут.
8. Инкубируйте при 50°C в растворе ESP 2 дня с мягким перемешиванием. На полную лизиса будет указывать появляющаяся прозрачность образцов.
9. Храните при 4°C в ESP (переносить можно при комнатной температуре в ESP).

Продолжение

Организм	Концентрация клеток в 100 мкл блок-вставки	Нагрузка на до-рожку при форезе
<i>Trypanosoma brucei</i>	2×10^8	1/16
<i>Plasmodium falciparum</i>	5×10^7	1/8
<i>Giardia lamblia</i>	1×10^7	1/10
<i>Leishmania</i>	2×10^8	1/16

Таблица 3. Приготовление блок-вставок с ДНК из клеток млекопитающих

А. Выделение из культивируемых клеток

1. Соберите клетки в начале стационарной фазы или в предконфлуентном состоянии.
2. Осадите клетки центрифугированием при 800 об/мин в центрифуге TJ (Beckman) в течение 10 мин при комнатной температуре и дважды отмойте PBS.
3. Ресуспендируйте клетки при концентрации 2×10^7 кл./мл (2×10^6 клеток на блок-вставку).
4. Перемешайте с равным объемом 1%-ной низкоплавкой агарозы.
5. Обработайте, как указано в табл. 2, пп. 4—9.

Концентрация ДНК.

Мы принимаем конечную концентрацию ДНК равной приблизительно 10 мкг на блок-вставку (около 100 мкг/мл). Для фореза наносите 1/6 блок-вставки на дорожку.

Б. Приготовление блок-вставок с ДНК из свежей цельной крови

1. Соберите кровь в 10-мл пластиковые пробирки (BD6457), содержащие по 15 мг K_3 ЭДТА.
2. Перенесите примерно 13 мл крови в 50-мл конические центрифужные пробирки.
3. Добавьте лизирующий раствор RBC до отметки 50 мл и перемешайте, переверачивая пробирку.
4. Оставьте во льду на 30 мин.
5. Центрифугируйте 15 мин при 3000 об/мин при 4°C в центрифуге TJ6 (Beckman).
6. Удалите супернатант, осторожно сливая его.
7. Ресуспендируйте осадок в 25 мл RBC, осторожно встряхивая.
8. Оставьте во льду на 5—10 мин до полного лизиса.
9. Центрифугируйте 15 мин 3000 об/мин при 4°C в центрифуге TJ6 (Beckman).
10. Ресуспендируйте осадок в 20 мл RBC, осторожно встряхивая, и инкубируйте во льду 5 мин.
11. Опять центрифугируйте 15 мин 3000 об/мин при 4°C в центрифуге TJ (Beckman).
12. Ресуспендируйте осадок в 20 мл холодного PBS.
13. Центрифугируйте 10 мин при 2500 об/мин при 4°C в центрифуге TJ (Beckman).
14. Удалите супернатант и ресуспендируйте осадок, содержащий лимфоциты в 1,5 мл PBS. Некоторое количество красного пигмента может содержаться во фракции лимфоцитов.

Продолжение

15. Добавьте 1,7 мл 1%-ной низкоплавкой агарозы, осторожно перемешайте и разлейте по формочкам, как описано в табл. 2, п. 4.
16. Далее продолжайте обработку, как указано в табл. 2, п. 5—9.
17. Концентрация ДНК.
В норме количество лимфоцитов составляет около 7000 в мм³ или 7×10^6 кл./мл. Описанная выше процедура приводит к потере примерно 10% клеток. Таким образом, конечное количество клеток на блок-вставку (100 мкл) оказывается около 1×10^6 или приблизительно 10 мкг ДНК (100 мкг/мл).
18. Для фореа наносите 1/8 блок-вставки на дорожку.

В. Приготовление вставок с ДНК из лимфоцитов свежей цельной крови

1. Разведите кровь (10 мл) тремя объемами PBS в конической пластиковой центрифужной пробирке (50 мл).
2. Подслоите 10 мл или более Histopaque (Sigma 1077) (фиколл) под разведенную кровь.
3. Центрифугируйте при 3000 об/мин 15 мин. Солевой раствор остается над фиколлом. Мутная взвесь на границе раздела (интерфаза) состоит из лимфоцитов.
4. Удалите солевой раствор, кроме последних 10 мл.
5. Соберите оставшиеся 10 мл раствора вместе с лимфоцитами с помощью пастеровской пипетки.
6. Подсчитайте клетки. Выход составляет обычно 75%.
7. Приготовьте блок-вставки с концентрацией клеток 1×10^8 клеток на вставку, как указано выше в п. А.

Таблица 4. Приготовление блок-вставок с ДНК из клеток *E. coli**Культивирование*

1. Нарастите $1,5 \times 10^8$ кл./мл (Klett=45 при красном 66 фильтре) в 10 мл М9 с необходимыми добавками. Хорошо аэрируйте при 37 °С.
2. Добавьте 18 мкл раствора хлорамфеникола (0,1 г/мл в 95%-ном этаноле) до конечной концентрации 180 мкг/мл.
3. Продолжайте инкубировать, контролируя рост, еще 1 ч.
4. Охладите, погрузив сосуд в ледяную баню и поворачивая его там.
5. Центрифугируйте при 8000 об/мин 15 мин при 4 °С в роторе SS34 центрифуги Sorvall.
6. Ресуспенсируйте в 10 мл раствора Pett IV.
7. Центрифугируйте при 8000 об/мин 10 мин при 4 °С в роторе SS34 центрифуги Sorvall.

Приготовление блок-вставок (30 вставок; 1,5 мкг ДНК на вставку)

1. Тщательно ресуспенсируйте клетки в 1,6 мл раствора Pett IV.
2. Нагрейте клетки до 30—40 °С.
3. Разведите суспензию клеток равным объемом 1%-ной низкоплавкой агарозы, приготовленной на стерильной воде.
4. Разлейте по формочкам, закрытым с одной стороны лентой. Избегайте образования воздушных пузырей.
5. Охлаждайте формочки точно 5 мин при -20 °С или при 4 °С 10—15 мин. Затем поместите в равный объем лизирующего буфера ЕС. Вставки должны хорошо держать полученную форму, в противном случае охладите их еще несколько минут.
6. Инкубируйте в течение ночи при 37 °С при мягком перемешивании (покачивании).

Продолжение

7. Удалите раствор и инкубируйте вставки в равном объеме ESP в течение 2 дней при 50 °С и плавном покачивании.
8. Храните вставки при 4 °С, переносить их можно при комнатной температуре.
9. Обычная нагрузка при фореze — 1/6 блок-вставки на дорожку.

Для подсчета выхода ДНК (мкг) в пересчете на измеренные единицы Klett и объем:

$$(\text{Klett}) (\text{объем}) \left(\frac{10^8 \text{ кл./мл}}{30 \text{ Klett}} \right) \left(\frac{2,5 \text{ хромосом}}{\text{клетка}} \right) \left(\frac{1 \text{ мкг}}{(2,4 \times 10^8 \text{ хромосом})} \right) = \text{мкг}$$

или (Klett) (объем) (0,0362) = мкг ДНК (суммарной).

Например, 10 мл при Klett=45 культуры *E. coli*. K12 дадут примерный выход ДНК $45 \times 10 \times 0,0362 = 16$ мкг ДНК.

Таблица 5. Приготовление блок-вставок с ДНК из клеток *S. cerevisiae*

1. Нарастите клетки в течение ночи при 30 °С в 200 мл среды YPD.
2. Центрифугируйте при 6000 об/мин в Sorvall GSA-роторе или аналогичном.
3. Ресуспенсируйте в 15 мл 50 мМ ЭДТА (рН 7,5). Определите концентрацию клеток, измеряя оптическую плотность разведенной в 1000 раз суспензии (используйте красный 66 Klett-фильтр¹⁾).
4. Центрифугируйте при 2000 об/мин 10 мин в центрифуге TJ6 (Beckman) или аналогичной в пластиковых центрифужных конических пробирках на 50 мл.
5. Ресуспенсируйте в 50 мМ ЭДТА (рН 7,5) до концентрации 1×10^{10} кл./мл.
6. Приготовление вставок осуществляется смешиванием нагретых до 38 °С 2 мл клеточной суспензии 1×10^{10} кл./мл 0,04 мл 2 мг/мл зимолизаы 100Т 2 мл 1%-ной агарозы. Поддерживая 38 °С, разлейте по 100 мкл в формочки.
7. Приготовьте сферопласты, вынув вставки из формочек и поместив их в равный объем раствора 0,5 М ЭДТА (рН 7,5), содержащего 7,5%-меркаптоэтанол, и инкубируйте в течение ночи при 37 °С (7,5 мл 14М β-меркаптоэтанол на 100 мл).
8. Удалите раствор и отмойте вставки 50 мМ ЭДТА (рН 9,0—9,5).
9. Лизируйте клетки. Для этого перенесите сферопласты в раствор ESP и инкубируйте 2 дня при 50 °С при мягком перемешивании (покачивании).
10. Храните вставки в ESP при 4 °С.
11. Для фореze наносите 1/5 вставки на дорожку.

¹⁾ Для подсчета клеток: Klett 50 = 5×10^7 клеток.

Таблица 6. Приготовление блок-вставок с ДНК из клеток *S. pombe*

1. Рассейте штрихом штамм на чашку с YPD-агаром и инкубируйте в течение ночи при 30 °С.
2. Перенесите одиночную колонию в 300 мл среды YPD. Инкубируйте, перемешивая, при 30 °С около 25 ч (до тех пор, пока плотность клеток не достигнет примерно 450 Klett единиц при красном 66 фильтре).
3. Охладите клетки во льду 10 мин.
4. Центрифугируйте при 3000 об/мин 10 мин в центрифуге TJ6 (Beckman).

Продолжение

5. Ресуспендируйте осадок в 75 мл 50 мМ ЭДТА (рН 7,5).
6. Центрифугируйте при 3000 об/мин 10 мин в центрифуге ТЖ6 (Вескман).
7. Ресуспендируйте клетки в 25 мл зимобуферного раствора и добавьте 3,8 мл 2 мг/мл зимолиазы 100 Т до конечной концентрации 0,3 мг/мл.
8. Инкубируйте 1—3 ч при 37 °С. Проверьте образование сферопластов, добавляя равный объем 1% додецилсульфата натрия (ДСН) и наблюдая клеточный лизис под микроскопом. Подсчитайте под микроскопом количество клеток.
9. Центрифугируйте при 5000 об/мин 10 мин в центрифуге ТЖ6 (Вескман).
10. Ресуспендируйте сферопласты в зимобуферном растворе до конечной концентрации 2×10^9 в мл. Обычно для этого необходимо добавить около 6,5 мл.
11. Добавьте равный объем 1%-ной низкоплавкой агарозы и тщательно перемешайте.
12. Разлейте по формочкам и дайте застыть.
13. Поместите вставки в раствор ESP и инкубируйте 1 день при 50 °С, мягко перемешивая (покачивая).
14. Смените раствор ESP на свежий и инкубируйте еще 1 день при 50 °С перед хранением при 4 °С.
15. Для фореза используют обычно 1/8 вставки на дорожку.

тивирования. Не бойтесь менять концентрации. Для предварительных экспериментов с новыми организмами мы рекомендуем использовать три варианта образцов с концентрацией, указанной в табл. 6, 5-кратный недостаток и 5-кратный избыток по отношению к этой концентрации.

Известно, что хромосомная ДНК из-за больших размеров молекулы чрезвычайно чувствительна к воздействию нуклеаз. В связи с этим необходимо принять за правило предварительно обрабатывать все растворы, контактирующие с ДНК (как это делают при выделении РНК). Растворы следует разлить на небольшие порции (аликвоты) и простерилизовать. Стерильными должны быть и посуда, и оборудование. Для переноса образцов из вставок или из трубочек можно использовать изогнутую стеклянную палочку, простерилизованную в спирте и в пламени горелки. При работе с образцами ДНК нельзя пользоваться никакими приспособлениями, содержащими металлические детали, в частности из нержавеющей стали, а также шпателями и бритвенными лезвиями. ДНК прочно связывается со многими бивалентными металлами и контакт с ними обычно приводит к появлению разрывов в молекуле ДНК.

2.1. Подготовка вставок с образцами ДНК простейших (табл. 2)

Свободно живущие простейшие могут быть прямо использованы для приготовления вставок с препаратами ДНК. Их можно отделить от культуральной среды центрифугированием. Перед

приготовлением вставок внутриклеточных паразитов выделяют из клеток крови или других хозяйских клеток. Эритроциты можно лизировать, как указано в табл. 3 (Б). В некоторых случаях трипаносом выделяли из различных клеточных элементов с помощью ионно-обменной хроматографии на ДЕАЕ-носителе [14].

2.2. Выделение ДНК из культивируемых клеток и лимфоцитов (табл. 3)

Процедуры получения ДНК из культивируемых клеток и из простейших имеют много общего. Для рестрикционного картирования необходимо использовать клеточные линии только с нормальным стабильным геномом. Например, клетки HeLa очень удобны для культивирования, но содержат большое количество хромосомных перестроек и имеют разную ploидность. Один миллион диплоидных клеток должен содержать примерно 6,6 мкг ДНК, что соответствует размерам генома 6×10^9 нуклеотидных пар. Поскольку несинхронизированные клеточные культуры обычно представляют собой смесь диплоидных, тетраплоидных и промежуточных состояний, мы используем для работы 1×10^9 клеток, считая, что они содержат примерно 10 мкг ДНК.

Процедуру, описанную в табл. 3 (А), использовали также для получения интактных хромосом из различных клеточных линий насекомых. При этом концентрация клеток должна быть пересчитана в соответствии с меньшими размерами генома (он в 10—20 раз меньше генома млекопитающих).

Методика выделения ДНК из лимфоцитов существенно близка используемой для культивируемых клеток, если лимфоциты свободны от примеси эритроцитов. Эритроциты могут быть или лизированы (табл. 3 (Б)), или удалены с помощью центрифугирования в градиенте фикола или перколла. Эти методы описаны в табл. 3 (В).

2.3. Выделение ДНК из клеток прокариот (табл. 4)

Методика выделения ДНК из клеток *E. coli* представлена в табл. 4. Именно эта методика была с успехом использована для получения интактной хромосомной ДНК широкого набора бактерий и архебактерий, включая *Salmonella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Haemophilus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Halobacterium* и некоторые другие быстрорастущие, сопуствовавшие им. Размеры хромосом у этих бактерий варьируют в пределах от 1 до 20×10^6 нуклеотидных пар, количество хромосом на одну клетку также может изменяться от 1 до 5 в зависимости от условий культивирования. Таким образом, в предварительные эксперименты необходимо включить подсчет клеток в широком диапазоне.

В некоторых случаях могут оказаться необходимыми небольшие изменения в методике. Например, в растворе Pett IV, когда его использовали для обработки *Halobacterium*, концентрацию NaCl пришлось увеличить до 0,5 М, чтобы предотвратить преждевременный лизис клеток.

Прием, описанный в табл. 4, предназначен для синхронизации репликативных вилок, которая достигается инкубацией клеток в хлорамфениколе в течение 1 ч непосредственно перед сбором. Обработка хлорамфениколом позволяет закончиться уже начатым репликативным процессам, но предотвращает запуск новых. Препараты ДНК можно получить и из несинхронизированных культур. Однако необходимо помнить, что области хромосом около точек конца репликации могут быть недопредставлены в некоторых препаратах [15]. Иногда это не имеет значения, но не всегда. Так, например, интенсивность окрашивания бромидом этидия зависит от молекулярного веса. Таким образом, хромосомную ДНК из области терминации репликации будет не просто выявить с помощью этого соединения.

2.4. Выделение ДНК из клеток грибов (табл. 5 и 6)

Мы предлагаем две методики для дрожжей. Первая из них (табл. 5) предназначена для *Saccharomyces cerevisiae*, а вторая — для делящихся клеток *Schizosaccharomyces pombe*. В обоих случаях для удаления клеточной стенки и приготовления сферопластов используется зимолиаза 100 Т. Получить сферопласты из *S. pombe* более трудно. В этом случае мы рекомендуем контролировать процесс лизирования под микроскопом.

Другие представители грибов могут иметь иные, нежели дрожжи, компоненты клеточной стенки. В этом случае полезно вспомнить, что существуют разнообразные зимолиазы, отличающиеся друг от друга по своей специфичности и активности. В каждом конкретном случае можно подобрать подходящий фермент. К сожалению, в этих ферментах присутствует большое количество примесных нуклеаз, которые препятствуют получению больших фрагментов ДНК. Препарат «Новозин», выпускаемый фирмой Novo Bio Labs, является смесью ферментов, воздействующих на клеточную стенку самых разных грибов. Мы так и не решились использовать этот препарат; нас смутил его коричневый цвет. Вероятно, необходима более тщательная очистка.

2.5. Выделение ДНК из растительных клеток

Усилия многих исследователей направлены сейчас на разработку методов получения интактных хромосомных ДНК из соевых тканей. Предварительные эксперименты с плоскими чер-

виями, *Caenorhabditis elegans*, личинками *Drosophila* и с *Chlamydomonas* продемонстрировали возможность использования различных приемов. Для небольших многоклеточных организмов могут пригодиться методы, применяемые для одноклеточных (табл. 2 и 3). Для предотвращения выхода подвижных клеток за пределы вставок полезна обработка раствором 0,2 мМ азидата натрия (или KCN). ДНК с большим молекулярным весом удастся получить при обработке коллагеназами, гомогенизировании, трипсинизации или просто разрезании материала, помещенного в раствор ESP. Можно вначале выделить из клеток ядра [16], а затем из них приготовить вставки с образцами.

3. Работа с агарозными блок-вставками, содержащими образцы ДНК

Для многих целей удобнее и проще иметь дело с ДНК, заключенными в агарозный гель, чем находящимися в растворе. Низкомолекулярные компоненты (соли, белки и даже ДНК с размерами 5 т. п. н.) свободно диффундируют через агарозу при мягком перемешивании. Мы работали с 100 мкл-агарозными блок-вставками просто как с жидкими образцами объемом 100 мкл.

Возможность обрабатывать ДНК ферментами непосредственно в агарозе зависит от типа агарозы. По крайней мере половина партий агарозы содержит примеси, которые не позволяют ферментам эффективно работать. Компания FMC выпускает агарозу с низкой температурой плавления (INCERT), специально проверенную на пригодность к рестрикционной обработке заключенных в нее молекул ДНК.

3.1. Ферментативная обработка

Для ферментативной обработки ДНК, содержащейся в блок-вставке, необходимо предварительно инактивировать протеинкиназу K, оставшуюся после приготовления образца, и убрать диализом ЭДТА и детергенты (табл. 7). Протеиназа K весьма устойчивый фермент и может оставаться активной в растворе ESP при 4°C по крайней мере 1 год. Однако она полностью инактивируется при обработке фенолметилсульфонилфторидом (ФМСФ), который крайне нестабилен и свежий раствор которого поэтому надо добавлять ежедневно. Любая остающаяся во вставке протеиназа K разрушит вносимые ферменты. Необходима чрезвычайная аккуратность, чтобы не загрязнить лабораторный стол и используемое оборудование протеиназой K. В правильно выбранной агарозе эффективными будут если не все, то большинство рестриктаз. Когда рестриктазы не активны в ага-

Таблица 7. Рестриктазная обработка блок-вставок, содержащих ДНК

1. Отмойте 10 вставок в каждом из последующих растворов в 15-мл конических пластиковых одиоразовых пробирках от 2 до 12 ч (ночь) на круговой качалке при комнатной температуре:
 - а) дважды в 10 мл раствора TE, содержащего 1 мМ ФМСФ (добавляйте свежие 100 мкл ФМСФ к 10 мл TE);
 - б) 3 раза в 10 мл TE (без ФМСФ).
2. Проводите рестриктазную обработку в пробирках Эппендорф в объеме, в два раза большем объема вставок.

1 блок-вставка	100 мкл
10×раствор для образцов ¹⁾	20 мкл
20 мг/мл БСА	1 мкл
Вода и фермент ²⁾	79 мкл
Всего	200 мкл
3. Удалите буфер.
4. Добавьте 1 мл ES (ES — это ESP без протеиназы K).
5. Инкубируйте 2 ч или в течение ночи при 50 °С.
6. Удалите ES, добавьте 250 мкл ESP и продолжайте инкубировать 2 ч или в течение ночи при 50 °С.
7. Храните при 4 °С в ESP.

¹⁾ Добавьте свежий сульфгидрильный реагент; концентрация глицерина должна быть менее 5%.

²⁾ Добавьте 20 ед. рестриктазы на 1 мкл ДНК.

розе, они, как правило, не проявляют активность и в растворе. Обычно мы используем соотношение фермент:ДНК, равное 20:1 (ед. акт./мкг). В большинстве случаев это соответствует по крайней мере 10-кратному превышению над реально необходимым количеством фермента. Наш опыт, основанный на использовании ДНК и рестриктаз из различных источников, а также опыт других исследователей подсказывает, что именно такой подход гарантирует полноту рестрикции. В случае низкой концентрации ДНК, особенно при работе с бактериями, может оказаться необходимым повысить концентрацию рестриктаз. Для частичного рестриктазного гидролиза необходимо титровать отдельные рестриктазы, добавляя различное их количество к вставкам с образцами ДНК и инкубируя в течение 2,5 ч.

4. Пульс-электрофорез (ПЭФ)

С тех пор как метод пульс-электрофореза был впервые описан [1], появилось большое количество сообщений о его вариантах. Разделение ДНК во всех этих случаях основывалось на одном и том же принципе. Молекулы ДНК подвергали внешнему воздействию, заставляющему их изменять направление движения. Быстрота, с которой молекулы делают это, зависит от их молекулярной массы, тогда как собственно электрофоретиче-

ская подвижность больших молекул ДНК от этого параметра не зависит. Изменение направления движения молекул ДНК осуществляется при воздействии меняющегося по направлению электрического поля. Время включения того или иного поля называется временем пульса. Переключение полей должно осуществляться как можно более быстро. Время пульса подбирается непосредственно для разделяемых молекул (см. ниже).

Большинство наших собственных экспериментов было проведено на приборе Pulsaphor фирмы Pharmacia-LKB. Методы, описываемые здесь, разрабатывались специально для этого прибора, однако основные приемы и параметры применимы и для другого оборудования.

4.1. Заливка геля и нанесение образцов

В большинстве случаев для приготовления геля используют стандартную 1%-ную агарозу с низким эндоосмосом (табл. 8). Гель наливают на установленный по уровню горизонтальный столик, гребенка должна быть строго перпендикулярна поверхности геля. Для воспроизводимости результатов гребенку всегда вставляйте одинаково (в приборе Pulsaphor — 3 см от края геля размерами 20×20 см).

Лучшее разделение достигается с небольшими количествами ДНК. Например, при работе с ДНК млекопитающих мы нано-

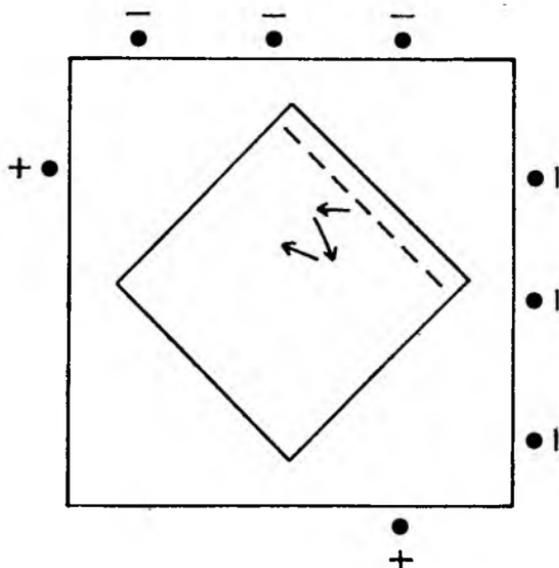


Рис. 2. Конфигурация электродов, позволяющая получить в геле типичное двойное однородное электрическое поле при пульс-электрофорезе.

Таблица 8. Приготовление электрофорезного геля, заливка его и пульсафор (Pulsaphor Pharmacia-LKB) и нанесение образцов

A. Приготовление 1%-ного агарозного геля размером 20×20×0,5 см

1. Внесите 2,5 г агарозы для электрофореза (FMC) в 225 мл дистиллированной воды.
2. Нагревайте 2 мин в микроволновой печи при полной мощности.
3. Добавьте 25 мл 10× модифицированного TBE, перемешайте и прогрейте еще 2 мин в микроволновой печи.
4. Мягко перемешайте и проверьте, вся ли агароза находится в жидком виде.
5. Охладите до 50 °С (до тех пор, когда можно будет держать сосуд рукой).
6. Убедитесь, что столик для заливки геля строго горизонтален.
7. Налейте 210 мл раствора агарозы на специальное стекло для геля, приложенное в комплекте к аппарату, избегая при этом образования пузырьков воздуха, постукивая по сосуду с агарозой.
8. Удалите пузырьки воздуха с подложки, на которую налита агароза, с помощью стеклянной пастеровской пипетки.
9. Для формирования лунок, в которые будут внесены образцы, вставьте гребенку в 3 см от края геля перпендикулярно к его поверхности. На нижнюю часть платформы, на которой происходит заливка геля, можно наклеить черную ленту для обозначения местоположения гребенки и для контрастирования, облегчающего нанесение образцов.
10. Дайте гелю остыть по крайней мере 20 мин перед удалением его со столика. Для отделения геля можно воспользоваться шпателем.

B. Нанесение образцов

1. Чтобы вынуть блок-вставки из пробирок и нанести их на внутреннюю сторону свежих кусочков парафила, используют стеклянные палочки. Стеклянные палочки удобно делать из пастеровских пипеток, расплавляя их и оттягивая кончики. Палочки можно использовать многократно, но каждый раз перед работой стерилизовать в пламени горелки.
2. Для разрезания блоков¹⁾ пользуйтесь стерильными покровными стеклами.
3. Требуемые кусочки блок-вставок поместите на поверхность геля в верхней его части. Для нанесения используйте покровные стекла. Для каждого кусочка необходимы новые стекла и парафил.
4. Осторожно вдавите вставку в гель с помощью стеклянной палочки. Избегайте образования воздушных пузырьков между вставкой и стенкой форезного геля.
5. Залейте вставки 0,5%-ной низкоплавкой агарозой.

¹⁾ Жидкие образцы можно наносить прямо на электрофорезный гель. Это делают за 10–20 мин до включения циркуляционного насоса, чтобы дать образцам всосаться в гель.

силы 1—3 мкг на дорожку. В случае двойного однородного поля можно наносить еще меньшее количество ДНК. Это приведет к лучшему разделению (см. рис. 2).

Для приготовления блок-вставок обычно используют концентрации ДНК в 4—10 раз большие, чем это необходимо для одной дорожки геля. Количество наносимого на одну дорожку образца зависит от времени пульса, конфигурации электрода и числа полос, на которые разделится ДНК. Количество ДНК можно подобрать, варьируя размеры используемых агарозных вставок, нарезаая их на кусочки с помощью покровного стекла.

Таким образом, одна вставка может быть разделена на несколько частей для нескольких дорожек или частично возвращена для дальнейшего хранения в растворе ESP при 4°C. Блок-вставки с образцами ДНК с помощью покровного стекла вдавливаются в образованные гребенкой отверстия в геле. Обычно маркируют дорожку, на которую нанесли образец, надрезая ее покровным стеклом. После того как все образцы нанесены, их заливают 0,5%-ной низкоплавкой агарозой.

4.2. Подбор эффективных условий разделения

Используемые обычно параметры ПЭФ таковы: 3—10 В/см, 15°C и модифицированный буферный раствор TBE; в этом растворе для уменьшения проводимости снижена концентрация ЭДТА (табл. 1). Тепло, выделяемое при фореze, может превышать мощность используемого охлаждения при обычной концентрации ЭДТА. Когда применяется конфигурация электродов, показанная на рис. 2, напряженность в геле равна приложенному напряжению, деленному на кратчайшее расстояние между анодом и катодом. Если фореz проводят при 12—15°C, то охлаждающая жидкость должна иметь 6—8°C (для Pulsaphor). Электродный буфер (3 л) необходимо охладить. В большинстве случаев единственный параметр, который должен быть подобран,— это время пульса. Оптимальное разделение достигается для тех молекул ДНК, которые за время пульса успевают только переориентироваться, но не успевают существенно продвинуться вперед, так как движение вперед не зависит от молекулярной массы. Разрешение больше зависит от разницы в степени замедления движения, чем от разницы в подвижностях. Отсюда следует, что для лучшего разрешения требуется большее время фореz.

Типичные значения продолжительности пульса для Pulsaphor, позволяющие разделить ДНК различных размеров представлены в табл. 9. В различных обзорах [11, 17, 18] приводятся данные о том, как изменение напряжения, конфигурации электродов, температуры и концентрации геля влияют на степень разрешения. Если эти параметры варьируют, то каждый раз необходимо подбирать время пульса. Например, диапазон разрешения (размер разделяемых молекул) изменяется примерно пропорционально квадрату напряженности и времени пульса [11]. Один из примеров зависимости разрешения от времени пульса показан на рис. 3. Время пульса 100 с при 10 В/см считается наиболее удачным, так как в этом случае наилучшим образом разделяются молекулы ДНК с размерами от 0,05 до 1×10^6 п. н. Если возникает необходимость разделять большие

молекулы, следует снизить напряжение для предотвращения разрушения молекул ДНК при форезе.

Условия, перечисленные в табл. 2, разработаны для прибора Pulsaphor. Их можно приспособить для других аппаратов. Подобранные нами условия фореза позволяют добиться максимального разрешения. При этом треки будут не прямыми. Любые

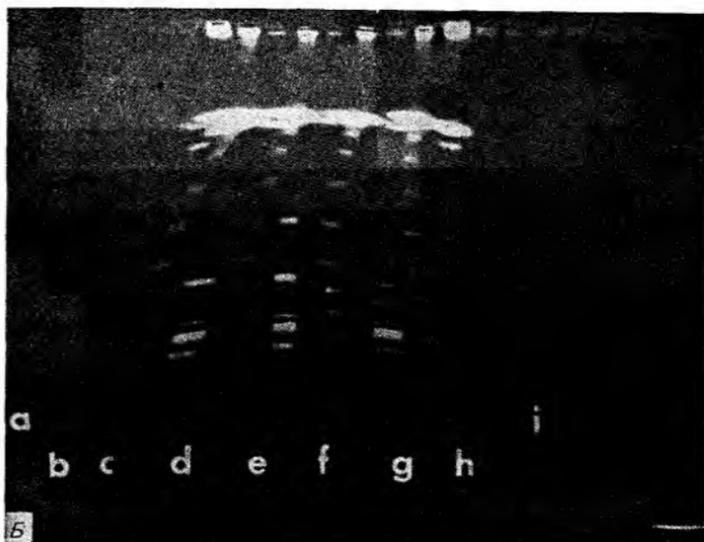
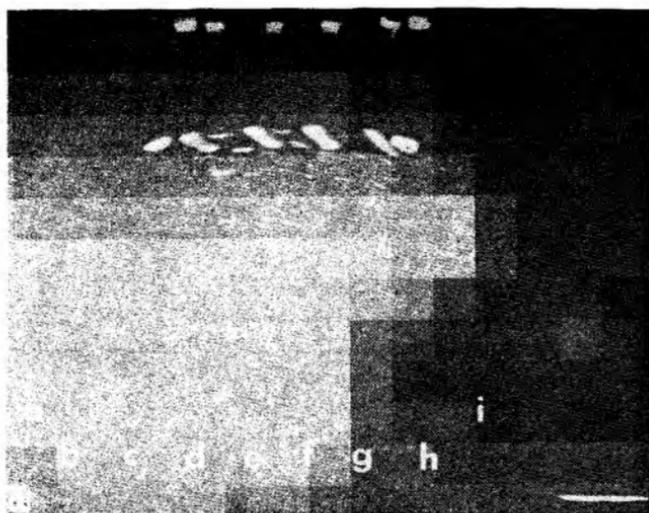
Таблица 9. Стандартные условия пульс-электрофореза: 1%-ная агароза, 12 °С, модифицированный ТВЕ, конфигурация электродов, представленная на рис. 2, аппарат Pulsaphor

Время пульса	Время фореза, ч	Напряжение, В/см	Диапазон разрешения, $\times 10^3$ п. н.
1 с	18	10	0,002—0,05
5 с	18	10	0,002—0,08
15 с	40	10	0,05—0,25
25 с	40	10	0,05—0,45
100 с	40	10	0,05—1,2
30 мин	168	3	1,0—2,0
60 мин	168	3	1,0—3,0
75 мин	168	3	3,0—7,0

усилия, направленные на их выпрямление, неизбежно приведут к ухудшению разрешения. Наиболее простые способы выпрямления треков — это использование более короткого времени фореза, нанесение образцов только в центральные дорожки или перемещение анода к середине стороны камеры (см. ниже).

Конфигурация двойного однородного поля (рис. 2), позволяющего получить лучшее разрешение, была подобрана эмпирически. Анод расположен в точке, отстоящей на 22% длины боковой стороны от края камеры, катоды — на расстоянии 11%, 44% и 77%. Перемещение анода к середине боковой стороны приводит к выпрямлению трека и ухудшению разрешения. Перемещение электродов ближе к углу приводит к увеличению кривизны треков и к утоньшению полос.

Тот факт, что треки не являются прямыми, не препятствует определению размеров молекул, проводимому путем сравнения длины пробега изучаемых образцов и стандартных препаратов [17, 18]. Это означает, что подвижность, а следовательно, и размеры могут быть определены простым сравнением диагоналей, проведенных от точек нанесения образца до интересующей нас полосы на треке. Синусоидальность в начале трека можно просто игнорировать. Однако кривизна трека в конце должна быть учтена. Чтобы уменьшить ее, пробег ДНК должен заканчиваться примерно за 5 см до конца геля. Для достижения лучшего разрешения время фореза обычно составляет 40—48 ч, однако может



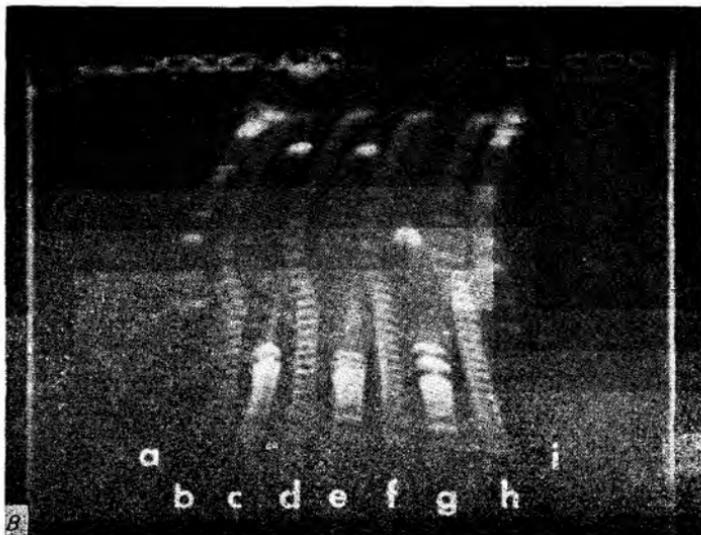


Рис. 3. Влияние времени пульса на разрешение метода ПЭФ. Стандартные условия фореза: 1%-ная агароза, 10 В/см, 12 °С, время фореза 40 ч в модифицированном растворе ТВЕ, время пульса 15 с (А), 45 с (Б) и 100 с (В). На форезный гель наносили следующие образцы: хромосомная ДНК *S. cerevisiae* (треки *a, i*), конкатемеры ДНК фага λ (треки *b, d, f, g*), *NotI* — рестриктазный гидролизат ДНК *E. coli* (треки *c, e, g*).

быть и меньше. Этот прием приводит к ухудшению разрешения, спрямлению треков и используется обычно для быстрой оценки экспериментальных результатов. Минимальное время, которое мы обычно использовали, — 20 ч. Проблемы, возникающие перед исследователями, и их причины обсуждаются в табл. 10 и в приложении.

Таблица 10. Ошибки при проведении пульс-электрофореза и возможные причины их возникновения

1. Источник питания — фирмы Pharmacia-LKB.
Электрофорез при постоянном токе, а не при постоянном напряжении. Для камеры используется очень много электродного буфера.
В ТВЕ слишком большая концентрация ЭДТА.
10× ТВЕ разведён неправильно.
2. Различия в токе между направлениями поля Юг/Север и Восток/Запад достигают значений больше 30 МА.
Электрофорезная камера установлена не строго горизонтально. Это можно сделать, поместив уровень на дно камеры.
Электроды не полностью находятся под напряжением или их контакт с буфером не полный. Если вокруг них нет изолирующих воздушных пузырьков, то проверьте, нет ли разрывов в платиновой проволоке, из которой сделаны электроды. При непрерывном использовании аноды пригодны к работе около 1 месяца, катоды — около 10 месяцев.

Продолжение

3. Отсутствует ток в цепи (амперметр на источнике тока показывает ноль). Цепь разомкнута. Проверьте электродные контакты и убедитесь, что все электроды погружены в буфер. Проверьте медные контакты на крышке электрофорезной камеры.
4. Перегрев геля.
Неправильно подобран состав электродного буфера.
Не работает циркуляционный насос. Проверьте горизонтальность камеры. Если насос заедает и периодически не работает, его следует закрепить, перевернуть камеру дном вверх и устранить причину заедания.
5. Не включается источник питания.
Таймер не выставлен в положение ON (не включен).
Переключатель таймера должен стоять на RUN, а переключатель ALARM — в положении AUDIBLE WITH SHUTDOWN.
6. Образцы движутся к одной стороне геля.
Электрическое поле не импульсное.
Проверьте наличие разрывов в платиновой проволоке электродов и плотность контакта между электродами и подводящими проводами. Проверьте, что CONTROL UNIT на источнике питания включен в положение ON.

5. Фотографирование, блотинг и гибридизация

В этом случае в принципе подходят общие приемы фотографирования, гибридизации и блотинга. Однако необходимы некоторые модификации для увеличения интенсивности сигнала и для уверенной гибридизации с уникальными генами млекопитающих (табл. 11). Процедура блотинга более «капризна», чем процеду-

Таблица 11. УФ-блотинг геля после пульс-фореза

1. Окрашивайте гель раствором бромида этидия с концентрацией 1 мкг/мл на шейкере в течение 10 мин.
2. Отмывайте гель в течение 30 мин раствором ТВЕ.
3. Облучите гель ультрафиолетом. Время экспозиции будет зависеть от интенсивности света, которая меняется по мере выработки ресурса лампы.
4. Откалибруйте вашу УФ-установку (см. в тексте).
5. Учтите время облучения при фотографировании.
6. Между манипуляциями храните гель в темноте.
7. Проведите денатурацию в течение 1 ч с мягким перемешиванием, используя 1 л следующих растворов на 400 мл геля:

<u>Конечные концентрации</u>	<u>На 1 л</u>
0,5 М NaOH	20 г NaOH (свежий)
0,5 М NaCl	29,2 г

8. Нейтрализуйте в течение 1 ч с мягким перемешиванием, используя 1 л следующих растворов на 400 мл геля:

<u>Конечные концентрации</u>	<u>На 1 л</u>
1,5 М NaCl	87,7 г
0,5 М трис-НСl	500 мл 1 М раствора
pH 7,5	

9. Немедленно проведите блотинг. Это займет примерно 24 ч (через блот должны пройти 2 л $15 \times \text{SSC}$). Сбор установки для проведения восходящего блотинга описан ниже. Перед проведением блотинга убедитесь в отсутствии воздушных пузырьков на стенках геля и между гелем и нитроцеллюлозным фильтром:
 - а) 10-см стопка бумаги для блотинга (для веса);
 - б) 15-см стопка белых бумажных полотенец;
 - в) 4-см стопка бумаги для блотинга (S+S, GB004);
 - г) два кусочка бумаги для блотинга, смоченной в $2 \times \text{SSC}$ (S+S, GB002);
 - д) нитроцеллюлозный фильтр (диаметр пор — 0,45 мкм)¹⁾;
 - е) несколько миллилитров $15 \times \text{SSC}$ до образования небольшой лужицы;
 - ж) гель (лицевой стороной вниз);
 - з) два кусочка свежей S+S, GB002;
 - и) губка²⁾, смоченная $15 \times \text{SSC}$;
 - к) пластиковый контейнер размером 22×34 см.
10. После проведения блотинга осторожно удалите полотенца, переверните гель вместе с нитроцеллюлозным фильтром верхней стороной вниз, поместите на 3ММ бумагу и пронумеруйте маркером дорожки через гель.
11. Поместите фильтр в $2 \times \text{SSC}$ и осторожно промойте фильтр 5 мин для полного удаления агарозы. Убедитесь, что агароза удалена.
12. Сушите на воздухе 30 мин, а затем в вакуумной печи 1 ч при 80°C .
13. Окрасьте повторно гель бромидом этидия. Сфотографируйте гель для определения полноты переноса ДНК из геля. В геле должно остаться около **20% ДНК**.

¹⁾ Приготовьте нитроцеллюлозный фильтр к работе, смачивая его бидистиллированной водой до полного насыщения; после этого смочите $2 \times \text{SSC}$.

²⁾ Перед употреблением губка толщиной 5 см должна быть тщательно промыта дистиллированной водой.

ра гибридизации. Большие молекулы ДНК должны быть подготовлены к ней. В качестве альтернативы блотингу для больших молекул ДНК можно использовать процедуру гибридизации в геле [19, 20].

5.1. Фотографирование и блотинг

Гель, окрашенный бромидом этидия, необходимо защищать от воздействия света. Для хранения, окраски, отмывки и гибридизации используются специальные закрывающиеся контейнеры. Для переноса ДНК мы применяли нитроцеллюлозные фильтры чаще, чем нейлоновые, хотя в последнем случае отношение сигнал/фон оказывается ниже. При использовании нитроцеллюлозных фильтров в частичном гидролизате ДНК млекопитающих с помощью уникального зонда при двухдневной экспозиции обычно удается выявить 4—6 полос. Наибольшее количество фрагментов, которые мы были в состоянии выявить с таким зондом, — 13. При аккуратном обращении нитроцеллюлозные фильтры можно использовать не менее 3—4 раз. Нейлоновые мембраны также пригодны для этих целей. Потенциально их можно ис-

пользовать большее число раз, к тому же они не такие ломкие, как нитроцеллюлозные. Оказалось, что отношение сигнал/фон у них ниже. Для нитроцеллюлозных и найлоновых фильтров применяют одинаковую процедуру блотинга. Перенос ДНК на мембраны осуществляется буферным раствором, проходящим через гель. Для переноса обычно требуется 2 л раствора. В некоторых экспериментах [21] перенос ДНК на фильтры успешно проходит в растворе NaOH. Предварительные эксперименты показали возможность быстрого (2 ч) и эффективного переноса ДНК с размерами в несколько миллионов нуклеотидных пар с помощью прибора Vacublot (Pharmacia-LKB). Установлено, что уникальная последовательность в ДНК млекопитающих может быть выявлена в гибридизационных экспериментах при однодневной экспозиции. Это означает, что эффективность такого переноса сравнима с эффективностью традиционного капиллярного блотинга.

Непосредственно перед переносом целесообразно внести в ДНК разрывы, или обрабатывая ее кислотой (HCl), или путем ультрафиолетового облучения в присутствии бромида этидия. Мы обнаружили, что большие молекулы ДНК гораздо более чувствительны к воздействию HCl, чем маленькие. При обработке ДНК длиной в несколько миллионов нуклеотидных пар кислотой для лучшей воспроизводимости результатов необходимо тщательно титровать кислоту. При использовании для внесения разрывов ультрафиолета необходимо подобрать время облучения, при котором достигается максимальный гибридизационный сигнал. Помните, что интенсивность света у УФ-источника уменьшается при его длительном использовании. Можно применять источники с длиной волны как 245, так и 300 нм. Для источника с длиной волны 300 нм необходима экспозиция 30 с с интенсивностью света примерно 5,3 мкВт/см (по радиометру UV×31). Однако измерения интенсивности света обычно не очень точны и варьируют на 90% даже при использовании одного и того же прибора. Так или иначе, но это необходимо стандартизировать.

Можно придерживаться следующих правил при подборе необходимой дозы ультрафиолета для пленки ПолярOID 667:

- 1) 20 с экспозиции для источника света, для которого время фотографирования на пленку составляет 1 с;
- 2) 10 мин экспозиции для старого источника света, для которого время фотографирования на пленку составляет 1,5 мин.

5.2. Гибридизация

В настоящее время предложено большое количество различных методик гибридизации и не ясно, какая из них наиболее приемлема. Гибридизация может быть успешной как с формамидом, так и без него. В состав гибридизационных смесей могут

входить разнообразные реагенты в разных сочетаниях. Одна из смесей, содержащая декстрансульфат, описана в табл. 1. Этот раствор пригоден как для одночасовой предгибризационной обработки, так и непосредственно для гибридизации.

Можно использовать ник-транслированный или меченный олигонуклеотидами зонд [22, 23]. В наших опытах, используя последнюю процедуру, мы получили значение удельной активности от 1 до 3×10^9 имп./мин/мкг. Когда работают с гибризационной смесью, содержащей декстрансульфат, необходимо добавлять не более 2—4 нг зонда в 1 мл. Для калибровки размеров при гибридизации в смесь можно включить 5×10^4 имп./мин/мкг λ [^{32}P]-ДНК. Показано, что λ ДНК не гибридизуется с человеческой геномной ДНК.

Можно использовать стандартные отмывки. Вначале полезно отмывать блот мягко. Например, для некоторых образцов ДНК млекопитающих сигналы от однокопийных зондов выявляются только при мягкой отмывке двукратным буфером (стандартный солевой буфер с цитратом при 50°C).

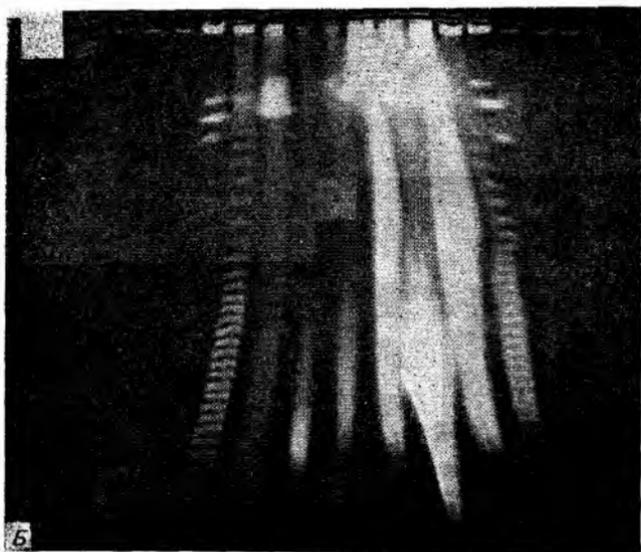
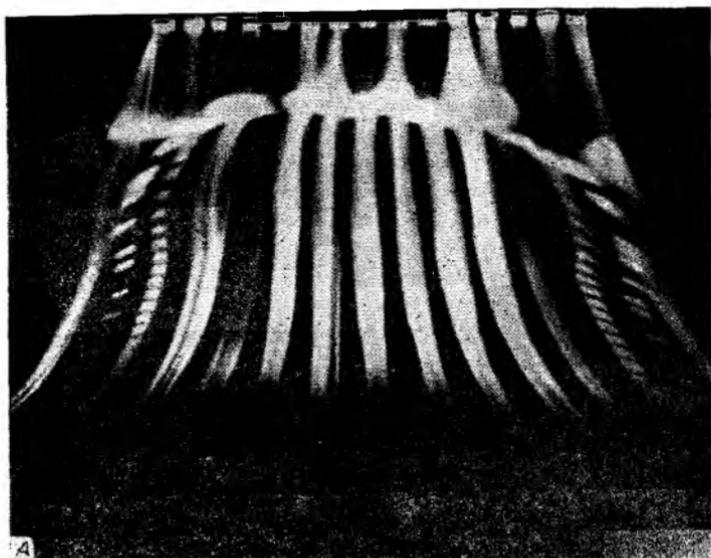
Весьма полезно включать в ПЭФ-эксперименты уже охарактеризованные рестрикционные гидролизаты ДНК. Их можно прогонять вместе с опытными при электрофорезе или добавлять позже, включая дорожки из одномерного фореза в гибризационные смеси. Примеры неудачных опытов и возможности их использования обсуждаются в приложении.

Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить многих исследователей за полезные советы и предложения, в том числе Симона Лавранса, Питера Варбуртона, Эрика Шона, Элизабет Эладаре, Осами Ниву, Митсухиро Янашиду, Андреаса Гаала и Фреда Алта. Эта работа была поддержана грантами от NIH, GM14825, NCI, CA39782, DOE DE-FG02-87ER-GD852; Фондом изучения наследственных болезней, Фондом Мак-Артура и фирмой Pharmacia-LKB.

6. Приложение

В этом разделе помещены фотографии неудачных гелей после пульс-электрофореза, которые обычно не публикуют. Они приведены здесь в качестве примеров некоторых ошибок и проблем, с которыми могут столкнуться экспериментаторы. В большинстве гелей крайние дорожки содержат хромосомную ДНК *S. cerevisiae*, а соседние внутренние дорожки — конкатемеры ДНК фага λ в качестве стандарта размеров. Внутренние дорожки содержат бактериальную ДНК или ДНК млекопитающих после



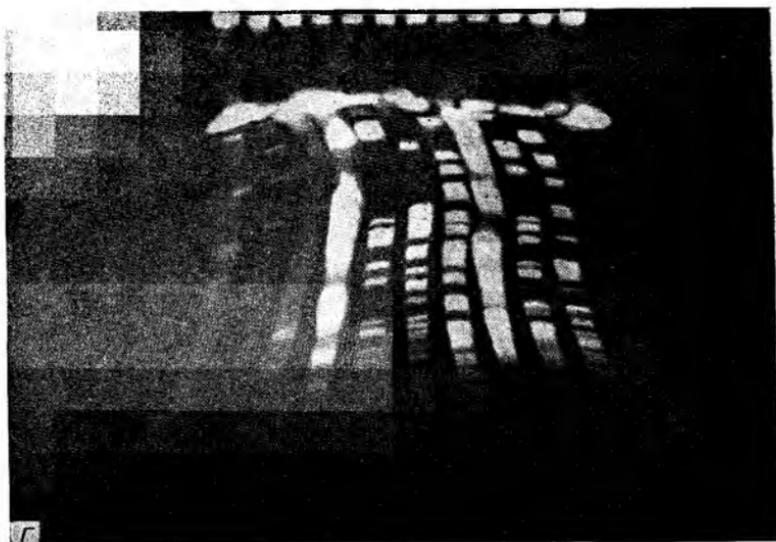
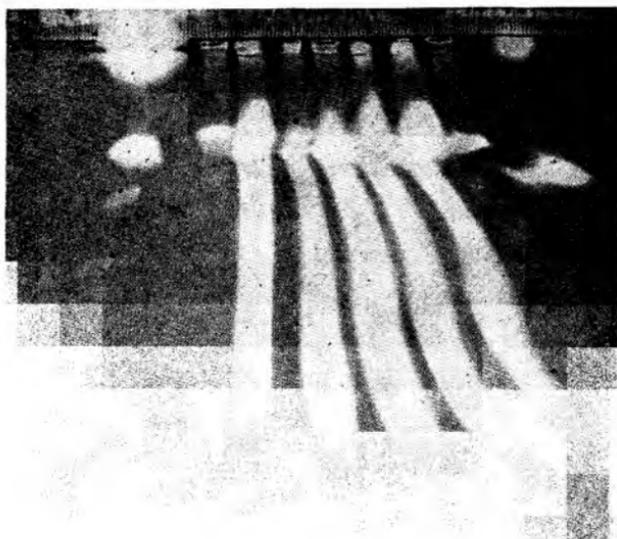
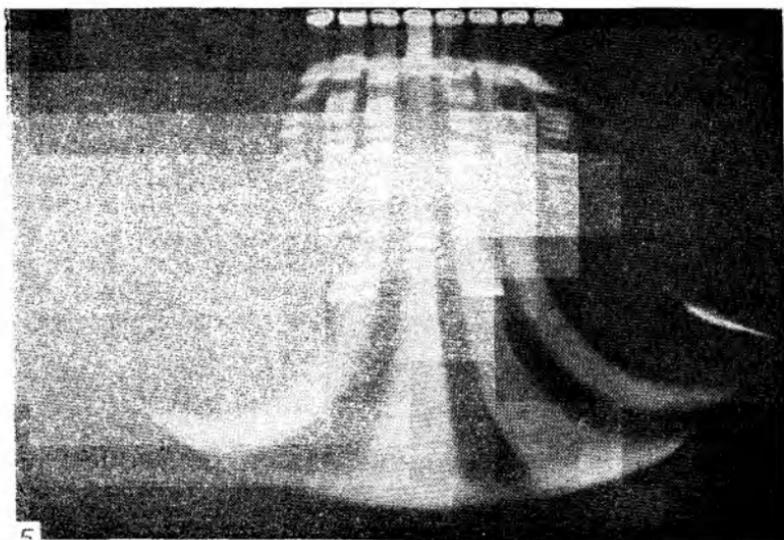


Рис. П.1. Пример перегрузки геля. Качество стандартных образцов удовлетворительно. Однако большинство дорожек с образцами из клеток млекопитающих (А—В) и бактерий (Г) перегружено.



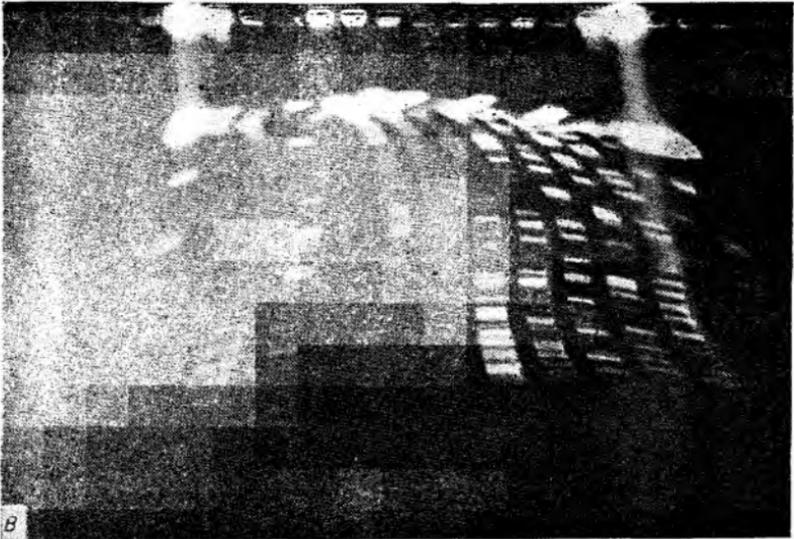
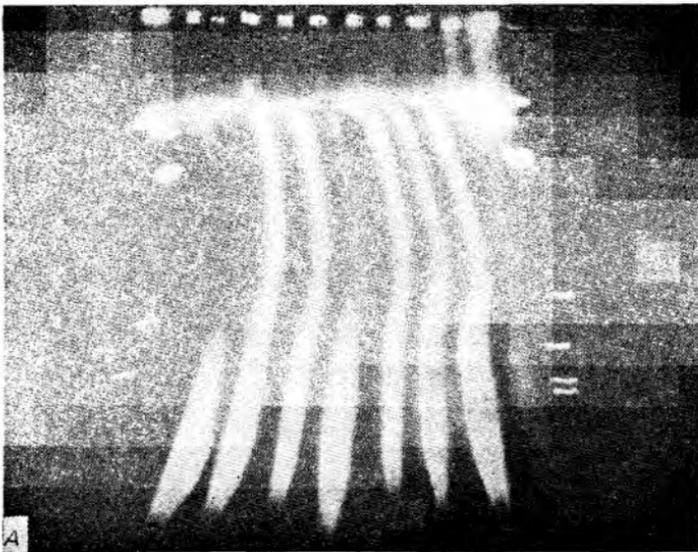
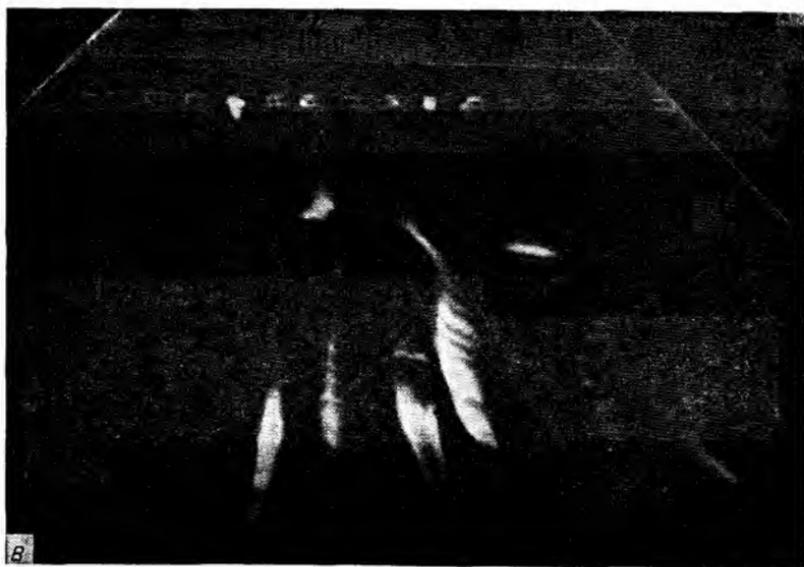
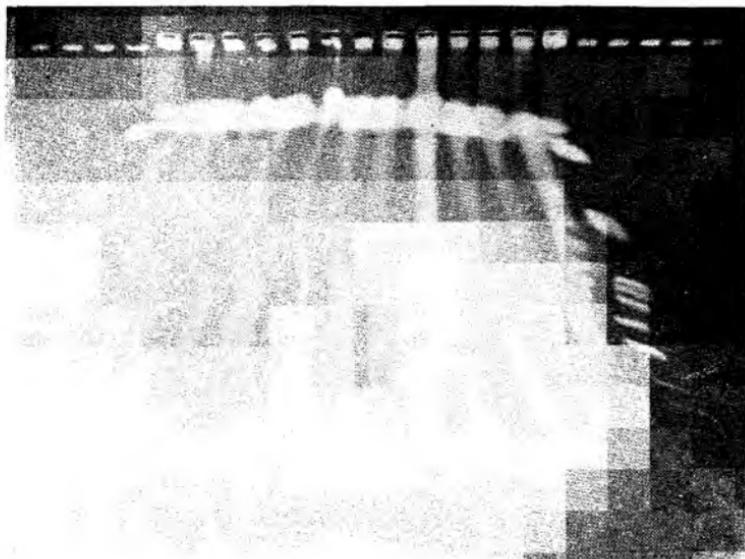


Рис. П.2. Пример неправильного приготовления образцов. А. Некоторые образцы бактериальной ДНК загрязнены белками. Б. Диффундирующий материал, вероятно белок, не отдиализован из образцов ДНК *S. cerevisiae*. В. Рестрикция бактериальной ДНК проведена не полностью (либо из-за остаточной ферментативной активности протеиназы К, либо из-за малого времени инкубации образцов в растворе ESP перед рестриктивной обработкой).





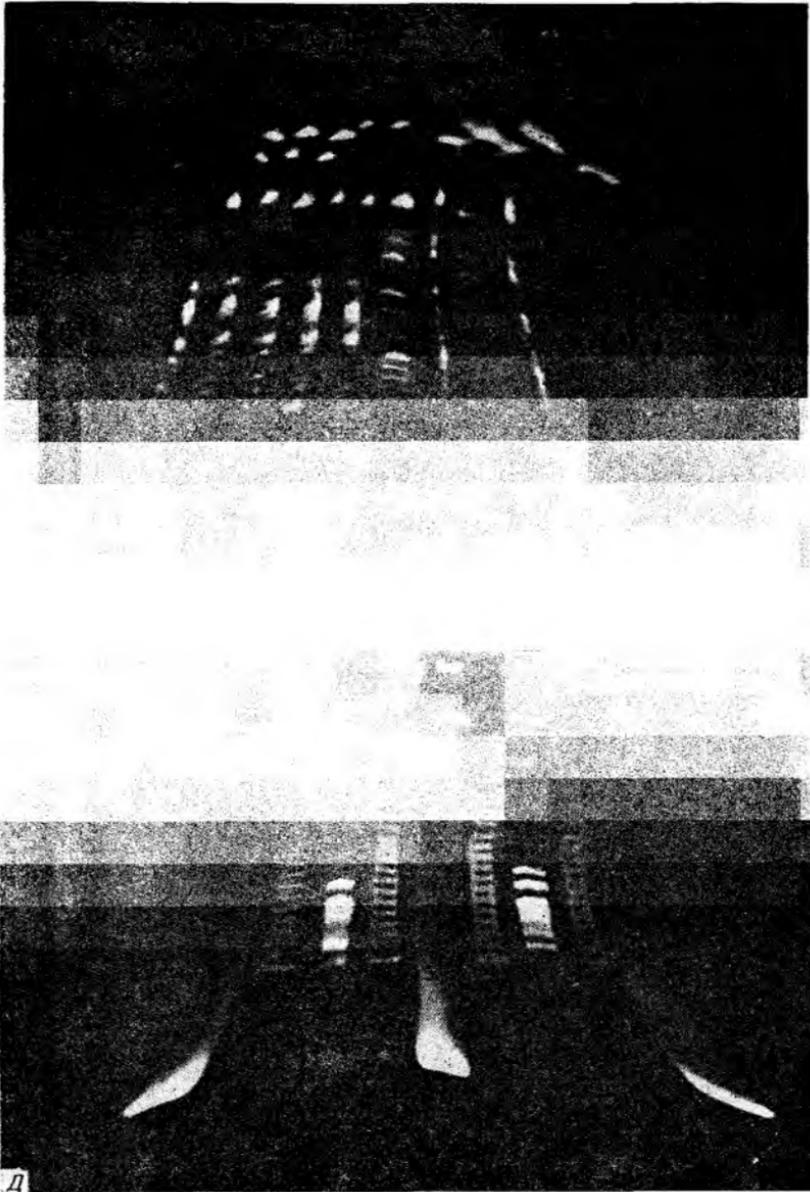
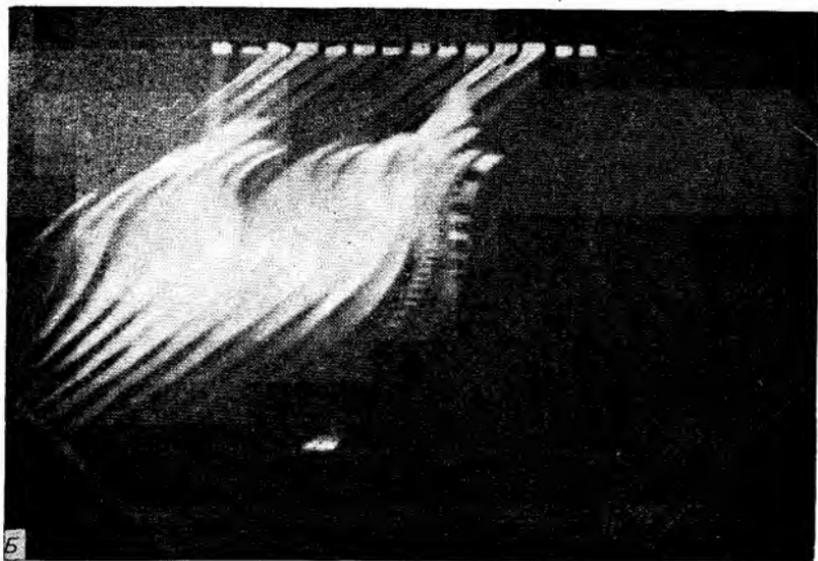
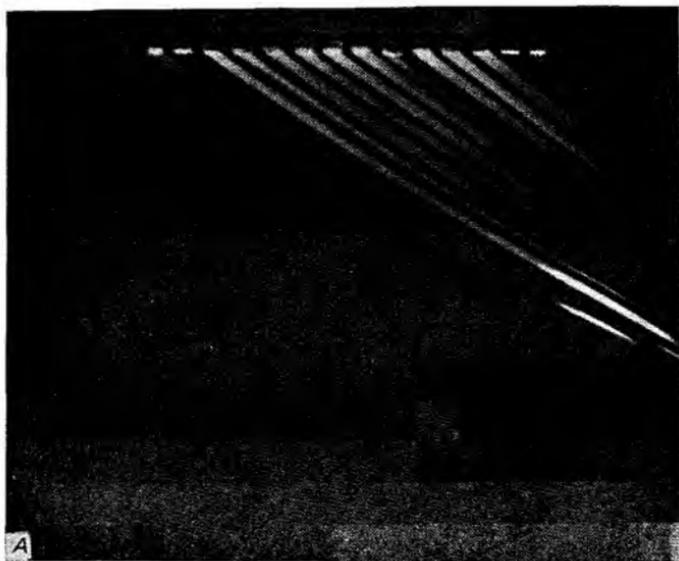


Рис. П.З. Пример неправильного нанесения образцов ДНК. А, Б. Некоторые (но не все) вставки с образцами ДНК не плотно контактируют со стенкой геля. В, Г. Все образцы бактериальной ДНК нанесены ровно. Д. Образцы бактериальной ДНК и ДНК фага λ нанесены правильно, а ДНК *S. cerevisiae* — неправильно.



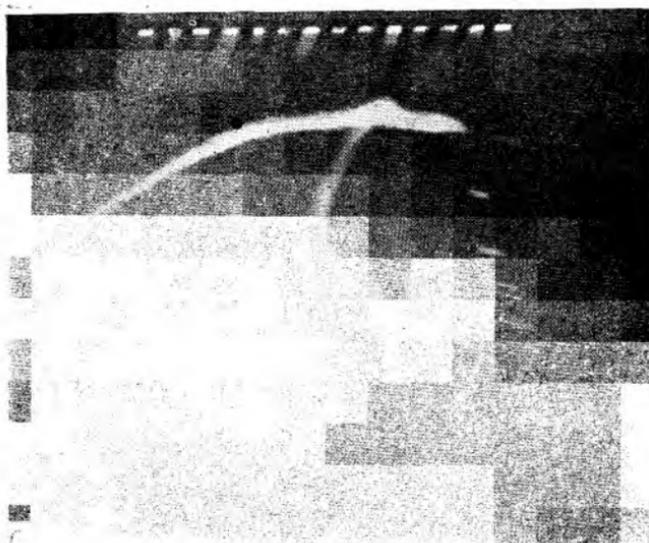
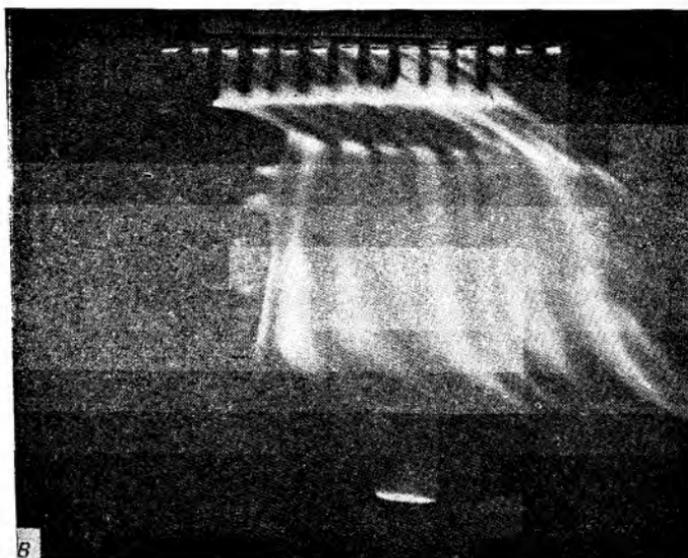
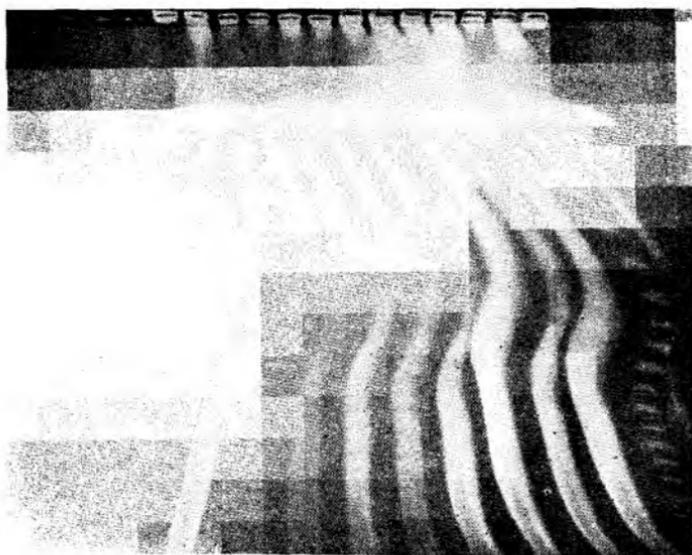




Рис. П.4. Пример неравномерного пульса. А. Нет чередования пульсов. Б, В. Анод перегорел во время фрезеза (Б, кроме того, — перегрузка образцов). Г, Д. Один из катодов не подсоединен.



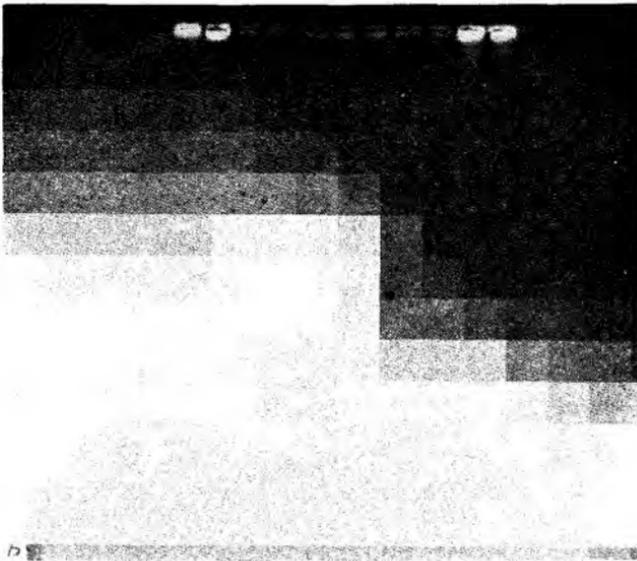
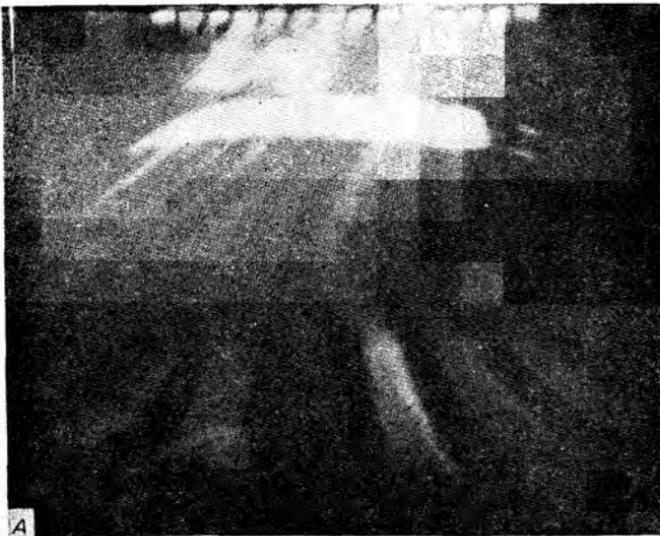


Рис. П.5. Пример неравномерного электрического поля в геле из-за негоризонтального расположения электрофоретического прибора. А. ДНК млекопитающих (некоторые треки сильно перегружены). Б. Образцы с бактериальной ДНК.



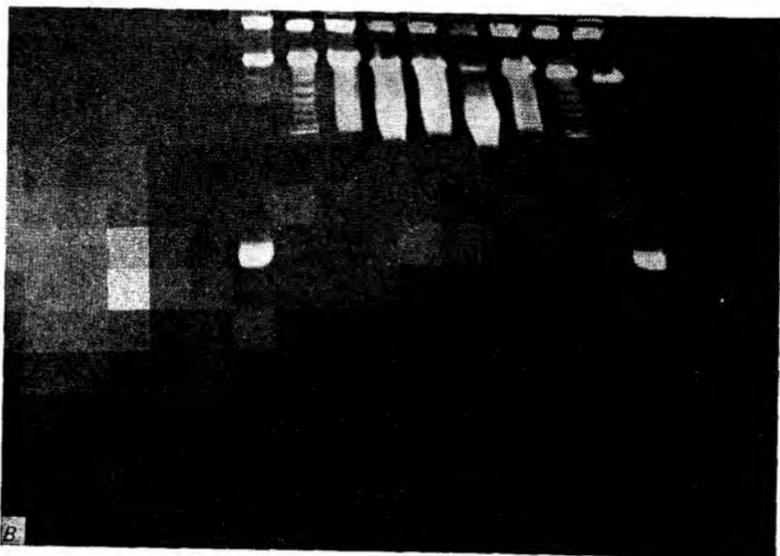
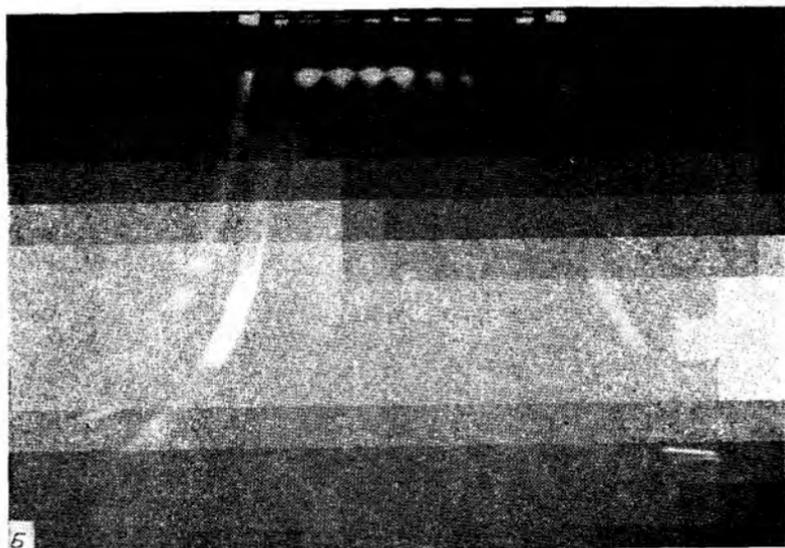


Рис. П.6. Пример недостаточного времени фореа. *А, Б.* Хотя время фореа выбрано правильно, образцы двигались существенно быстрее из-за перегрева геля, так как температура была выше обычной. *В.* Очень короткое время фореа.

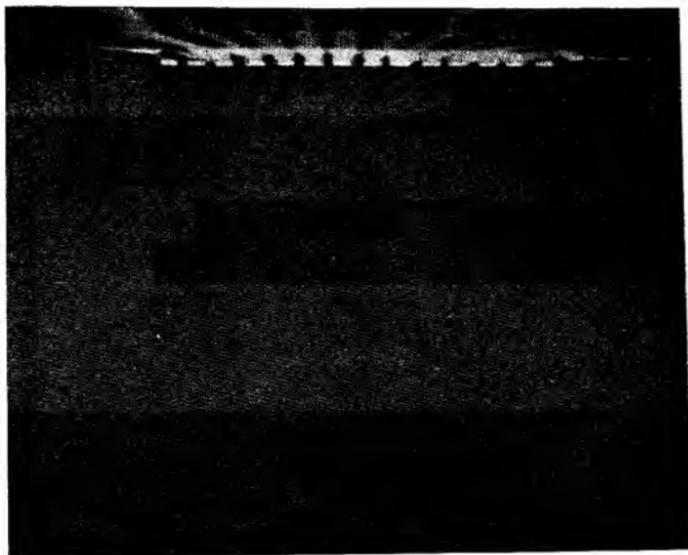


Рис. П.7. Тест для читателей: насколько хорошо понят прочитанный материал.

соответствующей рестриктазной обработки. Электрофорез проводили в стандартных условиях, используя время пульса 25 или 100 с.

Литература

1. *Schwartz D. C., Saffran W., Welsh J., Haas R., Goldenberg M., Cantor C. R.* (1983) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47, 18.
2. *Schwartz D. C., Cantor C. R.* (1984) Cell, 37, 76.
3. *Van der Ploeg L. H. T., Schwartz D. C., Cantor C. R., Borst P.* (1984) Cell, 37, 77.
4. *Smith C. L., Warburton P. E., Gaal A., Cantor C. R.* (1986) In: Genetic Engineering. Setlow J., Hollaender A. (eds), Plenum Press, New York, Vol. 8, p. 45.
5. *Smith C. L., Cantor C. R.* (1986) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51, 115.
6. *Smith C. L., Cantor C. R.* (1987) In: Methods in Enzymology. Wu R. (ed.), Academic Press, San Diego, Vol. 155, p. 449.
7. *Smith C. L., Lawrence S. K., Gillispie G. A., Cantor C. R., Weissman S. M., Collins F. S.* (1987) In: Methods in Enzymology. Gottesman M. (ed.), Academic Press, San Diego, Vol. 151, p. 461.
8. *Smith C. L., Econome J. G., Schutt A., Klico S., Cantor C. R.* (1987) Science, 236, 1448.
9. *Lawrence S. K., Smith C. L., Weissman S. M., Cantor C. R.* (1986) Science, 235, 1387.
10. *Cantor C. R., Mathew M. K., Smith C. L.* (1988) Annu. Rev. Biophys. Chem., 17, 287.
11. *Mathew M. K., Smith C. L., Cantor C. R.* (1988) Biochemistry, in press.

12. *Smith C. L., Cantor C. R.* (1987) *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 284.
13. *Cook P. R.* (1984) *EMBO J.*, **3**, 1837.
14. *Fairlamb A. H., Weisloge P. O., Hoeijmakers J. H. I., Borst P.* (1978) *J. Cell. Biol.*, **76**, 293.
15. *Smith C. L., Kolodner R.* (1988) *Genetics*, **119**, 227.
16. *Larsen A., Weintraub H.* (1982) *Cell*, **29**, 609.
17. *Mathew M. K., Smith C. L., Cantor C. R.* (1988) *Biochemistry*, in press.
18. *Cantor C. R., Gaal A., Smith C. L.* (1988) *Biochemistry*, in press.
19. *Rao R. V., Labie D., Krishnamoorthy R.* (1987) *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4355.
20. *Purrello M., Palazs I.* (1983) *Anal. Biochem.*, **128**, 393.
21. *Drum M. L., Smith C. L., Dean M., Cole J. L., Iannuzzi M. C., Collins F. S.* (1988) *Genomics*, in press.
22. *Feinberg A. P., Vogelstein B.* (1983) *Anal. Biochem.*, **132**, 6.
23. *Feinberg A. P., Vogelstein B.* (1983) *Anal. Biochem.*, **137**, 266.

ПРЫЖКИ ПО ХРОМОСОМЕ*Ф. Коллинз¹***1. Введение**

В последнее десятилетие мы стали свидетелями целой серии ошеломляющих успехов в области молекулярной биологии. Разработка надежных методов клонирования, секвенирования и анализа экспрессии эукариотических генов углубила наши представления о структуре и регуляции активности гена, сделала более понятными механизмы многих наследственных болезней человека. В это же время быстро развивались и достигли значительных успехов методы картирования человеческих генов. В сентябре 1987 г. в Париже состоялась конференция по проблеме картирования генома человека. На ней было доложено о локализации в общей сложности 1360 генов и сегментов ДНК в специфических участках хромосом. Процесс накопления данных в этой области носит лавинообразный характер. Заметим, однако, что при этом исследования по молекулярному клонированию и картированию с помощью анализа сцепления и методами генетики соматических клеток находятся на разных операционных уровнях (рис. 1).

До недавнего времени существовал некий «провал» в области размеров хромосомных сегментов от 100 до 5000 т. п. н.; для них не имелось адекватных методов исследования. Такое положение значительно усложняло интерпретацию данных по картированию, полученных методами генетики соматических клеток и с помощью генетического анализа. Сопряжение таких данных с информацией, полученной на молекулярном уровне, стали называть (может быть не совсем удачно) «обратной генетикой» [1, 2].

В последние годы было предложено несколько подходов, позволяющих вести исследования в этой новой области. В настоя-

¹ *F. S. Collins*. Division of Medical Genetics, The University of Michigan and The Howard Hughes Medical Institute, Ann Arbor, MI 48109, USA.

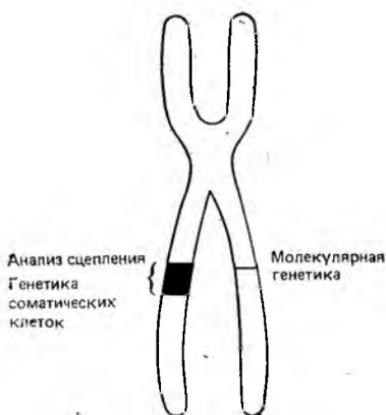


Рис. 1. Масштабы разрешения методов молекулярного клонирования и генетического картирования.

шей главе описан один из них — метод «прыжков по хромосоме» [3, 5]. С его помощью удастся клонировать последовательности ДНК, значительно удаленные на генетической карте от последовательностей, гомологичных используемому зонду. Излагаются методики создания библиотек «хромосомных прыжков» и клонов-связок [4, 5]. Обсуждены преимущества и недостатки описываемого метода. Разд. 6 посвящен его усовершенствованным модификациям. Возможно, внедрение таких модификаций расширит область применения метода.

2. Область применения метода

Рис. 2 дает представление о размерах хромосомных сегментов, в пределах которых «работают» различные современные методы генетических исследований. Ось ординат представляет собой логарифмическую шкалу физических расстояний, измеренных в парах (или в тысячах пар) нуклеотидов (п.н. или т.п.н.). На шкале приведены и значения генетических расстояний, измеряемые в сантиморганах (сМ). 1 сМ приблизительно равна 10^6 п.н. Однако это соотношение нельзя считать универсальным, ибо зависимость между генетическим и физическим расстоянием на хромосоме имеет нелинейный характер, на нее могут оказывать влияние «горячие точки» рекомбинации. Наличие таких областей может привести к ситуации, когда сравнительно большому генетическому расстоянию соответствует небольшой отрезок на физической карте. В то же время в геноме существуют участки, рекомбинация в которых маловероятна, а это приводит к обратной ситуации. Как показано на рис. 2, классические методы молекулярной генетики хорошо работают на последовательностях длиной до 50 т.п.н., что соответствует максимальному размеру вставки в космидный вектор. Участки большей длины можно клонировать путем «прогулки по хромосоме», когда, используя уже клонированные последовательности, геномную библиотеку скринируют с целью получения перекрывающихся клонов. Таким способом удастся анализировать последовательности длиной до нескольких сотен т.п.н. Однако, в

некоторых случаях эта процедура может занять очень много времени. Так будет, если какие-то участки практически не перекрываются из-за наличия протяженной области повторяющихся последовательностей или последовательностей ДНК, которые не удастся ввести в стандартные векторы. Если известно, что интересующий нас ген находится на расстоянии нескольких сотен т. п. н. от используемого клона, то применение метода «прогулки по хромосоме» весьма проблематично.

На противоположном конце спектра работают методы генетики соматических клеток, гибридизация *in situ*, анализ генетического сцепления; их разрешающая способность ограничена 1000—5000 т. п. н. И наконец, середине шкалы соответствуют три метода, позволяющие использовать данные картирования для поиска специфических молекулярных нарушений. Это пульс-электрофорез [6—11], «прыжки по хромосоме» [3—5] и клонирование в клетках дрожжей [12].

Важность этих подходов в том, что они дают ключ к пониманию молекулярных основ целого ряда генетических нарушений, для которых неизвестна функция кодирующих их генов. Известны наследственные болезни человека, связанные с аномалиями отдельных генов, такие, например, как муковисцидоз, болезнь Гентингтона, нейрофиброматоз. Наследование их происходит строго в соответствии с менделевскими правилами, они имеют четкие фенотипические характеристики, однако нормаль-

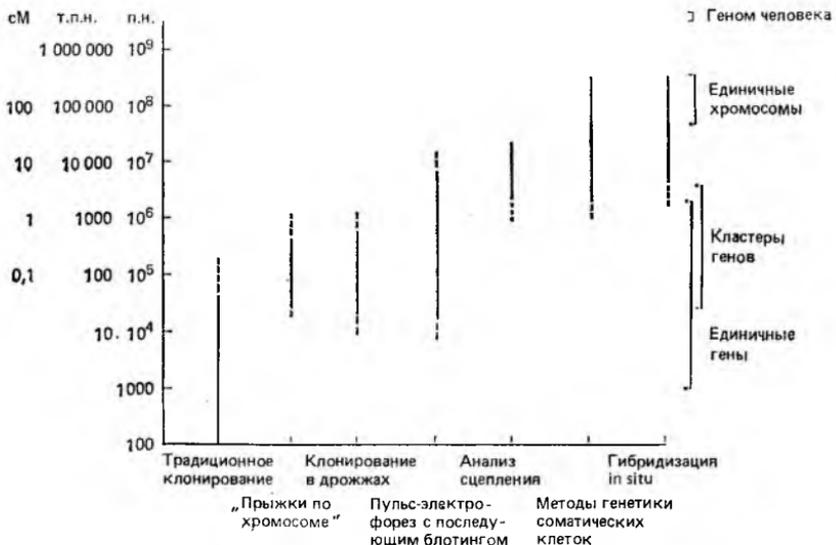


Рис. 2. Операционные уровни используемых в настоящее время методов. По вертикали отложены физические и генетические расстояния (в п. и., т. п. и. и в сМ соответственно) исходя из соотношения 1 сМ = 1000 т. п. н.

ные функции генов, кодирующих эти заболевания, не определены. Анализ сцепления с использованием полиморфных ДНК-маркеров (методы анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов — ПДРФ) позволил картировать соответствующие гены в специфических хромосомах человека [13, 14], что в свою очередь, значительно увеличило возможности пренатальной и пресимптоматической диагностики. Чтобы до конца разобраться в природе этих заболеваний и предложить адекватные методы их лечения, необходим молекулярно-биологический метод, работающий в области больших молекулярных размеров. Именно таким методом и являются «прыжки по хромосоме». Суть его и возможные области применения будут рассмотрены в последующих разделах.

3. Стандартные библиотеки «прыжков»

3.1. Типы «прыжков»

Следует разграничить понятия стандартных геномных библиотек для «прыжков по хромосоме» [3—5, 15] и специфических библиотек [4, 5, 16]. В первом случае библиотеки создаются таким образом, что начинать движение вдоль хромосомы отмеренными прыжками можно в принципе с любой точки генома. Специфические библиотеки состоят из клонов, позволяющих осуществлять прыжки от одного редко встречающегося сайта рестрикции, например *Not I*, к последующему такому же сайту. Типы прыжков схематически изображены на рис. 3. Очевидно, что

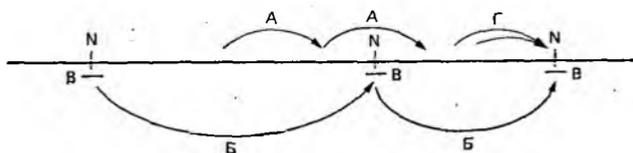


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая различные типы «прыжков по хромосоме». А — клоны стандартных библиотек, позволяющие осуществлять строго определенные прыжки, начиная от любой точки на хромосоме. Б — два клона специфических библиотек, в данном случае для фермента *Not I* (N). Они позволяют осуществлять прыжки от одного сайта этого фермента к ближайшему такому же сайту. В — клоны библиотек «связок», представляющие собой участки ДНК, которые включают редко встречающиеся сайты рестрикции, в данном случае *Not I*-сайты. Г — клоны стандартной библиотеки, позволяющие осуществлять прыжки от произвольной точки до ближайшего редкого сайта рестрикции, в данном случае тоже до *Not I*-сайта.

способы создания этих библиотек несколько различаются. С технической точки зрения труднее получать библиотеки первого типа, так как они должны содержать репрезентативную выбор-

ку последовательностей генома. Обычно для такой библиотеки требуется $1-3 \times 10^6$ клонов. Тогда можно быть твердо уверенным, что с ней можно работать, начиная от любой стартовой точки на хромосоме.

Для создания же полных специфических библиотек требуется всего лишь 10 000—20 000 клонов, так как количество независимых клонов эквивалентно числу рестрикционных фрагментов, полученных при использовании данного фермента рестрикции. Так например, для рестриктазы *Not I*, которая отщепляет приблизительно по 1000 т. п. н. в геноме человека, таких фрагментов должно быть всего лишь около 3000. Поэтому библиотеку из 10 000 клонов для прыжков по *Not I*-сайтам можно считать практически полной. Очевидным недостатком таких библиотек является то, что их нельзя использовать, когда стартовая точка прыжка не примыкает к редко встречающемуся сайту рестрикции. К сожалению, это довольно частое явление, препятствующее быстрому распространению данного метода. Если же все-таки удастся идентифицировать клон, примыкающий к редко встречающемуся сайту рестрикции, использование специфических библиотек для «прыжков по хромосоме» может оказать неоценимую помощь.

Очень эффективным могло бы оказаться создание геномной библиотеки третьего типа, имеющей в своем составе клоны, соединяющие редко встречающиеся сайты рестрикции с прилегающими случайными последовательностями ДНК генома. Имея такую библиотеку, мы могли бы начинать движение по хромосоме с любой стартовой точки, а при встрече с редким сайтом рестрикции пускать в ход специфическую геномную библиотеку. К сожалению, пока эта задача не решена и подходы к ее решению здесь обсуждаться не будут.

3.2. Принцип создания стандартных библиотек

Основная стратегия метода «прыжков по хромосоме» состоит в получении кольцевых формул очень крупных фрагментов ДНК путем лигирования их при большом разбавлении. Образование колец позволяет физически сблизить (соединить) участки ДНК, расположенные в геноме на значительном расстоянии друг от друга. Селективное клонирование таких соединенных фрагментов в стандартные векторы позволяет затем получить геномную библиотеку клонов-«прыжков». Эта стратегия применительно к стандартным библиотекам схематически изображена на рис. 4.

Прежде чем приступить к созданию библиотеки, следует ответить на несколько важных вопросов.

1. Какой размер прыжка желателен? Известно, что размер прыжка определяется размером частично гидролизованых

молекул ДНК. Как будет показано ниже, сложность построения библиотеки возрастает в степени $3/2$ с увеличением размера прыжка.

2. Какой использовать фермент? В идеальном случае хотелось бы иметь совершенно случайный набор фрагментов ДНК, чтобы была высокая вероятность того, что все геномные после-

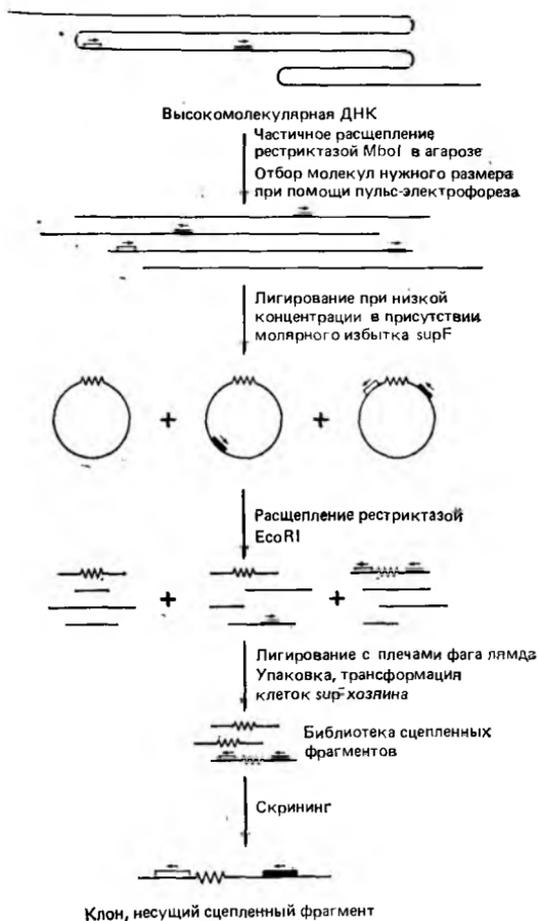


Рис. 4. Принцип создания стандартной библиотеки прыжков.

довательности будут представлены на концах клонов. На практике же [15] мы использовали *Mbo I* (или его изоэнзим *Sau 3A*), так как эти ферменты имеют сайты через каждые 25 п. н. Участки ДНК, лишённые таких сайтов, не будут, следовательно, представлены в библиотеке.

3. Какой источник ДНК использовать? Для оптимальной реализации библиотеки при наличии самых разнообразных стартовых зондов было бы предпочтительнее использовать источник ДНК, представляющей весь геном организма, например периферические лимфоциты донорской крови в случае геномных библиотек человека. Если же предполагается исследование специфической хромосомы, лучше работать с гибридными соматическими клетками, содержащими именно эту хромосому на известном фоне хромосом других видов. Преимущество такой стратегии в том, что она позволяет сразу определить принципиальную ценность клона, полученного при помощи имеющейся библиотеки, путем простой проверки клонированного фрагмента на его принадлежность интересующей хромосоме [17].

3.3. Получение ДНК-фрагментов желаемого размера

ДНК, подвергаемая частичному гидролизу, должна быть достаточно высокомолекулярной (>1000 т. п. н.). Методика приготовления образцов ДНК та же, что и для пульс-электрофореза [10, 11], с той лишь разницей, что количество ДНК рассчитывается для препаративных целей.

1. Исходя из того, что одна клетка млекопитающего содержит 6,7 пкг ДНК, необходимо вырастить их столько, чтобы получить достаточное количество ДНК. Обычно для создания библиотеки требуется 200 мкг ДНК, что соответствует приблизительно 3×10^7 клеткам. ДНК должна быть очень высокого качества, поэтому очень важно растить клетки в оптимальных условиях. Можно приготовить клетки и из периферической крови центрифугированием в смеси Ficoll-Нураце [18].
2. После сбора клеток аккуратно просчитайте их количество в гемоцитометре и суспендируйте в таком объеме фосфатно-солевого буфера (PBS), чтобы концентрация клеток составляла примерно 2×10^7 /мл. Затем суспензию быстро смешайте с равным объемом расплавленной 2%-ной низкоплавкой агарозы (Seaplaque, FMC) в 125 мМ ЭДТА при 40°C. Залейте в форму. Кроме стандартных ячеек форма должна иметь ячейки для блоков размером $2 \times 8 \times 135$ мм, которые служат для получения ДНК в препаративных количествах. Полезно приготовить 10—20 стандартных блоков с ДНК для тест-гидролизатов и два больших блока непосредственно для опытов.
3. Обработайте ДНК протеиназой К в присутствии больших количеств ЭДТА и N-лаурилсаркозина, как описано ранее [10, 11, 15].

4. Очищенную ДНК проверьте на нативность и на присутствие нуклеаз. Для этого инкубируйте половину содержимого блока при 37°C 3 ч с 10 мМ MgCl₂ и нанесите эту смесь, а также необработанную половину на OFAGE-гель [7] или на гель для электрофореза в инвертированном поле [8]. Определите размер ДНК. Необработанная ДНК должна практически полностью остаться в лунке, а в обработанном магнием препарате не должно быть низкомолекулярных примесей. Только в этом случае можно использовать препараты для «прыжков по хромосоме». Если же в препаратах, обработанных магнием, налицо признаки деградации, значит они загрязнены нуклеазами и надо повторить обработку протеиназой К. Как правило, этого бывает достаточно, чтобы избавиться от загрязнений.
5. Из некоторых источников ДНК постоянно выделяется с небольшим количеством низкомолекулярных примесей размером 50—100 т. п. н., видимо из мертвых клеток. Наиболее характерно это для лимфобластов. Такие деградировавшие молекулы ДНК могут сильно искажать результаты «прыжков по хромосоме», поэтому необходимо удалить их из агарозных блоков перед обработкой рестриктазами. Для этого блоки (как маленькие, так и большие) помещают в лунки OFAGE-геля и проводят пульс-электрофорез в течение 2—3 ч с интервалами между импульсами 20 с. Молекулы ДНК размером менее 100 т. п. н. выходят из блоков в гель, а высокомолекулярная ДНК остается практически без изменения. Блоки затем можно изъять из геля, получив, таким образом, высококачественный материал для дальнейшего исследования.
6. Проведите контрольную рестрикцию половинок агарозных блоков различными концентрациями *Mbo*I (1 ч при 37°C в микропробирках объемом 300 мкл со стандартным буфером для рестрикции, используя разные количества фермента: от 0,03 ед. до 0,15 ед.). Согласно данной методике, в каждой половине блока содержится примерно 3,3 мкг ДНК, следовательно, концентрация фермента составит от 0,01 ед./мкг до 0,045 ед./мкг. Остановите реакцию добавлением 10 мкл ЭДТА. Обработанные рестриктазой образцы поместите в гель и проведите пульс-электрофорез. Это поможет определить концентрацию фермента, оптимальную для получения фрагментов нужного размера (рис. 5). На рисунке наглядно продемонстрирована необходимость пре-электрофореза для удаления низкомолекулярных примесей ДНК перед обработкой рестриктазами.
7. При использовании больших агарозных блоков (для препаративных целей) пропорционально увеличьте количество

фермента, но так, чтобы концентрации фермента в ед./мкл и ДНК в мкг/мл остались прежними.

- Обработанные рестриктазой препаративные блоки поместите в гель и, используя соответствующие маркеры, проведите пульс-электрофорез с интервалами между импульсами, позволяющими хорошо отделить фрагменты нужной величины.

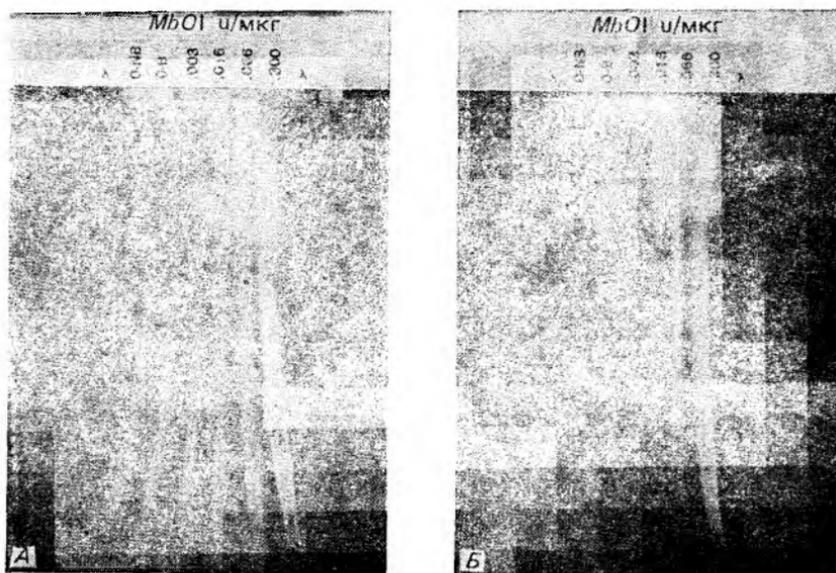


Рис. 5. Получение препаратов ДНК для «прыжков по хромосоме» путем частичного расщепления рестриктазой *MboI*. Показано влияние увеличивающихся количеств фермента на размеры получаемых молекул ДНК. *А* — результаты, полученные при непосредственном использовании агарозных блоков с ДНК. *Б* — препараты ДНК перед расщеплением рестриктазой *MboI* подвергнуты пре-электрофорезу для удаления молекул ДНК малого размера. Небольшие молекулы ДНК мешают конструированию библиотек прыжков и эффективно удаляются на этой стадии. В обоих случаях включены маркеры размера, представляющие собой мультимеры фага λ (размер генома 48,5 т. п. н.).

Если используется OFAGE-гель [7], маркеры следует наносить в середине и по обоим краям геля. Мы обнаружили, что для получения прямых полос молекул ДНК желаемых размеров лучше использовать CHEF-гели [9] и гель-электрофорез в инвертированном поле [8].

- Важно, чтобы ДНК, которую предстоит клонировать, не подвергалась ультрафиолетовому облучению. Поэтому отрежьте края геля, содержащие маркеры, а также небольшое количество рестрицированной геномной ДНК, окрасьте их бро-

мидом этидия и визуализируйте в ультрафиолете. По полученным данным определите участок геля с интересующей вас ДНК.

10. Вырежьте нужный участок геля. На этой и последующих стадиях важно использовать безнуклеазные реактивы и инструменты. Выделять ДНК из геля для получения кольцевой молекулы можно двумя способами. Нам представлялось удобным делать это методом электроэлюции. Поместите кусочек геля с ДНК в диализный мешок, залейте четырьмя объемами электрофорезного буфера ($0,5 \times \text{TBE}$), а затем поместите мешок в камеру для горизонтального электрофореза. Элюируйте ДНК из геля в течение двух часов $0,5 \times \text{TBE}$ -буфером при постоянном напряжении 100 В. Чтобы убедиться, что вся ДНК элюирована, можно вскрыть диализный мешок, достать гель и окрасить бромидом этидия. После удаления геля снова запечатайте диализный мешок и отдиализуйте ДНК против 10 мМ Трис, рН 7,4, 1 мМ ЭДТА (TE) с несколькими сменами буфера, подготовив таким образом препарат для лигирования.
11. Препаративные гели для определения размеров ДНК можно готовить из легкоплавкой агарозы. И тогда выделять ДНК из них можно, вырезая нужные участки и расплавляя их при 65°C . После того как гель расплавится, ДНК доводят до нужной концентрации и проводят лигирование в присутствии агарозы, которая не ингибирует эту реакцию. В настоящее время нет оснований предпочитать один метод другому. Важно лишь избегать операций, которые могли бы нарушить целостность молекул ДНК после извлечения их из геля. Нельзя центрифугировать, встряхивать, пипетировать препараты. И желательно как можно скорее приступить к их лигированию.

3.4. Циклизация

Успех или неудача «прыжков по хромосоме» в решающей степени определяются возможностью лигировать большие сегменты ДНК с образованием кольцевых молекул. Анализ стратегии этого метода, схематически изображенной на рис. 4, показывает, что тандемное лигирование молекул ДНК дает сцепленные фрагменты, соединяющие в себе две случайные последовательности. Такое сцепление приводит к образованию аномальных клонов, которые провоцируют «прыжки по хромосоме» из данной стартовой точки на какую-то случайную последовательность генома. Свести к минимуму риск возникновения такого события можно, проводя лигирование при достаточно низких кон-

центрациях ДНК так, чтобы на долю тандемных лигирований приходилось менее 5—10%.

Теория лигирования ДНК при низких концентрациях была разработана в 50-е годы Джекобсоном и Стокмайером [19]. Для некоторых размеров последовательностей ДНК теоретические прогнозы подтвердились экспериментально. Очень полезно, например, следующее соотношение:

$$j = \left(\frac{3}{2\pi lb} \right)^{3/2},$$

где j — концентрация молекул ДНК контурной длины l и сегментной длины b , при которой с равной вероятностью лигируются как разные молекулы, так и концы одной молекулы. Очевидно, что для эффективной циклизации лучше работать с концентрациями гораздо более низкими, чем j . Подставляя в уравнение известные параметры ДНК для водного раствора, его можно преобразовать следующим образом:

$$j = \frac{63,4}{(\text{т. п. н.})^{1/2}} \text{ мкг/мл},$$

где т. п. н. — длина ДНК в тысячах пар нуклеотидов [3]. При данной концентрации ДНК i — доля лигирований, приводящих к циклизации, составит $j/(i+j)$. Чтобы эта доля достигала 90%, работать следует с концентрацией ДНК, определяемой уравнением:

$$i_{90} = \frac{7,0}{(\text{т. п. н.})^{1/2}} \text{ мкг/мл}.$$

Обычно для получения $1-3 \times 10^6$ клонов в библиотеке, необходимо после расщепления циклизированных молекул ДНК иметь 0,5 мкг сцепленных фрагментов. Средний размер такого фрагмента 5 т. п. н., а это значит, что для осуществления прыжков в 100 т. п. н. необходимо иметь 10 мкг фракционированной по размеру ДНК; для прыжков в 200 т. п. н. — уже 20 мкг. На интенсивность лигирования влияют два фактора: 1) количество ДНК, необходимое для получения достаточного числа сцепленных фрагментов и создания геномной библиотеки. Это количество возрастает линейно с увеличением размера прыжка; 2) необходимость преимущественного получения циклизированных молекул. Интенсивность лигирования с циклизацией возрастает пропорционально квадратному корню длины молекул ДНК. Поэтому с увеличением размера прыжка объем лигазной смеси должен возрастать пропорционально $3/2$ степени длины молекулы ДНК. В табл. 1 приведены стандартные параметры для создания геномной библиотеки, рассчитанной на прыжки в 100 т. п. н. [20].

Очень важно маркировать в кольцевых молекулах места соединения фрагментов с тем, чтобы селективно клонировать их на последующих стадиях. В качестве селективного маркера мы использовали ген супрессорной тРНК — *supF* [3, 15], хотя возможны и другие способы селекции (см. ниже). Супрессорный ген должен иметь концы, комплементарные *MboI*-концевым фрагментам геномной ДНК. Для этой цели было взято несколько *supF*-генов с различающимися концевыми последовательностями

Таблица 1. Параметры библиотеки прыжков в 100 т. п. н.

Исходные количества высокомолекулярной геномной ДНК	100 мкг
Количество фракционированной по размеру ДНК	5 мкг
Размеры используемой ДНК	80—130 т. п. н.
Количество <i>supF</i> -ДНК с <i>Bam</i> HI-концами	2 мкг
Молярный избыток <i>supF</i> -ДНК (220 п. н.)	200 : 1
Объем смеси для лигирования	25 мл
Концентрация геномной ДНК	0,2 мкг/мл
Количество λ -вектора	150 мкг
Общее количество блюшек на <i>sup</i> ⁺ -газоне	4×10^8
Количество блюшек со вставками на <i>sup</i> ⁺ -газоне	5×10^7
Общее количество блюшек на <i>sup</i> ⁻ -газоне	2×10^6

ми, полученными при обработке рестриктазой *Bam*HI. Все они представлены на рис. 6. Наличие в концевых последовательностях дополнительных сайтов рестрикции, внутренних по отношению к *Bam*HI-сайту, очень полезно для последующего анализа клонов.

Ниже представлена методика реакции циклизации.

1. Используя приведенные выше уравнения, растворите ДНК и доведите раствор до нужной концентрации в 50 мМ Трис, рН 7,4, 1 мМ ЭДТА.
2. Добавьте 100- или 500-кратный молярный избыток ДНК *Bam*HI-фрагментов *supF*, предварительно проверенных на эффективность лигирования. Для этого проведите самолигирование и последующий анализ геля. По нашему мнению, наиболее удобно получать фрагменты генов *supF* электрофорезом с последующей электроэлюцией. Важно, чтобы фрагмент был максимально очищен от плазмиды, поскольку даже незначительные количества ее могут проявиться в окончательной библиотеке в виде клонов, гибридизующихся с зондом, несущим плазмиду. Оставьте смесь *supF* ДНК с геномной ДНК на полчаса.
3. Доведите концентрацию магния до 10 мМ и оставьте смесь еще на 10 мин, чтобы установилось равновесие. Затем добавьте ДНК-лигазу бактериофага T4 до конечной концентра-

ции 1—2 ед./мкл. Лигируйте 12 ч при 14°C, затем добавьте вторую порцию лигазы и лигируйте еще 12 ч.

- Осадите циклизовавшуюся ДНК этанолом, добавив 20 мкг дрожжевой тРНК-носителя. Отцентрифугируйте осадок при 23 000 об/мин в роторе SW27. Ресуспенсируйте осадок в 100 мкл ТЕ и инактивируйте все нелигировавшиеся концы, либо обработав их щелочной фосфатазой, либо добавив фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы I. Эта стадия очень важна, так как, если лигирование при низких концентрациях произ-

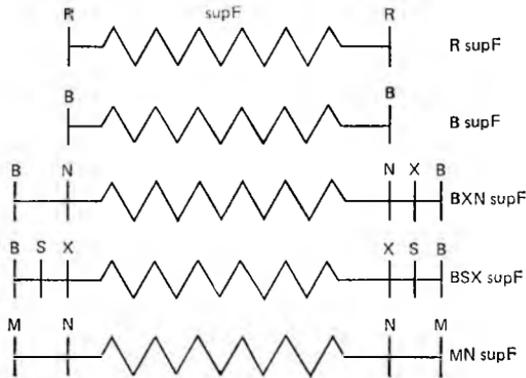


Рис. 6. Гены супрессорных тРНК (*supF*-гены), полученные для использования в качестве селективных маркеров при конструировании библиотек прыжков и библиотек клонов-связок. Для увеличения эффективности использования к концам *supF*-гена, имеющего длину 200 п. н., присоединяли разные сайты. Первым был получен ген *supF*, фланкированный *EcoRI*-сайтами [12]. Остальные гены были сконструированы с использованием других линкеров. R — *EcoRI*, B — *BamHI*, X — *XhoI*, N — *NotI*, S — *SfiI*, M — *MluI*.

ходит не полностью, свободные фрагменты могут аномально лигироваться с вектором (см. разд. 3.5). Экстрагируйте ДНК фенолом, осадите и, растворив, снова обработайте *EcoRI*.

- Для контроля очень полезно на каждой стадии отбирать небольшие аликвоты (2—5% объема) и подвергать их электрофорезу в 1,4%-ном агарозном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозу или полиамид и блот-гибридизацией с *supF*-геном. В случае успешной реакции циклического лигирования ДНК гена *supF* будет давать полосы в виде лестницы, и небольшое ее количество должно оказаться в той зоне геля, которая соответствует высокомолекулярной ДНК (что свидетельствовало бы о реакции лигирования с геномной ДНК). После обработки рестриктазой *EcoRI* лесенка *supF*-гена должна остаться, а полосы из высокомолекулярной области должны расщепиться на множество фрагментов размером от 1 до 20 т. п. н.

6. ДНК, обработанную *EcoRI*, экстрагируйте фенолом и осадите этанолом.

3.5. Клонирование и скрининг

На этой стадии обработанные *EcoRI* кольцевые молекулы геномной ДНК уже можно лигировать и производить селекцию сцепленных фрагментов. Для селекции геномные фрагменты встраивают в фаговый вектор, несущий амбер-мутации по крайней мере двух генов белковой оболочки, упаковывают фаговую ДНК *in vitro* и инфицируют клетки бактерии-хозяина, лишённые функции *supF*. Формировать бляшки на таком газоне могут только те фаговые частицы, геномы которых содержат собственные *supF*-гены.

Теоретически подходит любой фаговый вектор, несущий амбер-мутации и *EcoRI*-клонировующий сайт. Желательно, конечно, чтобы этот вектор обеспечивал максимальную клонирующую емкость (во избежание дискриминации относительно больших *EcoRI*-фрагментов). Идеальной можно считать ситуацию, когда кольцевые геномные фрагменты расщеплялись бы лишь частично мелкощепляющим ферментом, а затем лигировались в вектор большой емкости, чтобы не было дискриминации фрагментов, обусловленной расположением сайтов рестрикции. Однако обязательные потери, происходящие при частичном расщеплении, оказываются препятствием на пути создания полной библиотеки. Имеющиеся у нас в настоящее время стандартные геномные библиотеки для «прыжков по хромосоме» были получены в результате полного расщепления кольцевых геномных фрагментов рестриктазой *EcoRI*. Можно использовать и другие ферменты, для которых имеются амбер-мутантные фаговые клонирующие векторы, такие, например, как *HindIII*. Полезным дополнением к описанным здесь *EcoRI/MboI*-библиотекам являются, как будет указано ниже, библиотеки *HindIII/MboI*.

При работе мы обнаружили, что использование вектора Харон 3А, модифицированного в лаборатории Фредерика Блатнера так, что он способен нести минимальную клонируемую вставку в *EcoRI*-сайте, оказалось гораздо более эффективным, чем любого другого такого вектора, включая Харон 16А. На рис. 7 представлена карта этого модифицированного вектора, который называется λ Ch Δ lac. Размер его генома 38,5 т. п. н., он быстро растет, дает высокий урожай и может принимать вставки от 0 до 12 т. п. н.

Ниже приводится методика создания геномной библиотеки.

1. Экстрагируйте фенолом и пересадите обработанную *EcoRI* геномную ДНК, ресуспендируя ее в минимальном объеме.
2. Обработайте вектор рестриктазой *EcoRI* и удалите фермент

фенольной экстракцией и пересаживанием ДНК. Полноту расщепления вектора ферментом *EcoRI* и способность *EcoRI*-сайтов к лигированию следует проверять повторным лигированием небольших его количеств, а также сравнением эффективности упаковки ДНК в необработанном векторе, векторе,

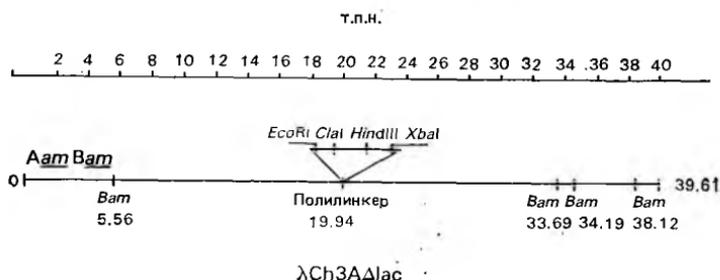


Рис. 7. Рестрикционная карта вектора λCh3AΔlac. Вектор был получен в лаборатории Фредерика Блатнера путем замещения фрагмента *EcoRI* — *Bam*HI длиной 8,6 т. п. н. в векторе λCh3A на *EcoRI* — *Bgl*III-полилинкерный фрагмент из мини-плазмиды pVX. Полученный вектор имеет размер генома 39,6 т. п. н. и может использоваться для клонирования *EcoRI*-фрагментов размером от 0 до 12 т. п. н.

обработанном рестриктазой *EcoRI*, а также в обработанном *EcoRI* и повторно лигированном векторе.

3. Лигируйте геномную вставку с молярным избытком вектора (4:1), чтобы уменьшить число клонов со множественными вставками. Эти клоны, в принципе, не мешают в работе, так как легко выявляются благодаря такому отличительному признаку, как наличие в них двух *EcoRI*-фрагментов.
4. Проведите пробную реакцию упаковки с 0,25 мкг лигированного материала. Из-за больших количеств вектора, который надо лигировать для последующего создания геномной библиотеки (см. табл. 1), использовать коммерческие экстракты для упаковки нецелесообразно. Мы работаем со стандартным двухкомпонентным экстрактом [22]. Чтобы обеспечить эффективность упаковки, достаточную для создания полной геномной библиотеки «прыжков по хромосоме», нужно иметь экстракты, осуществляющие контрольную упаковку ДНК фага дикого типа с эффективностью $3-4 \times 10^8$ б. о. е./мкг ДНК.
5. Если эффективность близка к желаемому уровню, но все же недостаточно высока, ее можно увеличить в 3 раза, добавив к упаковочной смеси грубый препарат λ-терминазы. Терминаза представляет собой фаговый белок, который расщепляет лигированную ДНК в *cos*-сайте после упаковки ее в головке фага. Как правило, именно терминаза является фактором,

лимитирующим эффективностью упаковки в экстрактах, приготовленных по приведенной выше методике. Грубый препарат этого фермента можно легко получить из штамма AZ1069, выделенного Муриальдо. Соответствующий ген в его клетках находится на селективируемой плазмиде под контролем терм-индуцибельной системы экспрессии [23]. Повышение температуры культивирования в определенный момент логарифмической фазы роста бактерий приводит к образованию больших количеств терминазы, которую легко выделить с помощью ультразвуковой обработки культуры. Активность терминазы можно проверить, инкубируя ее с космидой и наблюдая ее линейаризацию по *cos*-сайту. Мы обнаружили, что добавление одного объема грубого препарата терминазы на каждый объем озвученного упаковочного экстракта (SE) приводит к почти трехкратному увеличению эффективности упаковки лигированной ДНК. Важно уяснить себе, что в контрольной λ -ДНК увеличения эффективности не будет, так как в этих препаратах фага *cos*-сайты не лигированы и не требуют терминазы для нормальной упаковки. Терминазу добавляют после SE, а затем с 15-минутным интервалом добавляют FTL (лизат, прошедший процедуру замораживания—оттаивания) в стандартных количествах.

6. После упаковки трансформируйте этим препаратом клетки *supF*⁺-штамма (хорошо подходит для этой цели LF392) и *supF*⁻-штамма (лучше всего MC1061). За основу для расчетов возьмите цифры из табл. 1. Заметьте, бляшки на газоне MC1061 могут давать только рекомбинантные фаговые частицы, несущие *supF*. Но для создания полной геномной библиотеки лигировать и упаковывать необходимо и все остальные фрагменты генома. А для этого, в свою очередь, нужны большие количества вектора и экстракта для упаковки.
7. Пропорционально увеличьте объем реакционной смеси для упаковки. Путем контрольных высевов определите максимальное количество упакованного материала, которым можно инфицировать бактерии без ущерба для эффективности процесса. В дальнейшем выращивайте рекомбинантные бактериофаги для библиотеки на 150-мм чашках, исходя из полученного значения плотности (или 40 000 фаговых частиц на чашку) и используя в качестве бактерии-хозяина штамм MC1061. Библиотеку затем можно скринировать или амплифицировать стандартным способом для последующего повторного скрининга.
8. Проведите скрининг библиотеки стандартным методом. Целесообразно провести скрининг примерно 20 000 клонов, используя в качестве зонда рBR322, чтобы определить, не содержат ли некоторые бляшки примесей плазмидных последователь-

ностей, загрязняющих зачастую препараты гена *supF*. Если такие клоны имеются, то все зонды, используемые для скрининга данной библиотеки, необходимо тщательно очистить при помощи электрофореза, чтобы не путать истинные клоны *supF* с клонами, несущими плазмиду.

9. Скрининг можно эффективно производить, используя одновременно несколько зондов. Однако необходимо обязательно ставить позитивный контроль на каждый зонд. В идеальном случае это должен быть фаг, содержащий зонд как часть вставки, который можно высевать при низкой плотности так, чтобы визуально оценивать интенсивность возникновения ожидаемых клонов. Необходимо также иметь негативный контроль (вектор λ со вставкой pBR322), чтобы выявить потенциальные ложнопозитивные клоны. Важность контролей (и негативных, и позитивных) нельзя недооценивать; они должны использоваться и при вторичных, и при третичных скринингах по мере очистки блюшек.

3.6. Анализ клонов

После очистки блюшек можно приготовить минилизат ДНК из клонов, руководствуясь любой стандартной методикой. Использование на этой стадии в качестве газона LE392 позволяет получить несколько больший выход фаговой ДНК, чем при посеве на MC1061. Обработка рестриктазой *EcoRI* позволит определить размер инсерционного фрагмента. Если в данном клоне имеется более одного *EcoRI*-фрагмента, это значит, что при клонировании в один вектор были лигированы две вставки. В таком случае следует провести блот-гибридизацию данного клона с исходным зондом и с *supF*, чтобы определить, находятся ли эти вставки в одном *EcoRI*-фрагменте или в разных. В первом случае с клоном можно продолжать работать дальше традиционными методами; во втором случае он не представляет ценности для дальнейших исследований.

EcoRI-фрагмент полезно переклонировать в плазмиду, чтобы упростить работу по его изучению. Субклоны можно легко идентифицировать, благодаря наличию *supF*-маркера (рис. 8). Рестрицированный минилизат ДНК можно лигировать в pBR322, предварительно обработанную *EcoRI* и фосфатазой, и полученной рекомбинантной ДНК трансформировать штамм бактериального хозяина, несущий какую-либо амбер-мутацию в *lacZ*, например CARD-15 (Р. Дан, частное сообщение). Высев культуры на агар Мак-Конки с ампициллином позволяет практически сразу выявить интересующие колонии, так как они способны сбрасывать лактозу и окрашены в пурпурный цвет в отличие от остальных, имеющих розовую окраску.

Для того чтобы разделить стартовую и конечную точки прыжка, очень полезно использовать присутствие *AvaI*-сайта в центре гена *supF* [24]. Особенно эффективно это в том случае, когда имеющийся в рBR322 сайт *AvaI* элиминирован. Мы добивались этого, проводя последовательно обработку плазмиды рестриктазой *AvaI*, дотраивание фрагментом Клёнова и повторное лиги-

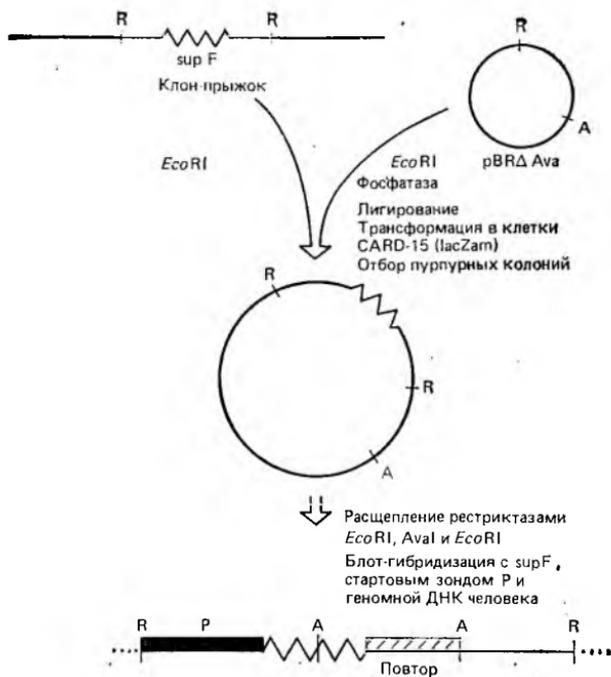


Рис. 8. Схема быстрого переклоинирования вставок из фаговых клонов в рBRΔ*AvaI*. R — *EcoRI*, A — *AvaI*.

рование. Отделить половины клонированного фрагмента можно, обрабатывая субклоны *EcoRI*, *AvaI* и обеими рестриктазами одновременно. *AvaI*-сайты встречаются иногда в геномных последовательностях, что несколько затрудняет составление карты. Однако при помощи блот-гибридизации рестрицированных субклонов с исходным зондом, *supF* и геномной ДНК человека, позволяющей локализовать повторы, обычно легко удается построить рестрикционную карту и идентифицировать уникальные последовательности. А это, в свою очередь, позволяет определить, является ли данный прыжок эффективным. Результаты блот-гибридизации представляют особый интерес, так как с их помощью удастся идентифицировать ближайшие к супрессорному гену фрагменты.

В случае же использования *supF*-гена с дополнительными вставками редко встречающихся сайтов рестрикции (см. рис. 6) разделение половинок фрагмента, составляющего прыжок, упрощается, и зонды можно получать непосредственно из минилизата фаговой ДНК. После того как установлено, что фрагмент-«прыжок» представлен в геноме единичной копией, надо провести его гибридизацию с блотом геномной ДНК из гибридных соматических клеток, чтобы убедиться, что прыжок осуществлен в пределах нужной хромосомы. Это очень важный момент, так как при создании геномной библиотеки всегда существует опасность нециклического лигирования.

3.7. Последовательные «прыжки»

Согласно стратегии лигирования, представленной на рис. 4, по концам клона-прыжка обычно имеются участки длиной 300—5000 п. н. в геноме, примыкающие к *EcoRI*-сайту. Из рис. 9 видно, что если использовать клонированный фрагмент в качестве зонда для возвращения к исходной библиотеке, то весьма вероятно, что при помощи полученных клонов преимущественно будет осуществляться движение вдоль хромосомы не вперед, а назад,

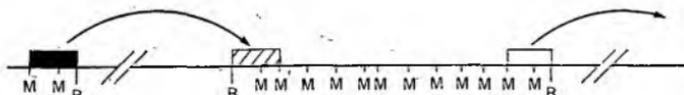


Рис. 9. Последовательность прыжков в стандартной библиотеке. Чтобы определенная последовательность оказалась представленной в библиотеке, конструируемой, как показано на рис. 4, она должна находиться в *EcoRI* — *MboI*-фрагменте. При использовании клонированного фрагмента (заштрихованный прямоугольник) для повторного скрининга библиотеки, прыжок, по всей вероятности, произойдет в обратном направлении, к исходной точке (к черному прямоугольнику). Чтобы продолжать двигаться в первоначальном направлении, лучше использовать зонд, находящийся на дальнем конце *EcoRI*-фрагмента (белый прямоугольник). R — *EcoRI*, M — *MboI*.

к стартовому зонду. Преодолеть эту трудность можно двумя способами: можно использовать библиотеку, полученную с помощью другой рестриктазы, например *HindIII*. Как отмечалось выше, попеременное использование библиотек *EcoRI/MboI* и *HindIII/MboI* с большей вероятностью позволяет продвигаться вдоль хромосомы в том же направлении. Кроме того, имеет смысл использовать фрагмент-«прыжок» из стандартной λ -библиотеки, чтобы выявить геномную последовательность большего размера и, таким образом, осуществить некоторую «прогулку после прыжка», прежде чем начинать новый прыжок. При этом в наших руках окажется большее количество зондов для скрининга биб-

лиотеки прыжков, и, кроме того, в нашем распоряжении будут более крупные последовательности для выявления полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Последний момент очень важен и часто является составной частью методики прыжков, так как всегда желательно проверить, не произошел ли кроссинговер между исходным зондом и последовательностью-мишенью.

4. Специфические библиотеки «прыжков»

4.1. Принцип метода

Как показано на рис. 3 и описано в разд. 3.1, специфические библиотеки «прыжков» создаются так, чтобы можно было осуществить прыжок с данного редко встречающегося рестрикционного сайта к ближайшему сайту той же редкощепящей рестриктазы. Основной принцип — циклизация очень больших молекул ДНК — одинаков для обеих библиотек. Но в данном случае первую обработку рестриктазой проводят полностью, используя редкощепящий фермент, и не отбирают фрагменты определенного размера. Преимущество такой библиотеки, как уже подчеркивалось, состоит в том, что для получения репрезентативного набора всех возможных для данной рестриктазы фрагментов требуется гораздо меньшее количество клонов. Очевидный недостаток ее — требование начинать прыжки из точки, находящейся недалеко от одного из специфических редких сайтов.

4.2. Методика создания библиотеки

Этапы работы аналогичны тем, которые подробно описаны для стандартной геномной библиотеки. Здесь мы отметим лишь различия. Хотя речь в этом разделе идет о конструировании с помощью рестриктазы *NotI*, данные, приведенные здесь, легко обобщить для специфических библиотек, получаемых на основе других редкощепящих ферментов.

1. Поскольку для окончательной специфической библиотеки требуется меньше клонов, чем для стандартной, нет необходимости иметь изначально большие количества ДНК. Мы убедились на практике, что для обработки рестриктазами нужно иметь около 10 мкг ДНК, а в итоге (для лигирования и упаковки) достаточно лишь 1 мкг из этого количества. Первую обработку рестриктазами проводите с большим избытком фермента (10—20 ед./мкг), чтобы в библиотеке были представлены сайты, как правило не расщепляемые при работе с обычными концентрациями фермента. Следует обязательно проверить результаты расщепления, проведя пульс-электрофорез

небольшого количества ДНК, а также убедиться, что инкубируемая в этих же условиях, но без рестриктазы ДНК не деградирует сама по себе.

2. ДНК из агарозы извлеките плавлением или электроэлюцией, как описывалось ранее.
3. Гены супрессорной тРНК, вокруг которых идет формирование циклических молекул, должны, разумеется, иметь соответствующие липкие концы. Нами были получены фрагменты *supF*-генов с *NotI*- и *MluI*-концами. Поскольку выступающие концы *MluI* и *BssHII* идентичны, для создания специфической *BssHII*-библиотеки можно использовать *supF*-ген с *MluI*-концами. Возможно, трудно будет подобрать концентрацию *supF* для лигирования, так как размер имеющихся геномных фрагментов сильно варьирует [16]. Опыты с фракционированной по размерам ДНК показали, что добавление *supF* не влияет на ход реакции, если в реакционной среде имеется по меньшей мере его 100-кратный молярный избыток (Ф. Коллинз, неопубликованные данные). Поэтому для надежности следует добавить такое количество ДНК супрессорного гена, чтобы 100-кратный избыток его достигался из расчета, что все молекулы имеют длину 100 т. п. н. Достаточный избыток при этом гарантируется, так как используемые молекулы обычно значительно длиннее. Другой способ подобрать концентрацию — провести два циклических лигирования при двух концентрациях *supF*, требуемых для работы с молекулами длиной 100 и 1000 т. п. н. Такой подход использовал Пустка [16] при создании *NotI*-специфической библиотеки. Возможно, что в данном случае этот путь был действительно предпочтительным, так как они обрабатывали маркерный ген фосфатазой.
4. Подберите такую концентрацию ДНК для лигирования, чтобы даже при очень больших длинах молекул в реакционной смеси она была наиболее благоприятной для циклизации. Лучше всего работать с концентрациями примерно 0,1 мкг/мл. При таких значениях даже молекулы в 2000 т. п. н. имеют вероятность циклизации более 90%.
5. После осаждения повторно обработайте циклические молекулы геномной ДНК рестриктазой *EcoRI* и клонируйте полученные фрагменты в λ Ch3AΔI_{as}, как описано в разд. 3. Недостаток этого метода в том, что фрагменты-«прыжки», оказавшиеся частью *EcoRI*-фрагментов, длина которых больше 12 т. п. н., клонироваться не будут. Преодолеть эту трудность можно, если создать дополнительную библиотеку, в которой при последнем рестрицировании использовать другую рестриктазу, например *VamHI*. Полученные фрагменты следует затем клонировать в *VamHI*-векторе, имеющем амбер-мутации, например в λ Ch30A.

6. Проверьте эффективность *NotI*-библиотеки. Это несколько проще, так как у значимых клонов обе половинки, составляющие прыжок, должны происходить из одного и того же *NotI*-фрагмента. Целесообразно идентифицировать 5—10 клонов, содержащих вставки уникальных последовательностей, а затем проверить обе половинки каждого клона-«прыжка» путем блот-гибридизации с ДНК, фракционированной пульс-электрофорезом. Это даст представление о варьировании размеров прыжков, представленных в библиотеке, а также о доле значимых прыжков.

5. Библиотеки клонов-связок

5.1. Принцип конструирования

Как показано на рис. 3, библиотеки специфических прыжков наиболее функциональны в сочетании с библиотеками клонов-связок [4, 5]. Клоны-связки — это фрагменты ДНК, содержащие сайт редкощепящей рестриктазы. Такие клоны позволяют пересечь участок, где расположен сайт редкощепящей рестриктазы, и осуществить следующий прыжок. В принципе, библиотеки клонов-связок контролировать легче, так как нет необходимости работать с очень большими молекулами ДНК. Существует несколько способов селективного клонирования фрагментов геномной ДНК, несущих редко встречающийся сайт рестрикции, из которых мы приводим один из наиболее эффективных (рис. 10). Весь процесс зависит от стадии циклического лигирования отобранных по размеру фрагментов геномной ДНК длиной 15—20 т. п. н., частично расщепленных *MboI* и содержащих супрессорный ген. Циклические молекулы затем обрабатывают *NotI*; большинство из них не расщепится, но те, с которыми это произойдет, можно будет селективно клонировать в фаговый вектор с амбер-мутацией, способный включать вставки такого размера. Идеальным для этой цели является сконструированный недавно вектор λ Ch40A [25].

5.2. Методика получения *NotI*-библиотеки клонов-связок

1. Препарат ДНК можно приготовить любым стандартным методом и все операции проводить в растворе, так как необязательно работать с очень длинными молекулами. Проведите частичное расщепление ДНК рестриктазой *MboI* и фракционирование в градиенте плотности сахарозы точно так же, как и при создании библиотеки фаговой ДНК [24].
2. Приготовьте раствор фрагментов нужного размера (15—20 т. п. н.) с концентрацией, обеспечивающей циклизацию

(примерно 1 мкг/мл), и добавьте 200-кратный молярный избыток очищенного *supF*-гена с концами *Bam*HI. Проведите лигирование, как описано в разд. 3.

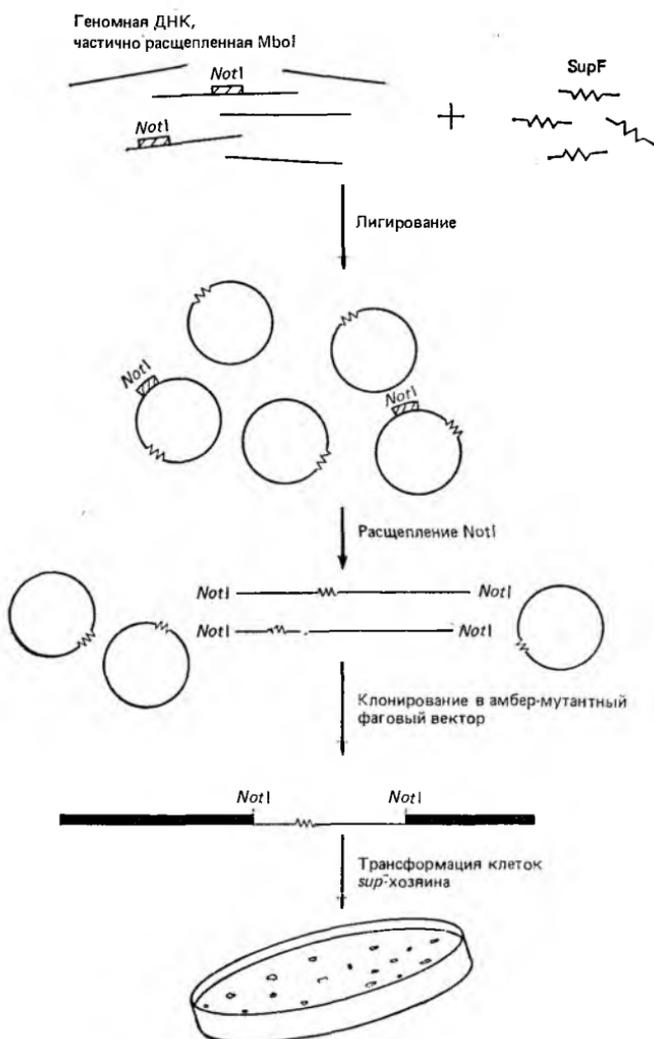


Рис. 10. Стратегия получения *NotI*-библиотеки клонов-связок. Бляшки образуют только те фрагменты, которые несут внутренний *NotI*-сайт.

3. Осадите циклические молекулы ДНК, а затем расщепите, обрабатывая большим избытком рестриктазы *NotI*. Желательно поставить контрольное расщепление небольшого количе-

ства препарата, к которому добавлена плаزمид, несущая *NotI*-сайт, с тем, чтобы убедиться, что расщепление не ингибируется.

4. Рестрицированную ДНК экстрагируйте фенолом и переосадите. Затем лигируйте ее с плечами λ -вектора. Поскольку большая часть геномной ДНК останется в виде циклических молекул, для создания десятикратного молярного избытка концевых фрагментов вектора по сравнению с клонируемой вставкой потребуется очень незначительное количество вектора.
5. Проведите упаковку ДНК и высейте фаг на газоне *sup*⁻-хозяина, например MS1061. Для более эффективного субклонирования вставок полезно использовать супрессорный ген, имеющий дополнительный сайт рестрикции редкоцепящей рестриктазы, внешний по отношению к сайту *Bam*HI. Это позволит субклонировать отдельно обе половинки сцепленного клона. Поэтому мы обычно использовали супрессорный ген, содержащий внешние по отношению к сайту *Bam*HI *Xho*I- и *Sfi*I-сайты (см. рис. 6).
6. Чтобы был представлен весь геном человека, как и в случае клонов-«прыжков», достаточно иметь всего около 10 000 *Not*I-сцепленных клонов.

5.3. Использование ДНК из сортированных хромосом

Библиотеки клонов-связок можно создавать из ДНК сортированных хромосом, хотя имеющееся при этом количество материала (обычно менее 1 мкг) не позволяет проводить этапы частичного расщепления и фракционирования. Однако клоны можно получать и из полностью расщепленной ДНК, как это показано на рис. 10, с той лишь разницей, что на начальной стадии проводят расщепление рестриктазами *Bam*HI и *Bgl*II. Используя такой подход, мы создали библиотеку в 5000 клонов из сортированных хромосом. В данном случае вектор должен обладать способностью включать небольшие вставки. С этой целью описанный выше вектор λ Ch3A Δ lac был модифицирован путем замены клонирующего *Eco*RI-сайта на сайт *Not*I.

6. Возможные усовершенствования

Приведенные здесь методики успешно применялись для создания стандартных библиотек прыжков в 100 и 200 т. п. н. [15, 17] и специфических библиотек, имеющих в своем составе клоны длиной до 800 т. п. н. [16]. Однако имеется целый ряд технических трудностей, ограничивающих использование этих методик для осуществления более дальних прыжков.

1. Объемы реакционной смеси в реакции циклического лигирования при создании стандартных библиотек прыжков составляют 25—100 мл, а это требует большого количества ДНК-лигазы.
2. Хотя из всей циклической молекулы клонировать желательно только область соединения концов, лигировать в λ -вектор и упаковывать перед проведением селекции по *supF* приходится и все остальные фрагменты. На практике это означает сотни микрограмм израсходованного вектора и миллилитры упаковочного экстракта.
3. Очень трудно подобрать такие условия, чтобы большинство циклических молекул включило хотя бы по одному *supF*-гену, особенно если размер молекул геномной ДНК сильно варьирует, как это бывает при конструировании библиотек прыжков с использованием редкощепящих рестриктаз.
4. Поскольку циклизация осуществляется за счет лигирования, необходимы ионы магния и, кроме того, требуется длительное время, чтобы могли встретиться соответствующие концы больших молекул геномной ДНК. В таких условиях даже мизерные количества нуклеазы могут быть губительны.

В настоящее время усилия по совершенствованию технологии конструирования библиотек прыжков направлены на преодоление именно этих трудностей. Схема одной из таких усовершенствованных методик представлена на рис. 11. Она касается в основном двух из указанных выше трудностей.

1. Добавление к концам больших молекул геномной ДНК линкеров («хвостов») позволяет осуществлять циклизацию в основном за счет отжига, а не лигирования. А это значит, что реакцию можно проводить в присутствии ЭДТА и тем самым избежать проблем с нуклеазами. Линкеры сконструированы таким образом, что они не комплементарны друг другу, но могут связываться при добавлении специального олигомера-«склещика», как мы его называем.
2. Последовательности «хвостов» и «склещиков» подобраны так, что при их отжиге получают две последовательности *lac*-оператора. Это позволяет отбирать соединенные фрагменты за счет взаимодействия *lac*-оператор—репрессор, т. е. обеспечивается скорее физическая, нежели биологическая селекция. В итоге становится возможным отбор нужных фрагментов перед клонированием и экономится таким образом большое количество вектора и экстракта для упаковки.

Еще одним прорабатываемым в настоящее время усовершенствованием является уменьшение эффективной контурной длины больших фрагментов геномной ДНК при помощи ДНК-связывающих белков. Ранее мы говорили о том, что уменьшение контурной длины ДНК позволило бы значительно расширить гра-

ницы применения метода и осуществлять все более дальние прыжки по геному (разд. 3.2). Традиционные методы, лишь незначительно уменьшающие контурную длину ДНК (такие, как изменение концентрации солей или использование полиаминов,

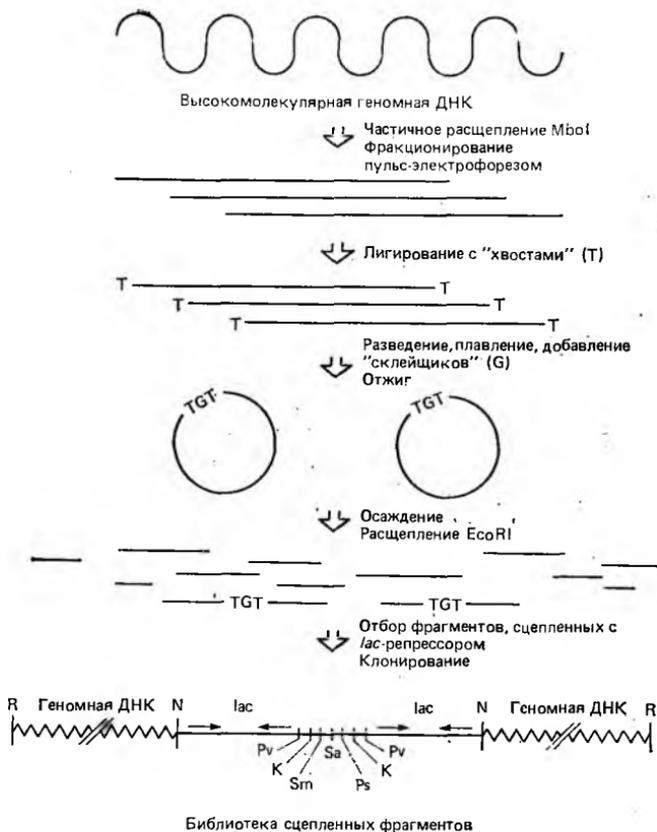


Рис. 11. Схема создания библиотеки прыжков с использованием системы *lac*-оператор—репрессор. «Хвосты» (Т) и «склеивщики» (G) подобраны таким образом, что при отжиге наряду со множеством сайтов рестрикции получаютcя два инвертированных повтора *lac*-оператора. N — *NotI*, Pv — *PvuI*, K — *KpnI*, Sm — *SmaI*, Sa — *SaI*, Ps — *PstI*, R — *EcoRI*.

например спермидина), не обладают достаточными преимуществами для широкого их использования. Все живые организмы, естественно, сталкиваются с одной и той же проблемой упаковки ДНК. Поэтому есть смысл использовать каким-то образом уже придуманные природой механизмы. Одна из таких возможностей — применение гистонов эукариот. Однако, следует учитывать, что репликация хроматина — процесс непростой; есть осно-

вания опасаться, что связывание с гистонами вблизи концов геномных фрагментов будет блокировать циклизацию. Еще одна возможность заключается в использовании HU-белка *Escherichia coli* [26], который тоже связывается с ДНК и уменьшает ее контурную длину в 5 раз. Получить HU-белок довольно просто. Правда, ДНК он связывает слабее, чем гистоны. При добавлении его в растворе устанавливается динамическое равновесие между связанной и не связанной ДНК, причем в любой данный момент времени связанной ДНК несравненно больше. Однако, слабое связывание может оказаться и не очень уж угрожающей помехой для циклизации. Все эти вопросы находятся в стадии экспериментальной разработки. В перспективе такой подход позволит работать с молекулами в 1000 т. п. н. также легко, как сейчас мы это умеем делать с молекулами в 200 т. п. н. Границы применения метода «прыжков по хромосоме», его возможности полностью раскроются только тогда, когда будут доработаны все предложенные модификации.

Благодарности

Я хотел бы поблагодарить Шермана Вейсмана, в лаборатории которого зародилась концепция метода «прыжков по хромосоме», за постоянный интерес к нашей работе и вклад в создание приведенных здесь методик. Большую помощь в их совершенствовании оказали сотрудники лаборатории Джеффри Коул, Митчелл Драм, Джейн Фаунтан, Майкл Яннусси, Джулия Ричардс и Пэгги Уоллас. Я бы хотел поблагодарить Роберта Дана за предоставленный исходный ген *supF*, Фредерика Блатнера за вектор λ Ch3 Δ lac, Кирка Фрая и Джансаха Кима за создание *NotI*-варианта этого вектора, Чарльза Кантора и Кассандру Смит за помощь в освоении метода пульс-электрофореза, Ганса Лераха и Анну-Марию Фришоф за обсуждение методик и результатов перед публикацией и, наконец, Бернис Бишоп за подготовку рукописи. Работа субсидировалась грантом NIH GM34960 и Фондом наследственных болезней.

Литература

1. Ruddle F. (1984) *Am. J. Hum. Genet.*, **36**, 944.
2. Orkin S. H. (1986) *Cell*, **47**, 845.
3. Collins F. S., Weissman S. M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6812.
4. Poustka A., Lehrach H. (1986) *Trends Genet.*, **2**, 174.
5. Smith C. L., Lawrence S. K., Gillespie G. A., Cantor C. R., Weissman S. M., Collins F. S. (1987) In: *Methods in Enzymology*. Gottesman M. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 151, p. 461.
6. Schwartz D. C., Cantor C. R. (1984) *Cell*, **37**, 67.
7. Carle G. F., Olson M. V. (1984) *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5647.
8. Carle G. F., Frank M., Olson M. V. (1986) *Science*, **232**, 65.

9. *Chu G., Vollrath D., Davis R. W.* (1986) *Science*, **234**, 1582.
10. *Smith C. L., Warburton P. E., Gaal A., Cantor C. R.* (1986) In: *Genetic Engineering*. Setlow J. K., Hollaender A. (eds), Plenum Press, New York, Vol. 8, p. 45.
11. *Smith C. L., Cantor C. R.* (1987) In: *Methods in Enzymology*. Wu R. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 155, p. 449.
12. *Burke D. T., Carle G. F., Olson M. V.* (1987) *Science*, **236**, 806.
13. *Botsstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W.* (1980) *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 314.
14. *Donis-Keller H. et al.* (1987) *Cell*, **51**, 319.
15. *Collins F. S., Drumm M. L., Cole J. L., Lockwood W. K., Vande Woude G. F., Iannuzzi M. C.* (1987) *Science*, **235**, 1046.
16. *Pousika A., Pohl T. M., Barlow D. P., Frischauf A. M., Lehrach H.* (1987) *Nature*, **325**, 353.
17. *Richards J. E., Gilliam T. C., Cole J. L., Drumm M. L., Wasmuth J. J., Gusella J. F., Collins F. S.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
18. *Shortman K.* (1972) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**, 93.
19. *Jacobson H., Stockmayer W. H.* (1950) *J. Chem. Phys.*, **18**, 1600.
20. *Collins F. S.* (1986) In: *Applications of DNA Probes*. Lerman L. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 67.
21. *Dunn R. J., Belagaje R., Brown E. L., Khorana H. G.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 6109.
22. *Hohn B., Murray K.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3259.
23. *Rackwitz H. R., Zehetner G., Murrialdo H., Delius H., Chai J. H., Poustka A., Frischauf A., Lehrach H.* (1985) *Gene*, **40**, 259.
24. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* (1982) *Molecular Cloning — A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
25. *Dunn I. S., Blattner F. R.* (1987) *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2677.
26. *Broyles S. S., Pettijohn D. E.* (1986) *J. Mol. Biol.*, **187**, 47.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЕДИНИЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ДНК: РАСЩЕПЛЕНИЕ РНКазой И ДЕНАТУРИРУЮЩИЙ ГРАДИЕНТНЫЙ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Р. Майерс, В. Шеффилд, Д. Кокс¹

1. Введение

Методы обнаружения нуклеотидных замен в геномной ДНК позволили исследователям разобраться в природе многих наследственных болезней человека. Эти методы дают возможность идентифицировать специфические мутации, приводящие к заболеванию [1—6], а также полиморфные участки ДНК, используемые в качестве маркеров в генетическом анализе [7—11]. Благодаря развитию методов выявления нуклеотидных замен стала реальностью пренатальная диагностика многих наследственных болезней человека. Если ген, отвечающий за заболевание, известен, соответствующую мутацию можно обнаружить в геномной ДНК или в РНК при помощи блот-гибридизации с использованием меченых олигонуклеотидов в качестве гибридизационных зондов. В том случае, когда мутировавшая нуклеотидная последовательность неизвестна, замены нуклеотидов можно определить по полиморфизму длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [7]. ПДРФ обнаруживается по наличию или отсутствию сайта рестрикции во фрагменте геномной ДНК при гибридизации меченого ДНК-зонда с обработанной рестриктазами геномной ДНК, расфракционированной по размеру в агарозном геле и перенесенной на мембранный фильтр. Этот метод оказался очень эффективным для выявления как значимых мутаций, так и нейтрального полиморфизма в геноме человека и других организмов. Однако большую часть мутаций и полиморфных участков генома не удается обнаружить с помощью анализа ПДРФ, поскольку вероятность того, что замена нуклеотида изменит именно сайт рестрикции, низка. Так, например, многие точковые мутации гена β -глобина человека, вызывающие талассемию, не изменяют сайтов рестрикции, а потому не могут быть непосред-

¹ *R. M. Myers*, Departments of Physiology and Biochemistry and Biophysics, University of California at San Francisco, 513 Parnassus Street, San Francisco, CA 94143, USA.

V. C. Sheffield, D. R. Cox, Departments of Pediatrics and Biochemistry and Biophysics, University of California at San Francisco, 513 Parnassus Street, San Francisco, CA 94143, USA.

ственно определены при анализе ПДРФ [12]. Кроме того, оказалось, что в некоторых участках генома млекопитающих полиморфизм незначителен, что крайне затрудняет выявление в них ПДРФ даже при использовании большого числа различных рестриктаз [13, 14]. Из всего сказанного следует, что новые подходы к обнаружению единичных нуклеотидных замен в геномной ДНК были бы очень полезны.

В сотрудничестве с доктором Маннатисом и доктором Лерманом нами были разработаны два таких метода, являющиеся дополнением к анализу ПДРФ: РНКазное расщепление и денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ) [15—20]. Каждый из них позволяет идентифицировать по крайней мере 50% всех возможных замен нуклеотидов на участке ДНК длиной до 1000 п. н.

Задача настоящей главы — подробно изложить суть новых методов, обсудить их преимущества и недостатки, рассмотреть некоторые модификации. Кроме того, мы на примерах покажем, как можно использовать предложенные нами методы для исследования фрагментов ДНК, полученных при амплификации специфических последовательностей в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [21—23].

2. Общее описание методов

2.1. РНКазное расщепление

Единичные нуклеотидные замены во фрагментах геномной ДНК можно обнаружить при расщеплении неспаренных участков в РНК—ДНК-дуплексах, обрабатывая эти дуплексы РНКазой А [15, 16]. Рис. 1 иллюстрирует последовательные этапы процедуры.

1. Синтез равномерно меченого одноцепочечного РНК-зонда с использованием транскрипции *in vitro* клонированного фрагмента ДНК.
2. Гибридизация зонда с комплементарными последовательностями геномных (клонированных или амплифицированных путем ПЦР) ДНК. Если в гибридизуемой ДНК имеется замена нуклеотида, образующие РНК—ДНК-дуплексы содержат однонуклеотидные неспаренные участки.
3. Обработка дуплекса РНКазой А, приводящая к расщеплению цепи РНК по многим, хотя и не по всем, неспаренным нуклеотидам.
4. Анализ меченых фрагментов РНК при помощи денатурирующего гель-электрофореза с последующей радиоавтографией. В этом случае эффективное расщепление по неспаренным основаниям приводит к появлению на радиоавтографах двух

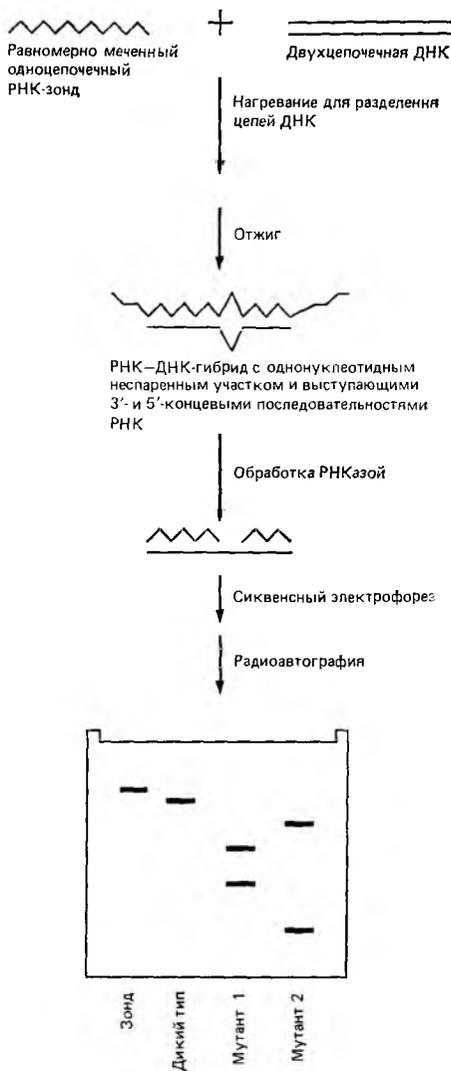


Рис. 1. Метод РНКазного расщепления. Равномерно меченный одноцепочечный РНК-зонд транскрибируется с клонированной ДНК-матрицы. Зонд смешивают с двухцепочечным тестируемым фрагментом клонированной (геномной или амплифицированной в ПЦР) ДНК, и смесь нагревают для разделения цепей. Проводят отжиг РНК-зонда с комплементарной ему последовательностью в тестируемой ДНК и получают гибридные дуплексы. Если во фрагменте ДНК имеется единичная нуклеотидная замена, то в гибриде РНК-ДНК окажется однонуклеотидный неспаренный участок. Реассоциированный образец обрабатывают РНКазой А, которая расщепляет цепь РНК по неспаренным участкам. Отметим также, что РНКаза А удаляет выступающие 3'- и 5'-концы дуплекса. Дуплекс обрабатывают денатурирующими веществами для разделения цепей, затем проводят электрофорез в денатурирующем (сиквенсном) геле и фрагменты РНК фракционируют по размеру. Гель высушивают и экспонируют с рентгеновской пленкой. Если в тестируемой ДНК нет мутаций, на радиоавтографе наблюдается одна полоса, соответствующая по размеру длине РНК. Если в тестируемой ДНК имеется мутация,

меченых фрагментов РНК, размеры которых указывают на положение нуклеотидной замены относительно концов фрагмента ДНК. Одиночный меченый фрагмент РНК, равный по длине фрагменту ДНК, наблюдается в том случае, если в последнем нет нуклеотидных замен или если существующие замены препятствуют расщеплению РНК—ДНК-дуплекса РНКазой.

На рис. 2 в качестве примера представлены результаты реакций РНКазного расщепления. При такой обработке расщепля-

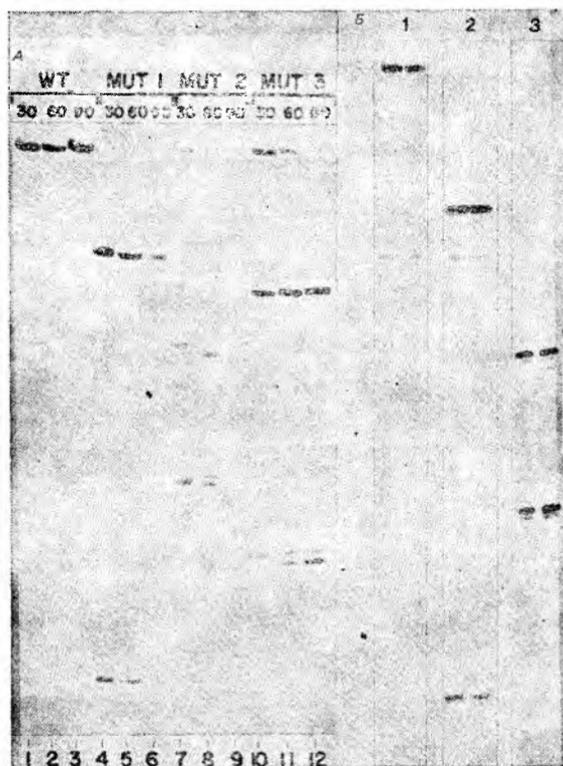


Рис. 2. Реакция РНКазного расщепления. А. РНКазное расщепление клонированных образцов тестируемой ДНК. Равномерно меченый РНК-зонд отжигают с малым количеством клонированной ДНК, обрабатывают РНКазой А и исследуют при помощи денатурирующего гель-электрофореза. На радиоавтографе видны результаты РНКазного расщепления полностью комплементарного РНК—ДНК-дуплекса («WT»-лунки) и РНК—ДНК-дуплексов, содержащих однонуклеотидные неспаренные участки (лунки MUT1, MUT2 и MUT3). Для каждого образца ДНК приводятся по три значения времени РНКазной

ется примерно 30—40% от общего числа неспаренных участков в РНК—ДНК-дуплексе. Тестирование фрагмента ДНК в двух независимых реакциях РНКазного расщепления с двумя зондами, комплементарными каждой из его цепей, позволяет выявить в нем 60—70% всех возможных замен нуклеотидов, так как в этом случае обнаруживаются даже комплементарные замены в обеих цепях [15, 16].

Оптимальными, на наш взгляд, являются РНК-зонды и соответственно исследуемые на однонуклеотидные замены участки ДНК длиной от 100 до 1000 нуклеотидов. В этом случае и сам зонд, и продукты его расщепления легко выявляются при помощи денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле, аналогичном используемому при секвенировании ДНК. При этом отношение сигнала к фону достаточно высоко для получения четких результатов. Совсем нетрудно наработать меченые одноцепочечные РНК-зонды гораздо большей длины, но результаты обработки таких длинных цепей РНКазой неоднозначны. Еще одна проблема, которая возникает при использовании зондов с длиной цепи более 1000 п. н., заключается в том, что под действием РНКазы наряду с расщеплением РНК—ДНК-дуплексов по неспаренным участкам может происходить (хотя и редко) расщепление цепи РНК по комплементарно спаренным участкам дуплекса. Кроме того, анализ продуктов расщепления длинных РНК-зондов (>1000 п. н.) требует проведения денатурирующе-

обработки (расщепление в течение 30, 60 и 90 мин). В «WT»-лунках не происходит расщепления дуплекса, и меченый РНК-продукт оказывается в участке геля, соответствующем полной длине необработанного рестриктазой РНК-зонда. В каждом из трех исследованных мутантов происходит расщепление по однонуклеотидным неспаренным сайтам, что приводит к появлению дополнительно двух РНК-продуктов. Длины их равны предсказанным ранее для каждого из расщеплений. В лунках MUT2 и MUT3 наблюдается неполное расщепление из-за недостаточной продолжительности реакции, и поэтому имеется фракция молекул зонда полной длины. При продолжении инкубации эти частично расщепленные дуплексы расщепляются полностью (см. точку, соответствующую 90 мин обработки) [15]. Б. РНКазное расщепление образцов геномной ДНК. Равномерно меченый РНК-зонд, комплементарный последовательностям ДНК, составляющим первый экзон, первый интрон и часть второго экзона гена β -глобина человека, отжигают с 5 мкг тотальной геномной ДНК трех индивидов. После образования РНК—ДНК-дуплексов смесь обрабатывают РНКазой А, как описано в тексте. Полученные образцы денатурируют и наносят на гель (8%-ный акриламид/8М мочевины), затем проводят электрофорез и экспонируют гель с рентгеновской пленкой. Каждую реакцию РНКазного расщепления осуществляли в двух параллелях (по две лунки в каждом варианте опыта): (1) Геномная ДНК индивида с нормальными β -глобиновыми генами; (2) геномная ДНК индивида с гомозиготной β -талассемией, возникшей в результате мутации в кодоне 26 (HbE); (3) геномная ДНК индивида с гомозиготной β -талассемией, возникшей в результате мутации в 110-й позиции интрона.

го электрофореза в агарозном геле. При этом в ряде случаев не удается полностью разделить гибриды РНК—ДНК и результаты получают полностью противоречивыми, так как фрагменты РНК, полученные при расщеплении ее по неспаренным участкам, но оставшиеся связанными с ДНК, обнаруживаются в геле в зонах, соответствующих длине всего зонда. Для более эффективного выявления единичных нуклеотидных замен путем РНКазного расщепления мы использовали по несколько зондов в каждой реакции отжига/расщепления. Однако полученные таким способом результаты зачастую очень неоднозначны и с трудом поддаются интерпретации. В силу перечисленных причин при исследовании фрагментов ДНК на единичные замены мы бы рекомендовали использовать в реакциях РНКазного расщепления РНК-зонды длиной от 100 до 1000 нуклеотидов.

Показано, что рибонуклеаза может расщеплять неспаренные участки и в дуплексах РНК—РНК [25]. По данным Перучо, единичные мутации в *H-ras*-гене выявляются при расщеплении неспаренных участков дуплекса РНК—РНК, образованного мРНК гена *H-ras* и его «антисмысловой» мРНК. Наши исследования показали, что естественные мутации в гене β -глобина и искусственные мутации в промоторном участке гена β -интерферона можно обнаружить при РНКазном расщеплении как РНК—ДНК-, так и РНК—РНК-дуплексов. На клонированной ДНК-матрице мы получали равномерно меченные одноцепочечные зонды «антисмысловой РНК», денатурировали их с комплементарной мРНК, обрабатывали образовавшиеся дуплексы РНКазой, а затем идентифицировали продукты расщепления денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле. Поэтому приведенные ниже методики для исследования образцов ДНК с равным успехом могут использоваться и при работе с РНК.

2.2. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез

Два фрагмента ДНК, различающиеся лишь делецией, inserцией или заменой одного нуклеотида, или единственным неспаренным нуклеотидом, можно легко разделить при помощи денатурирующего градиентного гель-электрофореза, ДГГЭ [15, 17—20, 27, 28]. Принцип метода заключается в разделении двухцепочечных фрагментов ДНК электрофорезом в стандартном акриламидном геле с линейным градиентом денатурирующих факторов — мочевины, формамида или температуры. Ниже приводятся теоретические основы метода. Здесь отметим только, что разделение очень похожих фрагментов в геле происходит из-за разных температур плавления их ДНК.

2.2.1. Теоретические основы метода ДГГЭ

При постепенном повышении температуры или концентрации денатурирующего вещества происходит плавление двухцепочечной ДНК, и для каждого фрагмента параметры этого процесса различны. Внутри фрагмента имеются так называемые области плавления — блоки последовательностей, плавящихся одновременно при определенных дискретных значениях температуры, которая и является температурой плавления (T_m) данной области (рис. 3, А). Длина таких областей (или доменов) составляет от 25 до нескольких сотен нуклеотидных пар. Два соседних домена могут иметь четкую границу и различаться по T_m на несколько градусов. Фрагменты ДНК длиной 100—1000 п. н. имеют обычно от двух до пяти областей плавления. Температура плавления доменов в рестрикционных фрагментах большинства образцов ДНК из природных источников колеблется от 65 до 80 °С.

Общеизвестно, что нуклеотидный состав фрагментов ДНК влияет на температуру их плавления. Оптимальные условия для отжига и отмычки нуклеиновых кислот в реакциях гибридизации подбирают исходя из их нуклеотидного состава. В гораздо меньшей степени учитывается вклад стэкинг-взаимодействий в термодинамическую стабильность двойной спирали. А между тем энергия таких взаимодействий между соседними нуклеотидами одной цепи ДНК, удерживающих ее в скрученном состоянии в физиологических растворах, больше энергии водородных связей комплементарного спаривания [29]. Порядок чередования оснований определяет степень стэкинга и, следовательно, влияет на термостабильность фрагмента ДНК. Даже единичная нуклеотидная замена может так сильно сказаться на стэкинг-взаимодействии, что T_m изменится более чем на 1 °С. Поскольку процесс плавления домена практически полностью определяется кооперативными взаимодействиями, любая единичная нуклеотидная замена в любой его точке будет менять температуру плавления.

Разработанный Лерманом и Фишером метод электрофоретического разделения близких последовательностей ДНК основан на использовании различий в температуре плавления, обусловленных нуклеотидными заменами [27, 28]. Они исходят из того факта, что последовательность оснований влияет на T_m области плавления и что конформация фрагмента ДНК обуславливает его подвижность в геле под действием электрического поля. Принцип метода — электрофорез ДНК в акриламидном геле фиксированной концентрации с линейно возрастающим к нижней части геля градиентом концентрации веществ, денатурирующих ДНК: обычно мочевины или формамида (рис. 3, Б). Электрофорезная камера нагревается до температуры примерно 60 °С.

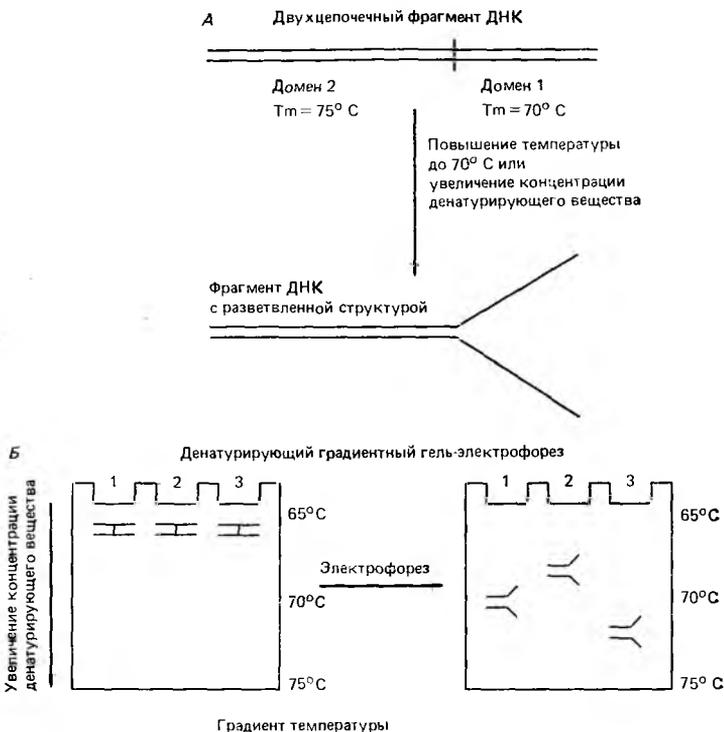


Рис. 3. Плавление ДНК в растворе и в денатурирующих градиентных гелях. **А.** В верхней части рисунка изображен двухцепочечный фрагмент ДНК в условиях физиологических температур. Этот фрагмент имеет длину от 100 до 1000 п. н. и два домена плавления с T_m 70 и 75°C соответственно. При нагревании до 70°C или при соответствующем увеличении концентрации денатурирующего вещества плавится первый домен. Это приводит к образованию разветвленной молекулы, изображенной в нижней части рисунка. Дальнейшее нагревание (до 75°C) или увеличение концентрации денатурирующего вещества приводит к полному разделению цепей фрагмента. **Б.** Использование ДГГЭ для разделения фрагментов ДНК, различающихся однонуклеотидной заменой. Слева изображены три двухцепочечных фрагмента ДНК в самом начале прохождения через полиакриламидный гель с линейно возрастающим градиентом денатурирующих факторов; концентрация их на вершине геля соответствует температуре в температурном эквиваленте 65°C , у основания — 75°C . Фрагменты ДНК на всем протяжении имеют двухцепочечную структуру. Справа показано положение фрагментов в геле после окончания электрофореза. Во всех трех фрагментах первый домен расплавился, и они представляют собой молекулы с разветвленной структурой. ДНК в лунке 1 соответствует фрагменту «дикого типа» с температурой плавления первого домена 70°C . В лунке 2 находится мутантный фрагмент ДНК с меньшим значением T_m для первого домена, поэтому он начинает плавиться и замедлять движение в геле при более низких концентрациях денатурирующих веществ. В лунке 3 мутантный фрагмент имеет самую высокую температуру плавления первого домена, поэтому и в геле он проходит самое большое расстояние, прежде чем начинает снижать скорость. Снижение скорости фрагментов вследствие частичного их плавления во время ДГГЭ приводит к тому, что в геле они образуют четкие, легко разделяемые полосы.

Это чуть ниже температуры плавления самой легкоплавкой области во фрагменте ДНК. Двухцепочечная молекула ДНК входит в гель и продвигается в нем со скоростью, пропорциональной ее молекулярной массе. Как только фрагмент достигает участка геля, в котором температура камеры и концентрация денатурирующих веществ создают условия для плавления первой, самой легкоплавкой области (домена), он как бы разветвляется: одна часть его остается двухцепочечной, а другая переходит в одноцепочечную форму. Такая разветвленная структура застревает в порах геля, в результате чего ее подвижность снижается. Снижение электрофоретической подвижности молекулы коррелирует с соотношением длин денатурированного и двухцепочечного участков: чем длиннее самый легкоплавкий домен, тем сильнее снижается подвижность. Участок геля, в котором молекула ДНК начинает терять скорость, соответствует самым легкоплавким доменам. Если концентрации денатурирующих веществ подобраны правильно, то два фрагмента ДНК, различающиеся лишь одной нуклеотидной заменой и имеющие неодинаковые значения T_m , начнут снижать скорость в различных участках геля, и к концу прохождения через него их легко будет разделить. Ранее считалось, что отделить мутировавшие фрагменты от фрагмента ДНК дикого типа за счет разной степени снижения их подвижности в ДГГЭ можно лишь в том случае, если замены произошли в области с самым низким значением T_m . Однако анализ большого числа образцов ДНК, а также последующие теоретические выкладки показали, что в большинстве случаев метод ДГГЭ дает возможность обнаружить нуклеотидные замены во всех областях плавления, за исключением самых термостабильных [18, 19]. Замены в областях с самой высокой температурой плавления обычно не обнаруживаются, так как по окончании плавления последнего домена ДНК полностью денатурирует, а это приводит к нарушению корреляции между конформацией молекулы и скоростью ее продвижения. Важно помнить, что успех при проведении ДГГЭ с целью разделения мутировавшего фрагмента и фрагмента ДНК дикого типа определяется структурой фрагмента. Она должна быть разветвленной, причем мутации должны приходиться на области, подвергшиеся плавлению. Для увеличения разрешающей способности метода к исследуемому фрагменту ДНК «пришивали» последовательность с более высокой температурой плавления ДНК, так называемый «ГС-зажим». При этом все области плавления фрагмента, включая самую тугоплавкую, становились доступными для анализа [18, 19]. Эти опыты проводили с препаратами ДНК, клонированными в плазмидном векторе, содержащем «ГС-зажим». Чтобы избежать стадии клонирования, фрагменты с «зажимами» можно получить в полимеразной цепной реакции (см. разд. 2.3).

Еще одним усовершенствованием ДГГЭ следует считать использование гетеродуплексных фрагментов, образованных мутировавшей ДНК и ДНК дикого типа. В предыдущих опытах сравнивали подвижность гомодуплексных фрагментов мутантной и исходной ДНК в параллельных дорожках при ДГГЭ. Работа с полученными из них гетеродуплексами позволяет значительно повысить разрешающую способность метода и долю обнаруживаемых мутаций [15, 17, 20]. Причина заключена в том, что неспаренные участки гетеродуплекса, в которых имеются однонуклеотидные замены, сильно снижают стэкинг-взаимодействия оснований, дестабилизируя вторичную структуру, а это, в свою очередь, приводит к снижению температуры плавления фрагмента ДНК. В ряде случаев замена всего одного нуклеотида обуславливала снижение температуры на целых 6 °C [15]. Анализ большого числа гетеродуплексов и теоретические подсчеты показывают, что все возможные замены нуклеотидов в легкоплавких доменах, приводящие к образованию неспаренных участков во фрагменте ДНК, выявляются при помощи ДГГЭ с вероятностью 100% за счет изменения подвижности. На долю легкоплавких областей во фрагментах ДНК от 100 до 1000 п. н. приходится в среднем более 50% их длины, следовательно, использование гетеродуплексов таких фрагментов позволяет выявить более половины всех возможных замен нуклеотидов. В клонированных же фрагментах ДНК с «GC-зажимом» выявляются практически все замены нуклеотидов [18, 19].

Гетеродуплексы дают возможность наблюдать изменение подвижности мутантных фрагментов ДНК в геле, не выявляемое при стандартных условиях проведения электрофореза. Зачастую единичные мутации можно обнаружить по вызываемым ими значительным изменениям структуры доменов во фрагменте ДНК. Изменения эти отражаются и на характере плавления ДНК: домены, имевшие изначально самую высокую температуру плавления, могут стать самыми легкоплавкими. Таким образом, когда вместо гомодуплексов используются гетеродуплексы, ДГГЭ позволяет выявлять замены нуклеотидов даже в самых тугоплавких доменах.

2.2.2. Практическое использование ДГГЭ

Приведенные здесь схемы ДГГЭ обеспечивают более высокую разрешающую способность и эффективность обнаружения мутаций за счет использования гетеродуплексов. Их основные этапы приведены на рис. 4. Исследуемые препараты ДНК отжигают с меченым одноцепочечным ДНК-зондом, и если в них произошла замена нуклеотида, образовавшийся гетеродуплекс будет иметь однонуклеотидный неспаренный участок. Далее про-



Рис. 4. Выявление единичных нуклеотидных замен методом ДГГЭ. Меченый одноцепочечный ДНК- или РНК-зонд смешивают с двухцепочечной (клонированной, геномной или амплифицированной в ПЦР) ДНК; смесь нагревают для разделения цепей. Происходит отжиг зонда с комплементарной ему цепью исследуемого фрагмента, при этом образуются гибридные дуплексы. Если в исследуемом образце имеется мутация, то в гибриде будет однонуклеотидный неспаренный участок. После отжига к смеси добавляют избыток одноцепочечной кольцевой ДНК, комплементарной зонду, для удаления его остатков. Проводят электрофорез смеси в денатурирующем градиентном геле. Гель высушивают и экспонируют с рентгеновской пленкой. Наличие неспаренных участков в мутантных образцах ДНК, изменяющих характер плавления, приводит к тому, что эти фрагменты оказываются в геле ближе к старту вследствие пониженной термостабильности. Преимущество такого метода разделения молекул с неспаренными участками в его повышенной разрешающей способности.

водят электрофорез в денатурирующем геле с последующей радиоавтографией, используя в качестве контроля гомодуплекс ДНК дикого типа. Таким образом, в этом случае не требуется стадии блотинга геля. Кроме одноцепочечных ДНК-зондов можно использовать асимметрично меченные двухцепочечные ДНК-зонды (см. разд. 6.3), а также меченые одноцепочечные РНК-зонды для тестирования ДНК в гибридах РНК—ДНК (разд. 6.3; S. Wolf, частное сообщение) или РНК в РНК—РНК-гибридах [31]. Некоторые из этих методов обсуждаются в разд. 6.

С помощью ДГГЭ, также как и при РНКазном расщеплении, можно исследовать фрагменты нуклеиновых кислот (РНК, ДНК, гибриды РНК—ДНК) длиной от 100 до 1000 п. н. Верхний предел значений длин в некоторой степени определяется необходимостью использовать полиакриламидный гель. Подвижность в нем фрагментов ДНК длиной более 1000 п. н. резко снижается,

Таблица 1. Сравнительная характеристика методов градиентного

	Количество потенциальных однонуклеотидных замен, скринируемых в одной дорожке	Гель	Метод выявления	Зонд
ПДРФ	10—20	Агароза	Блотинг, радиоавтография	1. Ник-трансляция 2. Мечение со случайным праймером (в обоих случаях зонды двухцепочечные)
РКНазное расщепление	250—500	Мочевина/акриламид (сиквенсные гели)	Прямая радиоавтография	Равномерно меченная одноцепочечная РНК
ДГГЭ	250—500	Акриламид с градиентом мочевины или формамида	Прямая радиоавтография	Равномерно меченная одноцепочечная РНК или ДНК Меченная по концам одноцепочечная ДНК

а это значительно увеличивает время, необходимое для их электрофоретического разделения. Еще более серьезную проблему представляет собой характер плавления длинных фрагментов. Известно, что чем длиннее фрагмент, тем больше в нем доменов плавления. При прохождении такого фрагмента через гель очень быстро наступает резкое снижение его подвижности, обусловленное плавлением одновременно большого числа доменов, что делает доступной для обнаружения замены лишь незначительную часть длинного фрагмента. В силу вышеуказанных причин мы стараемся работать с фрагментами, длина которых не превышает 1000 п. н. Поскольку для большинства фрагментов ДНК более половины их длины приходится на легкоплавкие домены, то денатурирующий электрофорез фрагмента в 1000 п. н. позволяет тестировать на нуклеотидные замены примерно 500 нуклеотидов. Для повышения информативности анализа можно использовать анализ ПДРФ, рестрикционного расщепления и денатурирующего гель-электрофореза

Размеры тестируемых фрагментов (п. н)	Количество ДНК в лунке	Предварительные стадии	Недостатки
500—10 000	5—10 мкг	<ol style="list-style-type: none"> 1. Клонировать зонд в векторе 2. Очистить зонд при помощи электрофореза 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Выявляется малая доля нуклеотидных замен 2. Однонуклеотидные замены, дающие небольшие фрагменты ДНК, не выявляются
100—1000	3—5 мкг с ПЦР менее 10 нг	<ol style="list-style-type: none"> 1. Клонировать зонд в РНК-pol-векторе 2. Сделать рестрикционную карту 3. Для ПЦР: просеквенируйте концы зонда 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Расщепление комплементарных участков может давать фон 2. Неполное расщепление затрудняет выявление гомозигот
100—1000	3—5 мкг с ПЦР менее 10 нг	<ol style="list-style-type: none"> 1. Клонировать зонд в векторе 2. Сделать рестрикционную карту 3. Перпендикулярно-градиентный денатурирующий электрофорез 4. Оптимизирующий электрофорез 5. Для ПЦР: секвенируйте концы зонда 	Значительные затраты на постановку метода

Рис. 5. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез. А. Анализ клонированных гомодуплексных фрагментов ДНК методом ДГГЭ. На фотографии представлен негатив окрашенного бромидом этидия денатурирующего градиентного геля, в котором исследовали фрагменты ДНК длиной 450 п. н., различающиеся однонуклеотидными заменами. В левой лунке находится реперный фрагмент ДНК дикого типа, в остальных лунках — индивидуальные клонированные фрагменты мутантной ДНК [30]. Б. Анализ клонированных гетеродуплексных фрагментов ДНК методом ДГГЭ. На негативе окрашенного этидием денатурирующего градиентного геля можно различить мутантный гомодуплекс (лунка 1), гомодуплекс дикого типа (лунка 2) и смесь гомодуплексных и гетеродуплексных фрагментов, образованных при смешивании в эквимольных количествах мутантных гомодуплексов и гомодуплексов дикого типа, их денатурации и отжига с перегруппировкой цепей ДНК в четырех возможных вариантах (лунка 3). Два вида гетеродуплексов в лунке 3, в каждом из которых имеется однонуклеотидная замена, сильно замедляются в геле из-за значительного изменения температуры плавления, вызванного точечной некомплементарностью. В лунках 4 и 5 находятся смеси гомодуплексов и гетеродуплексов, полученные аналогичным образом при смешивании того же самого фрагмента ДНК дикого типа и двух других мутантных фрагментов ДНК. На примере этих двух лунок наиболее четко прослеживается необходимость использования гетеродуплексов для увеличения разрешающей способности ДГГЭ. Мутантные гомодуплексы и гомодуплексы дикого типа разделены здесь очень слабо, в то время как гетеродуплексы отделяются от гомодуплекса дикого типа с гораздо более высокой степенью разрешения. В. Анализ суммарной геномной ДНК человека методом ДГГЭ. На снимке представлен радиоавтограф денатурирующего градиентного геля, в котором исследовали образцы ДНК двух индивидов. Одноцепочечный ДНК-зонд, представляющий собой последовательность нуклеотидов (с 132-го по 404-й) смысловой цепи гена β -глобина человека, отжигали с 5 мкг суммарной геномной ДНК индивида с нормальными β -глобиновыми генами (лунка 1) и индивида с гомозиготной β -талассемией, вызванной мутацией G \rightarrow A в кодоне 39 (лунка 2); остаток зонда «улавливались» одноцепочечной кольцевой плазмидной ДНК, комплементарной зонду, и смесь наносили на 14%-ный акриламидный гель с градиентом концентраций денатурирующих веществ от 30 до 60%. Электрофорез проводили при 150 В в течение 10,5 ч при 60°C. Гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой в течение 20 ч при -70°C с усиливающим экраном. В нижней части геля видны фрагменты глобиновых генов длиной 272 п. н., а на вершине геля, у стартовой точки — «выловленные» остатки зонда [15]. Г. Анализ амплифицированной в ПЦР суммарной геномной ДНК человека методом ДГГЭ. На снимке представлен радиоавтограф 14%-ного акриламидного геля с градиентом концентраций денатурирующих веществ от 30 до 60%, в котором исследовали образцы ДНК двух индивидов с β -талассемией (лунки 1 и 2) и человека с нормальными глобиновыми генами (лунка 3). Примерно 300 нг суммарной геномной ДНК каждого образца амплифицировали в ПЦР, как описано в тексте, и одну сотую часть амплифицированной ДНК отжигали с одноцепочечным меченым зондом. После отжига десятую часть образца исследовали при помощи электрофореза. Гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой и усиливающим экраном в течение 6 ч. Таким образом, применение ПЦР позволяет получить результаты всего за несколько часов радиоавтографирования, имея лишь 2—3 нг тотальной геномной ДНК. Использованные образцы геномной ДНК были получены от индивидов, гетерозиготных по мутациям в позициях 21 и 6 интрона 1 глобиновых генов (лунка 1), гомозиготных по мутации в позиции 110 интрона 1 (лунка 2) и гомозиготных по нормальным глобиновым генам (лунка 3).

зовать ДНК-зонд длиной 1000—2000 п. н.; отжигать его с геномной ДНК, обрабатывать соответствующими рестриктазами и получать при этом два-три фрагмента оптимального размера (по 500—700 п. н.).

На рис. 5 приведены некоторые примеры использования ДГГЭ и полученные результаты. В табл. 1 сравниваются результаты выявления однонуклеотидных замен, полученные при РНКазном расщеплении методами ДГГЭ и ПДРФ.

2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

РНКазное расщепление и ДГГЭ можно использовать для непосредственного исследования фрагментов геномной ДНК, минуя стадию клонирования. Работая с равномерно меченными зондами, обладающими высокой удельной активностью (примерно 200—400 Ки/ммоль по одному из нуклеотидов), можно любым из этих методов получить желаемый результат, имея изначально 5—10 мкг геномной ДНК человека и проводя радиоавтографию 24 ч. Чем проще организм, тем выше чувствительность методов. Хотя получаемые результаты в большинстве своем можно оценить высоко, непосредственное использование суммарной геномной ДНК ставит перед исследователем ряд проблем. Это, во-первых, нередко низкое отношение сигнала к фону, особенно при РНКазном расщеплении. Во-вторых, активность равномерно меченных фосфором зондов должна быть настолько высокой, чтобы использовать их в течение дня или двух (и избежать таким образом высокого фона за счет радиоактивного распада). В-третьих, при проведении некоторых анализов, особенно в случае множественных тестов, лимитирующим фактором может стать количество геномной ДНК. Любой тест тем предпочтительнее, чем меньшее количество ДНК требует.

В 1985 г. был описан принципиально новый метод, позволяющий в миллион раз амплифицировать интересующие последовательности в препарате геномной ДНК,—полимеразная цепная реакция, ПЦР [21—23]. Идея метода и ее воплощение очень просты (рис. 6, А). Сначала синтезируются два дезоксирибонуклеотида длиной 20—30 оснований, представляющие собой концевые последовательности интересующего фрагмента ДНК. Полярность выбрана так, чтобы после отжига их направления 5'→3' были обращены друг к другу. Избыточные количества этих олигонуклеотидов смешивают с геномной ДНК, и смесь нагревают для денатурации последней. Снижение температуры приводит к реассоциации олигонуклеотидов с гомологичными участками геномной ДНК. Затем проводят наращивание цепи при

участии ДНК-полимеразы и дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Такая последовательность реакций денатурации, реассоциации и наращивания цепи повторяется 20—30 раз. Уже после двух циклов среди продуктов реакции появляются фрагменты ДНК, точно совпадающие по длине с исходным фрагментом, ограниченными олигонуклеотидами (рис. 6, А). Эти фрагменты служат матрицей для последующих реакций и идентичны большинству конечных продуктов. Процесс является по существу цепным, так как продукты данной реакции служат матрицей для последующих реакций. Количество вновь образующейся ДНК возрастает в геометрической прогрессии, поэтому за 20 циклов при 100%-ной эффективности каждого из них можно получить 2^{20} ($>10^6$) молекул. На практике эффективность каждого цикла амплификации составляет 20—50%, т. е. при проведении достаточного числа циклов можно добиться увеличения количества специфической последовательности кратного миллиону.

Если при амплификации геномной ДНК позвоночных в качестве праймеров для ПЦР используют олигонуклеотиды длиной 20 нуклеотидов и более, то процесс этот довольно специфичен и амплифицируется только один фрагмент ДНК. Однако иногда среди продуктов реакции наблюдается накопление фрагментов, происхождение которых трудно объяснить. А поскольку эти фрагменты могут мешать последующему анализу (РНКазное расщеплению, ДГГЭ, секвенированию), то рекомендуется провести еще одну серию амплификаций, с использованием другого набора олигонуклеотидных праймеров. Этот метод, именуемый «nested oligo» [22], состоит в следующем: продукт первичной полимеразной цепной реакции используется в качестве матрицы в последующих раундах ПЦР, но уже с двумя другими олигонуклеотидами, имеющими гомологии с участками ДНК внутри первично амплифицированного фрагмента (рис. 6, Б). Такая процедура позволяет получить большое количество индивидуальной последовательности ДНК, несколько более короткой, чем исходный фрагмент, и использовать ее для последующего анализа.

Имея исходно менее 1 мкг суммарной геномной ДНК позвоночных, в ПЦР можно получить несколько микрограмм специфического фрагмента. Хорошо амплифицируются фрагменты до 2000 п. н. (и несколько более длинные). В одной реакции можно амплифицировать одновременно и несколько фрагментов. Амплификация специфических фрагментов с помощью ПЦР может применяться и в диагностике, и при клонировании. Левинсон и Гитшейер использовали амплифицированную в ПЦР геномную РНК и РНКазное расщепление для выявления однонуклеотидных замен в гене фактора VIII, обуславливающих X-сцепленную гемофилию А человека [32]. В разделах, посвященных эксперимен-

тальным методам, мы объясняем, как применять ПЦР в сочетании с РНКазным расщеплением и с ДГГЭ для обнаружения однонуклеотидных замен в препаратах геномной ДНК. Более полное описание метода содержится в работах [21, 23, 33, 34] и гл. 6.

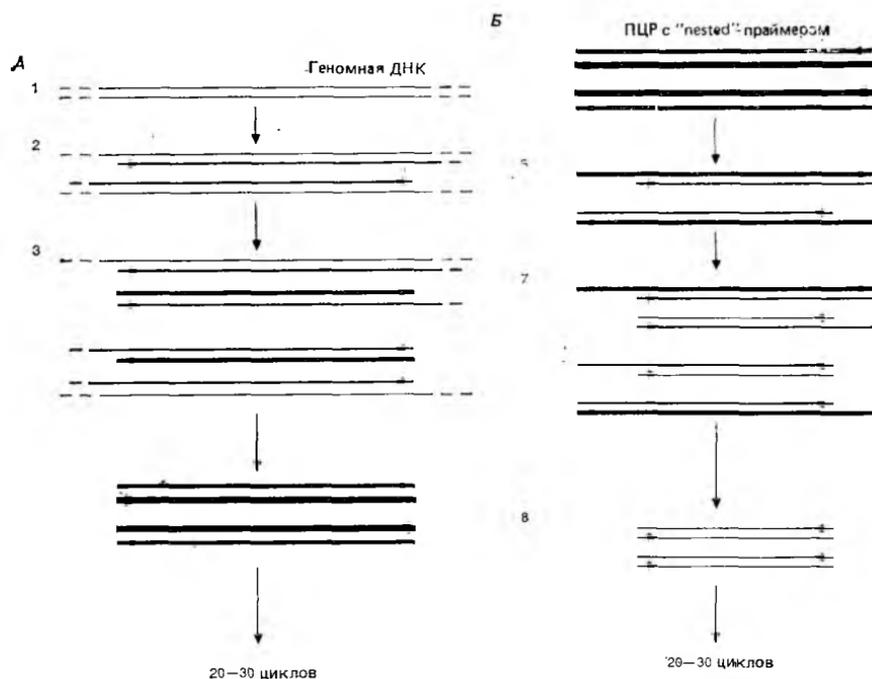


Рис. 6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). А. Геномную ДНК (1) денатурируют и отжигают с избытком двух олигонуклеотидных праймеров, изображенных в виде маленьких стрелок (2). Реассоциировавшие олигонуклеотиды удлиняются термостабильной ДНК-полимеразой за счет присоединения dNTP (2). Полученные таким путем двухцепочечные молекулы ДНК снова денатурируют, отжигают с олигонуклеотидами и снова достраивают, получая продукты реакции, изображенные на стадии 3. Следующий цикл нагревания, отжига и удлинения цепи приводит к образованию продуктов, показанных на стадии 4. Продолжая процесс еще 20—30 циклов, получают большие количества требуемого продукта реакции (4). Б. Модификация ПЦР с использованием «nested»-праймера [22]. После первой серии реакции амплификации с использованием «внешних» олигонуклеотидных праймеров (см. А) небольшое количество полученных в ней продуктов реакции берут в качестве матрицы для второго этапа амплификации. Используя амплифицированный на стадии (А) фрагмент ДНК, проводят еще 20—30 циклов с «внутренними» праймерами и получают в результате несколько микрограмм специфической последовательности ДНК из нескольких сотен нанограмм геномной ДНК, взятой изначально для первого этапа амплификации. Этот второй этап зачастую позволяет увеличивать специфичность метода ПЦР.

3. Предварительные процедуры

Для проведения ПЦР, РНКазного расщепления и ДГГЭ необходимы следующие предварительные процедуры.

1. Фрагмент ДНК, тестируемый на мутации или полиморфизм, необходимо клонировать в плазмидном векторе, позволяющем синтезировать определенные типы зондов (обычно одноцепочечные РНК- или ДНК-зонды). Некоторые из векторов описаны в разд. 5.1 и 6.3.

2. Очень полезно, а иногда и просто необходимо иметь рестрикционную карту такой клонированной вставки ДНК. Расположение сайтов рестрикции, особенно тех, что встречаются лишь 1—2 раза во всей плазмиде, можно определить при помощи стандартных методов рестрикционного картирования [24]. Для обоих типов одноцепочечных зондов необходимо иметь единственный сайт рестрикции в участке тестируемой ДНК, дистальном по отношению к сайту связывания с РНК-полимеразой в случае РНК-зондов (см. разд. 5.1) или с олигонуклеотидами в случае ДНК-зондов (см. разд. 6.3 и рис. 10). После реассоциации одноцепочечного меченого ДНК-зонда с тестируемой ДНК может возникнуть необходимость расщепить гибридную последовательность ДНК на 2—3 фрагмента с оптимальной для ДГГЭ длиной. В этом случае надо использовать сайты рестрикции, имеющиеся в тестируемом фрагменте.

3. При использовании ПЦР необходимо определить концевые нуклеотидные последовательности тестируемой вставки ДНК. Обычно требуется секвенировать 40—50 п. н., чтобы получить первый набор олигонуклеотидов длиной 20—25 п. н. При работе методом «nested oligo» необходимо дополнительно просеквенировать любую последовательность внутри фрагмента ДНК, ограниченного первой парой олигонуклеотидов.

4. Полимеразная цепная реакция

Стандартный метод ПЦР требует большого количества ДНК-полимеразы из *Escherichia coli* для синтеза ДНК [21]. Относительно недавно было показано, что термостабильная ДНК-полимераза, выделенная из *Thermus aquaticus*, по ряду причин больше подходит для ПЦР. Во-первых, этот фермент выдерживает многократное нагревание, отжиг и полимеризацию, и нет необходимости добавлять его после каждого цикла амплификации (что сильно экономит время и снижает трудоемкость процесса). Во-вторых, поскольку реакции удлинения цепи проводят при повышенной температуре, вторичная структура ДНК-матрицы не

препятствует процессу, как это часто бывает в случае элонгации *in vitro* с ДНК-полимеразой кишечной палочки. Использование термоустойчивой полимеразы в ПЦР позволяет амплифицировать очень длинные фрагменты ДНК (2000 п. н. и более).

4.1. Материалы

Для проведения ПЦР по описанной в разделе схеме требуются следующие буферы и реактивы.

1. *10×буфер ПЦР*. Для приготовления 1 мл необходимо

670 мМ трис-НСl, рН 8,8	670 мкл 1 М раствора
67 мМ MgCl ₂	67 мкл 1 М раствора
166 мМ сульфат аммония	83 мкл 2 М раствора
100 мМ β-меркаптоэтанол	7 мкл 14 М раствора
	177 мкл Н ₂ О
2. *Исходные растворы dNTP*. Это четыре отдельных 50 мМ раствора каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов в воде. Хранить их следует небольшими аликвотами при -70 °С. Очень хороши для работы концентрированные растворы dNTP фирмы Pharmacia.
3. *10×смесь dNTP*. Для приготовления 0,2 мл необходимо:

12,5 мМ dATP	50 мкл 50 мМ исходного раствора dATP
12,5 мМ dTTP	50 мкл 50 мМ исходного раствора dTTP
12,5 мМ dGTP	50 мкл 50 мМ исходного раствора dGTP
12,5 мМ dCTP	50 мкл 50 мМ исходного раствора dCTP
4. *Диметилсульфоксид*. Можно использовать безводный ДМСО высокого качества любой марки.
5. *ТЕ-буфер*. Используется при приготовлении растворов ДНК для всех описываемых в данной главе методов.
На 100 мл:

10 мМ трис-НСl, рН 7,8	1 мл 1 М раствора
1 мМ ЭДТА, рН 8,0	0,2 мл 0,5 М раствора
	99 мл Н ₂ О
6. *Матричная ДНК*. Мы считаем, что для амплификации в ПЦР можно использовать геномную ДНК, выделенную различными методами (см., например, [24]). После выделения следует приготовить исходный раствор с концентрацией 100 мкг/мл. Обрабатывать его рестриктазами необязательно. Чтобы подготовить клонированные препараты ДНК для ПЦР, обработайте плазмидную ДНК рестриктазой, которая расщепляет участки ДНК, внешние по отношению к амплифицируемому сайту. Это уменьшит напряжение цепи ДНК, обусловленное суперскрученностью. После удаления рестриктазы фенольной экстракцией и осаждения в этаноле растворите образцы ДНК в ТЕ-буфере и доведите концентрацию до 100 мкг/мл. Очень

разбавленные растворы клонированных ДНК (примерно 0,01 мкг/мл) готовят с добавлением тРНК-носителя в концентрации 100 мкг/мл (см. разд. 5.1).

7. *Олигонуклеотидные праймеры.* Олигонуклеотидные праймеры должны иметь в длину 20—25 нуклеотидов, чтобы обладать достаточной специфичностью. После синтеза следует очистить их при помощи электрофореза и хранить в ТЕ-буфере в концентрации 10 пмоль/мкл при -20°C .
8. *ДНК-полимераза Taq.* Термостабильную ДНК-полимеразу из термофильной бактерии *T. aquaticus* можно приобрести у разных фирм, в частности у New England Biolabs (Beverly, MA) и Perkin-Elmer, Inc. Активность выпускаемых этими фирмами ферментов колеблется от 1 до 10 ед./мкл.

4.2. Методы

1. В микроцентрифужной пробирке смешайте следующие компоненты:
5 мкл $10\times$ буфера ПЦР,
5 мкл $10\times$ смеси dNTP,
5 мкл ДМСО,
1,5—5 мкл геномной ДНК (100 мкг/мл)
или
1,5—5 мкл обработанной рестриктазами клонированной ДНК (0,01 мкг/мл),
25 пмоль каждого олигонуклеотидного праймера (в случае «nested oligo» только первую, наружную пару).
Добавьте воду до 50 мкл.
2. Инкубируйте смесь 5 мин при 95°C для денатурации двухцепочечной ДНК.
3. Центрифугируйте, чтобы собрать все капли конденсата (воспользуйтесь микроцентрифугой).
4. Добавьте 2 единицы ДНК-полимеразы Taq.
5. Поверх образца наклоните 50 мкл минерального масла для предотвращения испарения во время последующих нагреваний.
6. Инкубируйте образец 30 с при 50°C , чтобы произошла реассоциация олигонуклеотидных праймеров с комплементарными последовательностями в ДНК.
7. Инкубируйте образец при 65°C , чтобы прошла реакция полимеризации ДНК. Время, необходимое для полной полимеризации, зависит от длины амплифицируемой последовательности. Полимеризация в данных условиях происходит примерно со скоростью 500 нуклеотидов в минуту; минимальное время инкубации — 1 мин.

8. Инкубируйте образец 1 мин при 93 °С, чтобы денатурировать двойные цепи ДНК.
9. Повторите стадии с 6 по 825—30 раз. Добавлять ДНК-полимеразу Taq в промежутках между циклами необязательно.
10. В случае «nested oligo» перенесите 1 мкл десятикратного разведения реакционной смеси первой реакции амплификации в другую пробирку, которая содержит:
 - 5 мкл 10×буфера ПЦР,
 - 5 мкл 10×смеси dNTP,
 - 5 мкл ДМСО,
 - 25 пмоль каждого из второй пары внутренних олигонуклеотидных праймеров,
 - H₂O до 50 мкл.
11. Повторите стадии 2—9 для амплификации второй (внутренней) последовательности.
12. Примерно десятую часть продуктов реакции амплификации исследуйте при помощи электрофореза в агарозном геле. Во многих случаях получается одна полоса, окрашенная бромистым этидием. Можно даже примерно рассчитать количество амплифицированной ДНК. Обычно при амплификации последовательности длиной 1 т. п. н. из 0,3 мкг геномной ДНК млекопитающих получают 1 мкг амплифицированной последовательности. При амплификации маленького фрагмента ДНК последовательно с двумя парами праймеров (внутренних и внешних) можно получить несколько микрограмм такого «внутреннего» фрагмента. Иногда в геле обнаруживаются дополнительные полосы, происхождение которых неизвестно. Однако они не мешают анализу специфических фрагментов методом РНКазного расщепления или ДГГЭ. При использовании метода «nested oligo» такие полосы не появляются.

5. Метод РНКазного расщепления

Основное внимание в этом разделе уделено экспериментальным особенностям каждой стадии процесса РНКазного расщепления, включая получение меченого РНК-зонда. Большинство этапов аналогично описываемым в оригинальных работах, но приведены и некоторые модификации. Обсуждаются также возможные методические трудности и способы их преодоления.

Отметим, что для данного метода необязательно, чтобы концевые участки РНК-зонда и тестируемого образца ДНК были строго комплементарны. Выступающие некомплемментарные 5'-

или 3'-концы зонда не мешают анализу, так как они просто разрушаются РНКазой в процессе реакции расщепления. В принципе даже полезно иметь выступающие концы, удлиняющие зонд на 5—10% по сравнению с фрагментом ДНК. Это позволяет различать зонд и гибридный фрагмент дикого типа, получающийся при РНКазном расщеплении (см. рис. 1). Кроме того, выступающие концы дают возможность проверить активность РНКазы: если фермент инактивирован или активность его недостаточна, то не происходит их эффективного удаления и они обнаруживаются при радиоавтографии.

5.1. Материалы

5.1.1. Реактивы для получения РНК-зондов

Для получения равномерно меченных РНК-зондов необходимы те же реактивы, что и для реакций РНКазного расщепления. Здесь мы приводим условия использования РНК-полимераз и промоторов из бактериофагов SP6, T7 и T3. Более подробную информацию по синтезу РНК-зондов можно получить из оригинальных публикаций, посвященных системе SP6 [26, 35, 37].

Чтобы предупредить нежелательные последствия активности чужеродных рибонуклеаз, следует соблюдать определенные меры предосторожности при приготовлении растворов, при работе с пробирками, автоматическими пипетками и т.д. Растворы, выдерживающие нагревание, необходимо автоклавировать и хранить в стерильном виде. Бычий сывороточный альбумин, диэтиотрейтол и другие растворы, не выдерживающие автоклавирования, следует готовить на стерильной воде и хранить в стерильных пробирках или бутылках. При работе с РНК желательно также стерилизовать пластиковую посуду и регулярно чистить стержни автоматических пипеток.

1. *Матричная ДНК.* Фрагмент ДНК-мишени нужно клонировать в плазмидном или фаговом векторе в участке, примыкающем к высокоспецифическим последовательностям промотора бактериофага. В качестве векторных систем обычно используются фаги SP6, T7 и T3. Имеются также векторы с одним либо двумя промоторами, обращенными к полилинкерным клонирующим сайтам, например pSP70-серии (Krieg and Melton [39]), pGEM-серии (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), pBluescribe-серии (Stratagene Inc., La Jolla, CA). В идеальном случае последовательность-мишень встраивается в полилинкер между промоторами так, чтобы обратные РНК-транскрипты можно было получать с обеих ее целей.

После клонирования последовательности-мишени в век-

торной плазмиде с двумя промоторами обработайте 10—20 мкг плазмидной ДНК рестриктазой, разрезающей по одному из концов мишени или внутри полилинкерной последовательности. В результате вы получите матрицу для обратной транскрипции. Если в качестве зонда предстоит использовать обе цепи матричной ДНК, обработайте такое же количество ДНК еще одной рестриктазой, разрезающей по противоположному концу последовательности-мишени. Экстрагируйте обработанную рестриктазами ДНК фенолом, осадите этанолом и перерастворите в ТЕ в концентрации 1000 мкг/мл.

2. *РНК-полимеразы*. Очищенные РНК-полимеразы из SP6, T7 и T3 выпускаются многими фирмами. Поступающие в продажу препараты обычно имеют концентрацию 5—20 ед./мл.
3. *Меченые нуклеотиды*. Приобретите один из четырех нуклеозидтрифосфатов (NTP), меченный фосфором в альфа-положении с удельной активностью 400 Ки/ммоль. Мы рекомендуем меченый GTP и приводим методику получения зонда на основе именно этого нуклеотида. Можно одновременно использовать и еще один меченый NTP, изменив соответственно количество взятых в реакцию немеченых нуклеозидтрифосфатов.
4. *Немеченый GTP*. 2 мМ раствор «холодного» GTP (или другого нуклеотида, соответствующего меченому NTP) хранить при -70°C .
5. *Смесь 3-NTP*. Для приготовления «3-NTP» используют 50 или 100 мМ исходные растворы остальных трех нуклеотидов в ТЕ-буфере. Концентрация каждого NTP в смеси 10 мМ. Хранить при -70°C .
6. *10 \times буфер для транскрипции*. Для приготовления 1 мл буфера необходимо:

400 мМ трис-HCl, pH 7,5	400 мкл 1 М раствора
60 мМ MgCl ₂	60 мкл 1 М раствора
20 мМ спермидина	200 мкл 100 мМ раствора
	340 мкл H ₂ O
7. *Исходный раствор DTT*. Приготовьте 1,0 М исходный раствор DTT в воде и храните его при 20 °C.
8. *Исходный раствор БСА*. Приготовьте водный раствор без РНКазного БСА в концентрации 1 мг/мл и храните при -20°C .
9. *Плацентный ингибитор РНКазы*. Плацентный ингибитор РНКазы производится различными фирмами, в том числе и фирмой Promega Biotec Inc.
10. *ДНКазы I*. Приобретите сверхчистую, свободную от РНКазы ДНКазу I и приготовьте водный раствор в концентрации 1 мг/мл. Храните в аликвотах при -20°C или -70°C . В сво-

ей работе мы пользовались ДНКазой фирмы Coorger Biochemical (Worthington, каталоговый номер LS06333).

11. *ДСН*. Приготовьте 25%-ный исходный раствор ДСН в воде. Если есть возможность, используйте реактив «сверхчистой» квалификации. Не автоклавируйте. Храните при комнатной температуре.
12. *тРНК-носитель*. На некоторых этапах процесса требуется тРНК-носитель, свободный от примесей РНКазы и ДНКазы. Мы рекомендуем использовать дрожжевую тРНК, тщательно очищенную следующим образом:
 - а) суспендируйте тРНК в ТЕ из расчета 20 мг/мл, добавьте ДСН до 0,1% и протеиназу К до конечной концентрации 100 кмг/мл;
 - б) инкубируйте при 37°—50 °С в течение ночи;
 - в) экстрагируйте 3—4 раза фенолом и диализуйте в течение ночи против нескольких литров ТЕ;
 - г) доведите концентрацию до 5 мг/мл и храните в аликвотах при —70°С.

5.1.2. Реактивы для отжига, расщепления и анализа гелей

Для отжига, реакций расщепления и анализа гелей в процессе РНКазного расщепления требуются следующие реактивы:

1. *Тестируемая ДНК*. Тестировать можно геномную или клонированную ДНК, амплифицированную в ПЦР, просто клонированную и неамплифицированную геномную ДНК. Получение ДНК в ПЦР описано в разд. 4. Клонированную и неамплифицированную геномную ДНК следует предварительно обработать рестриктазами для последующего количественного учета, а также для достижения максимально эффективной денатурации и реассоциации с зондом. Обработайте ДНК рестриктазами, выщепляющими тестируемый фрагмент, удалите ферменты фенольной экстракцией, сконцентрируйте ДНК, осадив ее этанолом. Ресуспендируйте в ТЕ-буфере в концентрации 100 мкг/мл.
2. *Буфер для гибридизации*. Для приготовления 10 мл необходимо:

80% формамида	8 мл деионизованного формамида
50 мМ PIPES буфера,	1 мл 0,5 М PIPES, pH 6,4
pH 6,4	1 мл 5 М раствора NaCl
500 мМ	20 мкл 0,5 М раствора ЭДТА, pH 8,0
1 мМ ЭДТА	H ₂ O до 10 мл
	Не автоклавируйте

Примечание: приобретайте формамид высокого качества и деионизируйте, осторожно перемешивая с ионообменной смолой Dowex AG50W (200—400 меш; «Mixed Bed Resin», Bio-

gad (Ipc.) или ее аналогами в течение 30 мин при комнатной температуре. Используйте примерно 2 г смолы на 100 мл формамида. Соберите формамид, профильтровав его через ватмановскую бумагу 1 ММ и храните в плотно закрытых пробирках при -20°C или -70°C .

Некоторые партии формамида содержат примеси, разрушающие РНК, особенно при высоких температурах. Это приводит к появлению на радиоавтографах высокого фона продуктов реакции РНКазного расщепления. Если остро встает проблема с фоном, рекомендуем перекристаллизовать формамид перед использованием.

3. *Буфер для РНКазной реакции.* Для приготовления 100 мл необходимо:

20 мМ трис-НСl, рН 7,5	2 мл 1 М раствора трис-НСl, рН 7,5
200 мМ NaCl	4 мл 5 М раствора NaCl
100 мМ LiCl	10 мл 1 М раствора LiCl
1 мМ ЭДТА	0,2 мл 0,5 М раствора ЭДТА, рН 8,5
	H ₂ O до 100 мл

Стерилизуйте автоклавированием

4. *Исходный раствор РНКазы А.* Приобретайте очищенную кристаллическую рибонуклеазу А (РНКазу А). Мы успешно использовали РНКазу различных марок, но самые хорошие результаты были получены с ферментом фирмы Sigma (каталоговый номер R-5125):

а) в пробирке с завинчивающейся крышкой приготовьте водный раствор РНКазы А из расчета 2 мг/мл. Будьте очень осторожны; избегайте загрязнения рук, лабораторного оборудования, посуды, так как фермент очень активен и устойчив во внешней среде;

б) плотно закройте пробирку и поместите в стакан с кипящей водой на 10—15 мин для удаления следов ДНКазы; рН 7,5; 10 мМ ЭДТА и 1% ДСН. Храните в аликвотах при -20°C .

5. *Протеиназа К.* Кристаллическую протеиназу К можно закупать у различных фирм, включая Boehringer Mannheim. Приготовьте исходный раствор 10 мг/мл в 100 мМ трис-НСl, рН 7,5; 10 мМ ЭДТА и 1% ДСН. Храните в аликвотах при -20°C .

6. *2FC.* 2FC представляет собой смесь хлороформа, фенола и изоамилового спирта, используемую для удаления белков после РНКазной реакции. На 500 мл необходимо

50%-ного фенола (уравновешенного ТЕ до рН 7)	250 мл
48%-ного хлороформа	240 мл
2%-ного изоамилового спирта	10 мл
0,01% гидроксихинолина	50 мг

Хранить в темной бутылки при 4°C .

7. *Раствор для нанесения образцов на гель.* На 1 мл
 80%-ный деионизованный формамид 8 мл
 1×ТВЕ 1 мл 10×раствора
 0,01% ксиленианола 0,1 мл 1%-ного раствора
 0,01% бромфенолового синего 0,1 мл 1%-ного раствора
 Хранить при -20°C . H_2O до 10 мл
 10×ТВЕ: 0,9 М Трис-основание, 0,9 М борная кислота,
 ЭДТА, рН довести до 8,3. 25 мМ

8. *Сиквенсные гели.* Меченые РНК-продукты реакции РНКазного расщепления после разделения комплементарных РНК- и ДНК-цепей исследуют электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле с мочевиной, аналогичном используемому при секвенировании ДНК. Приготовление таких гелей и проведение электрофореза в них подробно описано в другой работе [24].

Концентрацию акриламида в таких гелях следует подбирать, добиваясь максимального разделения продуктов реакции РНКазного расщепления. Как правило, если РНК-зонд содержит 500 нуклеотидов и меньше, используют 10—12%-ный полиакриламидный гель. Для зондов длиной 500—1000 нуклеотидов следует готовить 5—6%-ные гели.

5.2. Методы

5.2.1. Синтез РНК-зондов

В этом разделе описывается синтез РНК-зондов путем транскрипции *in vitro* клонированных ДНК, несущих фаговый промотор [37, 38]. Заметим, что удельная активность таких РНК-зондов ниже, чем полученных стандартным способом и традиционно используемых при тестировании геномных ДНК (10 Ки/ммоль на один меченый NTP). Такой активности достаточно для работы с одной десятой от общего количества ДНК, получаемой в ПЦР, или с очень небольшим объемом клонированной ДНК. Преимущество этих зондов состоит в том, что они сохраняют стабильность более 1 нед (а не 1—2 дня, как зонды с высокой удельной активностью). Кроме того, длинные зонды с выступающими концами легче синтезировать так как при этом нуклеозидтрифосфаты не лимитируют реакцию транскрипции. Если исследуется геномная ДНК и не проводится ПЦР, то следует использовать зонды с высокой удельной активностью (200—400 Ки/ммоль по одному из NTP). Важно, чтобы концентрация меченого NTP в начале транскрипции была не менее 10 мкМ, поэтому для синтеза высокоактивного зонда требуется 40—80 мкКи меченого NTP.

1. В стерильной микроцентрифужной пробирке смешайте в следующем порядке:
 - 9 мкл воды,
 - 1 мкл рестрицированной матричной ДНК,
 - 1 мкл смеси 3-NTP,
 - 1 мкл «холодного» GTP (2 мМ),
 - 1 мкл [α -P³²] GTP (10 Ки/мл; 400 Ки/ммоль),
 - 2 мкл DTT (1,0 М),
 - 2 мкл БСА (1 мг/мл),
 - 2—5 единиц плацентного ингибитора РНКазы,
 - 2 мкл 10× буфера для транскрипции.
2. К смеси добавьте 3—5 единиц РНК-полимеразы фагов SP6, T7 или T3.
3. Инкубируйте 1 ч при 40 °С, чтобы прошла транскрипция.
4. Добавьте 1 мкл ДНКазы I (1 мг/мл) для разрушения матричной ДНК; инкубируйте 20 мин при 37 °С.
5. Добавьте 10 мкг тРНК-носителя, 10 мкл воды и 20 мкл ацетата аммония (7 М) и проэкстрагируйте один раз 2FC.
6. После экстракции водный слой осадите этанолом; ресуспендируйте осадок в 80 мл воды, 20 мл ацетата аммония (7 М) и снова осадите этанолом.
7. Ресуспендируйте осадок РНК в 200 мкл ТЕ-буфера, содержащего 0,1% ДСН. Храните при —20 °С.

5.2.2. Реакции отжига и расщепления

Первоначально реакцию гибридизации между меченым РНК-зондом и небольшим количеством комплементарных последовательностей из нескольких микрограмм суммарной геномной ДНК проводили с молярным избытком РНК. Сейчас, когда за счет амплификации ДНК в ПЦР удается получать большие количества специфических фрагментов ДНК, нет необходимости использовать избыток зонда. В описываемых ниже экспериментах используется по существу избыток тестируемой ДНК. Эта модификация позволяет увеличить отношение сигнала к фону, так как в этом случае уже не приходится удалять остаток длинного зонда с помощью РНКазной обработки.

При постановке эксперимента полезно иметь следующие контроли:

контроль 1: неспецифическая гибридизация зонда с тРНК-носителем;

контроль 2: положительный контроль на дикий тип — реассоциация зонда с клонированным фрагментом ДНК дикого типа;

контроль 3: зонд реассоциирует с известным мутантным фрагментом геномной ДНК, клонированным или полученным

в ПЦР. Это дает возможность оценить эффективность расщепления неспаренных участков.

1. В стерильной микроцентрифужной пробирке смешайте следующие компоненты:

1 мкл амплифицированной в ПЦР геномной ДНК в концентрации примерно 100 мкг/мл (можно использовать фрагменты, амплифицированные как обычным путем, так и методом «nested oligo») или 1 мкл рестрицированной клонированной ДНК (100 мкг/мл),

1 мкл меченого РНК-зонда,

30 мкл буфера для гибридизации.

2. Прогретьте смесь 10 мин при 95—100 °С на кипящей водяной бане.
3. Воспользуйтесь микроцентрифужой, чтобы собрать конденсат на дне пробирки.
4. Инкубируйте смесь 60 мин при 40—45 °С, чтобы произошла реассоциация между зондом и комплементарными ему последовательностями в тестируемом фрагменте геномной ДНК.

Примечание: по оригинальной методике гибридизацию проводят в течение 10—12 ч. Считается, что за это время реакция реассоциации между фрагментами геномной ДНК и РНК-зондом достигает насыщения. В клонированных и амплифицированных в ПЦР фрагментах геномной ДНК доля последовательностей-мишеней намного больше, поэтому время гибридизации можно значительно уменьшить. Сокращение сроков инкубации облегчает проведение эксперимента и уменьшает деградацию зонда.

5. Добавьте 350 мкл смеси РНКазы с РНКазным буфером. Как следует перемешайте встряхиванием. Эта смесь представляет собой буфер для РНКазной реакции с разведенной в нем до концентрации 40 мкг/мл прокипяченной РНКазой А и тРНК-носителем в концентрации 20 мкг/мл. Раствор можно приготовить за несколько часов до использования и хранить во льду. На 5 мл смеси (этого количества достаточно для проведения 13—14 реакций) надо 5 мл буфера для РНКазной реакции, 100 мкл исходного раствора (2 мг/мл) прокипяченной РНКазы А, 20 мкл тРНК (5 мг/мл).

Примечание: в большинстве наших опытов по РНКазному расщеплению концентрация РНКазы А была 40 мкг/мл. Однако, используя фермент из другой партии, мы обнаружили, что эта концентрация слишком велика — фермент в таком количестве разрушал гибриды РНК — ДНК. Положительных результатов удалось достичь, снизив его концентрацию до 4 мкг/мл. Поэтому мы рекомендуем каждую новую партию РНКазы перед использованием калибровать

в пределах концентраций от 2 до 40 мкг/мл. Для калибровки желательно использовать как мутантный контрольный образец, так и контрольный образец дикого типа. В оптимальной концентрации РНКазы А эффективно расщепляет неспаренные участки в мутантном образце и дает фоновый сигнал в контроле дикого типа.

6. Инкубируйте 60 мин при 25 °С.

Примечание: по оригинальной методике инкубацию проводили в течение 30 мин. За это время РНКазы А расщепляет многие неспаренные участки лишь частично, что приводит к появлению радиоактивных сигналов в участках геля, соответствующих фрагментам дикого типа. При более длительной обработке удается расщепить эти уже частично расщепленные РНКазой сайты полностью [15]. Легче всего интерпретировать результаты РНКазной обработки, отбирая в процессе реакции аликвоты после 30, 60 и 90 мин инкубации. В ряде случаев полуторачасовая обработка бывает чрезмерной и приводит помимо прочего к деградации концевых областей фрагментов РНК. Поэтому если кинетика реакции не исследована, то оптимальным временем обработки следует считать примерно 60 мин.

7. Остановите РНКазную реакцию добавлением 10 мкл ДСН (25%) и 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл). Инкубируйте 30 мин при 37 °С.
8. Добавьте 10 мкг тРНК-носителя.
9. Экстрагируйте реакционную смесь один раз фенолом и один раз 2 ФС. После первой экстракции осторожно отберите только 300 мкл верхнего водного слоя автоматической пипеткой с пластиковым наконечником и перенесите в другую пробирку. Делается это, чтобы не допустить попадания РНКазы из интерфазы между водным слоем и фенолом.
10. Осадите нуклеиновые кислоты этанолом. Промойте осадок 70%-ным этанолом и высушите.
11. Ресуспендируйте осадок РНК в 10—20 мкл насыщенного раствора формамида. Иногда бывает трудно полностью перерастворить РНК в формамиде. Чтобы ускорить процесс, пипетируйте раствор несколько раз при помощи автоматической пипетки с пластиковым наконечником.

5.2.3. Анализ

1. Перед нанесением образцов проведите пре-электрофорез в течение 1—2 ч.
2. Прогрейте образцы 4 мин на водяной бане при 95—100 °С, чтобы разделить РНК- и ДНК-цепи.
3. Отключите источник питания и отсоедините электроды.

4. Перед внесением образца в лунку промойте ее при помощи капиллярной автоматической пипетки или шприца для подкожных инъекций.
5. 5 мкл образца непосредственно из водяной бани перенесите быстро в лунку геля. Быстро продолжайте процедуру, пока не нанесете все образцы.
6. Присоедините клеммы к аппарату для электрофореза, снова включите источник питания. Проводите электрофорез при 15—20 В до тех пор, пока бромфеноловый синий не достигнет края геля.
7. После окончания электрофореза отключите источник питания, отсоедините клеммы, выньте пластины с гелем из установок. Высушите гель на листе ватмановской бумаги 1 ММ или ее аналога и экспонируйте с рентгеновской пленкой.
Примечание: экспозицию геля с рентгеновской пленкой можно проводить без высушивания. Преимущество высушивания в том, что оно увеличивает разрешающую способность.

6. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез

В этом разделе подробно описана система ДГГЭ.

6.1. Гель-электрофоретическая система

Большинство последовательностей ДНК из естественных источников плавится в интервале температур от 60 °С до 90 °С. Чтобы достичь таких значений и создать крутой денатурирующий градиент в гелях, необходимо проводить электрофорез в них при температуре, близкой к температуре плавления нативных ДНК. Обычно это 60 °С. Гели лучше всего помещать в кюветы, прогретые до 60 °С. Мы обычно пользуемся аппаратом для электрофореза конструкции Лермана и Фишера. Описание его приводится в работах [20] и [28]. Вся система состоит из следующих частей:

1 — устройство, поддерживающее пластины с гелями в таком положении, что образуется верхняя электрофорезная камера;

2 — нижняя электрофорезная камера, служащая в качестве нагреваемой ванны;

3 — термостатирующее устройство;

4 — электроды;

5 — перистальтический насос для постоянного прокачивания буфера из большой нижней камеры в верхнюю камеру меньшего размера.

Эта система поддерживает температуру гелей во время электрофореза с разбросом в 0,1 °С.

6.1.1. Оборудование для проведения электрофореза

Установку и нагревательную систему, пригодные для ДГГЭ, можно получить из разных источников: либо приобрести у фирм-производителей, либо изготовить по эскизам, приведенным в ссылках [20] и [28]. Все оборудование, необходимое для проведения денатурирующего гель-электрофореза, или отдельные его части можно приобрести у следующих фирм:

1) Green Mountain Lab Supply, 86 Central St, Waltham, MA 02154, USA. Эта фирма продает камеры для электрофореза, изготовленные по типу моделей, указанных в ссылках [20] и [28], а также плексигласовые ванны, термостатирующие устройства, стеклянные пластины, гребенки, спейсеры, перистальтические насосы и электроды.

2) Hoefer Scientific Instruments. Эта фирма поставляет установки для электрофореза, которые можно приспособить для ДГГЭ. Установка имеет станину, удерживающую стеклянные пластины в вертикальном положении, и верхнюю электрофорезную камеру, прилегающую к верхнему краю пластин. Фирма дает инструкции по установке пластин и заливке гелей. После заливки геля к пластинам прикрепляется верхняя камера, и все это сооружение опускается в ванну так, чтобы гель был погружен в электрофорезный буфер. Буфер циркулирует через верхнюю камеру за счет перистальтического насоса. Каталогový номер этой установки — Hoefer SE 600.

3) CBS Scientific Company, Po Box 856, Del Mar, CA 92014, USA. Установка, которую делает эта фирма, аналогична описанной в параграфе 2.

Плексигласовую установку для электрофореза можно относительно недорого изготовить и самим. Для этого следует использовать фотографии, имеющиеся в работах [20] и [28]. По желанию можно получить подробные инструкции у Майерса.

Кроме самой установки для электрофореза требуется ряд дополнительных устройств, как правило имеющихся во многих лабораториях. Дополнительное оборудование и фирмы, у которых мы его покупаем, перечислены ниже:

1) термостатирующее устройство. Например, модель 70, Poly-science Corporation (Niles, IL);

2) перистальтический насос. Номер по каталогу J7543-20 (мотор насоса), J7017-20 (головка насоса) и J6411-17 (силиконовые шланги) фирмы Cole Parmer, Inc. (Chicago, IL);

3) ванна. Наиболее удобна ванна шириной 22 дюйма (1 дюйм = 2,54 см), глубиной 6 дюймов, высотой 10 дюймов, сделанная из плексигласа или из стекла толщиной 1/4 дюйма. Этот «аквариум» удерживает две камеры для геля. Его легко сделать самостоятельно, склеив куски плексигласа водо- и тер-

мостойкой смолой, или из кусков стекла, склеив их силиконовым клеем, часто используемым для изготовления и ремонта аквариумов для рыб. Аквариумы, специально приспособленные для ДГТЭ, продает фирма Mountain Lab Supply. Помимо этого аквариумы можно приобрести в зоомагазинах. Единственное предъявляемое к ним в этом случае требование — чтобы они не содержали металлических частей;

4) источник питания. Можно использовать любой источник, дающий 150 В и 150 мА;

5) электроды. Платиновый анод, погружаемый в буфер, можно изготовить, руководствуясь указаниями, содержащимися в работе [20]. Аквариумы фирмы Green Mountain Lab Supply имеют встроенный анод. Катод, помещаемый во время электрофореза в верхнюю камеру меньшего размера, делают из графита или платины. Фирмы Green Mountain Lab Supply и CBS Scientific Co продают графитовые катоды.

6.1.2. Материалы

1. *Исходный раствор акриламида.* Для приготовления 250 мл необходимо:

40% акриламида	10 г акриламида
1,07% бисакриламида	2,7 г бисакриламида
	H ₂ O до 250 мл
	Не автоклавировать.

Оба реактива должны быть самой высокой степени чистоты. Заметим, что отношение акриламида к бисакриламиду в растворе 37,5:1, т. е. степень сшивки в геле примерно в половину меньше, чем в используемых обычно сиквенсных гелях.

2. *20× электрофорезный буфер.* Для приготовления 2 л необходимо:

800 мМ трис-основания	190 г трис-основания
400 мМ ацетата натрия	110 г CH ₃ COONa×3 H ₂ O
20 мМ ЭДТА	15 г Na ₂ ЭДТА
pH 7,4	H ₂ O до 2 л pH доводите уксусной кислотой до значения 7,4

3. *80%-ный денатурирующий исходный раствор.* На 250 мл:

7% акриламида (37,5:1)	44 мл исходного раствора акриламида
32% формамида	80 мл деионизованного формамида (см. разд. 5.1)
5,6 М мочевины	85 г сверхчистой мочевины
1× электрофорезный буфер	12,5 мл 20× электрофорезного буфера
	H ₂ O до 250 мл.

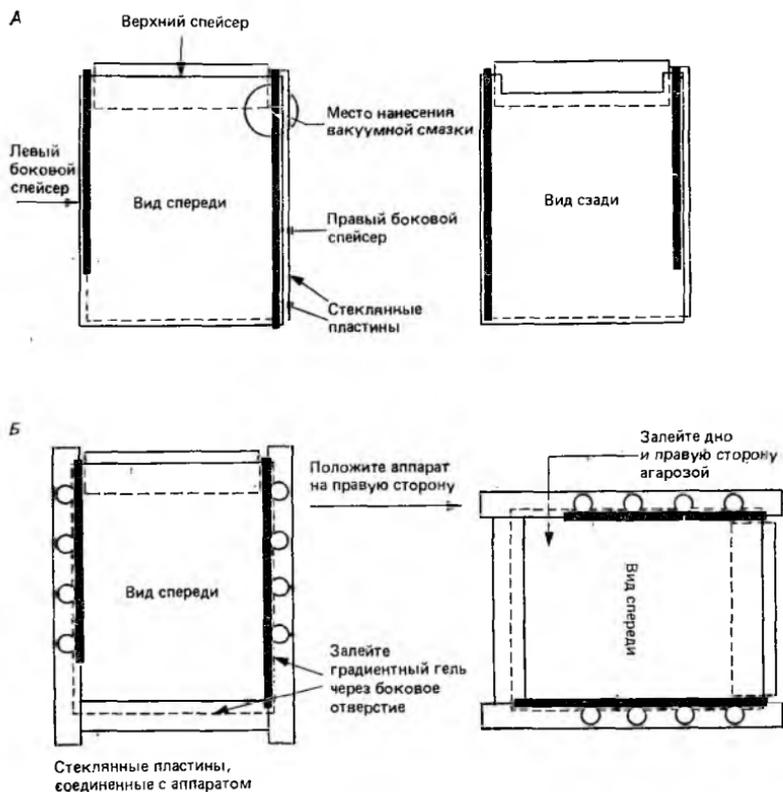


Рис. 7. Приготовление перпендикулярно-градиентного денатурирующего геля. А. Расположение стеклянных пластин и спейсеров. Левый рисунок представляет собой вид спереди стеклянных пластин со вставленными спейсерами для электрофореза. Обратите внимание, что передняя пластина имеет форму прямоугольника (без «ушек»), а задняя пластина имеет «ушки». Левый боковой спейсер помещается между пластинами так, что между ним и основанием геля образуется зазор в 3—4 см. Правый спейсер располагается между пластинами от вершины до самого основания геля. Верхний спейсер вставлен на 1 см ниже пластины с «ушками» и плотно пригнан к боковым спейсерам. Место соединения верхнего и правого бокового спейсеров смазывают небольшим количеством вакуумной смазки. Правый рисунок представляет собой вид пластин сзади. Б. Соединенные пластины и аппарат для электрофореза. Собранные пластины и спейсеры закрепляют в аппарате для электрофореза; основание и правую сторону пластин заливают расплавленной агарозой. Дно заполняют, наливая 50 мл агарозы в кювету, в которой крепятся пластины. После застывания агарозы аппарат для электрофореза переворачивают на правую сторону и через отверстие в нем и зазор с левой стороны заливают градиентный гель.

левой) помещают между пластинами не вровень с нижним основанием геля, а на 3—4 см выше (рис. 7). Еще один спейсер располагают у верхнего края; места его соединения с боковыми спейсерами смазывают небольшим количеством вакуумной смазки. Пластины закрепляют в установке для электрофореза, боковые стороны геля и дно смачивают 1%-ной агарозой в 1× электрофорезном буфере, после чего установку переворачивают на правую сторону и заливают градиентную смесь в зазор на левой стороне (рис. 7). Количество акриламида, необходимое для заливки геля, определяют эмпирически, в большинстве случаев это примерно 16—24 мл.

Для определения характера плавления неизвестного фрагмента ДНК его электрофоретическая подвижность исследуется в вертикальном акриламидном геле фиксированной концентрации с перпендикулярным направлению электрофореза градиентом концентраций денатурирующих веществ от 0% на левой стороне и до 80% на правой стороне. Гель для заливки (из расчета на 16 мл) готовят следующим образом.

1. Добавьте 5 мкл ТЕМЕДа и 80 мкл 10%-ного раствора персульфата аммония к 8 мл 80%-ного денатурирующего исходного раствора, тщательно перемешайте и поместите на лед.
2. Добавьте 5 мкл ТЕМЕДа и 80 мкл 10%-ного персульфата аммония к 8 мл 0%-ного денатурирующего исходного раствора, тщательно перемешайте, поместите на лед.
3. Залейте 80%-ный раствор в резервуар градиент-формера, питающий гель. Удалите пузырьки воздуха из шланга, который соединяет два резервуара, создающие градиент.
4. Во второй резервуар залейте 0%-ный денатурирующий исходный раствор.
5. Медленно, по 2—3 капли, постоянно перемешивая, пропустите 80%-ный градиентный раствор между пластинами для заливки геля через отверстие в левой части камеры. Таким образом, после заливки геля в основании лежащей на боку камеры с гелем концентрация денатурирующих веществ будет 80%, а на вершине — 0%. После того как гель заполимеризуется, верните установку в исходное положение, и направление градиента концентраций от 0% к 80% будет теперь слева направо.
6. После полимеризации поставьте гель в исходное вертикальное положение и уберите верхний спейсер.
7. Поместите установку с гелем в ванну с электрофорезным буфером и подсоедините перистальтический насос так, чтобы буфер поступал из нижней камеры в верхнюю и вытекал через верхний край геля.
8. Образцы ДНК наносите в гель, как описано в разд. 6.2.1.

6.1.4. Приготовление параллельно-градиентных гелей

В параллельно-градиентных гелях направление градиента концентраций ДНК-денатурирующих веществ совпадает с направлением электрофореза: он линейно увеличивается от вершины к основанию геля. Интервал значений концентраций в градиенте выбирается исходя из данных о характере плавления исследуемого фрагмента, полученных с помощью перпендикулярно-градиентного геля. Обычно этот интервал составляет 25% и подбирается так, чтобы образец ДНК начинал плавиться в середине геля. Так, например, параллельно-градиентный гель с градиентом концентраций от 25 до 50% можно использовать при анализе фрагмента ДНК, который плавится при концентрации денатурирующих веществ 37,5%. В таких гелях имеется несколько лунок, так что одновременно в одном геле можно исследовать несколько препаратов ДНК.

Гели для параллельно-градиентного электрофореза готовят так же, как гели с перпендикулярным градиентом, и электрофорез проводят аналогичным образом. По бокам от вершины к основанию вставляют два боковых спейсера точно так же, как в сиквенсных гелях или гелях для анализа белков. После закрепления в аппарате для электрофореза боковые стороны и основание пластин заливают, как обычно, агарозой. Раствор заливают так же, как при обычном вертикальном форезе, только не сбоку, а сверху. После заливки вставляют дельриновую или тефлоновую гребенку и оставляют гель полимеризоваться. Из заподимеризовавшегося геля вынимают гребенку и помещают установку в ванну с нагретым буфером. Все необходимое снаряжение подсоединяется, как при обычном вертикальном электрофорезе.

6.2. Подготовительные эксперименты: перпендикулярно-градиентный и оптимизирующий электрофорезы

Чтобы установить оптимальные условия анализа фрагмента ДНК на нуклеотидные замены методом ДГГЭ, предварительно проводят два относительно простых эксперимента.

1. Анализ фрагмента в перпендикулярно-градиентном геле для определения его доменов плавления и значений T_m для них. По результатам этого опыта определяют оптимальные параметры градиента для последующих множественных анализов в параллельно-градиентном геле.
2. Оптимизирующий гель представляет собой параллельно-градиентный гель с оптимальным градиентом концентраций денатурирующих веществ, определенным на предыдущем этапе. Тестируемый образец при этом наносят в несколько лунок.

и прогоняют в течение разных промежутков времени. Каждый раз ставить такой электрофорез необязательно, но он помогает установить оптимальное время для максимально эффективного выявления однонуклеотидных замен в тестируемом фрагменте ДНК.

6.2.1. Перпендикулярно-градиентный электрофорез: определение характера плавления

Существуют различные методы определения характера плавления фрагмента ДНК в растворе. Зная нуклеотидную последовательность фрагмента, с помощью компьютерного алгоритма Лермана [18, 19, 38, 39] можно предсказать количество, локализацию и T_m его доменов плавления. А эти данные, в свою очередь, позволяют подобрать оптимальные градиент и время для наилучшего разделения мутантных фрагментов в геле. Наряду с компьютерным анализом, который является эффективным и надежным средством определения характера плавления, можно использовать эмпирический подход. В его основе лежит денатурирующий перпендикулярно-градиентный электрофорез в вертикальном геле. Этот метод особенно важен при исследовании неизвестных фрагментов ДНК на полиморфизм и в ряде других случаев, когда неизвестна его нуклеотидная последовательность.

Анализ фрагмента ДНК в таком геле позволяет определить зависимость между подвижностью фрагмента в полиакриламиде и концентрацией денатурирующего вещества. Образец ДНК наслаивается на всю верхнюю часть геля с градиентом денатурирующих веществ, возрастающим слева направо. В процессе электрофореза фрагменты ДНК в левой части геля (с низкой концентрацией денатурирующих веществ) движутся с большой скоростью, соответствующей скорости двухцепочечных молекул. Градиент подобран так, что при прохождении через гель в этих фрагментах не происходит даже частичного плавления. В правой части, где концентрация максимальная, фрагменты начинают плавиться и резко снижать при этом подвижность практически сразу после вхождения в гель. В участках геля с промежуточными концентрациями плавление происходит в разных точках и наблюдается неодинаковое изменение подвижности. Резкое замедление, проявляющееся в увеличении кривизны полосы, происходит, когда концентрация денатурирующего вещества соответствует значению T_m , при котором наступает кооперативное плавление домена. Число позиций, в которых происходит изменение подвижности, на единицу меньше количества доменов плавления во фрагменте ДНК, так как после плавления последнего домена обе цепи фрагмента начинают двигаться независимо и изменение скорости не наблюдается.

На рис. 8, А показано проведение фрагмента ДНК с одним участком изменения подвижности (на геле в виде перегиба) и соответственно с двумя доменами плавления. Точка перегиба находится в том месте геля, где концентрация денатурирующего вещества 58% (что соответствует температуре плавления самого легкоплавкого домена фрагмента). Исходя из этих ре-

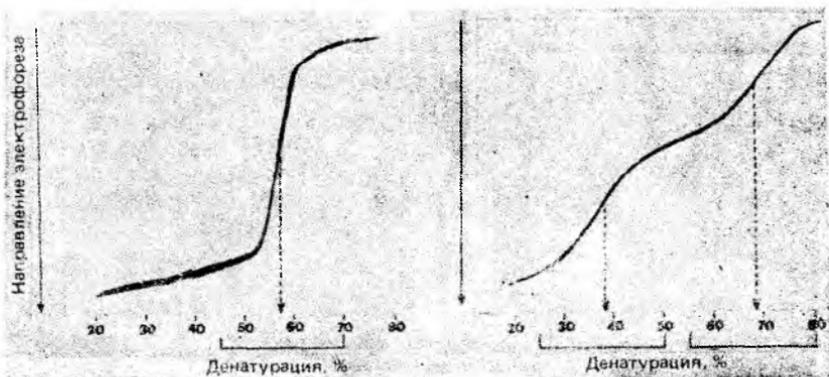


Рис. 8. Перпендикулярно-градиентный денатурирующий гель-электрофорез. В обоих случаях представлены негативы окрашенных бромидом этидия гелей с фракционированными двухцепочечными фрагментами ДНК длиной 450 п. н. А. Перпендикулярно-градиентный денатурирующий гель с фрагментом ДНК длиной 450 п. н., имеющим два домена плавления. Резкое изменение подвижности фрагмента в середине геля происходит в результате плавления его первого домена при концентрации денатурирующего вещества 60%. Температуру плавления этого домена можно определить, установив параметры точки перегиба этого участка. Исходя из полученных данных, параллельно-градиентный денатурирующий электрофорез такого фрагмента следует проводить в геле с концентрациями денатурирующих факторов от 47,5% до 72,5%. Б. Перпендикулярно-градиентный денатурирующий гель с фрагментом ДНК длиной 450 п. н., имеющим три домена плавления. На рисунке видны две области изменения подвижности. Левая, с концентрацией денатурирующего вещества 35%, образуется при плавлении первого домена. Правая образуется в результате плавления второго домена при концентрации денатурирующего вещества 65% [30].

зультатов, можно подобрать оптимальные условия для анализа данного фрагмента в параллельно-градиентном геле. Наилучшее разделение происходит в 10—15%-ных интервалах концентраций денатурирующих веществ с каждой стороны от точки, соответствующей данной T_m . Следовательно, для денатурирующего параллельно-градиентного электрофореза надо выбрать интервал концентраций от 45 до 70%. При таких условиях электрофореза фрагмент входит в гель в двухцепочечном состоянии и сохраняет свою структуру вплоть до того участка, где концентрация денатурирующего вещества состав-

ляет 38%. Здесь начинает плавиться его первый домен, а сам фрагмент замедляет движение.

Второй фрагмент (рис. 8, Б) с двумя участками изменения подвижности содержит три домена плавления. Два низкоплавких домена соответствуют участкам перегиба в геле. Первый плавится при концентрации денатуранта 38%, второй — 68%. Поскольку эти два домена находятся далеко друг от друга, лучше анализировать каждый независимо, в отдельном геле. Первый домен исследуют в денатурирующем геле с градиентом концентраций от 25 до 50%, второй — в геле с градиентом от 55 до 80%. В первом геле, как и в случае на рис. 8, А, фрагмент входит в гель в двунитевой форме, и в середине геля, где концентрация денатуранта примерно 38%, происходит уменьшение его подвижности. Во втором геле (55—80%) первый домен начинает плавиться, как только фрагмент ДНК входит в гель, и такая частично расплавленная молекула медленно проходит через гель до тех пор, пока не достигнет участка, где плавится второй домен. Здесь фрагмент еще больше замедляется.

Результаты, представленные на рисунках, характерны для большинства фрагментов ДНК размером от 100 до 1000 п. н. Обычно в них имеются два или три домена, различия в T_m у которых соответствуют различиям в концентрации денатурирующих веществ в 10—30%. У некоторых фрагментов в вертикальных гелях имеются по два участка перегиба, но T_m этих доменов оказывается очень близкой (в пределах интервала концентраций от 1 до 10%). В таком случае лучше всего проводить один параллельно-градиентный форе́з с несколько большим интервалом концентраций денатурирующих веществ (примерно 30%, причем концентрация в середине геля должна соответствовать значению T_m , среднему для температур плавления двух доменов).

Для проведения перпендикулярно-градиентного электрофореза выполните следующие процедуры.

1. Обработайте 15—20 мкг плазмидной ДНК, несущей вставку ДНК-мишени рестриктазами, выщепляющими эту вставку из плазмидного вектора. Удалите фермент фенольной экстракцией и осадите ДНК этанолом. Ресуспендируйте сначала в 20—40 мкл TE, затем добавьте около 100 мкл нейтрального раствора для нанесения на гель (разд. 6.1.2).

Примечание: для предварительных градиентных электрофорезов, проводимых с целью оптимизации условий, нет необходимости отделять вставку (тестируемый фрагмент) от векторной последовательности. Размеры вектора и вставки сильно различаются, и поэтому скорости продвижения их в геле неодинаковы. Обычно векторные последовательности из-за своего большого размера едва успевают войти в гель.

2. После заливки 0—80%-ного геля и помещения его в нагретую ванну, как описано в разд. 6.1.3, нанесите образец вдоль всей вершины геля капиллярной пипеткой с оттянутым носиком.
3. Поместите катод в верхнюю камеру установки и проведите электрофорез при 150 В.

Примечание: продолжительность электрофореза строго не регламентирована. Приблизительный расчет, исходя из размера фрагмента и процента акриламида, следующий:

Размер фрагмента (п. н.)	Концентрация акриламида	Время (ч)
50 — 300	14%	7,5
300 — 500	7%	5
500 — 750	7%	7,5
750 — 1000	7%	10

4. По окончании электрофореза отключите источник питания, отсоедините катод и перистальтический насос, выньте пластины с гелем из установки. Разъедините пластины и поместите гель в раствор бромида этидия (5 мкг/мл) на 10—20 мин.

Примечание: бромид этидия — канцероген. Работайте с гелями, окрашенными бромидом этидия, только в перчатках и тщательно мойте руки после работы.

5. Визуализируйте окрашенные этидием фрагменты ДНК в УФ-трансиллюминаторе. Положите линейку с четкими делениями (любого цвета, кроме красного) вдоль основания геля и отметьте нуль в крайней левой точке (с низкой концентрацией денатурирующих веществ). Сфотографируйте гель.
6. Используйте деления линейки на фотографии для определения расстояния от точки с 0%-ной концентрацией денатурирующего вещества до участка перегиба (рис. 8). Используйте эти значения для определения концентрации, при которой происходит перегиб.

6.2.2. Определение продолжительности электрофореза в параллельно-градиентных гелях: гели для оптимизации продолжительности электрофореза (оптимизирующие гели)

Профиль плавления фрагмента ДНК определяется электрофорезом в перпендикулярно-градиентном геле. Подобранные условия воспроизводят затем на параллельно-градиентных гелях. Наряду с этим следует проводить эксперименты по выявлению оптимального времени проведения параллельно-градиентного электрофореза. Цель таких опытов — установить продолжительность электрофореза, достаточную для того, чтобы фрагмент ДНК достиг участка геля, в котором концентрация денатурирующего вещества вызывает плавление исследуемого в дан-

ном фрагменте домена. В действительности для максимально эффективного разделения рекомендуется проводить электрофорез в течение еще некоторого времени после плавления домена.

Для определения оптимального времени электрофореза можно поставить простой эксперимент с оптимизирующим гелем. Аликвоты клонированного фрагмента тестируемой ДНК, выщепленного рестриктазами из вектора, наносят на параллельно-градиентный гель с интервалом в 1 ч. Проводят электрофорез и затем окрашивают гель бромидом этидия, как было описано выше. Фотографируя гель с линейкой-маркером, расположенной сбоку, можно установить, в результате какого из нанесений (по времени) фрагмент ДНК оказался в зоне геля с концентрацией денатурирующего вещества, соответствующей T_m его первого домена плавления (рис. 9, А).

Во многих случаях достаточно лишь взглянуть на гель, чтобы понять, в результате какого из нанесений фрагмент прошел достаточное расстояние в геле, чтобы начать плавиться (на это укажет резкое снижение подвижности). Исходя из рисунка 9, Б, оптимальным временем электрофореза изображенного на нем фрагмента следует считать 8 ч. Сюда входит время, в течение которого наблюдается первое снижение скорости, и еще 2 ч. Степень замедления при плавлении домена зависит от ряда факторов, в том числе и от размера домена.

Независимо от того, бывает замедление резким или оно происходит плавно, один из двух результатов, полученных при помощи оптимизирующих гелей, можно использовать для определения оптимальной продолжительности электрофореза.

Если имеется даже один вариант фрагмента ДНК в виде клонированной молекулы, то для оптимизации условий проведения электрофореза можно использовать его вместе с фрагментом дикого типа. В этом случае в соседние лунки наносят фрагменты дикого типа и имеющийся вариант фрагмента ДНК. Для последующих электрофорезов подбирают условия и время, позволяющие добиться максимального разделения этих двух фрагментов (рис. 7, В).

1. Поместите параллельно-градиентный гель в нагретую ванну и подсоедините все, как описано в разд. 6.1.4. Для оптимизирующих гелей желательно перед помещением их в аквариум отметить на стеклянных пластинах положение лунок.
2. Обработайте 20—40 мкг плазмидной ДНК рестриктазами (как описано в разд. 6.2.1), чтобы выщепить тестируемую вставку. Ресуспенсируйте в ТЕ и нейтральном растворе для нанесения на гель так, чтобы концентрация ДНК была примерно 250 мкг/мл.
3. Внесите 4—5 мкл образца в лунку с левой стороны геля. Пометьте ее фломастером на стекле, чтобы избежать повтор-

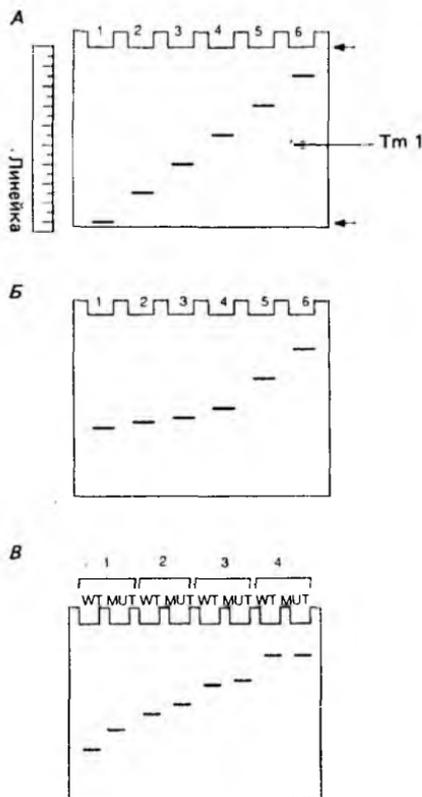


Рис. 9. Гели для оптимизации продолжительности электрофореза (оптимизирующие гели). На каждом рисунке показаны результаты, полученные в параллельно-градиентных денатурирующих гелях с нанесением образцов через определенные промежутки времени. Такие оптимизирующие гели дают представление об оптимальной продолжительности электрофореза, проводимого с целью максимального разделения мутантного фрагмента ДНК и фрагмента ДНК дикого типа. А. Оптимизирующий гель с фрагментом ДНК, не претерпевшим заметных изменений подвижности по достижении участка с концентрацией денатурирующего вещества, соответствующей температуре плавления первого домена. Расстояние между вершиной и основанием геля измерено линейкой. Полученная информация используется для определения участка геля, соответствующего T_m первого домена плавления. Это значение в свою очередь было предварительно установлено в перпендикулярно-градиентном электрофорезе. Промежуток времени, за который фрагмент достигнет данного участка, считается минимальной продолжительностью проведения последующих электрофорезов. Обычно для получения оптимальных результатов к этому времени прибавляют еще 1—2 ч. Б. Оптимизирующий гель с фрагментом ДНК, резко изменившим подвижность при плавлении первого домена. Электрофорез в течение 12 ч (луника 1), 10 ч (луника 2), 8 ч (луника 3), 6 ч (луника 4), 4 ч (луника 5) и 2 ч (луника 6). Через восемь часов прохождения через гель, когда начинается процесс плавления, фрагмент замедляет движение. Оптимальное время для последующих электрофорезов этого фрагмента — 9—10 ч. В. Оптимизирующий гель с мутантными фрагментами и фрагментами дикого типа. Если имеется известный мутантный фрагмент, то гели такого типа можно использовать для эмпирического определения оптимального времени электрофореза. Это время, за которое достигается максимальное разделение мутантного фрагмента и фрагмента дикого типа.

ной загрузки одной и той же лунки. Проводите электрофорез 1 ч при 150 В.

- Аналогичным образом загрузите аликвоты образца в следующие лунки с интервалом в 1 ч. Установить, какое понадобится количество нанесений, трудно, поэтому мы рекомендуем по крайней мере шесть нанесений. После последнего нанесения проводите электрофорез в течение времени, необходимого, чтобы фрагмент ДНК прошел одну треть или четверть длины геля, считая от вершины. Обычно это 4—6 ч.

Примечание: в гелях, предназначенных для обнаружения нуклеотидных замен во втором или третьем домене плавления, концентрация денатурирующих веществ подобрана так, что самый легкоплавкий домен начинает плавиться сразу при вхождении фрагмента ДНК в гель. Электрофорез в данном случае необходимо проводить более длительное время (это объясняется снижением подвижности фрагментов, вызванной быстрым плавлением первого домена).

- После электрофореза окрасьте и сфотографируйте гель. По линейке-маркеру или по наблюдаемому резкому снижению подвижности установите время электрофореза, необходимое для инициации плавления. Прибавьте 1—2 ч и вы получите время, в течение которого необходимо проводить электрофорез, работая с этим образцом ДНК.

6.3. Приготовление зондов для анализа при помощи ДГГЭ

Существует несколько способов приготовления зондов и анализа тестируемых образцов с целью обнаружения нуклеотидных замен в геномной, клонированной или амплифицированной в ПЦР ДНК при помощи ДГГЭ. Вот некоторые из них.

- Использование одноцепочечных ДНК-зондов, меченных равномерно или по концам; их реассоциация с денатурированной тестируемой ДНК для получения гетеродуплексов и непосредственного выявления замен в них с помощью электрофореза и последующей радиоавтографии гелей [17].
- Использование одноцепочечных равномерно меченных РНК-зондов для получения гетеродуплексов с последующим выявлением замен с помощью электрофореза и радиоавтографии геля [20].
- Использование двухцепочечных ДНК-зондов, меченных по одной из цепей; отжиг их с избытком немеченой ДНК исследуемого образца, получение гетеродуплексов, электрофорез и непосредственное обнаружение замен с помощью радиоавтографии геля.
- Использование равномерно меченных одноцепочечных РНК-зондов, их отжиг с клеточной мРНК и непосредственное вы-

явление замен с помощью радиоавтографии геля (см., например, [31]).

5. Электрофорез гомодуплексов в градиентном геле с последующим электроблоттингом геля и гибридизацией блота с меченым зондом.
6. Анализ изменения подвижности гомодуплексов клонированных или амплифицированных в ПЦР фрагментов ДНК (как мутантных, так и дикого типа) в гелях, окрашенных бромидом этидия.

Во всех случаях зонды следует синтезировать так, чтобы они как можно точнее соответствовали полученным в ПЦР или при рестриктазном расщеплении исследуемым фрагментам ДНК. Для ДГГЭ допустима некоторая избыточность 5- и/или 3-концевых последовательностей зонда в гетеродуплексе с тест-фрагментом, но надо стараться, чтобы она не превышала 40 нуклеотидов.

В данном разделе мы приводим методики синтеза двух типов зондов: равномерно меченных и меченных по концам одноцепочечных ДНК-зондов. РНК-зонды для ДГГЭ синтезируют, как описано в разд. 5.2 для метода РНКазного расщепления.

6.3.1. Одноцепочечные ДНК-зонды

Методы, используемые нами для синтеза равномерно меченных и меченных по концам одноцепочечных ДНК-зондов, очень похожи. Принцип их проиллюстрирован на рис. 10. Фрагмент ДНК, который предстоит исследовать, клонируется в репликативной форме бактериофага или в плазмидном векторе, продуцирующем одноцепочечные кольцевые молекулы только одной ориентации. Две наиболее распространенные системы такого типа — бактериофаг M13 и плазмиды, несущие точки начала репликации фага M13. Олигонуклеотидный праймер реассоциируют с одноцепочечной кольцевой молекулой так, чтобы он инициировал синтез ДНК на матрице тестируемой вставки в направлении от 5'- к 3'-концу. Для равномерно меченных зондов один из используемых при синтезе dNTP метится изотопами ^{32}P или ^{35}S в альфа-положении. Для зондов с концевой меткой олигонуклеотид метят по 5'-концу [γ - ^{32}P]АТФ, а для синтеза ДНК используют холодные dNTP. По окончании синтеза ДНК обрабатывается рестриктазой, расщепляющей кольцевую молекулу у конца вставки, противоположном сайту реассоциации с олигонуклеотидным праймером. В результате такой реакции получается линейный фрагмент ДНК, состоящий частично из двухцепочечного и частично из одноцепочечного участков. Денатурируя ДНК и проводя препаративный электрофорез в поли-



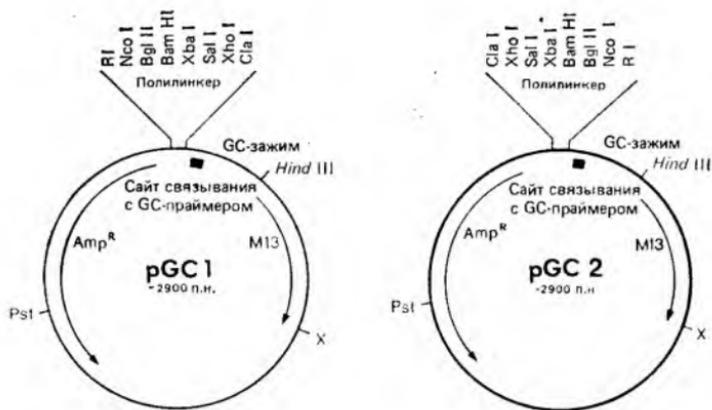
Рис. 10. Синтез одноцепочечного ДНК-зонда. Одноцепочечную плазмидную ДНК отжигают с олигонуклеотидным праймером, праймер удлиняется за счет достройки дезокси-нуклеозидтрифосфатов при участии ДНК-полимеразы в направлении от 5'-к 3'-концу. После реакции полимеризации, в результате которой, как правило, не удается получить последовательность ДНК, равную по длине плазмидной, двухцепочечный участок молекулы обрабатывают рестриктазой, расщепляющей его у дистального конца тестируемой вставки. При расщеплении образуется линейный фрагмент, имеющий частично двухцепочечную и частично одноцепочечную структуры. Смесь нагревают в формамиде и проводят препаративный электрофорез в денатурирующем акриламидном (сиквенсном) геле для разделения цепей зонда и ДНК-матрицы. Разделение происходит хорошо, так как цепи сильно различаются по размеру. Меченую цепь зонда затем элюируют из геля. Заметим, что, согласно этой схеме, зонд можно метить двумя способами: 1 — удлинять за счет меченых dNTP с образованием равномерно меченного зонда или 2 — меченным по 5'-концу олигонуклеотидом и холодным dNTP, получая зонд с концевой меткой.

акриламидном геле, можно отделить более короткие молекулы одноцепочечного зонда от более длинных цепей ДНК-матрицы.

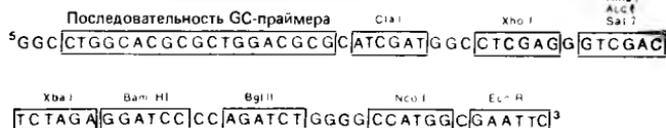
Ниже приводятся три методики.

1. Подготовка одноцепочечной матричной ДНК.

- а) клонируйте тестируемую вставку ДНК в плазмидном векторе, несущем участок начала репликации фага М13, например в рGC1 и рGC2 (рис. 11; [30]);
- б) нарастите 10 мл культуры какого-либо штамма *E. coli*, несущего плазмиду и F'-фактор, до стационарной фазы, например LE392F' [40] или HM101 [41]. Культивируйте клетки на среде LB с антибиотиком (как правило, с ампициллином) для селекции плазмиды;
- в) инфицируйте культуру хелпером, чтобы иметь компоненты фага, необходимые для упаковки одноцепочечной ДНК, например M13gvl [40]. Множественность инфекции — от 20 до 200. Смешайте фаг с культурой и инкубируйте при комнатной температуре 10 мин.
Примечание: 10 мл культуры *E. coli*, выращенной до ОП590=0,5, содержат примерно 4×10^9 бактерий;
- г) внесите 10 мл инфицированной культуры в 500 мл среды LB с антибиотиком для селекции плазмиды. Инкубируйте на качалке 10—14 ч;
- д) отцентрифугируйте 500 мл культуры 15 мин при 4000g, чтобы осадить бактерии;
- е) перелейте супернатант в центрифужный стакан (на 1 л), в котором уже находится 125 мл раствора ПЭГ/NaCl. Хорошо перемешайте встряхиванием и оставьте во льду на 2—12 ч (раствор ПЭГ/NaCl: 20% полиэтиленгликоля 8000 и 2,5 M NaCl);
- ж) осадите комплекс фаг/ПЭГ центрифугированием при 4000 g в течение 20 мин. Осторожно слейте супернатант;
- з) суспендируйте осадок фага в остаточном количестве супернатанта пипетированием. Перенесите в пластиковую пробирку (емкость 5—15 мл) и переосадите фаг центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин. Высушите в вакууме, чтобы удалить следы жидкости;
- и) ресуспендируйте осадок фага в 2 мл ТЕ. Отцентрифугируйте при 4000 g 15 мин для осаждения клеточного дебриса. Супернатант, представляющий собой раствор фага, перенесите в другую пробирку;
- к) дважды экстрагируйте раствор фага фенолом и один раз 2FC (см. разд. 5.1);
- л) добавьте ацетат натрия до 0,3 M и осадите одноцепочечную ДНК этанолом. Ресуспендируйте осадок ДНК в 0,5—1,0 мл ТЕ и определите количество ДНК спектрофотомет-



pGC 1 Полилинкерная последовательность



pGC 2 Полилинкерная последовательность

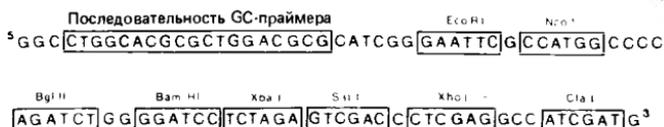


Рис. 11. Рестрикционные карты pGC1 и pGC2. Эти плазмиды несут участок начала репликации фага M13, что позволяет получать из них одноцепочечные кольцевые формы и инфицировать ими клетки при участии хелперных фагов. Единственное различие между этими плазмидами в ориентации полилинкерного клонирующего участка. Таким образом, обе цепи вставленного фрагмента можно выделить путем непосредственного клонирования в любом из этих векторов. Организация участка начала репликации (origin) такова, что одноцепочечные ДНК в каждом векторе достраиваются при участии праймера от 5'- к 3'-концу в направлении, противоположном началу репликации фага M13, указанному стрелками. Плазмида состоит из следующих последовательностей против часовой стрелки от полилинкера: а) от полилинкера к «X» — нуклеотиды pBR322 от 4362- до 2440-го. Этот сегмент включает β-лактамазный ген и последовательности, контролирующие его активность, а также участок начала репликации pBR322; б) от «X» к HindIII — нуклеотиды фага M13 от 6000- до 5530-го. Этот сегмент включает участок репликации фага M13, выделенный Сидом [40]; в) от HindIII к полилинкеру — «GC-зажим» (длиной 300 п. н.), выделенному из последовательностей человека, расположенных на генной карте «выше» β-глобиновых генов [18, 19]. (Перепечатано из работы [30].)

рически при ОП₂₆₀, принимая коэффициент экстинкции равным 38 ОП/1 мг/мл раствора.

2. *Приготовление равномерно меченных одноцепочечных ДНК-зондов.* Перечень необходимых материалов:

- а) одноцепочечная ДНК-матрица (10—1000 мкг/мл);
- б) олигонуклеотидный праймер (10 пмоль/мкл), один из двух, используемых при амплификации исследуемого фрагмента ДНК в ПЦР (см. разд. 4.2). Если применяется метод «nested oligo», синтез зонда следует проводить с одним из внутренних олигонуклеотидных праймеров, используемых на втором этапе амплификации;
- в) 10×3-dNTP смесь (dGTP, dCTP, dTTP, концентрация каждого — 1,5 мМ);
- г) раствор «холодного» dATP (1 мМ dATP);
- д) [α -³²P] dATP (400 Ки/ммоль);
- е) 10× буфер для синтеза зонда: 100 мМ трис-НСl (рН 7,8), 100 мМ MgCl₂, 500 мМ NaCl и 20 мМ DTT;
- ж) фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы из *E. coli* (5—20 ед./мкл);
- з) соответствующие рестриктазы;
- и) денатурирующие полиакриламидные (сиквенсные) гели для препаративных целей с гребенками и спейсерами (толщина 0,6—1,0 мм, ширина лунок — 1,5—2,5 см) и формамидный денатурирующий раствор для нанесения на гель (см. разд. 5.1).

Синтез зонда по приводимой здесь схеме позволяет получить одноцепочечную меченную ДНК с удельной радиоактивностью 10 Ки/ммоль по одному меченому дезозоксинуклеотиду (dATP):

- а) в микроцентрифужную пробирку внесите следующие компоненты:
 - 1 мкг одноцепочечной матричной ДНК;
 - 1 мкл олигонуклеотидного праймера (10 пкмоль/мкл);
 - 2 мкл 10× буфера для синтеза зонда;
 - H₂O до 15 мкл;
- б) инкубируйте при 45—50 °С 30 мин, чтобы произошла реассоциация олигонуклеотидного праймера с ДНК-матрицей;
- в) внесите следующие компоненты:
 - 2 мкл 10× 3-dNTP смеси;
 - 1 мкл раствора «холодного» dATP (1 мМ dATP);
 - 1 мкл [α -³²P]dATP (400 Ки/ммоль);
 - 5 ед. фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы;
- г) инкубируйте 1 ч при комнатной температуре;
- д) нагрейте реакционную смесь до 70 °С, чтобы остановить реакцию ДНК-полимеризации. Добавьте буфер для рестрикции и воду до 100 мкл, а затем 5 ед. соответствующей

шей рестриктазы для расщепления рекомбинантной ДНК у дистального конца вставки;

- е) добавьте 10 мкг тРНК-носителя, экстрагируйте фенолом и осадите этанолом;
- ж) ресуспендируйте осадок в 25 мкл формамидного раствора для нанесения на гель (см. разд. 5.1);
- з) прокипятите образец 3—4 мин и немедленно нанесите в лунку денатурирующего полиакриламидного геля с мочевиной (сиквенсного геля) шириной 1,5—2,5 см.
Примечание: для зондов длиной 100—500 нуклеотидов применяйте 7%-ный акриламидный гель, для зондов длиной 500—1000 нуклеотидов используйте 5%-ный гель;
- и) проводите электрофорез при 20—30 Вт (1000—1500 В) до тех пор, пока бромфеноловый синий не достигнет конца геля;
- к) определите локализацию меченого зонда путем радиоавтографии геля. Вырежьте радиоактивную полоску геля, размельчите ее и экстрагируйте ДНК, как описано в работе [42], используя 10 мкг тРНК-носителя. После осаждения этанолом ресуспендируйте осадок зонда в 50 мкл ТЕ.

3. Подготовка одноцепочечных ДНК-зондов, меченных по концам.

Метод получения зондов с концевой меткой почти идентичен методу, описанному выше, однако имеются и некоторые различия:

- а) олигонуклеотидный праймер метится по 5-концу и полинуклеотидкиназой, как будет описано ниже;
- б) в отличие от ДНК-полимеразной реакции, где используется смесь этих немеченных нуклеотидов, а также «холодный» и меченный [α - ^{32}P]dATP, в этой реакции необходима смесь всех четырех немеченных dNTP.

Ниже приводится схема опыта по получению олигонуклеотидного праймера, меченного ^{32}P по 5'-концу:

- а) в микроцентрифужной пробирке смешайте следующие компоненты:
 - 1 мкл олигонуклеотидного праймера (10 пмоль/мкл);
 - 2 мкл 10× киназного буфера;
 - 2 мкл DTT (100 мМ);
 - 14 мкл H_2O ;
 - 100 мкКи [γ - ^{32}P]dATP (1000—7000 Ки/ммоль);
 - 5 ед. полинуклеотидкиназы;
 - конечный объем реакционной смеси 20 мкл;
 - 10×киназный буфер=0,5 М трис-НСl, рН 9,5, 0,1 М MgCl_2 , 10 мМ спермидин, 1 мМ ЭДТА;
- б) инкубируйте 1 ч при 37 °С;
- в) добавьте 10 мкг тРНК-носителя, 20 мкл ацетата аммония

- (7 М) и 80 мкл воды. Добавьте 30 мкл этанола, охладите до -70°C и оставьте при этой температуре на 20 мин, затем открутите на микроцентрифуге 10 мин;
- г) ресуспендируйте меченый олигонуклеотид в 10 мкл ТЕ. Используйте в реакциях синтеза зонда по 5—10 мкл меченого праймера.

6.4. Обнаружение единичных нуклеотидных замен при помощи денатурирующего градиентного гель-электрофореза

В этом разделе описываются методы анализа при помощи ДГГЭ гибридных молекул ДНК, образующихся при реассоциации меченого зонда с тестируемыми фрагментами ДНК. В приводимом ниже примере необязательно строго соблюдать соотношение между количеством зонда и тестируемой ДНК, так как в этих условиях образец находится в большом молярном избытке по отношению к зонду.

1. В микроцентрифужной пробирке смешайте следующие компоненты:
0,01—0,1 пмоль меченого одноцепочечного ДНК- или РНК-зонда (примерно 1/50 от общего количества зонда, синтезированного вышеописанными методами);
25—100 нг амплифицированной в ПЦР тестируемой ДНК (примерно 1/20 от общего количества ДНК полученного тем или иным способом в ПЦР, см. разд. 4.2);
вода до 20 мкл.
2. Нагревайте смесь 10 мин при $95\text{--}100^{\circ}\text{C}$ для денатурации ДНК.
3. Отцентрифугируйте, чтобы собрать на дне капли жидкости.
4. Добавьте 10 мкл ацетата натрия (2,5 М) и инкубируйте 30 мин при 45°C , чтобы произошла реассоциация зонда и тестируемого фрагмента.
5. Если имеется одноцепочечная кольцевая плазида, комплементарная РНК- или ДНК-зонду, можно ввести еще один дополнительный этап по связыванию остаточных количеств зонда, не вступивших в реакцию гибридизации [15, 43]. В этом случае после окончания реассоциации добавьте в пробирку 1 мкг одноцепочечной комплементарной кольцевой ДНК и инкубируйте еще 10 мин при 45°C . Полученные при этом гибридные молекулы в процессе электрофореза остаются на вершине денатурирующего градиентного геля. Эта стадия помогает также уменьшить фон, даже если тестируемая ДНК имеется в избытке. Отметим, что в случае одноцепочечных ДНК-зондов в качестве матрицы-ловушки используется та же самая одноцепочечная ДНК, что служит матрицей для синтеза зонда.

6. Добавьте 70 мкл воды и 5 мкг тРНК-носителя. Осадите нуклеиновые кислоты этанолом.
7. Высушите осадок и ресуспендируйте в 20 мкл нейтрального раствора для нанесения на гель (см. разд. 6.1.2).
8. Загрузите 10 мкл образца в лунку параллельно-градиентного денатурирующего геля и проводите электрофорез, как описано в разд. 6.2.2.

Примечание: в качестве контроля полезно проводить электрофорез отдельно зонда, а также зонда, реассоциированного с клонированной ДНК-матрицей, амплифицированной в ПЦР и имеющей ту же нуклеотидную последовательность, что и сам зонд. Кроме того, если с помощью данного зонда установлено, что исследуемый фрагмент геномной ДНК является гомозиготной последовательностью дикого типа, то полезно использовать его в качестве контроля при последующих анализах.

9. Высушите гель, экспонируйте с рентгеновской пленкой и проанализируйте радиоавтограф.

Благодарности

Большая часть работы по РНКазному расщеплению и ДГГЭ была проведена в лаборатории доктора Маниатиса. Мы выражаем ему признательность за помощь в работе и критические замечания при разработке этих методик. Мы также очень признательны доктору Лерману, внесшему большой вклад в изобретение и последующее развитие метода денатурирующего гель-электрофореза. Мы благодарим Алисона Кови за рисунки, а также Стюарта Фишера, Зою Ларину, Брайана Сида, Мэри Коллинз, Эзру Абрамс, Кэри Маллис и Фрэнка Мак-Кормика.

Литература

1. Flavell R. A., Kooter J. M., DeBoer E., Little P. F. R., Williamson R. (1978) *Cell*, **15**, 25.
2. Geever R. F., Wilson L. B., Nallaseth F. S., Milner P. F., Bittner M., Wilson J. T. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5018.
3. Chang J. C., Kan Y. W. (1982) *New Engl. J. Med.*, **307**, 30.
4. Orkin S. H., Little P. F. R., Kazazian H. H., Boehm C. D. (1982) *New Engl. J. Med.*, **307**, 32.
5. Kidd V. J., Wallace R. B., Itakura K., Woo S. L. C. (1983) *Nature*, **304**, 230.
6. Pirastu M., Kan Y. W., Cao A., Connor B. J., Teplitz R. L., Wallace R. B. (1983) *New Engl. J. Med.*, **309**, 284.
7. Botstein D., White R., Skolnick M., Davis R. (1980) *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 314.
8. Solomon E., Bodmer W. (1979) *Lancet*, **i**, 923.
9. Kan Y. W., Dozy A. M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5631.
10. Gusella J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., Naylor S. L., Anderson M. A., Tanzi R. E., Watkins P. C., Ottina K., Wallace M. R., Sakaguchi A. Y., Young A. B., Shoulson I., Bonilla E., Martin J. B., (1983) *Nature*, **306**, 234.

11. Orkin S. H., Kazazian H. H., Antonarakis S. E., Goff S. C., Boehm C. D., Sexton J. P., Waber P. G., Giardina P. J. V. (1982) *Nature*, 296, 627.
12. Orkin S. H., Kazazian H. H. (1984) *Annu. Rev. Genet.*, 18, 131.
13. Gitschier J., Drayna D., Tuddenham E. G. D., White R. L., Lawn R. M. (1985) *Nature*, 314, 738.
14. Gitschier J., Wood W. I., Tuddenham E. G. D., Shuman M. A., Goralka T. M., Chen E. Y., Lawn R. M. (1985) *Nature*, 315, 427.
15. Myers R. M., Maniatis T. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 275.
16. Myers R. M., Larin Z., Maniatis T. (1985) *Science*, 230, 1242.
17. Myers R. M., Lumelsky N., Lerman L. S., Maniatis T., (1985) *Nature*, 313, 495.
18. Myers R. M., Fischer S. G., Maniatis T., Lerman L. S. (1985) *Nucleic Acids Res.*, 13, 3111.
19. Myers R. M., Fischer S. G., Lerman L. S., Maniatis T. (1985) *Nucleic Acids Res.*, 13, 3131.
20. Myers R. M., Maniatis T., Lerman L. S. (1987) In: *Methods in Enzymology*. Wu R. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 155, p. 501.
21. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985) *Science*, 230, 1350.
22. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 263.
23. Mullis K. B., Faloona F. A. (1987) In: *Methods in Enzymology*. Wu R. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 155, p. 335.
24. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
25. Freeman G. J., Huang A. S. (1981) *J. Gen. Virol.*, 57, 103.
26. Winter E. E., Yamamoto E., Almoguera C., Perucho M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7575.
27. Fischer S. G., Lerman L. S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1579.
28. Fischer S. G., Lerman L. S. (1979) In: *Methods in Enzymology*. Wu R. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 68, p. 183.
29. Saeger W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, New York.
30. Myers R. M., Lerman L. S., Maniatis T. (1985) *Science*, 229, 2423.
31. Smith F. I., Parvin J. D., Palese P. (1986) *Virology*, 150, 55.
32. Levinson B., Janco R., Phillips J., Gitschier J. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 15, 9797.
33. Wrischnick L. A., Higuchi R. G., Stoneking M., Erlich H. A., Arnheim N., Wilson A. C. (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15, 529.
34. Wong C., Dowling C. E., Saiki R. K., Higuchi R. G., Erlich H. A., Kazazian H. H. (1987) *Nature*, 330, 384.
35. Zinn K., DiMaio D., Maniatis T. (1983) *Cell*, 34, 865.
36. Melton D. A., Krieg P. A., Rebagliati M. R., Maniatis T., Zinn K., Green M. R. (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12, 7035.
37. Krieg P. A., Melton D. A. (1987) In: *Methods in Enzymology*. Wu R. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 155, p. 397.
38. Lerman L. S., Silverstein K. (1987) In: *Methods in Enzymology*. Wu R. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 155, p. 482.
39. Lerman L. S., Silverstein K., Grinfeld E. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 285.
40. Levinson A., Silver D., Seed B. J. (1984) *J. Mol. Appl. Genet.*, 2, 507.
41. Messing J., Crea R., Seeburg P. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9, 309.
42. Maxam A., Gilbert W. (1980) In: *Methods in Enzymology*. Grossman L., Moldave K. (eds), Academic Press, New York, Vol. 65, p. 499.
43. Noll W., Collins M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3339.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Р. Саики, У. Гилленстен, Г. Эрлих¹

1. Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это метод амплификации *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в 10^8 раз [1, 2]. Такая высокая степень направленного обогащения значительно упрощает использование имеющегося образца ДНК. Некоторые области применения ПЦР: высокоэффективное клонирование геномных последовательностей [3], прямое секвенирование митохондриальной и геномной ДНК [5—7, см. ниже], анализ вариаций нуклеотидных последовательностей [8] и выявление вирусных патогенов [9—11].

При амплификации с помощью ПЦР используют два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующие интересующий нас участок ДНК; процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой (рис. 1). Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая количество копий этого участка ДНК.

В результате происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента приблизительно по формуле 2^n , где n — число прошедших циклов амплификации. Поскольку праймеры физически включаются в концы продуктов застройки, они детерминируют сам продукт реакции — фрагмент ДНК, равный по длине расстоянию между 5'-концами праймеров на исследуемом участке ДНК.

Недавние эксперименты показали, что процесс амплификации идет гораздо более эффективно, если использовать термо-

¹ R. K. Saiki, U. B. Gyllensten, H. A. Erlich. Department of Human Genetics, Cetus Corporation, 1400 Fifty-third Street, Emeryville, CA 94608, USA.

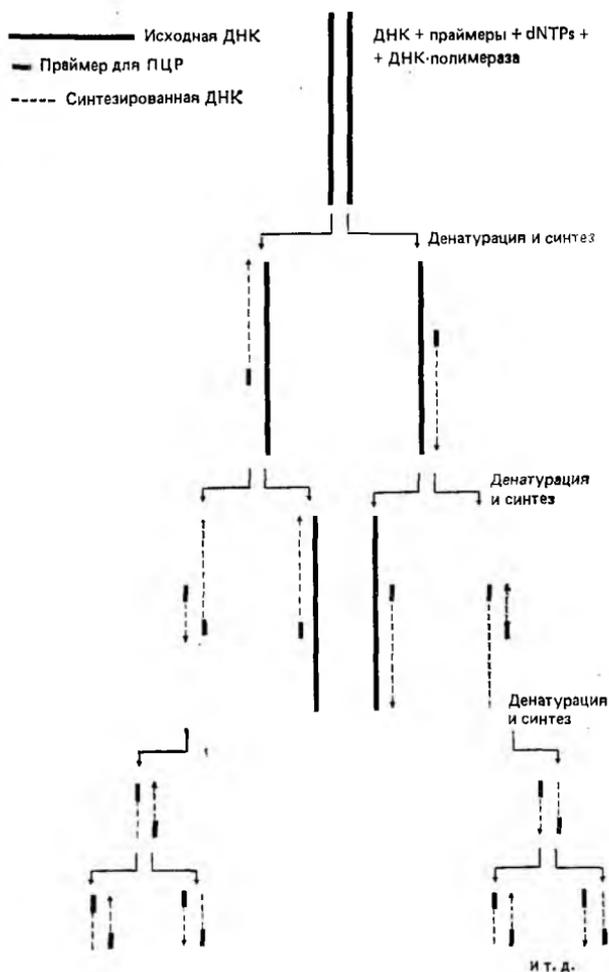


Рис. 1. Диаграмма полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полностью показаны только два первых цикла. Начиная с 3-го цикла, на диаграмме не отражена судьба исходной ДНК и продуктов достройки, синтезированных на ее цепях. Заметьте, что длинные фрагменты, синтезируемые на исходной цепи, накапливаются по формуле арифметической прогрессии. В противоположность этому — короткие дискретные фрагменты, ограниченные на концах праймерами, которые впервые появляются только в конце третьего цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

стабильную ДНК-полимеразу, выделенную из бактерии *Thermus aquaticus* (*Taq*) [12]. В отличие от термолабильного фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I *E. coli*, использовавшегося ранее, *Taq*-полимераза сохраняет свою активность после тепловой денатурации ДНК, и нет необходимости в замене фермента после каждого цикла. Еще одно достоинство новой полимеразы заключается в более высоком температурном оптимуме детерминируемой ею реакции (70—75°), что значительно повышает специфичность, количественный выход и возможную длину синтезированных копий интересующей последовательности.

Эта глава описывает ПЦР-амплификацию с использованием ДНК-полимеразы *Taq* и стратегию прямого секвенирования продуктов ПЦР-амплификации.

2. Основные методики

2.1. Оборудование

Реакции обычно проводят в 0,5- или 1,5-мл микроцентрифужных пробирках Эппендорф (силиконировать их обязательно). Оборудование для нагрева и охлаждения может быть совсем простым и состоять всего лишь из набора водяных бань с различной температурой воды, или очень сложным и включать нагревательный блок, управляемый микропроцессором. Такой блок используется для полностью автоматизированной реакции амплификации. Условиям неавтоматического проведения ПЦР могут удовлетворять как водяные бани, так и масляные или воздушные нагревательные блоки. Водяные и масляные бани обеспечивают более быстрый теплообмен, чем воздушные нагревательные блоки, но не всегда обеспечивают требуемую чистоту работы.

Если говорить о нагревательных блоках, то наилучшие результаты получают при использовании алюминиевых штативов с отверстием по форме пробирок. Штативы с большими отверстиями, заполненными песком или мягкими стеклянными шариками, непригодны, поскольку такие наполнители обладают малой теплопроводностью и способны поддерживать температуру не дольше нескольких циклов.

В настоящее время разработано несколько автоматических устройств для проведения цепной реакции полимеризации с участием *Taq*-полимеразы. В одном из аппаратов образцы из одной водяной бани в другую переносит робот. В другом — образцы помещены в полость, в которой смена холодной и горячей воды контролируется микрокомпьютером или простым таймером, соединенным с клапанами устройства, подающего воду. Контролируемый микрокомпьютером нагревательный блок, специ-

ально разработанный для автоматизированной реакции, можно приобрести у фирмы Perkin Elmer-Cetus Instruments (PECI). Он состоит из алюминиевого штатива на 48 образцов, который нагревается электрически, охлаждается жидкостью и для которого можно запрограммировать любой профиль кривой нагрева. Соблюдение необходимых условий дает возможность получать продукты амплификации эквивалентного качества (т.е. специфичности) и количества при любом способе проведения.

2.2. Компоненты реакции

Помимо последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать, смесь для ПЦР содержит буфер, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, два праймера, специфичных в отношении связывания с исследуемым образцом, и термостабильную ДНК-полимеразу *Taq*. Буфер для ПЦР, использующий *Taq*-полимеразу, содержит 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 8,4, 2,5 мМ MgCl₂ и 100 мкг/мл желатины (Difco). Желатина предпочтительнее БСА, так как она более устойчива к коагуляции на этапе денатурации и легко стерилизуется автоклавированием. Некоторые методики для нарушения вторичной структуры ДНК предусматривают использование 10%-ного диметилсульфоксида (ДМСО), хотя по нашему опыту это соединение в некоторой степени ингибирует полимеразу и снижает выход продукта амплификации. Если ДМСО все-таки применяется, для удобства следует приготовить 10-кратный исходный раствор и хранить его при -20 °С.

Нейтрализованные растворы трифосфатов (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) можно приобрести у ряда коммерческих фирм (USB, Sigma, Pharmacia). Затраты могут быть значительно снижены, если закупать лиофилизированные порошки и делать из них водные растворы. Прежде чем приступить к работе, эти растворы необходимо нейтрализовать гидроокисью натрия и точно развести, проверив концентрацию по УФ-поглощению. Для хранения готовят смесь всех трифосфатов (каждый в концентрации 2 мМ) и полученный 8 мМ раствор замораживают при -20 °С.

Праймеры для ПЦР обычно имеют длину 20 нуклеотидов. Можно синтезировать и более длинные затравки, но они редко бывают необходимы. К 5'-концу праймера можно присоединить последовательность, не комплементарную исследуемому образцу. Такие последовательности включаются в двухцепочечные продукты ПЦР, что обеспечивает возможность введения сайтов рестрикции [3] или регуляторных элементов (к примеру, промоторов в концы амплифицированных последовательностей [6]). Если о подлежащей амплификации последовательности имеется

только ограниченная информация, можно использовать и более короткие праймеры с учетом поправки на изменение стабильности «посадки» праймера при температуре достройки (см. ниже). Препараты праймеров следует хранить в концентрации 10 мкМ в TE-буфере (10 мМ Трис-НСI, 0,1 мМ ЭДТА, рН 8,0) при -20°C .

Подбор эффективных праймеров для ПЦР — процесс эмпирический. Соблюдение определенных требований увеличивает вероятность получения праймеров, пригодных для использования.

1. Выбирайте праймеры с содержанием GC $\sim 50\%$ и случайным распределением оснований. Следует избегать использования праймеров с протяженными полипуриновыми, полипиримидиновыми или другими неординарными последовательностями.
2. Избегайте последовательностей с устойчивыми вторичными структурами. Для изучения вторичной структуры очень полезны компьютерные программы, исходно разработанные для анализа вторичных структур РНК, и программы построения дот-матриц гомологий.
3. Проверьте затравки на комплементарность друг другу. Очевидно, что праймеры, отжигающиеся друг с другом, не смогут участвовать в амплификации интересующей последовательности.

Хотя большинство затравок с большей или меньшей эффективностью способны работать, бывают случаи, когда и синтезированные праймеры совершенно непригодны для амплификации желаемых последовательностей. Причина этого явления остается пока неясной. Во многих случаях простой сдвиг последовательности затравки на несколько оснований «вверх» или «вниз» решает проблему.

Taq-полимеразу можно приобрести у ряда фирм (например, Perkin Elmer-Cetus Instruments, New England Biolabs, Stratagene). Для реакции ПЦР обычно используют фермент в концентрации 2 ед. в 100 мкл реакционной смеси. Для амплификации образцов ДНК, обладающих высокой кинетической сложностью, например, последовательностей геномной ДНК, оптimum концентрации *Taq*-полимеразы обычно 1—4 ед. на 100 мкл реакционной смеси. Увеличение количества фермента выше указанного уровня может привести к возрастанию уровня неспецифического синтеза и к уменьшению выхода требуемого фрагмента [12].

2.3. Параметры температурных циклов

Полимеразная цепная реакция предусматривает инкубацию образцов при трех температурах, соответствующих трем этапам цикла амплификации, — денатурации, отжигу и достройке.

Обычно двухцепочечную ДНК денатурируют путем кратковременного нагрева образца до 90—95 °С, затем проводят отжиг, охлаждая образец до 40—60 °С, и далее нагревают до 70—75 °С, чтобы осуществить дестройку отоженных затравок с помощью *Taq*-полимеразы. Время инкубации при 70—75 °С варьируют в зависимости от длины амплифицируемой последовательности. Длительность температурного скачка (время, требуемое для смены температуры) определяется типом оборудования, используемого для нагрева и охлаждения (водяная баня, нагревательный блок и т. п.). За одним лишь исключением (см. ниже), скорость смены температуры не имеет значения и для сокращения длительности цикла практически всегда используются быстрые температурные скачки. Однако, чтобы быть уверенным, что образцы все-таки нагрелись до необходимой температуры, время скачка следует определить, проводя замеры температуры в контрольном эксперименте амплификации. Термопара для замсра в микропробах (Cole Parmer) и цифровой многофункциональный счетчик очень полезны для этих целей.

Обычно длительность смены температур для 100 мкл реакционной смеси в 1,5-мл пробирках и водяных банях, настроенных на 72°, 93° и 55 °С, следующая:

- 1) 72° — 93 °С — 1 мин,
- 2) 93 — 55 °С — 1 мин,
- 3) 55 — 72 °С — 45 с.

Время скачка для таких же образцов, но в нагревательном блоке с формованными отверстиями обычно больше по крайней мере в два раза. Недостаточный прогрев на этапе денатурации — одна из наиболее распространенных причин неудач при проведении реакции ПЦР вручную. Как правило, разделение цепей происходит, если реакционная смесь нагрета выше 90 °С. Чтобы гарантировать разделение, следует довести температуру смеси до 93 °С. Как только этот рубеж достигнут, образец можно охлаждать до температуры отжига затравки. Долгая денатурация не является необходимой; более того, именно непродолжительное воздействие повышенных температур обеспечивает поддержание высокой активности фермента в течение всей реакции амплификации. Чтобы предотвратить потерю влаги за счет испарения с поверхности реакционной смеси, можно наслотить на нее 50 мкл минерального масла.

Температура проведения отжига зависит от длины затравки и содержания в ней GC-пар. Для типичной затравки длиной 20 нуклеотидов и 50%-ным содержанием GC-пар подбор температуры хорошо начинать с 50—60 °С. Из-за большого молярного избытка затравки в реакционной смеси гибридизация происходит почти мгновенно и не требуется долгой инкубации при температуре отжига. Иногда оказывается возможным отжигать

затравки и при 72 °С, т. е. при температуре достройки. При этом значительно упрощается вся процедура: она сводится к двух-температурному циклу.

В некоторых случаях, когда доступны только 12—15-нуклеотидные затравки, требуется температура отжига 40 °С. Однако затравки такой длины не удерживаются на матрице при температуре достройки 72 °С. Преодолеть эту трудность можно следующим образом. Используя частичную ферментативную активность полимеразы при низких температурах, можно удлинить затравки на несколько нуклеотидов и тем самым стабилизировать их. Это достигается либо за счет промежуточной инкубации в течение нескольких минут при 55—60 °С («ручные» реакции) или путем медленного нагревания от 40 до 72 °С (автоматизированная реакция).

Температура достройки праймера 72 °С очень близка к температуре, при которой ДНК-полимераза *Taq* проявляет максимальную активность. Как уже отмечено, продолжительность инкубации при 72 °С зависит от длины амплифицируемого участка ДНК. Считается, что *Taq*-полимераза синтезирует последовательность длиной 1000 нуклеотидов за 1 мин, однако можно опробовать и более короткое время инкубации. Этап удлинения затравки можно совсем исключить, если исследуемая последовательность имеет длину, не превышающую 150 нуклеотидов. При нагреве между этапами отжига и денатурации образцы будут находиться в диапазоне температур 70—75 °С несколько секунд, что достаточно для полной достройки отожженной затравки.

3. Амплификация геномной последовательности «вручную»

Методика, описанная в этом разделе, предназначена для проведения амплификации однокопийной последовательности ДНК длиной до 500 п. н. Детали ее могут быть изменены в соответствии с целями эксперимента. Реакционная смесь в объеме 100 мкл включает 1 мкг геномной ДНК человека, 1-кратный солевой буфер, 1 мМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого dNTP (dATP, dCTP, dTTP и dGTP — в сумме 0,8 мМ) и 2,5 единиц *Taq*-полимеразы. В приведенном частном примере район β-глобинового гена человека длиной в 250 п. н. будет амплифицирован с ПЦР-затравками PC03 и GH21. Список реагентов приведен в табл. 1.

1. Подготовьте 3 водяных бани на 93, 55 и 72 °С. Баню на 93 °С следует держать закрытой в промежутках между операциями, чтобы снизить охлаждение за счет испарения.

Таблица 1. Реагенты для амплификации β -глобинового гена человека при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), проводимой вручную

10-кратный солевой буфер для <i>Taq</i> -полимеразы:	500 мМ КСl, 100 мМ Трис-НСl, рН 8,14, 15 мМ MgCl ₂ , 0,1% желатина
8 мМ dNTP:	2 мМ dATP, 2 мМ dCTP, 2 мМ dTTP, 2 мМ dGTP, рН 7
Праймеры для ПЦР:	10 мМ растворы в ТЕ (10 мМ Трис-НСl, рН 8, 0,1 мМ ЭДТА) PC03: 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3' GH21: 5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG-3'
Геномная ДНК человека:	MOL T4 (100 мкг/мл)
ДНК-полимераза <i>Taq</i> :	(PECI) (5000 ед./мл)

- В 1,5-мл пробирку добавьте 10 мкл геномной ДНК (1 мкг), 10 мкл 10×*Taq*-буфера, 10 мкл затравки PC03 (100 пмоль), 10 мкл затравки GH21 (100 пмоль), 10 мкл dNTP (20 нмоль каждого) и 50 мкл воды, конечный объем составит 100 мкл.
 - Добавьте 0,5 мкл *Taq*-полимеразы (2,5 единицы), перемешайте и наложите несколько капель легкого минерального масла (~50 мкл).
 - Поместите пробирку в пенопластовый штатив-«поплавок». Мягкий, полиуретановый пенопласт подходит больше, чем плотный полистироновый, так как он меньше деформируется в бане на 93 °С.
 - Поместите штатив в баню на 93 °С и инкубируйте в ней 2 мин (это этап денатурации).
 - Перенесите штатив в баню на 55 °С и инкубируйте в ней 1 мин (это этап отжига).
 - Перенесите штатив в баню на 72 °С и инкубируйте в ней 1 мин (это этап удлинения затравки).
 - Повторите этапы 5—8 30 раз, уменьшив только время последующих инкубаций в бане на 93 °С до 1 мин.
 - По окончании последнего цикла оставьте образец в бане на 72 °С еще на 4 мин, чтобы полностью завершить образование двухцепочечных структур — продуктов реакции ПЦР.
 - По желанию масло можно удалить экстракцией с хлороформом.
- Хранить амплифицированный образец необходимо при —20 °С.

Качество и количество продуктов реакции легко оценить, проанализировав 5 мкл реакционной смеси в 4%-ном Nu Sieve-агарозном геле (FMC) с окрашиванием бромидом этидия. Фотография такого геля представлена на рис. 2, он содержит продукты «ручной» амплификации фрагмента β -глобинового гена в диапазоне длин от 110 п. н. до 1829 п. н.

4. Прямое секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК

Анализ генетических вариаций в последовательностях, амплифицированных путем ПЦР, осуществлялся до недавнего времени посредством секвенирования клонированных продуктов ПЦР [3, 8, 19], а также с помощью гибридизации с олигонуклеотидными пробами [14]. Теперь для этого разработан метод секвенирования амплифицированной ДНК без предварительного ее клонирования [4—6].

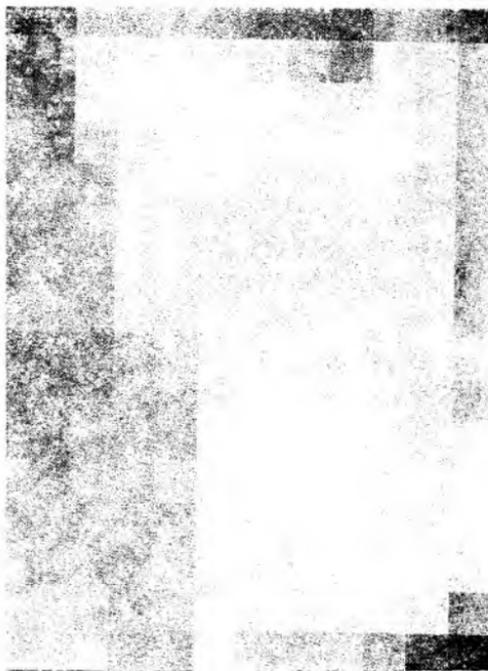


Рис. 2. Электрофоретический анализ ручной ПЦР-амплификации фрагментов β -глобинового гена человека с использованием различных пар затравок. Длина амплифицируемых последовательностей слева направо 110, 167, 250, 441, 1232 и 1829 п. н. Слабое свечение внизу геля обусловлено избытком затравок. Каждая из маркерных дорожек по краям геля содержит 250 нг *Hae*III-гидролизата ϕ X174-RF (BioLabs). Реакция амплификации и последующий анализ были выполнены строго по методикам, описанным в разд. 3.

Прямое секвенирование имеет два важных преимущества перед традиционным клонированием фрагментов ПЦР в плазмидных и вирусных геномах.

1. Эту процедуру проще стандартизовать (и, следовательно,

- проще автоматизировать), так как ее проводят *in vitro* и она не зависит от живых систем (бактерий, вирусов).
2. Метод более быстр и надежен, поскольку в норме достаточно проанализировать единственную последовательность для каждого образца. Если же мы имеем дело с клонированными ПЦР-последовательностями, то для одного образца их нужно проанализировать несколько, чтобы отличить мутации, происшедшие в исходной геномной последовательности, от случайных ошибок при достройке ДНК-полимеразой в реакции ПЦР и таких артефактов полимеразной реакции, как образование мозаичных аллелей («перетасованные клоны») вследствие рекомбинации *in vitro* [12].

Простота, с которой можно получить четкие надежные данные, не прибегая к клонированию в бактериях, определяется 1) способностью ПЦР-затравок амплифицировать только интересующие последовательности (специфичность праймера) и 2) способом получения образца, приемлемого для секвенирования. Для прямого секвенирования продуктов ПЦР вполне пригоден химический метод (Максама—Гилберта). Мы рассмотрим здесь только наиболее распространенный метод Сэнгера, использующий нуклеотиды-терминаторы полимеразной реакции. Специфичность ПЦР-затравок в принципе определяет гомогенность амплифицируемых последовательностей. В идеале, в результате реакции экспоненциально наращивается только интересующая последовательность. Однако в реальных условиях многие праймеры амплифицируют также различные посторонние последовательности. Повышая температуру отжига в полимеразной реакции, это осложнение удается преодолеть [12]. К тому же для устранения затруднений, связанных со свойствами конкретной амплифицируемой последовательности, можно применить предварительную очистку интересующей последовательности электрофорезом в геле или использовать денатурирующий градиентный гель [15].

В конечном счете, если эти осложнения никак более не удастся преодолеть, можно при секвенировании использовать внутренние праймеры, отжигающиеся только на интересующей последовательности.

Еще одно неудобство, вызванное прямым секвенированием продуктов ПЦР, обусловлено способностью двух цепей амплифицированного фрагмента к быстрой реассоциации, что мешает отжигу секвенационного праймера на комплементарной последовательности или блокирует реакцию достройки комплекса затравка—матрица. Устранить это препятствие можно, применяя один из вариантов стандартного метода секвенирования двухцепочечной ДНК или модифицируя ПЦР с целью получения одноцепочечных продуктов.

4.1. Секвенирование двухцепочечных образцов

Для приготовления двухцепочечных образцов, используемых при секвенировании, выберите одну из двух методик.

1. Денатурируйте образец NaOH, перенесите в лед, нейтрализуйте реакцию, после чего быстро осадите ДНК. Растворите ДНК в буфере, содержащем секвенационный праймер, при необходимой температуре отжига.
2. Денатурируйте образец нагреванием (95 °С), затем быстро перенесите в спиртовую баню, охлажденную до температуры сухого льда, замедлив таким образом процесс реассоциации цепей. Добавьте секвенационный праймер и нагрейте до необходимой температуры отжига.

Для секвенирования двухцепочечных плазмидных ДНК подходят оба способа. Секвенировать продукты ПЦР по этим инструкциям гораздо труднее, так как короткие линейные фрагменты ДНК более склонны к реассоциации, чем двухцепочечные кольцевые плазмиды. Подробное описание методик секвенирования двухцепочечных продуктов ПЦР можно найти в работах [4] и [16].

4.2. Секвенирование одноцепочечных фрагментов ДНК

Затруднения, связанные с реассоциацией цепей фрагмента, можно преодолеть, если приготовить одноцепочечные образцы ДНК путем разделения цепей в геле или синтезировать их в самой реакции ПЦР. Для разделения цепей фрагментов длиной не менее 500 п. н. могут быть с успехом использованы соответствующие агарозные гели. В случае более коротких фрагментов такой подход не эффективен. Однако недавно мы разработали метод, позволяющий синтезировать одноцепочечные ДНК в ходе реакции ПЦР (рис. 3) [6].

Эта процедура предусматривает использование неэквивалентных количеств двух праймеров для амплификации, что позволяет синтезировать за первые 20—25 циклов двухцепочечную ДНК (дцДНК) и за последующие 5—10 циклов в условиях недостатка одного из праймеров — одноцепочечную ДНК (оцДНК).

Рис. 4, А демонстрирует накопление дцДНК и оцДНК в ходе обычной амплификации геномной последовательности, использующей исходное соотношение затравок 50 : 0,5 пмоль в 100 мкл реакционной смеси. Как и ожидалось, количество дцДНК возрастает экспоненциально до момента практического исчезновения из реакционной смеси одного из праймеров, после чего количество этой ДНК нарастает очень медленно. Фракция оцДНК появляется, начиная с 25-го цикла, с момента, когда запас ли-

митирующей затравки почти полностью исчерпан. После короткой начальной стадии быстрого роста оцДНК накапливается линейно, чего следует ожидать в присутствии одного праймера.

Разные соотношения праймеров дадут в принципе сходную картину образования оцДНК. На рис. 4, Б показано, что различные неравные отношения 50:5, 50:0,5, 50:0,05 дают за 30 циклов полимеразной реакции количество оцДНК, превышающее количество синтезированной дцДНК. Как правило, соотношение 50:0,5 позволяет получить после 30 циклов ПЦР

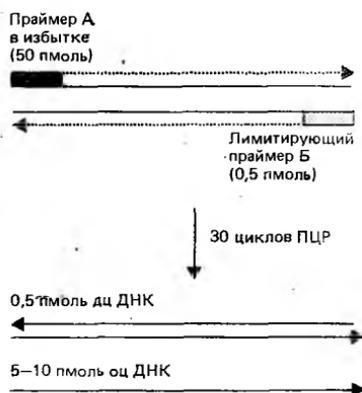


Рис. 3. Процедура, позволяющая получать оцДНК в ходе полимеразной цепной реакции. Рассматривается случай, когда в реакции используются затравки в количестве 50 и 0,5 пмоль. После накопления в реакционной смеси около 0,5 пмоль дцДНК лимитирующая затравка в основном израсходована и начинается синтез оцДНК в количестве ~0,5 пмоль за 1 цикл амплификации. Полученную одноцепочечную ДНК можно секвенировать, добавив небольшое количество лимитирующего праймера или используя внутренние затравки.

1—5 пмоль оцДНК. Образованная оцДНК может быть затем секвенирована с использованием лимитирующего праймера ПЦР или внутреннего праймера по обычной схеме химической или энзиматической методики секвенирования. Синтезированные фрагменты будут иметь гомогенный 5'-конец и в различной степени усеченный 3'-конец вследствие преждевременной терминации синтеза. Однако при использовании некоторых секвенационных затравок (к примеру, лимитирующей ПЦР-затравки) только полная оцДНК может служить образцом для секвенирования.

Подробное описание методики получения оцДНК и проведения секвенационных реакций с использованием модифицированной ДНК-полимеразы фага T7 (Sequenase, US Biochemicals) приведено ниже.

1. Проведите реакцию ПЦР по уже описанной методике, изменив только количества используемых праймеров на 50 пмоль и 0,5 пмоль в 100 мкл реакционной смеси. Проведите 30—35 циклов реакции. Если необходимо секвенировать обе цепи, приготовьте также образец с обратным соотношением объема используемых затравок.

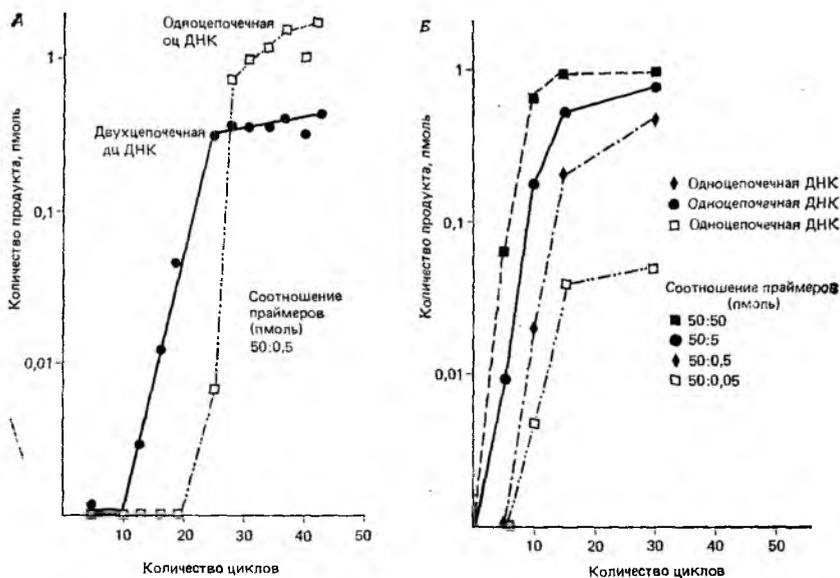


Рис. 4. Кинетика синтеза двух- и одноцепочечных фрагментов ДНК длиной 242 п. и. локуса HLA-DQ α при различных соотношениях затравок. А. Отношение затравок 50 пмоль/0,5 пмоль, 43 цикла амплификации. Б. 4 различных соотношения затравок (пмоль): 50:50; 50:5; 50:0,5; 50:0,05. Количество одноцепочечной ДНК приводится на момент завершения 30 циклов амплификации. Кривые построены на основе анализа денситограмм радиоавтографов.

2. После завершения ПЦР смешайте 100 мкл реакционной смеси с 2 мл дистиллированной воды, заполните этой смесью микроконцентратор Centricon 30 (Amicon) и для удаления избытка dNTP и компонентов буфера отцентрифугируйте при 5000 об/мин в роторе с фиксированным наклоном пробирок.
3. Высушите 10 из 40 мкл концентрата и растворите в 10 мкл секвенационного буфера (40 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 20 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl), содержащего 1 пмоль секвенационного праймера (лимитирующая затравка в реакции ПЦР или внутренняя затравка, комплементарная синтезированной оцДНК).

4. Прогрейте смесь праймер—матрица при 65 °С в течение 2 мин, затем оставьте охлаждаться до 30 °С в течение 20 мин.
5. Добавьте
 - 1 мкл 100 мМ DDT,
 - 2 мкл смеси для включения метки, разведенной в соотношении 1/100 (содержащей 7,5 мМ каждого из dNTP, за исключением dATP),
 - 0,5 мкл [³⁵S] dATP (1000 Ки/ммоль), 10 мкКи/мкл,
 - 2 мкл ДНК-полимеразы Т7 (разведенной 1/8 в ТЕ).
6. Внесите 3,5 мкл приготовленной смеси в каждую из 4 пробирок, содержащих 2,5 мкл смеси дидезоксирибонуклеозидов (по 80 мМ каждого из dNTP и 8 мМ соответствующего ddNTP), и инкубируйте 5 мин при 37 °С.
Остановите реакцию добавлением 4 мкл 95%-ного формамида, 20 мМ ЭДТА; прогрейте в течение 2 мин при 75 °С и нанесите на секвенационный гель.

5. Заключение

ПЦР открывает возможность быстрого синтеза миллионов копий индивидуальной последовательности ДНК, что значительно упрощает последующий ее анализ.

Поскольку в результате цепной амплификации образуются идентичные фрагменты специфичной ДНК, сразу же может быть осуществлено клонирование или секвенирование продуктов реакции. Матрицей для ПЦР-амплификации могут служить как геномная ДНК, так и кДНК, синтезированная путем обратной транскрипции РНК. Чувствительность метода позволяет обнаружить и амплифицировать единственную молекулу ДНК. При автоматизации ПЦР и наличии нерадиоактивных материалов для мечения ДНК полимеразная цепная реакция обещает стать в будущем стандартной молекулярно-биологической процедурой. Можно предположить, что велика будет и ее роль в диагностике наследственных и инфекционных заболеваний.

Литература

1. Mullis K. B., Faloona F. A. (1987) In: *Methods in Enzymology*. Wu R. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 155, p. 335.
2. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985) *Science*, **230**, 1350.
3. Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H. A. (1986) *Science*, **233**, 1076.
4. Wrischnick L. A., Higuchi R. G., Stoneking M., Erlich H. A., Arnheim N., Wilson A. C. (1987) *Nucleic Acids Res.*, **15**, 529.
5. Wong C., Dowling C. E., Saiki R. K., Higuchi R. G., Erlich H. A., Kazazian H. H. (1987) *Nature*, **330**, 384.
6. Stoffel E. S., Koeberl D. D., Sarkar G., Sommer S. S. (1988) *Science*, **239**, 491.

7. Gyllensten U. B., Erlich H. A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press.
8. Horn G. T., Bugawan T. L., Long C. M., Erlich H. A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **35**, 6012.
9. Kwok S., Mack D. H., Mullis K. B., Poiesz B., Ehrlich G., Blair D., Friedmen-Kien A., Sninsky J. J. (1987) J. Virol., **61**, 1690.
10. Ou C.-Y., Mitchell S. W., Krebs J., Feorino P., Warfield D., Kwok S., Mack D. H., Sninsky J. J., Schochetman G. (1987) Science, **239**, 295.
11. Shibata D. K., Arnheim N., Martin J. W. (1988) J. Exp. Med., **167**, 225.
12. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988) Science, **239**, 487.
13. Scharf S. J., Friedmann A., Bautbar C., Szafer F., Steinmann L., Horn G., Gyllensten U., Erlich H. A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 3504.
14. Saiki R. K., Bugawan T. L., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1986) Nature, **324**, 163.
15. Fisher S. G., Lerman L. S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 1579.
16. Higuchi R. G., von Beroldingen C. H., Sensabaugh G. F., Erlich H. A. (1988) Nature, **332**, 543.

ГЕНОМНАЯ ДАКТИЛОСКОПИЯ

*Р. Уэллс*¹**1. Введение**

В течение последних нескольких лет в геноме человека были обнаружены последовательности ДНК, обладающие свойством структурного полиморфизма [1—9]. Такие гипервариабельные районы (ГВР) (их функция еще не определена) содержат набор коротких, обычно GC-богатых тандемно повторенных единиц. Именно в этих тандемно повторяющихся структурах заключена молекулярная основа вариабельности указанных последовательностей. Длинные гомологичные участки повторяющейся последовательности подвержены рекомбинации, происходящей, как правило, вследствие неравного обмена при мейозе или митозе или вследствие ошибок при репликации ДНК [10]. Рекомбинационные события обуславливают аллельные различия в числе тандемно повторяющихся единиц, имеющих в данном локусе ГВР, и вследствие этого являются причиной наблюдаемого полиморфизма длины всего тандемного блока [11]. Степень гетерозиготности по локусам ГВР высока (до 99% для некоторых ГВР), и, следовательно, они могут быть использованы в качестве маркеров при картировании генов [11—13].

Недавно появились данные, свидетельствующие о том, что ГВР существуют в виде разбросанных по всему геному семейств, родство членов которых определяется гомологией с той или иной кор-последовательностью — основной единицей соответствующих тандемных повторов [14, 15]. Клонированные участки ГВР были использованы для приготовления проб (зондов), которые при гибридизации с геномной ДНК в мягких условиях выявляют множественные аллели ГВР. Получающийся сложный набор гипервариабельных полос и заключает в себе специфичную для данного индивидуума картину геномного «дактоотпечатка» (DNA fingerprint) [14]; аллели, формирующие эту картину, обладают соматической стабильностью, ста-

¹ R. A. Wells, Nuffield Department of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford OX3 9DU, UK.

бильны в клетках зародышевого пути и наследуются в соответствии с правилами Менделя.

Таким образом, используя один зонд, можно одновременно наблюдать за наследованием большого количества аллелей. Эволюционная нестабильность, вследствие которой эти последовательности гипервариабельны, не настолько велика, чтобы затруднить сегрегационный анализ, поэтому метод геномной дактилоскопии может быть применен при изучении генетического сцепления [16]. Индивидуальный характер гибридизационной картины позволяет использовать метод в судебной медицине и применять его в качестве инструмента, с помощью которого с высокой степенью достоверности могут быть уточнены структуры родословных.

2. Гибридизационные зонды для геномной дактилоскопии

2.1. Зонды на основе минисателлитов

Джеффризу с соавторами [14] удалось впервые показать, что зонды на основе кор-последовательности ГВР могут быть использованы для одновременного выявления большого количества соответствующих генетических локусов. С помощью зонда, синтезированного путем тандемного лигирования 33 повторяющихся элементов ГВР из гена человеческого миоглобина, они обнаружили на Саузерн-блотах, несущих гидролизат геномной ДНК человека, картину из большого числа полос. Некоторые из них оказались полиморфными последовательностями. Для выделения этих родственных участков исследователи отобрали из геномной библиотеки соответствующие клоны, используя в качестве зонда при гибридизации в мягких условиях конкатенированные повторы из гена миоглобина. Когда же эти выделенные клоны, в свою очередь, выступили в роли зондов, с помощью некоторых из них в геномной ДНК удалось выявить сложную картину гипервариабельных полос. Клоны содержали последовательности, имеющие области гомологии с тандемными повторами миоглобиновых ГВР, которые и представляли собой общие для этой группы кор-последовательности. Последовательности этого семейства были названы минисателлитами. Для изучения доступны два из них, являющиеся вариантами основной кор-последовательности. Соответствующие зонды, названные 33.6 и 33.15, существуют в виде рекомбинантных форм векторов, полученных на основе бактериофага M13 [17] (рис. 1). Каждая из них выявляет около 15 высокополиморфных полос в диапазоне 4—20 т. п. н. Среднее значение гетерозиготности по

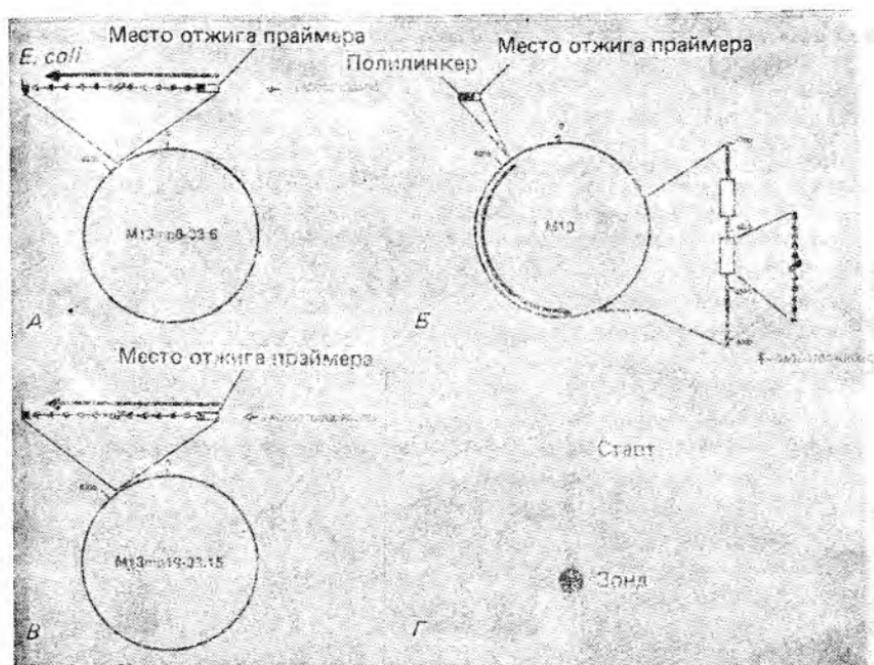


Рис. 1. Структура и схема синтеза проб для метода геномных отпечатков. Маленькие стрелочки обозначают тандемно повторяющиеся единицы гиперварибельной последовательности, а большие стрелки показывают направление синтеза меченых комплементарных цепей (методика приведена ниже в тексте). (Г) — радиоавтограф геля из легкоплавкой агарозы, в котором минисателлитная проба 33.6 была очищена электрофорезом (см. табл. 2). Отмечены начало дорожки и положение полосы, соответствующей меченой пробе.

этим полосам около 90%, при этом варибельность пропорциональна длине фрагмента и наибольший фрагмент фактически на 100% гетерозиготен в популяции.

2.1.1. Приготовление минисателлитных зондов

Одноцепочечные матрицы для синтеза зондов можно легко и быстро получить, используя стандартные методики (суммировано в табл. 1).

Матрицы, приготовленные по методике из табл. 1, обычно получают в концентрации около 100 нг/мкл, однако лучше оценить концентрацию данной партии путем сравнения со стандартными растворами в геле, окрашенном бромидом этидия.

Учитывая, что молекула матрицы является одноцепочечной и кольцевой, ее нельзя пометить с помощью рассеянных затра-

Таблица 1. Подготовка одноцепочечной матрицы фага M13

А. Подготовка компетентных клеток

1. Инокулируйте 5 мл $2 \times \text{TU}^{(1)}$ единичной колонией JM101⁽²⁾. Растите до стационарной фазы, инкубируя культуру в течение ночи при 37°C на качалке.
2. Добавьте 500 мкл ночной культуры JM101 к 50 мл $2 \times \text{TU}$. Инкубируйте на качалке при 37°C до $\text{ОП}_{550} \sim 0,3$.
3. Охладите 30 мл 50 мМ CaCl_2 во льду.
4. Осадите клетки центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин. Удалите супернатант.
5. Аккуратно ресуспендируйте клетки в 25 мл охлажденного CaCl_2 . Оставьте во льду на 20 мин.
6. Осадите клетки центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин. Удалите супернатант.
7. Аккуратно ресуспендируйте клетки в 5 мл CaCl_2 . Оставьте во льду на 2 ч.

Б. Трансформация компетентных клеток одноцепочечной ДНК фага M13

1. Разведите препарат одноцепочечной ДНК фага M13 до концентрации 1 нг/мкл в ТЕ. Тщательно перемешайте.
2. Внесите 400 мкл аликвоты компетентных клеток JM101 в четыре стерильные пробирки на 15 мл. Добавьте в пробирки 1, 5, 10 или 50 мкл разведенного раствора одноцепочечной ДНК. Слегка перемешайте и оставьте во льду на 1 ч.
3. Перенесите пробирки в баню на 42°C, инкубируйте 3 мин, после чего быстро охладите в бане со льдом.
4. В каждую пробирку добавьте по 40 мкл XGAL (2%-ный раствор в диметилформамиде), 40 мкл 100 мМ ИПГТ и 200 мкл ночной культуры JM101. Добавьте 3 мл расплавленного верхнего агара⁽³⁾, выдержанного в водяной бане при 40—50°C, и перемешайте, переворачивая пробирку. Без промедления вылейте на чашку с Н-агаром⁽⁴⁾. Дайте верхнему слою агара застыть в течение 5 мин, затем переверните чашки и поместите в термостат на 37°C. После ночной инкубации станут заметными бляшки: голубые соответствуют клонам M13 без вставки, а белые — рекомбинантам.
5. Во время инкубации приготовьте 5 мл свежей ночной культуры JM101 в $2 \times \text{TU}$.

В. Подготовка одноцепочечной матрицы

1. Разведите свежую культуру JM101 в соотношении 1 : 100 в $2 \times \text{TU}$.
2. Разлейте по 1,5 мл разведенной культуры в стерильные пробирки на 15 мл (по одной пробирке на каждую из анализируемых бляшек).
3. Инокулируйте каждые 1,5 мл культуры фагом, сделав укол в отдельную бляшку стерильной микропетлей и помешивая затем этой петлей в среде с культурой.
4. Инкубируйте культуры при 37°C на качалке в течение 5 ч.
5. Перенесите культуры в микроцентрифужные пробирки и осадите, центрифугируя в течение 5 мин. Перенесите супернатанты в новые микроцентрифужные пробирки, содержащие 200 мкл ПЭГ/NaCl⁽⁵⁾. Перемешайте, переворачивая пробирку, оставьте при комнатной температуре на 15 мин.
6. Центрифугируйте в течение 5 мин. Слейте супернатант и отцентрифугируйте в течение 2 мин. Удалите остатки супернатанта вытянутой пастеровской пипеткой. На этой стадии должны быть видны небольшие осадки.
7. В каждую пробирку добавьте 100 мкл ТЕ и 50 мкл трис-насыщенного фенола. Встряхивайте 15 с и дайте отстояться в течение 10 мин. Снова встряхните (10 с) и отцентрифугируйте (5 мин).

Продолжение

8. Перенесите водные (верхние) фазы в новые пробирки. Добавьте в каждую по 10 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5,5) и 300 мкл холодного (-20°C) абсолютного этанола. Быстро встряхните и оставьте при -20°C на ночь.
9. Осадите ДНК центрифугированием в течение 15 мин. Слейте супернатант и промойте осадки 500 мкл холодного абсолютного этанола. Удалите супернатант пастеровской пипеткой и высушите осадки под вакуумом в течение 3 мин. Растворите осадки в 50 мкл ТЕ.
10. Чтобы оценить концентрацию и молекулярный вес выделенной ДНК, проведите электрофорез, нанеся в гель по 2 мкл аликвоты каждого образца, вместе со 100 нг ДНК вектора M13.

1) 2X TY, на 1 л: 16 г бактотриптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl.

2) Штамм *Escherichia coli* JM101 (*lacpro*, *thi*, *supE*, *F'*traD36, *porAB*, *lacI*^q Δ ZM15) должен быть проведен через минимальную среду с глюкозой для селекции *F'*-плазмиды.

3) Верхний агар: на 1 л: 10 г бактотриптона, 8 г NaCl, 8 г агара.

4) Н-агар: на 1 л: 10 г бактотриптона, 8 г NaCl, 12 г агара.

5) ПЭГ/NaCl: 20%-ый полиэтиленгликоль 6000, 2,5 М NaCl (хранить при 4°C).

вок или методами ник-трансляции. В этом случае следует воспользоваться техникой достройки праймера (табл. 2, рис. 1). По этой методике синтетический олигонуклеотид, комплементарный последовательности, находящейся со стороны 3'-конца минисателлитной вставки, отжигается на матрице в растворе. В результате чего появляются 3'-гидроксильные группы, к которым большой фрагмент ДНК-полимеразы I может присоединить меченые дезоксирибонуклеозиды. По истечении времени, необходимого для синтеза комплементарной цепи по всей длине вставки, можно использовать рестриктазу для расщепления новой двухцепочечной молекулы у 5'-конца вставки. Если две

Таблица 2. Приготовление проб на основе минисателлитов

Мечение проб 33.6 и 33.15 радиоактивными изотопами

1. В микроцентрифужную пробирку внесите 400 нг одноцепочечной ДНК-матрицы, 4 нг 17-мерного секвенационного праймера, 1 мкл 10-кратного буфера для фрагмента Клёнова и воды до конечного объема 10 мкл. Инкубируйте при $55-60^{\circ}\text{C}$ не менее часа. (После отжига праймера на матрице реакционную смесь можно сохранять при -20°C .)
2. Быстро отцентрифугируйте, собрав таким образом капли конденсата. Добавьте 10 мкл смеси АГТ, 6 мкл буфера ТЕ и 30 мкКи [α - ^{32}P] dCTP. Добавьте 6 единиц ДНК-полимеразы I (фрагмент Клёнова) и смешайте легким пипетированием. Инкубируйте при 37°C в течение 45 мин.
3. Внесите 2,5 мкл 0,5 мМ dCTP. Продолжайте инкубацию при 37°C еще 15 мин.
4. Добавьте 3 мкл 10-кратного буфера для рестрикции ферментами *EcoRI* и *HindIII*, 3 мкл 10 мМ спермидин трихлорида, рН 7, и 15 единиц соответствующего фермента рестрикции. (*EcoRI* для 33.6, *HindIII* для 33.15). Смешайте пипетированием. Инкубируйте при 37°C не менее часа.
5. Остановите реакцию добавлением 5,2 мкл щелочного раствора; перемешайте легким встряхиванием и оставьте на 5 мин.
6. Добавьте 5 мкл буфера для ионесения образца.

Продолжение

Очистка пробы с помощью электрофореза

1. Приготовьте 1,2%-ный гель из легкоплавкой агарозы на трис-ацетатном буфере (удобно это делать во время инкубации, следующей за этапом 4 процедуры мечения пробы).
2. Проведите фореz в холодной комнате при 7 В/см в течение 2 ч. Фронт бромфенолового красителя должен находиться в 6 см от старта.
3. Гель очень радиоактивен. Работая в перчатках и защитных очках, заверните гель в тонкую пленку. Экспонируйте с рентгеновской пленкой в течение 5 мин. Проявите пленку.
4. Радиоавтограф должен показать очень сильный сигнал от полосы пробы и слабый размытый фон, на котором различимы следы от лунок геля (см. рис. 1, Г). Отмерьте расстояние от лунки до ближнего и дальнего края полосы пробы и скальпелем вырежьте соответствующую зону геля. Проба мигрирует примерно так же, как и бромфеноловый краситель, в то время как не включившиеся нуклеотиды дают более размытую полосу далее по гелю.
5. Перенесите кусок агарозы в 5 мл пластиковую пробирку. Добавьте 500 мкл стерильной дистиллированной воды и 10 мкл раствора конкурентной ДНК. Расплавьте пробу при 100 °С в течение 5 мин.
6. Чтобы измерить удельную активность пробы, отберите 10 мкл алиquotы и просчитайте в сцинтилляционном счетчике. 400 иг матрицы должны давать значение суммарной активности $1-3 \times 10^7$ имп./мин.

Приготовление раствора конкурентной ДНК

1. Приготовьте 10 мл раствора геномной ДНК человека в ТЕ-буфере с концентрацией 0,5 мкг/мкл.
2. Воздействуйте ультразвуком при 50 Вт в течение 15 с. Повторите процедуру 10 раз с интервалами в 5 с.
3. Оцените длину фрагментов, проведя контрольный фореz 1-мкл алиquotы. Средняя длина фрагмента должна быть 200—600 п. н.

Растворы для синтеза проб

ТЕ-буфер: 10 мМ Трис рН 8,0, 1 мМ ЭДТА.

Растворы дезоксирибонуклеозидов: 0,5 мМ dATP, dCTP, dTTP, dGTP рН 7,0.
Смесь AGT: смесь равных объемов ТЕ-буфера и 0,5 мМ растворов dATP, dGTP, dTTP.

10-кратный буфер для фрагмента Клёнова: 100 мМ Трис рН 8,0 50 мМ MgCl₂.

10-кратный буфер для рестрикции (*EcoRI/HindIII*): 100 мМ Трис, 600 мМ NaCl, 70 мМ MgCl₂, 70 мМ меркаптоэтанол.

Щелочной стоп-раствор: 1,5 М NaOH, 0,1 м ЭДТА.

цепи полученной молекулы разделить путем обработки щелочью, то меченую цепь, комплементарную последовательности минисателлитной ДНК, можно затем очистить с помощью электрофореза в геле из легкоплавкой агарозы и последующей экстракции из геля (см. рис. 1). В результате мы будем иметь ДНК, меченую с высокой удельной активностью (10^8 имп./мин/мкг) и относительно свободную от невключившихся меченых нуклеотидов.

2.2. M13

Недавно в литературе появилось сообщение об удивительном открытии. Оказалось, что последовательность из генома

одноцепочечного бактериофага М13 выявляет семейство гипервариабельных последовательностей, если используется в качестве зонда при гибридизации с геномной ДНК человека [18]. Последовательность является частью фагового гена III, кодирующего белок, который участвует в прикреплении к бактериальным F-пилям в ходе инфекции и содержит два участка GC-богатых тандемных повторов (рис. 1). Эти последовательности отжигаются с конкурентной ДНК, содержащейся в большинстве гибридизационных буферов, поэтому для получения картины геномных «отпечатков пальцев» необходимо исключить этот компонент при использовании указанного зонда.

Семейство ГВР, выявляемое тандемным повтором из гена III бактериофага М13, отличается от семейств детектируемых с помощью минисателлитных зондов 33.6 и 33.15 (рис. 2), но сход-

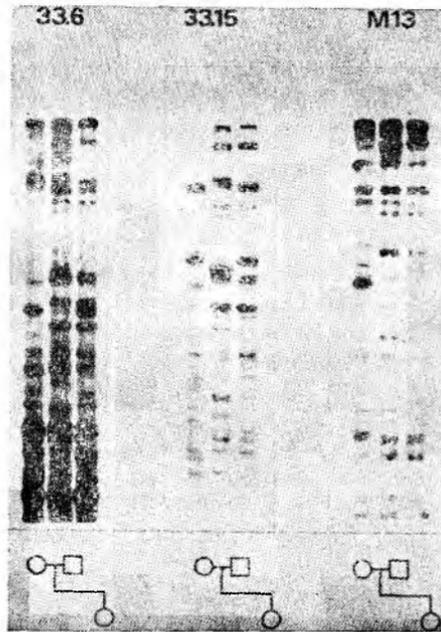


Рис. 2. Отпечатки ДНК приготовлены с использованием одного фильтра в гибридизационных экспериментах с разными пробами. 5 мкг ДНК женщины и ее родителей были гидролизваны ферментом рестрикции *MboI* и разделены на фореze в 1%-ном агарозном геле при 2 В/см в течение 48 ч. ДНК перенесена из геля на нейлоновую мембрану. Фильтр последовательно использовали для гибридизации с пробами 33.6, 33.15 и М13. На рисунках приведены радиоавтографы гибридизационных экспериментов. Отмывка от гибридизационных проб проводилась по методике, описанной в разд. 4.4. Большое сходство картин отпечатков ДНК матери и отца объясняется их двоюродным родством.

но с ними высокой степенью полиморфизма, а также тем, что частота аллелей уменьшается пропорционально их размерам. Средняя частота совпадения для одной полосы у индивидов европейского происхождения, не находящихся в родстве, составляет около 0,20 для фрагментов больше 2 т.п.н., причем для отдельного индивида таких полос выявляется 15—20 (Уэллс, неопубликованные данные). Таким образом, тандемный повтор M13 выявляет картину «отпечатков ДНК», сравнимую по своей сложности с картинами, получаемыми при использовании минисателлитов, и позволяет проанализировать 15—20 дополнительных гипервариабельных участков в ДНК человека и других млекопитающих. Так как повтор M13 не содержит сайтов узнавания для рестриктаз *Hinf*I, *Mbo*I, *Hae*III и *Alu*I и поскольку распределение детектируемых фрагментов сходно с таковым для отпечатков, полученных с помощью минисателлитов, представляется удобным и эффективным готовить блоты для гибридизации по очереди с каждой из трех проб (рис. 2).

2.2.1. Приготовление зонда на основе гена III фага M13

Тандемные повторы M13 локализируются в положениях 1700—1900 и 2300—2500 фагового генома. Можно использовать эти данные и свойства фагового вектора для синтеза гибридизационного зонда с высокой удельной активностью (табл. 3). После

Таблица 3. Мечение ДНК фага M13

1. В микроцентрифужную пробирку внесите 400 мкг одноцепочечной ДНК вектора M13 (например, M13, mp8), 4 нг 17-мерного секвенационного праймера, 1 мкл 10× буфера для фрагмента Клёнова и воду до конечного объема 10 мкл. Инкубируйте при 55—60 °С не менее часа.
2. Быстро центрифугируйте. Добавьте 10 мкл смеси АГТ¹⁾, 6 мкл ТЕ¹⁾-буфера, 30 мкКи [α -³²P] dCTP и 2 ед. ДНК-полимеразы I (фрагмент Клёнова). Смешайте пипетированием.
3. Инкубируйте при 37 °С 15 мин, оставив реакцию добавлением 70 мкл 3× SSC.

¹⁾ См. табл. 2.

отжига 17-нуклеотидного секвенационного праймера на одноцепочечной ДНК-матрице любого из фагов M13 серии mp и достройки второй цепи фрагментом Клёнова с участием меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, реакцию останавливают добавлением соли. Если время инкубации выбрано таким образом, что удвоение цепи происходит не далее гена III, то вновь синтезированная цепь длиной до 4,5 т.п.н. содержит меченые

нуклеотиды, а проксимальная часть генома фага M13 длиной 2,5 т. п. н., имеющая тандемные повторы, остается одноцепочечной. Это позволяет тандемному повтору гибридизоваться с комплементарными последовательностями ДНК, иммобилизованной на фильтре, и тем самым делает возможным использование меченой ДНК фага в качестве гибридизационной пробы. После освобождения от невключившихся меченых нуклеотидов можно измерить удельную активность ДНК-зонда, которая обычно варьирует в пределах $1-2 \times 10^9$ имп./мин/мкг ДНК матрицы. Однако, по-видимому, очистка зонда на колонке с сефадексом, снижает его гибридизационную активность, поэтому лучше избегать этого этапа и использовать в качестве зонда полученную реакционную смесь без дальнейшей ее очистки (этап 3, табл. 3).

3. Гель-электрофорез и перенос ДНК

С обзором методов гель-электрофореза можно познакомиться в работе [19]. Однако полезно все же вкратце выделить специфические условия, повышающие эффективность анализа методом геномной дактилоскопии.

3.1. Выбор фермента рестрикции

Обсуждаемые в этом разделе молекулярные основы вариабельности членов семейств ГВР заключаются в разном количестве повторяющихся единиц в каждом ГВР-локусе. Чтобы выявить вариации подобного рода с возможно большим разрешением, необходимо гидролизовать ДНК ферментом рестрикции, который расщепляет достаточно часто, но не нарушает целостности повторяющихся единиц ГВР. Для обсуждаемых в этом разделе ГВР удобно использовать рестриктазы *HinfI*, *MboI*, *AluI* и *HaeIII*.

В некоторых случаях встречаются фрагменты с такими близкими значениями R_f , что их нельзя разрешить на картине фореа. Тогда полезно повторить эксперимент с использованием другого фермента. При этом имеет место «перетасовка» рестриктов ГВР, что дает нам лишний шанс разделить сомнительные полосы. Когда используется фермент рестрикции, узнающий четырехнуклеотидную последовательность, эффект «перетасовки» обычно едва заметен, особенно для высокомолекулярных фрагментов, так как вклад в величину этих фрагментов фланкирующих последовательностей (содержащих сайты узнавания для рестриктаз) невелик, независимо от того, какой фермент используется. Тем не менее некоторые полосы можно идентифицировать благодаря тому, что их подвижность по другим ферментам будет лишь немного изменена. Для достижения эф-

фекта «перетасовки» наиболее подходящим считают фермент рестрикции *HaeIII* (Р. Шерингтон, неопубликованное сообщение).

3.2. Приготовление образцов ДНК для электрофореза

ДНК, получаемая обычным способом [20], обладает достаточно хорошим качеством для проведения анализа методом геномной дактилоскопии. Наилучшие результаты получают, если на дорожку приходится 1—5 мкг ДНК. Поскольку имеет значение не только присутствие, но и интенсивность отдельной полосы, важно достичь равномерного распределения материала между всеми дорожками геля. Хорошо известно, что измерения оптической плотности растворов ДНК дают ненадежные значения концентраций, которые могут рассматриваться только как грубые оценки. Для проверки полноты рестрикции и правильности нанесения необходимо поставить контрольный форе́з с аликвотами гидролизата ДНК и на основе этого подобрать оптимальное количество наносимой пробы.

Иногда для уменьшения наносимого объема бывает нужно осадить ДНК из рестрикционной смеси, но обычно в этой процедуре все же нет необходимости: хорошие результаты получаются и без этапа очистки. Если образец был осажден, очень важно промыть его 70%-ным этанолом для удаления избытка соли, которая нарушает подвижность фрагмента ДНК; важно также высушить осадок под вакуумом перед растворением, иначе присутствие следов этанола вызовет флотацию материала из лунок при нанесении.

3.3. Условия электрофореза

Оптимальные условия электрофореза для геля, используемого при геномной дактилоскопии, определяются требованиями к информативности получаемых отпечатков ДНК. Если данные необходимы для подтверждения структуры родословной или для окончательного уточнения картины в случае неудачно прошедшей гибридизации, или для сравнения образцов ДНК из разных тканей индивида, то желательно получить информацию о возможно большем числе полос, поддающихся разрешению. Для этих случаев наиболее удобно использовать 1%-ный агарозный гель и вести форе́з при 2 В/см в течение 48 ч с двумя сменами форе́зного буфера. Такие условия обеспечивают разрешение полос в диапазоне 2—25 т. п. н. Для сегрегационного анализа более важно достичь хорошего разделения наиболее высокомолекулярных гиперполиморфных фрагментов. В этом случае следует вести форе́з в 0,8%-ном геле при 1,5 В/см в течение 72 ч с

пятью сменами форезного буфера. При этих условиях все фрагменты короче 3 т. п. н. выходят из геля, и в нем остаются оптимально разделенными более информативные длинные фрагменты, по которым наблюдается высокая степень гетерозиготности.

Состав буфера для нанесения и форезного буфера (ТАЕ), используемых для приготовления отпечатков, приведен в табл. 4.

Таблица 4. Буферы для электрофореза

ТАЕ: 40 мМ Трис-НСl, 5 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, рН 7,7.

6-кратный буфер для нанесения образцов: 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленцианол, 15% фиколл (тип 400) (водный р-р).

Раствор для окраски гелей: раствор бромид аэтидия в ТАЕ, 50 мкг/л.

3.4. Перенос по Саузерну

После проведения электрофореза гель окрашивают бромидом этидия (табл. 4), и для оценки полноты проведения фореза и регистрации картины разделения фрагментов относительно маркеров размера гель фотографируют в УФ-свете.

Перенос по Саузерну проводят, как описано в методике, приведенной в табл. 5.

Таблица 5. Подготовка гелей для переноса

Работайте в перчатках!

1. Поместите гель в пластиковую ванночку. Добавьте 50 мл 0,25 М НСl и оставьте на качалке на 15 мин. Вылейте раствор НСl и добавьте 500 мл свежего раствора 0,25 М НСl. Оставьте еще на 15 мин. (На этом этапе ДНК частично апурицируется, что облегчает перенос высокомолекулярных фрагментов.)
2. Вылейте раствор кислоты и промойте гель в дистиллированной воде. Добавьте 500 мл 0,5 М NaOH/1,5 М NaCl. Оставьте при комнатной температуре на 15 мин (на качалке). Вылейте раствор и повторите эту процедуру.
3. Вылейте щелочной раствор и промойте гель в дистиллированной воде. Добавьте 500 мл 0,5 М Трис рН 7,5/1,5 М NaCl. Вылейте раствор и повторите процедуру. Гель готов для переноса ДНК на нейлоновый фильтр.

4. Условия гибридизации и отмывки фильтров

Наиболее критическим моментом в приготовлении отпечатков ДНК с помощью зондов на основе ГВР является гибридизация и отмывка фильтров. Оптимальные условия варьируют в зависимости от характера зондов.

4.1. Минисателлиты

4.1.1. Прегибридизация

1. Смочите фильтры в дистиллированной воде и поместите их в пластиковый пакет, по 2 фильтра на пакет. Каждый из фильтров должен быть повернут стороной, несущей ДНК, наружу.
2. Добавьте 15 мл предварительно прогретого до 37 °С прегибридизационного буфера с гепарином [21] (табл. 6).

Таблица 6. Буфер для гибридизации

	Формаид	SSC ¹⁾	Декстран сульфат	ДСН	Гепарин
Прегибридизация	50%	3×	—	0,2%	50 мкг/мл
Гибридизация	50%	3×	5%	0,2%	200 мкг/мл

¹⁾ SSC: 150 мМ NaCl, 15 мМ цитрат натрия pH 7,0.

3. Инкубировать пакет при 37 °С не менее 3 ч.

4.1.2. Гибридизация

1. Нагрейте 7,5 мл гибридизационного буфера с гепарином до 37 °С.
2. Добавьте зонд (4×10^6 — 10^7 имп./мин) и перемешайте, перевернув пробирку.
3. Надрежьте пакет, содержащий фильтры, и выдавите прегибридизационный буфер с помощью валика.
4. Добавьте в пакет гибридизационный буфер, содержащий зонд, и осторожно заплывте его, стараясь не допустить проникновения пузырей воздуха в пакет.
5. С помощью валика равномерно распределите зонд в пакете и инкубируйте в течение ночи при 37 °С.

4.1.3. Отмывка

1. Нагрейте в большой ванночке 1 л раствора, содержащего однократный стандартный цитратный солевой буфер (SSC) и 0,1%-ный додецилсульфат натрия (ДСН) до 65 °С.
2. Надрежьте пакет и выдавите раствор с зондом.
3. Поместите еще горячий фильтр в ванночку и инкубируйте при 65 °С в течение 15 мин покачивая, после чего перенесите раствор в ванночку, содержащую прогретый до 65 °С свежий раствор для отмывки. Инкубируйте 15 мин при 65 °С.

4. После инкубации перенесите фильтры из раствора для отмывки на бумажное полотенце и оцените количество оставшейся метки с помощью счетчика радиоактивности.
5. Продолжайте 15-мин отмывки при 65 °С до прекращения изменения количества остающейся на фильтре радиоактивности. Для зондов с очень высокой удельной активностью практически невозможно отмыть фильтры до низкого уровня радиоактивности, и поэтому рекомендуются более короткие сроки экспозиции.

4.2. Метод геномной дактилоскопии с использованием M13

4.2.1. Прегибридизация

Проводится так же, как и для минисателлитов.

4.2.2. Гибридизация

1. Нагрейте 10 мл буфера для гибридизации с гепарином до 37 °С, добавьте 50 мкл некипяченой пробы (половину реакционной смеси), перемешайте, переворачивая пробирку.
2. Выдавите буфер для прегибридизации из пакета и добавьте зонд.
3. Заплавьте пакет, равномерно распределите раствор с зондом и инкубируйте ночь при 37 °С.

4.2.3. Отмывка

1. Выдавите раствор с зондом из пакета и перенесите фильтр в большую ванночку.
2. Добавьте 1 л 3,0×SSC/0,1% ДСН и инкубируйте покачивая при комнатной температуре в течение 30 мин с одной сменой раствора для отмывки.
3. Промойте в 2,0×SSC/0,1% ДСН при комнатной температуре в течение 15 мин. После этой стадии фильтры можно подвергнуть радиоавтографии.

4.3. Радиоавтография

3. Слегка влажные фильтры заверните в тонкую пленку и поместите в кассету с усиливающими экранами.
2. Проявите рентгеновскую пленку, экспонированную в течение ночи при —70 °С.
3. Иногда на этой стадии сигнал от фона оказывается достаточно сильным. В этом случае заново отмойте фильтры в течение 45 мин при 65 °С в 1,0×SSC/0,1% ДСН и повторите радиоавтографию.

4. В последующих экспозициях лучше увеличить разрешение полос, экспонируя пленку в течение 5—10 дней без усиливающих экранов.

4.4. Удаление проб с нейлоновых фильтров

Для получения более полной информации от одного фильтра его можно гибридизовать по очереди со всеми тремя зондами, смывая после каждой гибридизации меченые пробы с фильтра (рис. 2). Больших потерь связанной с фильтром ДНК и возможных повреждений фильтра при отмывках можно избежать, если использовать нейлоновые мембраны (например, Hybond-N, Amersham International). Приведенная ниже методика позволяет легко удалить пробу, связанную с ДНК на фильтре.

1. Нагрейте 1 л щелочного раствора для отмывки (0,4 М NaOH) до 45 °С.
2. Инкубируйте 1—4 радиоактивных фильтра в этом растворе.
3. По истечении 30 мин инкубации перенесите фильтры в ванночку с нейтрализующим раствором (0,2 М Трис-HCl, pH 7,5, 0,1×SSC, 0,1% ДСН).
4. Инкубируйте фильтры при 45 °С в течение 30 мин со сменой нейтрализующего раствора через 15 мин.

После короткой промывки в дистиллированной воде фильтры можно заново использовать. Применяя эту методику отмывки и соблюдая простые предосторожности при хранении фильтров в промежутках между их использованием, удается до 10 раз получать хорошие результаты на одном и том же фильтре. Однако при отмывке от пробы неизбежно теряется часть иммобилизованной на фильтре ДНК. Зонд 33.15, по-видимому, лучше двух других связывается с ДНК, и для гибридизации с ним требуется меньшее количество материала на фильтре. Вот почему этот зонд следует применять последним, если один и тот же фильтр используется несколько раз.

5. Использование метода геномной дактилоскопии в анализе генетического сцепления

5.1. Обоснование метода

Методический подход, получивший название «обратная генетика» и оказавшийся очень полезным при изучении наследственных заболеваний, в настоящее время взят на вооружение широким кругом исследователей. За последние годы наши представления о мышечной дистрофии Дюшенна, муковисцидозе и ретинобластоме значительно расширились. Если раньше усилия ученых были направлены на выяснение закономерностей насле-

дования заболеваний, то сейчас на повестке дня стоит вопрос о локализации и молекулярной характеристике генов, ответственных за эти болезни [22—24].

Изучение большинства наследственных заболеваний шло именно таким путем. В некоторых случаях хромосомная локализация интересующего гена устанавливается достаточно легко. Это бывает, если у индивидов с абберантным фенотипом наблюдаются устойчивые аномалии в определенной области хромосомы (к примеру, 13q14 делеции при ретинобластоме). К сожалению, для большинства наследственных заболеваний такая благоприятная в плане диагностики ситуация не характерна и для локализации гена необходимо проводить анализ генетического сцепления.

Применение ПДРФ (полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) в анализе сцепления стало обычной процедурой и значительно ускорило процесс картирования [25]. Однако этот подход имеет и некоторые недостатки. В большинстве случаев ПДРФ представляет собой всего лишь диморфизм, и соответствующие локусы не могут поэтому характеризоваться более чем 50%-ной гетерозиготностью. Для того чтобы данное скрещивание дало какую-нибудь информацию о сцеплении, по крайней мере один из родителей должен быть гетерозиготным как по интересующей, так и по маркерной области.

Таким образом, большая часть семей, подвергнутых анализу на сцепление с применением ПДРФ, окажется совершенно неинформативной. Это пример неэффективного использования информационных ресурсов родословной. Как инструмент в анализе сцепления метод геномных отпечатков нашел применение в случаях тех заболеваний, биохимическая природа которых пока неизвестна или когда приуроченность к подозреваемому гену была исключена. Поскольку не существует простого метода определения, какая из полос «отпечатка» генома данного индивида представляет ту или иную полосу в картине другого индивида, обычная процедура получения данных о сцеплении по нескольким малым родословным невозможна. Сложность гибридационных картин не позволяет достоверно проследить наследование аллельных пар, но в рамках большой родословной и, конечно же, в группе sibсов отдельный фрагмент данного размера может рассматриваться для простоты предварительного анализа как отдельный локус. По этой причине наличие одной большой родословной является обязательным требованием (а широкие ветви sibсов — очень желательны) для традиционного сегрегационного анализа полос в геномном «отпечатке». Такие родословные редко когда можно получить для рецессивно наследуемых нарушений, однако для доминантных заболеваний — это реально.

Для сегрегационного анализа полос в «отпечатках» ДНК в силу допущенного упрощения, сделанного в отношении их аллелизма, классический метод правдоподобия не может быть применен. В данном случае допустима лишь оценка шансов на сцепление. Таким образом, метод следует рассматривать как быстрый предварительный анализ на сцепление. Если результат окажется обнадеживающим, т. е. если в отпечатках будет найдена полоса, наличие которой для данной родословной коррелирует с экспрессией аномального фенотипа, то эту полосу следует выделить и клонировать [26]. Таким путем можно получить локус-специфичный зонд и с его помощью проанализировать другие родословные с целью подтвердить или отвергнуть наличие сцепления.

Недостаток больших родословных для рецессивно наследуемых признаков, конечно, ограничивает применение метода геномной дактилоскопии, но не исключает полезность его использования для анализа рецессивных болезней. Если в родословной имеются близкородственные браки, возможно также картирование по гомозиготности [27]. Суть этого метода в следующем: если оба родственных индивида несут редкий рецессивный ген, то вероятнее всего они унаследовали его от единого предка [28]. Если индивиды находятся в достаточно далеком родстве, то общие для них последовательности будут составлять лишь малую долю генома. К тому же поскольку аллельные частоты фрагментов, образующих полосы в отпечатках (особенно больших фрагментов), очень малы, то маловероятно, что в геноме родственников эти фрагменты совпадут, если они произошли от разных предков. Если при близкородственном скрещивании больные дети имеют общую для их геномных отпечатков полосу в удвоенном количестве, а здоровые дети наследуют одинарную дозу или вовсе не имеют этой полосы, то тем самым подтверждается гипотеза о физическом сцеплении между участком, ответственным за признак, и данной полосой. Условившись об аллелизме, можно подсчитать шансы на сцепление, но, как уже отмечалось, для подтверждения или опровержения наличия сцепления фрагмент необходимо клонировать.

5.2. Статистические расчеты

На блоте среднего качества с помощью одной пробы можно проследить до 10—20 полос, что в сумме для трех проб дает 30—60 маркеров. Генетические данные указывают на то, что не существует заметной кластеризации ГВР [16], поэтому есть основания предположить их независимое расположение. Вероятность P того, что по крайней мере один из 45 независимо расположенных маркеров находится на генетическом расстоянии

в 15% от сайта, ответственного за признак, может быть оценена с помощью алгоритма Элстона и Ланга [29, 30] равной приблизительно 0,33. Таким образом, при наличии соответствующей родословной этот метод позволяет успешно обнаружить сцепление.

Необходимо определить критическое значение вероятности сцепления с тем, чтобы после подсчета этой вероятности на основе предварительного анализа отпечатков можно было сделать заключение о необходимости следующей стадии — клонирования «подозрительной» полосы. В классических методах правдоподобия критическое значение лод-балла составляет 3: $z(\theta) = 3$; лод-балл, превышающий 3, рассматривается как свидетельство в пользу сцепления [31]. Учитывая, что затраты на клонирование фрагмента достаточно велики, для перехода к этому этапу оправданным представляется требование уверенного превышения критической величины лод-балла на этапе предварительного анализа (к примеру, 1000:1 или более в пользу сцепления). Как же рассчитываются шансы на сцепление?

Легко получить численную оценку рекомбинации между маркерной областью и участком, ответственным за признак:

$$\theta = \frac{r}{n},$$

где r — количество рекомбинантов, n — общее количество возможных рекомбинаций.

Исходя из этого, обычным путем можно получить соотношение для оценки вероятности сцепления:

$$\frac{L(\theta)}{L(0,5)} = \frac{\theta^n (1 - \theta)^{n-r}}{0,5^n}, \quad \text{и } \lambda = \frac{L(\theta)}{L(0,5)} = 2^{n\theta} (1 - \theta)^{n-r}.$$

Это соотношение не учитывает поправку на использование множественных маркеров. Заметим, однако, что существуют некоторые сомнения в необходимости коррекции результатов в тех случаях, когда используется менее 100 маркеров. По мнению Отта [31], при увеличении количества маркеров с ростом вероятности ошибочного выявления сцепления растет и вероятность того, что хотя бы один из маркеров действительно сцеплен с изучаемым признаком, при этом последняя вероятность растет быстрее, чем первая, поэтому доля истинных сцеплений среди всех выявленных не уменьшается. Являясь математически убедительным, этот вывод противоречит интуиции. Высокий уровень ошибочных позитивных ответов (наличие сцепления) на предварительном этапе сделал бы метод отпечатков малоинформативным. В связи с этим представляется целесообразным сделать условие перехода ко второй стадии анализа более строгим, подняв значение порога. В будущем при наличии более убедительных данных можно было бы рассмотреть возможность

тельной модели, описывающей эту задачу, можно было бы его снизить.

5.3. Практические аспекты сегрегационного анализа

5.3.1. Минимальный размер родословных

Для того чтобы сегрегационный анализ полос в отпечатках ДНК sibсов (рис. 3) был информативным, необходимо изучить не менее 10 мейозов (при $n=10$ и $r=0$, $\theta=0$ и $\lambda=1024$; а при $n=9$ и $r=0$ $\lambda=512$). Такое количество sibсов далеко не всегда доступно для изучения, и поэтому приходится проводить сегрегационный анализ по большой родословной.

Для фрагментов короче 3 т.п.н. частота встречаемости одного и того же фрагмента у индивидов, не находящихся в родстве, очень мала. Таким образом, необязательно иметь для исследований образцы ДНК обоих родителей близнецов; при наличии отпечатков ДНК одного из родителей отпечатки второго можно восстановить с высокой степенью достоверности. Если есть ДНК обоих родителей, то образцы следует разгонять на фореze в соседних дорожках геля. В этом случае фрагменты в геномных отпечатках потомков можно с легкостью отнести к тому или иному родителю.

5.3.2. Пример с сегрегационного анализа, проводимого с помощью метода геномных отпечатков

Ниже приводится пример анализа наследования полос в геномных отпечатках отдельной широкой sibсовой ветви (рис. 3).

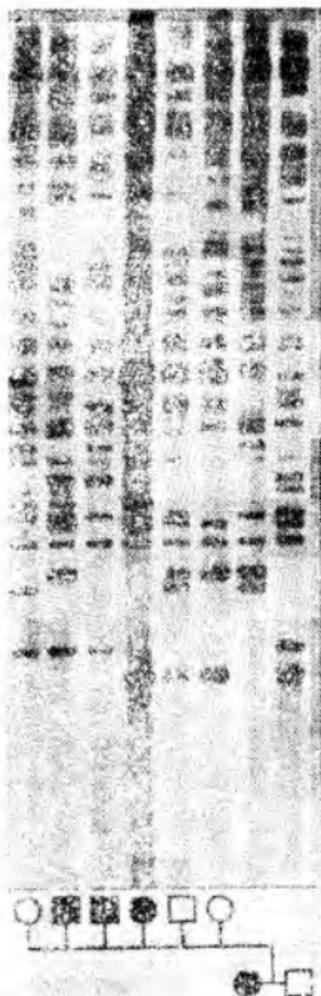
Из-за несовершенства агарозного геля при электрофореze (приводящего к эффекту «банана») лучше не использовать для считывания данных отпечатков компьютерную технику, а «прочитать» их «вручную». Это легко проделать, если отдельно исследовать каждого из sibсов, параллельно проводя сегрегационный анализ полос в отпечатках каждого из родителей. Удобно

Рис. 3. Сегрегация гипервариабельных фрагментов, выявленных минисателлитной пробой 33.15. Образцы ДНК (3 мкг) гидролизваны *HinfI*, разделены фореzом в 0,8%-ном агарозном геле при 1,5 В/см в течение 72 ч и перенесены на нейлоновую мембрану по методике, описанной в тексте. Родство индивидов показано на схеме родословной, где кружки изображают женщин, а квадраты — мужчин. Закрашенные символы демонстрируют передачу аутосомного доминантного признака от матери к трем ее детям. Сегрегация полос в отпечатках сведена в таблицу, где для каждой полосы, выявляемой у матери, приведены соотношения вероятностей λ (см. разд. 5), $g(c)$ и $g(r)$ — количество рекомбинантов, выявленных среди потомства, исходя из гипотезы о сцеплении (для одной и разных групп сцепления, соответственно). Отцовские аллели пронумерованы 1—21 и материнские аллели обозначены буквами А—W в нисходящем порядке. Аллели, отмеченные звездочкой, не учитывались, так как мигрировали слишком близко от полосы из отпечатка другого родителя (показаны в скобках).

Дорожки

		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	
								A
								B +
								C
	1	+	+	+				D
	2	+	+		+		+	E(9)
	3				+	+	+	F
	4	+		+		+		G
	5	+	+	+		+		H
	6		+		+	+	+	Материнские аллели
Отцовские аллели	7			+		+	+	
	8			+	+	+		J +
	9(В)							K(14)
	10	+		+	+		+	L
	11	+	+		+	+	+	M(16)
	12			+		+	+	N +
	13	+	+	+			+	O
	14(К)							P +
	15	+	+	+	+	+	+	Q +
	16(М)							R
	17					+		S
	18	+		+				T +
	19		+					U
	20	+	+					V +
	21		+	+	+			W

	$r(c)$	$r(r)$	θ	λ
+		1	0.17	4.3
+	+	2	0.33	1.4
+		2	0.33	1.4
	+	2	0.33	1.4
		2	0.33	1.4
	+	3	0.50	1.0
+		2	0.33	1.4
		2	0.33	1.4
	+	2	0.33	1.4
+	+	2	0.33	1.4
		1	0.17	4.3
+	+	2	0.33	1.4
+		2	0.33	1.4
	+	1	0.17	4.3
+	+	2	0.33	1.4
		2	0.33	1.4
	+	2	0.33	1.4
		2	0.33	1.4
	+	3	0.50	1.0
+	+	3	0.50	1.0
		1	0.17	4.3
+	+	1	0.17	4.3



присваивать полосам одного родителя цифры, а полосам другого — буквы.

После регистрации и отсчета полос для каждого из sibсов можно проанализировать полученные результаты на наличие сцепления. Если рассматривается гипотеза сцепления локуса, ответственного за изучаемый наследственный дефект, с какой-либо из полос в отпечатках ДНК большого родителя, то можно сосчитать число рекомбинантных и нерекомбинантных индивидов, численно оценить долю рекомбинантов ($\theta = r/n$) и рассчитать вероятность по схеме, приведенной в разд. 5.1. Эта процедура продлевается для каждой из полос в отпечатках ДНК большого родителя.

6. Другие применения метода геномных отпечатков

6.1. Определение структуры родословной

Часто в генетических исследованиях бывает необходимо точно установить для индивида истинное биологическое отцовство. Традиционные средства, используемые для этого, включают определение группы крови, анализ белков и ДНК-маркеров. Эти методы страдают тем недостатком, что не могут обеспечить

высокую степень индивидуальной специфичности, поэтому они позволяют с достоверностью лишь исключить отцовство. Напротив, отпечатки ДНК фактически полностью специфичны для данного человека, в силу чего представляют собой хороший инструмент для положительной идентификации [17, 32, 33].

Полосы, составляющие отпечатки ДНК, наследуются строго по схеме Менделя. Полагая скорость мутирования



Рис. 4. Установление истинного отцовства с помощью геномной дактилоскопии. Каждая полоса, выявленная пробой на основе минисателлита 33.15 в ДНК индивида S, не имеющая аналога в отпечатках ДНК матери, (m) присутствует в отпечатке ДНК истинного отца (f), при этом только три из восьми нематеринских полос присутствуют в отпечатках ДНК родного дяди по отцу.

равной 10^{-4} /т.п.н./мейоз, можно сделать вывод, что практически все полосы геномного отпечатка данного человека должны выявляться также в отпечатках ДНК либо его матери, либо отца. Около половины всех полос отпечатка ДНК потомства должны иметь отцовское происхождение. При ис-

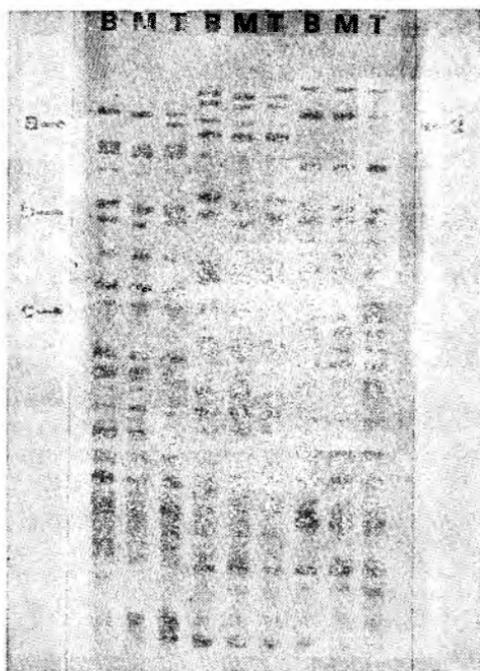


Рис. 5. Применение метода геномной дактилоскопии для сравнения ДНК из нормальной и неопластической тканей. На автографе представлены образцы ДНК, выделенной из периферической крови (В), нормальной слизистой (М) и опухолевой ткани (Т), полученных от трех больных с злокачественными опухолями желудочно-кишечного тракта. ДНК (10 мкг) была гидролизованна *Hinf*I и разделена электрофорезом в 1,0%-ном агарозном геле при 2 В/см в течение 48 ч, после чего перенесена на нейлоновую мембрану и гибридизована с пробой на основе минисателлита 33.15. У первого пациента в отпечатке опухолевой ДНК наблюдается отклонение от нормы в виде двух новых полос (а, б). У второго пациента полоса (с) присутствует в ДНК лейкоцитов периферической крови и в ДНК нормальной слизистой толстой кишки, но отсутствует в ДНК, выделенной из клеток опухоли толстой кишки. У третьего пациента новая полоса (d) появилась в отпечатке ДНК, выделенной из клеток опухоли желудка. Как и ожидалось, отпечатки ДНК нормальных лейкоцитов и ДНК клеток нормальной слизистой не отличаются. В трех случаях появление новой полосы сопровождалось падением интенсивности высокомолекулярной полосы, следовательно, механизм появления новой полосы в субпопуляции опухолевых клеток может заключаться в неравном кроссинговере, приводящем к потере родительским аллелем нескольких копий повтора и, следовательно, к его укорочению.

пользовании всех трех проб разрешению поддаются в среднем 15 фрагментов отцовского происхождения в диапазоне длин 4—20 т. п. н. Вероятность того, что предполагаемый отец будет случайно иметь все 15 фрагментов и что ложное отцовство не будет установлено, очень мала ($<4 \times 10^{-11}$, если предполагаемый отец не родственник истинного отца, $<4 \times 10^{-5}$, если они являются братьями) (рис. 4).

6.2. Сравнения в пределах одного организма

Метод геномной дактилоскопии представляет собой удобный инструмент для быстрого анализа генома на предмет идентификации в нем соматических изменений. Этот подход нашел применение при сравнении лейкоцитарной и конституционной ДНК после пересадки костного мозга, а также при анализе ДНК опухолевой и нормальной тканей [34, 35].

Для многих злокачественных опухолей были зарегистрированы изменения геномных отпечатков: появление новых полос или исчезновение старых (рис. 5). Последний факт наиболее интересен, так как недавно было показано, что опухолевые патологии чаще ведут именно к потере некоторых гипервариабельных аллелей. Приготовленные с использованием описанных проб «отпечатки» опухолевой и нормальной ДНК индивида дают возможность изучить до 60 аллелей в диапазоне длин фрагментов 2—20 т. п. н., что обеспечивает большую вероятность выявления изменений.

Благодарности

Я хотел бы выразить благодарность Мартину Фею за предоставленную возможность использовать радиоавтографы, приведенные на рис. 5, а также за критический анализ рукописи. Рэчел Кит и Хелен Блэйбер за помощь в подготовке рукописи, Робину Шеррингтону за плодотворное обсуждение и Стефену Ридерсу за советы и поддержку. Я благодарен фонду Роудз, финансировавшему эту работу, и профессору сэру Дэвиду Везероллу, заведующему лабораторией, в которой выполнялась эта работа.

Литература

1. Wyman A. R., White R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6754.
2. Higgs D. R., Goodbourn S. E. Y., Wainscoat J. S., Clegg J. B., Weatherall D. J. (1981) Nucleic Acids Res., 9, 4213.
3. Bell G. I., Selby M. J., Rutter W. (1982) Nature, 295, 31.
4. Capon D. J., Chen., Levinson A. D., Seeburg P. H., Goeddel D. V. (1983) Nature, 302, 33.
5. Goodbourn S. E. Y., Higgs D. R., Clegg J. B., Weatherall D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5022.
6. Proudfoot N. J., Gill A., Maniatis T. (1982) Cell, 31, 553.
7. Jarman A. P., Nicholls R. D., Weatherall D. J., Clegg J. B., Higgs D. R. (1986) EMBO J., 5, 1857.

8. Higgs D. R., Wainscoat J. S., Flint J., Hill A. V. S., Thein S. L., Nicholls R. D., Teall H., Ayyub H., Peto T. E. A., Fatusi Y., Jarman A. P., Clegg J. B., Weatherall D. J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5165.
9. Simmler M. C., Johnsson C., Petit C., Rouyer F., Vergnaud G., Weissenbach J. (1987) EMBO J., 6, 963.
10. Smith G. P. (1976) Science, 191, 528.
11. Goodbourn S. E. Y., Higgs D. R., Clegg J. B., Weatherall D. J. (1984) J. Mol. Biol. Med., 2, 223.
12. Reeders S. T., Breuning M. H., Davies K. E., Nicholls R. D., Jarman A. P., Higgs D. R., Pearson P. R., Weatherall D. J. (1985) Nature, 317, 542.
13. Hodgkinson S., Sherrington R., Gurling H., Marchbanks R., Reeders S., Mallet J., McInnis M., Petursson H., Brynjolfsson J. (1987) Nature, 325, 805.
14. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. (1985) Nature, 314, 67.
15. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. (1987) Science, 235, 1616.
16. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Weatherall D. J., Ponder B. A. J. (1986) Am. J. Hum. Genet., 39, 11.
17. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. (1985) Nature, 316, 76.
18. Vassart G., Georges M., Monsieur R., Brocas H., Lequarre A. S., Christophe D. (1987) Science, 235, 683.
19. Sealy P. G., Southern E. M. (1982) In: Rickwood D., Hames B. D. (eds), Gel Electrophoresis of Nucleic Acids—A Practical Approach. IRL Press, Oxford, p. 39.
20. Old J. M., Higgs D. R. (1982) In: Methods in Haematology. Weatherall D. J. (ed.), Churchill Livingstone, London, p. 74.
21. Singh L., Jones K. W. (1984) Nucleic Acids Res., 12, 5627.
22. Davies K. E., Pearson P. L., Harper P. S., Murray J. M., O'Brien T., Sarfarazi M., Williamson R. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 2303.
23. Monaco A. P., Bertelson C. J., Middlesworth W., Colletti C.-A., Aldridge J., Fischbeck K. H., Bartlett R., Pericak-Vance M. A., Roses A. D., Kunkel L. M. (1985) Nature, 316, 842.
24. Cavenee W. K. (1986) Trends Genet., 2, 299.
25. Botstein D., White R. L., Scolnick M. H., Davis R. W. (1980) Am. J. Hum. Genet., 32, 314.
26. Wong Z., Wilson V., Jeffreys A. J., Thein S. L. (1986) Nucleic Acids Res., 14, 4605.
27. Lander E. S., Botstein D. (1987) Science, 236, 1567.
28. Bulmer M. J. (1985) The Mathematical Theory of Quantitative Genetics. Oxford University Press, Oxford.
29. Elston R. C., Lange K. (1975) Ann. Hum. Genet., 38, 341.
30. Elston R. C. (1975) Hum. Gene Mapping, 2, 290.
31. Ott J. (1985) Analysis of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
32. Jeffreys A. J., Brookfield J. F. Y., Semeonoff R. (1985) Nature, 317, 818.
33. Gill P., Jeffreys A. J., Werrett J. D. (1985) Nature, 318, 577.
34. Thein S. L., Jeffreys A. J., Blacklock H. A. (1986) Lancet, ii, 37.
35. Thein S. L., Jeffreys A. J., Gooi H. C., Coiter F., Flint J., O'Connor N. T. J., Weatherall D. J., Wainscoat J. S. (1987) Br. J. Cancer, 55, 353.

КАРТИРОВАНИЕ СЛОЖНО НАСЛЕДУЕМЫХ ПРИЗНАКОВ ЧЕЛОВЕКА

Э. Ландер¹

1. Введение

За последние несколько лет генетика человека достигла значительных успехов. Конечно, еще с момента переоткрытия законов Менделя было очевидно, что человек подчиняется тем же законам наследственности, что и другие организмы. Более того, именно анализ наследования семейных заболеваний убедительно свидетельствовал в пользу менделизма. Однако, несмотря на это многообещающее начало, генетика человека намного отстала от частной генетики таких организмов, как дрозофила и кукуруза, по двум главным причинам. Во-первых, люди не лабораторные животные, с которыми можно проводить скрещивания, адекватные целям эксперимента, и, во-вторых, обнаружено лишь небольшое число генетических маркеров, степень гетерозиготности по которым, позволяла рассматривать встречающиеся в естественной популяции браки как информативные для анализа сцепления.

Разработка метода рекомбинантных ДНК явилась импульсом для развития генетики человека. Было высказано предположение [1], что генетический полиморфизм на уровне последовательностей ДНК, который можно легко наблюдать на примере полиморфизма длины рестриционных фрагментов (или ПДРФ), — достаточно частое явление и соответствующие аллельные варианты могут использоваться как генетические маркеры, позволяющие проводить систематическое изучение наследственности человека, включая построение полной картины его генома.

Прежде всего технология ПДРФ была применена для анализа менделевских заболеваний. Обширные исследования подтвердили, что феномен ПДРФ действительно наблюдается довольно часто [2], и уже совсем недавно был разработан метод поиска высокополиморфных ПДРФ [3]. На сегодняшний день

¹ E. S. Lander, Whitehead Institute of Biomedical Research, 9 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, USA.

известно более 2500 ПДРФ-маркеров [4]. Анализ некоторых из них в родословных с больными выявил ПДРФ-маркеры, проявляющие тесное генетическое сцепление с мышечной дистрофией Дюшенна [5], болезнью Гентингтона [6], муковисцидозом [7—10], поликистозом почек у взрослых [11], ретинобластомой [12], ранней семейной формой болезни Альцгеймера [13], биполярным аффективным психозом в большой родословной амишей (восточная Пенсильвания) [14], нейрофиброматозом Реклингаузена [15, 16], множественной эндокринной неоплазией типа 2А [17, 18] и семейным полипозом [19]. Более того, значительный прогресс в построении генетической карты человека [20, 21] обещает сделать процесс поиска сцеплений более эффективным за счет замены случайного выбора ПДРФ систематическим анализом всех ПДРФ, диспергированных по геному человека.

Достигнутые успехи убеждают нас в том, что для любого заболевания человека может быть найден сцепленный с ним ПДРФ-маркер при условии, что это заболевание:

- 1) наследуется как простой менделевский признак — рецессивный или доминантный;
- 2) возникает вследствие мутации в уникальном генном локусе;
- 3) достаточно распространено, чтобы можно было собрать необходимое количество семей с несколькими пораженными.

К сожалению, очень многие из интересующих нас наследственных признаков человека обусловлены генетическими причинами, менее подходящими для такого анализа. Затруднения заключаются в следующем:

- 1) неполная пенетрантность, вследствие которой не все индивиды — носители мутантного генотипа, проявляют фенотип, отличный от нормы;
- 2) фенোকопии, вследствие которых индивиды с нормальным генотипом могут проявить мутантный фенотип по причинам негенетического характера;
- 3) генетическая гетерогенность, благодаря которой мутации по нескольким различным генетическим локусам могут дать вполне сходную клиническую картину;
- 4) генные взаимодействия, вследствие которых фенотип является результатом функционирования аллелей нескольких локусов;
- 5) редкость заболевания, которая может затруднить или сделать невозможным анализ семей с несколькими больными индивидами.

Эти проблемы (кроме последней) обычны при анализе таких хорошо изученных объектов, как бактерии, дрожжи, нематоды и плодовые мушки. По-видимому, и человек в этом отношении не является исключением. Чтобы преодолеть указанные труд-

ности, генетики обычно работают с чистыми линиями (штаммами), несущими мутацию по единичному локусу, культивируя огромное количество особей в контролируемых условиях и проводя целенаправленные скрещивания. В генетике человека приходится, однако, анализировать уже имеющиеся браки.

В этой главе мы даем обзор основных принципов, на основе которых планируется изучение генетического сцепления у человека в случаях, когда возникают указанные осложнения. Акцент будет сделан на практических вопросах отбора семей с целью максимизации вероятности обнаружения сцепления. Мы не будем подробно останавливаться на вычислительных и чисто алгебраических аспектах такого анализа. (Более полную информацию по этим вопросам см. в работах [22—24].) Необходимо заметить, что оптимальное планирование анализа сцепления существенно зависит от точности модели наследования заболевания (степени пенетрантности, числа независимых локусов, природы генетических взаимодействий, частоты фенкопий, частоты семей с несколькими поражениями и т. п.), а это не часто бывает известно заранее. Если генетика в действительности очень сложна (например, если болезнь может быть вызвана мутацией в любом из 100 возможных локусов), анализ сцепления явно будет неуспешным. Поэтому выбор плана зависит в определенной степени от знания возможных осложнений. Заметим, что точное планирование значительно увеличивает мощь анализа сцепления при изучении заболеваний со сложным типом наследования.

2. Основы анализа сцепления

Основы анализа генетического сцепления достаточно полно изложены в работе Отта [25]. Мы лишь суммируем здесь основные понятия анализа правдоподобия.

Предположим, что мы хотим сравнить рабочую гипотезу H с альтернативной «нулевой» гипотезой H_0 . Гипотеза H , к примеру, может утверждать, что локус ПДРФ сцеплен с заболеванием с 10%-ной частотой рекомбинаций, в то же время по гипотезе H_0 сцепление может вовсе отрицаться. (В действительности, это сильное упрощение, так как, вообще говоря, мы должны рассматривать множество альтернативных гипотез, соответствующих сцеплению с другими значениями частоты рекомбинации, отличными от рассматриваемой.) После сбора семейных данных мы подсчитываем две вероятности: P — вероятность того, что наблюдаемые данные не противоречат основной гипотезе H , когда она истинная, и P_0 — вероятность того, что те же данные могли иметь место, когда верна гипотеза H_0 . По отношению P/P_0 (отношение шансов или правдоподобия) можно судить о том, насколько более вероятно появление на-

блюдаемых данных при условии истинности H , чем при условии истинности H_0 . Если это отношение превосходит какой-нибудь достаточно большой порог T , мы отвергаем H_0 в пользу гипотезы H .

По соглашению, в генетике человека предпочитают использовать десятичные логарифмы отношений вероятностей, именуемые лод-баллами (от английского \log_{10} of the Odds Ratio). Отношения вероятностей для независимых выборок могут быть объединены путем перемножения, и, таким образом, лод-баллы, полученные по независимым выборкам, могут просто суммироваться.

При планировании анализа возникают два вопроса.

1. Порог: какой должна быть величина порога T , чтобы снизить до приемлемой величины риск ошибочно отвергнуть нулевую гипотезу H_0 , в случае, когда она в действительности верна?
2. Необходимая величина выборки: как велика должна быть выборка для того, чтобы можно было с большой достоверностью принять гипотезу H в случае, когда она действительно верна?

В генетике человека принятая величина порога [26] для единичного наблюдения сцепления соответствует отношению шансов не меньше чем $1000:1$ и значению лод-балла $3,0$. Этот порог не такой строгий, как может показаться. Два случайным образом выбранных локуса в геноме человека, вероятнее всего, располагаются в разных хромосомах или в разных хромосомных плечах, если речь идет об одной хромосоме. При грубой оценке имеется шансов $50:1$ против сцепления. Даже если, согласно наблюдаемым данным, вероятность сцепления в 1000 раз превышает вероятность его отсутствия, тот факт, что в общем случае отсутствие сцепления в 50 раз более правдоподобно, чем его наличие, означает, что лод-балл, равный 3 , соответствует истинной величине отношения шансов за сцепление только $20:1$. Другими словами, при значении лод-балла, равном 3 , в одном из 20 случаев может быть ложный результат. (Иногда авторы ошибочно утверждают, что лод-балл, равный 3 , означает 1000 -кратное превышение вероятности сцепления над вероятностью его отсутствия — это неверно.) При величине лод-балла, равной 4 , результат за наличие сцепления будет фиктивным в одном случае из 200 .

Необходимый размер выборки может быть установлен подсчетом ожидаемого вклада каждой семьи в общую сумму лод-баллов. При заданной структуре семьи подсчитывается «ожидаемое значение лод-балла», или ELOD (от англ. «Expected LOD score»). Необходимо набрать достаточное количество семей, чтобы сумма ожидаемых лод-баллов значительно превы-

сила порог, требуемый для принятия гипотезы о наличии сцепления.

Сила метода правдоподобия — в его гибкости. При наличии генных взаимодействий, к примеру, можно проверить гипотезу, согласно которой для проявления болезни необходимо наличие мутаций одновременно по обоим локусам. В случае же с генетической гетерогенностью можно проверить гипотезу о том, что для проявления заболевания достаточно мутации по любому из двух локусов. В данной ситуации это означает, что в каждой семье будет наблюдаться сцепление только с одним из двух локусов.

3. Карта генетического сцепления генома человека

Генетика человека существенно продвинется вперед с появлением полной карты сцепления. Такая карта будет состоять из маркеров ПДРФ, равномерно разбросанных по всем хромосомам, покрывая в целом около 3300 сантиморганид (сМ).

За последние несколько лет в этом направлении был сделан значительный шаг вперед. В конце 1987 г. Донис-Келлер [20] сообщил о построении карты для 403 локусов генома человека, распределенных по всем группам сцепления соответственно числу хромосом. В это же время Уайт [21] распространил буклеты, содержащие 255-локусную карту, с группами сцепления, охватывающими 17 из 23 хромосом. Так как перекрывание между наборами маркеров, изученными в этих двух группах, невелико, возможно построение 600-локусной суммарной карты. Учитывая, что в настоящее время этими и другими группами исследователей картируется множество дополнительных ПДРФ-маркеров, представляется вполне реальным, что вскоре в нашем распоряжении окажется карта для более чем 1000 ПДРФ. Эта карта будет иметь в среднем по одному маркеру на каждые 3 сМ (хотя реальные промежутки будут случайными, а не регулярными).

Такая плотная карта ПДРФ-маркеров чрезвычайно удобна для анализа человеческого генома.

1. *Все без исключения семьи оказываются полностью информативными для анализа сцепления.* Когда в анализе сцепления используются случайные и некартированные ПДРФ-маркеры, мейозы, происходящие у индивидов, гомозиготных по одному из них, не являются информативными для анализа сцепления ПДРФ-маркера с интересующим нас заболеванием. Наличие плотной карты позволяет, однако, выбирать в любом районе несколько близко расположенных ПДРФ таким образом, чтобы все индивиды были заведомо гетерозиготными хотя бы по одному из них. Получение такой инфор-

мации позволяет осуществить анализ полилокусного сцепления с помощью компьютера.

2. *Наследование локуса, ответственного за заболевание, можно проследить более строго, используя фланкирующие маркеры.* Если между маркерами, расположенными по обе стороны от предполагаемого локуса, ответственного за болезнь, рекомбинация не наблюдается, можно быть уверенным, что данный локус, расположенный между ними, наследовался совместно с этими маркерами (если не учитывать малую вероятность того, что мог произойти двойной кроссинговер). В действительности, в генетике давно уже считается, что анализ по таким тройным перекрестам много точнее, чем по двойным. Повышенная точность упрощает процедуру принятия или отклонения гипотезы, и таким образом, уменьшает необходимое для анализа количество семей (см., к примеру, рис. 1).

3. *Можно одновременно проследить наследование нескольких разных районов генома.* Это позволяет установить сцепление в случае генетической гетерогенности заболевания.

Нам представляется, что в будущем анализ сцепления первоначально будет основан на использовании стандартного набора приблизительно 150—200 высокоинформативных ПДРФ-маркеров, распределенных по всему геному, с интервалом около 15—20 сМ. После того как все изучаемые родословные окажутся генотипированными по каждому маркерному локусу, будет проведен компьютерный анализ, тестирующий каждый такой участок на наличие шансов за сцепление (т. е. на превышение величины суммарного лод-балла, равной 1,5—2,0). Любой фрагмент, предположительно сцепленный с изучаемым признаком, будет изучен затем более подробно с использованием плотной карты ПДРФ, например с плотностью один маркер на каждые 3 сМ. Это позволит извлечь всю информацию, заключенную в родословной, и увеличит величину лод-балла. Естественно, при планировании такого анализа вполне уместен вопрос: сколько семей необходимо, чтобы при наличии редкой карты ПДРФ уловить хотя бы намек на сцепление, а для плотной карты ПДРФ иметь возможность доказать с определенностью наличие сцепления?

4. Планирование анализа сцепления для болезней с простым типом наследования

Под простым типом наследования мы понимаем, что болезнь: 1) наследуется как классический менделевский доминантный или рецессивный признак, проявляющий полную пенетрантность, и 2) вызвана мутациями в одном локусе. Данные

точных эпидемиологических исследований заболевания обычно дают основания судить о том, справедливо первое условие или нет. В противоположность этому второе условие обычно следует принимать на веру: не существует такого мощного метода (за исключением картирования самого гена) для доказательства того, что мутации по одному локусу являются причиной данного заболевания, и в то же время существует много поводов усомниться в этом. Но к данному вопросу мы вернемся позже, при обсуждении генетической гетерогенности (разд. 6).

Болезнь Гентингтона и муковисцидоз являются яркими примерами признаков с доминантным и рецессивным типом наследования, соответственно. Оказывается, что в обоих случаях болезнь — следствие мутаций единичного локуса (на хромосоме 4p для болезни Гентингтона и 7q — при муковисцидозе).

Для заболевания с простым типом наследования относительно легко построить карту сцепления. Рассчитав сумму ELOD-баллов (ожидаемая величина лод-балла), можно прямо оценить требуемую величину выборки. На рис. 1А, Б показано число ядерных семей с двумя или тремя пораженными, которое требуется, чтобы гарантировать 50%-ную вероятность успеха при картировании доминантного или рецессивного признака. Это число является функцией плотности расположения используемых ПДРФ-маркеров. Рисунок демонстрирует количество семей, необходимое 1) в случае, когда несколько маркеров рестрикционного полиморфизма используются по отдельности, и 2) если задействован весь потенциал карты ПДРФ, т. е. используются фланкирующие маркеры. Рис. 1В, Г позволяет судить о количестве семей, необходимых для достижения успеха в 95% случаев. (В каждом случае предполагается, что ПДРФ полностью информативны: по существу, закономерность такова, что потребуется вдвое большее количество семей, если используемые ПДРФ информативны в 50% случаев.) Как следует из рис. 1, необходимое количество семей (<12) вполне эффективно при наличии геномной карты ПДРФ, отстоящих друг от друга на расстоянии 20—30 см.

Далее мы рассмотрим признаки с более сложным типом наследования и обсудим проблемы, возникающие при их картировании с помощью анализа сцепления, и пути их преодоления.

5. Осложнения: неполная пенетрантность и ошибки клинической диагностики

Генетический признак, для проявления которого необходимы дополнительные факторы, проявляет неполную пенетрантность. Эти факторы могут включать в себя условия окружающей среды, генетическое предрасположение, а также случай-

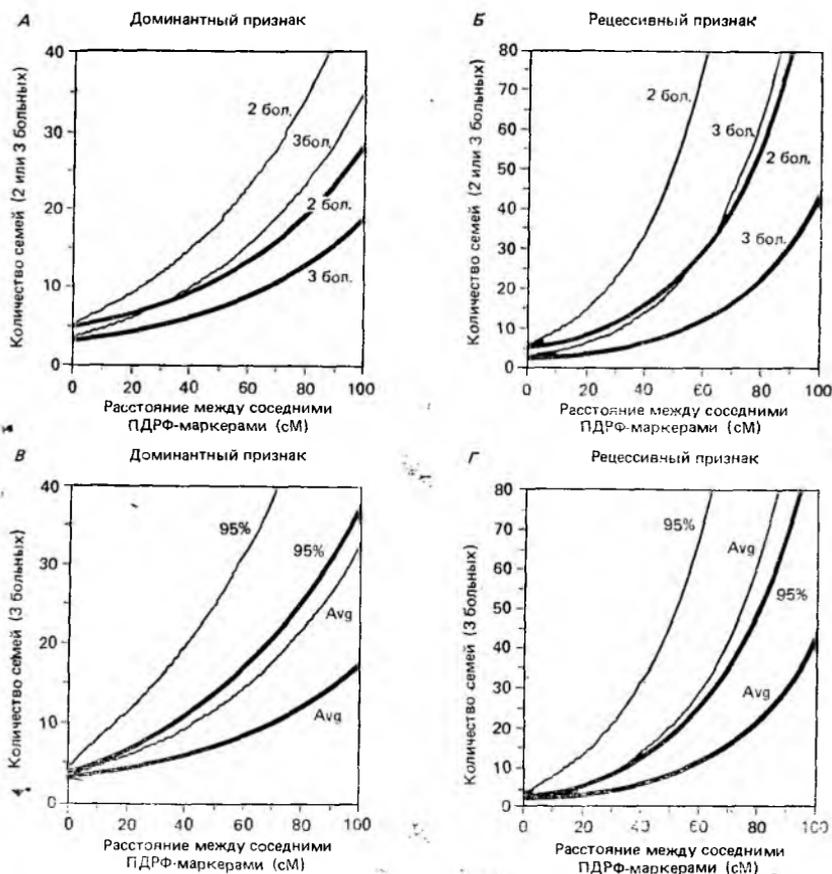


Рис. 1. Количество семей, необходимое для картирования простых менделевских признаков с помощью полностью информативного набора ПДРФ-маркеров: сравнение метода единичных маркеров (жирные кривые) и интервального картирования (тонкие кривые). Гаплотипные фазы ПДРФ-маркера и доминантного признака считаются известными, в случае рецессивного признака — неизвестными. Для доминантного признака графики показывают ожидаемое количество мейозов, необходимое для накопления суммарного лод-балла, равного 3,0 (А), а также количество, необходимое для обеспечения 95%-ной гарантии достижения этой величины (В). Для рецессивного признака графики показывают ожидаемое количество различных (по количеству больных sibсов) семей, необходимое для достижения суммарного лод-балла 3,0 (Б), а также количество этих семей, необходимое для достижения 95%-ной гарантии (Г). Учет количества больных в семье необходим, так как при рецессивном наследовании отсутствует информация о фазе наследуемого признака; анализ пораженных sibсов дает дополнительную информацию о фазе признака и маркера. В случае доминантного наследования, когда фазы известны, все мейозы можно изучать независимо друг от друга.

ность. Простой пример — ретинобластома, при которой у индивидов, наследующих одну дефектную копию рецессивного онкогена, развивается рак, если вторая копия инактивирована событиями в соматических клетках; это случайное событие встречается достаточно часто, поэтому пенетрантность высока [12]. В семьях с наследственными формами болезни Альцгеймера заболевание может не проявить полную пенетрантность попросту из-за того, что некоторые пораженные погибнут по другим причинам, так и не проявив симптомов. Синдром Вернике — Корсакова вызван, по-видимому, мутацией, приводящей к более слабому по сравнению с нормой присоединению транскетолазой тиаминпирофосфата, однако клинический фенотип (энцефалопатия, вызванная алкоголем) проявляется только у

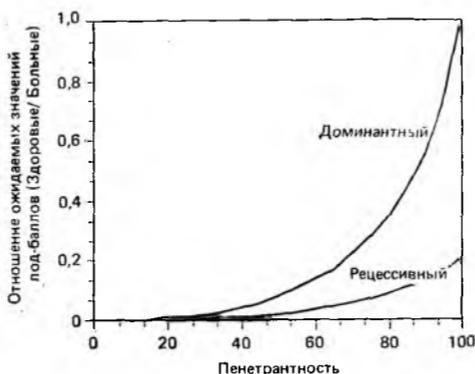


Рис. 2. Шансы успешного картирования признака у больных и у здоровых sibсов как функция пенетрантности гена, обуславливающего заболевание. Диаграмма показывает отношение двух ожидаемых лод-баллов (ELOD): для здорового sibса и для больного при отсутствии маркера (0 cM). Все фазы считаются известными.

больных, предпочитающих диету, обедненную тиамин [27]; таким образом, степень пенетрантности может широко варьировать в зависимости от условий окружающей среды и точности определения фенотипа (энцефалопатия или связывание тиаминпирофосфата). Многие заболевания, такие, как наследственные формы маниакально-депрессивного психоза, проявляют неполную пенетрантность по неизвестным причинам.

В случае болезни, наследуемой как доминантный признак с полной пенетрантностью, здоровые дети от брака с одним больным родителем так же информативны, как и больные дети: в обоих случаях мы точно знаем, какой аллель локуса, ответственного за заболевание, был унаследован каждым из них. Однако, когда пенетрантность неполная, генотип здорового

потомка от больного родителя всегда неоднозначен. Неудивительно, что и анализ наследуемых ими маркеров мало что может дать в этом отношении, поскольку мы не знаем точно, унаследовали они мутантный аллель или нет. Рис. 2 показывает, как быстро уменьшается величина суммарного лод-балла с уменьшением степени пенетрантности.

Проблема неопределенности генотипа здорового индивида возникает и в случае рецессивного признака при полной пенетрантности: существуют три возможных генотипа для группы здоровых sibсов, но только один — для группы больных. Для тесно сцепленного маркера отношение шансов будет $1:(3/4)$ в случае здоровых sibсов и $1:(1/4)$ в случае больных, что делает вклад в суммарный лод-балл от больных членов в 5 раз меньшим, чем от здоровых. Неполная пенетрантность только усложняет ситуацию (рис. 2).

Оценивая информативность семьи для анализа сцепления, необходимо обратить внимание на количество мейозов, порождающих появление больных индивидов (исключая случаи доминантных признаков с полной пенетрантностью, когда при гетерозиготности интересующего нас локуса все мейозы представляют ценность). Сбор данных по здоровым sibсам не приведет к ошибке, но необходимо ясно представлять, что польза от этих данных для идентификации локуса, ответственного за болезнь, относительно невелика, кроме случаев доминантности с полной пенетрантностью. (Заметим, что, хотя здоровые sibсы не очень информативны в плане выявления ответственного за болезнь локуса, они могут быть ценны для восстановления генотипа умершего родителя по ПДРФ-маркерам.)

Следует учесть, что неполная пенетрантность заметно осложняет анализ сцепления. Если в проверяемую на сцепление модель не заложена соответствующая степень неполноты пенетрантности, тогда истинное сцепление может быть полностью просмотрено: здоровые индивиды окажутся рекомбинантами. Чтобы исключить сцепление данной болезни с каким-либо районом, необходимо провести специальный анализ, принимая степень пенетрантности очень низкой. Величина суммарного лод-балла при этом будет отражать информацию, полученную от больных индивидов.

Обратным по отношению к проблеме неполной пенетрантности является вопрос о возможности ошибочной диагностики болезни у здоровых индивидов. В то время как неполная пенетрантность определяет неоднозначность генотипа здорового индивида и тем самым снижает его ценность в анализе сцепления, возможность неправильного диагноза означает, что и генотипы больных индивидов также должны рассматриваться как неоднозначные. Ошибочный диагноз маловероятен для таких

явных заболеваний, как муковисцидоз, но представляет серьезную проблему при анализе психических нарушений. В диагностические критерии для этих заболеваний включено огромное количество поведенческих реакций, а наличие других больных в этой семье зачастую рассматривается как подтверждение диагноза. Используя рис. 3, можно оценить влияние данного уровня ошибок диагностики на анализ сцепления. Так как неправильная диагностика может серьезно отразиться на анализе сцепления, лучший выход из положения — приписывать всякому индивиду, диагноз которого сомнителен, «неизвестный фенотип». Только после обнаружения сцепления можно вернуться к таким индивидам и выяснить, унаследовали ли они

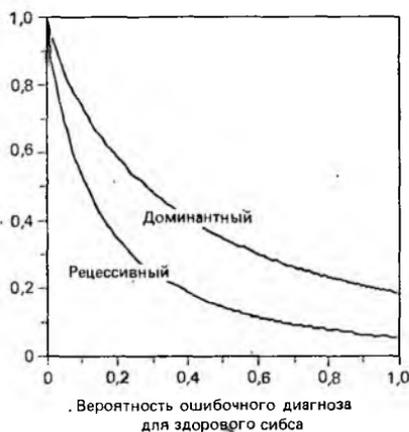


Рис. 3. Кривые показывают для доминантных и рецессивных заболеваний относительные вероятности (ELOD) того, что в результате мейоза для случаев с известной фазой сцепления появится больной ребенок; значения приводятся для разных вероятностей ошибочного диагноза генетически нормального сибса как больного.

генотип больного. Только таким путем можно узнать, являются ли неоднозначные симптомы проявлением исследуемого заболевания.

6. Осложнения: генетическая гетерогенность и фенкопии

Самым серьезным препятствием при изучении сцепления является генетическая гетерогенность, связанная с тем фактом, что мутации в разных локусах приводят к одному фенотипу. Классические примеры генетической гетерогенности для низших организмов — прерывание автономного биохимического пути на любой из его стадий и потеря или нарушение гетеромультимер-

ного белкового комплекса вследствие мутаций в структурном гене любой из его субъединиц. Несложно представить и другие возможные причины гетерогенности. Ими могут быть мутации регуляторных генов или посттрансляционные модификации. Хотя у низших организмов генетическая гетерогенность фенотипов является правилом, это не приводит к серьезным осложнениям, поскольку генетик всегда может поставить комплементарное скрещивание для проверки аллельности мутаций.

Феномен генетической гетерогенности у человека изучен в меньшей степени, однако нет оснований полагать, что в данном случае он более редок. К примеру, выяснилось, что наследственная метгемоглобинемия, которая ранее рассматривалась в клиническом отношении как однородная, может быть вызвана мутациями как альфа-, так и бета-цепей гемоглобина или даже мутациями NADH-дегидрогеназы [28]. Эллиптоцитоз [29] и болезнь Шарко — Мари — Туса [30, 31] оказались гетерогенными, поскольку в обоих случаях тесное сцепление, наблюдаемое в одних больших родословных, полностью отсутствовало в других. Сходная картина обнаружена и при изучении наследования маниакально-депрессивного психоза в большой родословной религиозной общины амишей [14], в которой было выявлено сцепление этого заболевания с одним из сегментов хромосомы 11p. В других больших родословных подобное сцепление не было обнаружено [32, 33]. По-видимому, пигментная ксеродерма и синдром Луи-Бар (атаксия-телеангиэктазия) генетически гетерогенны, поскольку опыты *in vitro* на клеточных экстрактах выявили соответственно девять и пять групп комплементации [34—36]. Некоторые браки дают возможность исследовать комплементацию и у человека. Так, семьи, в которых оба родителя страдают альбинизмом, а все их дети — здоровые, демонстрируют генетическую гетерогенность альбинизма, на что ранее указывали фенотипические различия и популяционная генетика (более высокий уровень близкородственных браков среди родителей больных детей по сравнению с ожидаемым уровнем для случая одного рецессивного генома). Сходные данные предполагают гетерогенную природу врожденной глухоты [28].

Гетерогенность — это настоящий кошмар для генетика, поскольку в разных семьях можно найти свидетельства как в пользу сцепления, так и против него. Даже небольшая степень гетерогенности может сказаться на стандартном лод-балле, приводя к отрицательным значениям, даже если маркер тесно сцеплен с одним из локусов, контролирующих признак. (Вследствие этого необходимо быть очень осторожным при «исключении» локуса из кандидатов на ген болезни во всех случаях, когда возможна гетерогенность, а она встречается почти всегда.)

Возможное разрешение затруднений, вызванных гетерогенностью, состоит в следующем.

1. *Дифференциация клинических форм заболевания.* Наилучший способ преодолеть генетическую гетерогенность — это выявить клинический признак, по которому различные генетические формы четко отличаются: исследование одного гетерогенного нарушения сводится тогда к изучению двух или более гомогенных нарушений. Так, к примеру, клинические фенотипы были использованы для выявления двух форм нейрофиброматоза (Реклингхаузена и билатеральный акустический НФ), которые по данным недавних исследований картируются в различных локусах [15, 16, 38].

К сожалению, пока нет единого правила, позволяющего безошибочно дифференцировать различные формы генетического заболевания. Клиническая картина заболевания может значительно варьировать вследствие как минимум трех причин:

- а) единичная мутация в единственном локусе может экспрессироваться различным образом под влиянием несцепленного генетического локуса, выполняющего роль модификатора окружающей среды или в силу простой случайности;
- б) различные мутации в одном локусе могут нарушить одну и ту же биохимическую функцию, но по-разному или с разной степенью, как это имеет место в случае мышечной дистрофии Бекера, которая вызвана менее тяжелыми по своему проявлению аллелями гена мышечной дистрофии Дюшенна;
- в) заболевание может быть вызвано мутациями в нескольких разных локусах.

Такие явления носят соответственно названия: (а) эффект фона, (б) аллельная гетерогенность, (в) генетическая гетерогенность.

Другими словами, болезнь может быть клинически гетерогенна, даже если она не является гетерогенной генетически, обратное утверждение тоже верно. Для того чтобы рассматривать клинические различия как полезный генетический инструмент, необходимо показать сначала, что все члены данной семьи попадают в один фенотипический подкласс. (Не существует генетических приемов, позволяющих определить, является ли данное различие следствием аллельной или генетической гетерогенности. Такую возможность предоставляют только комплементационные браки.) К примеру, естественным кандидатом для анализа на дифференциацию генетической картины психического нарушения был бы признак восприимчивости к определенному лекарству. К сожалению, лишь немногие исследователи

изучали склонность больных индивидов из одной семьи сходным образом реагировать на лекарства.

Дифференциация фенотипов — ключевой момент в медицинской генетике. Однако следует также полагаться на интуицию, ведь нельзя с уверенностью утверждать, что картина заболевания полностью ясна.

2. *Изучение отдельной большой родословной.* Другой подход, позволяющий избежать осложнений, вызванных генетической гетерогенностью, — это работа с отдельной родословной, достаточно большой для проведения анализа сцепления. К примеру, Гузелла [16] проанализировал одну обширную родословную (сотни индивидов) из Венесуэлы, в которой сегрегировала хорея Гентингтона. Хотя дальнейшие исследования сцепления показали, что люди, страдающие этой болезнью, составляют генетически гомогенную группу, этот факт все же нельзя было заранее предсказать. При исследовании большой родословной в религиозной общине амишей Эгланд продемонстрировал расщепление по наследуемой форме I маниакально-депрессивного психоза. Кроме того, обнаружено сцепление с ПДФФ-маркером на хромосоме 11p. Анализ нескольких других больших родословных [32, 33] не выявил сцепления с этим районом и доказал таким образом наличие гетерогенности.

В подходе, использующем большие родословные, существуют некоторые недостатки:

- а) для большинства доминантных и почти для всех рецессивных заболеваний просто невозможно найти достаточно большой родословной;
- б) попытка «расширить» родословную путем выявления как можно большего количества больных может на самом деле привести гетерогенность в случаях широко распространенных мультифакториальных заболеваний, таких, как маниакально-депрессивный психоз, ишемическая болезнь сердца и др. При сборке таких родословных из большой смешанной популяции, каковой является население США, возникает вероятность того, что в разных частях одной и той же родословной будут сегрегировать аллели или локусы, ответственные за разные заболевания. С позиций анализа сцепления такая внутрисемейная гетерогенность еще хуже, чем гетерогенность межсемейная;
- в) даже если подход, основанный на анализе больших родословных, увенчается успехом, сделанный вывод нельзя переносить на общую популяцию.

Чтобы выяснить, имеют ли полученные данные общее значение, необходимы дальнейшие интенсивные исследования на многих других (обязательно меньших) семьях. Действительно, сцепление между маниакально-депрессивным психозом (МДП)

и маркерами на хромосоме 11p, выявленное в большой родословной амишей, надо доказать на примере других родословных. Предположительно это может быть очень редкая форма МДП. Несмотря на эти ограничения, подход с использованием больших родословных может быть достаточно полезным, особенно для относительно редких заболеваний.

3. *Изучение отдельного географического района.* Аналогичный подход, позволяющий избежать эффекта генетической гетерогенности, заключается в проведении исследований в изолированной общине. Заболевания, которые в смешанной популяции, такой, как США, являются гетерогенными, в изолированной группе скорее всего будут обусловлены уникальной мутацией.

4. *Симультаный скрининг генома с использованием малых семей.* Доступность полной карты сцепления ПДРФ человеческого генома делает возможным выявить сцепление, даже если в изучаемой популяции сегрегирует более чем один локус. Этот недавно разработанный метод [23], известный как симультаный скрининг, подводит к естественному обобщению стандартного метода картирования сцепления.

После приготовления препаратов ДНК отобранных семей проводится анализ ПДРФ-маркеров, охватывающих весь геном. Если для всех семей один и тот же фрагмент генома окажется тесно сцепленным с исследуемым заболеванием, картирование на этом будет закончено. Если сцепление не будет обнаружено ни с одним из фрагментов генома, следует проверить все пары фрагментов с целью найти такую их пару А и В, для которой в каждой семье наблюдается тесное сцепление признака либо с фрагментом А, либо с фрагментом В. Если болезнь связана с мутациями в одном из двух локусов, то правильным образом выбранная пара будет обладать указанным свойством.

Для вычисления лод-баллов по любой из пар фрагментов А и В необходимо подсчитать: 1) вероятность появления заболевания для случая, когда оно обусловлено мутациями как по локусу из фрагмента А, так и по локусу из фрагмента В (грубо приблизительно с равной частотой) и 2) вероятность появления заболевания в случае, когда оба фрагмента А и В не сцеплены с заболеванием. (Метод может быть без изменений распространен на случаи, допускающие участие в развитии болезни трех и более локусов в разных интервалах генома, на случаи, допускающие использование части семей в отсутствие генетических данных, а также на случаи, допускающие разную частоту аллелей для разных участков.) Смысл состоит в том, что легче выявить пару участков, по которым идет расщепление во всех семьях, чем выделить единичный участок, объясняющий сегрегацию только в половине семей.

Важная проблема — это выбор удовлетворительного порога

для принятия наличия сцепления. Так как рассматривается много различных гипотез, вероятность того, что а priori каждая данная гипотеза верна, уменьшается, поэтому обычный порог 3,0 должен быть увеличен в случаях, когда анализируют одновременно два интервала. Ландер и Богштейн рассмотрели этот математический вопрос [23] и подсчитали количество семей, необходимое для выявления сцепления с доминантным или рецессивным гетерогенным признаком для семей, различных по величине (для примера см. рис. 4). Основная идея сделанного ими вывода: необходимо отбирать семьи с количеством больных в одном поколении не меньше трех (предпочтительнее четырех), а в случае с доминантным признаком также и с одним больным родителем.

Метод симультанного скрининга может быть использован не только для поиска локусов, как в приведенном выше примере, но и для проверки ранее установленных другими методами локусов-кандидатов, с той лишь разницей, что для группы порог требуется меньший, чем для начального выявления единичного локуса. Для некоторых гетерогенных заболеваний сцепление с различными локусами может быть первоначально установлено традиционным анализом на сцепление, проводимым в больших родословных. Чтобы решить вопрос о достаточности только этих локусов для объяснения ситуации с данным заболеванием, необходимо, используя метод симультанного скрининга, исследовать малые семьи (исключая все сколько-нибудь большие) для достижения суммарного лод-балла, равного 3,0.

Заметим, что, хотя генетическая гетерогенность может свести на нет усилия традиционного анализа сцепления, она не выявляется даже сегрегационным анализом (закключающимся в тестировании родословных на соответствие менделевским правилам наследования): сколько бы разных локусов ни участвовало в проявлении рецессивного признака, в каждой семье ожидаемое менделевское расщепление равно 3 : 1.

С проблемой гетерогенности тесно связано явление фенкопий. О фенкопии говорят, когда негенетическая причина (такая, как вирус или условия окружающей среды) сказывается на проявлении фенотипа, характерного для наследственного заболевания. К примеру, гомозиготность по мутантному аллелю гена α_1 -антитрипсина часто вызывает легочную эмфизему, но более частой причиной такого фенотипа в общей популяции является курение¹ [28].

¹ Это неудачный пример фенкопии, поскольку эмфизема легких развивается только у меньшей части курильщиков, генетически предрасположенных к ней в силу разных причин, одной из которых является недостаточность α_1 -антитрипсина. — Прим. ред.

А Как часто каждый из фрагментов сегрегирует независимо от заболевания?

Фрагменты	A	B	C	D	E	F	G	H	I
«Наблюдаемые» кроссоверы	11	6	8	13	10	4	12	8	9
«Ожидаемые» кроссоверы, если:									
признак в В	10	0	10	10	10	10	10	10	10
признак в F	10	10	10	10	10	0	10	10	10
признак в В либо в F	10	5	10	10	10	5	10	10	10
Общее количество возможных кроссоверов:	20								

Б Как часто одновременно В и F сегрегируют независимо от заболевания?

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A	3	5	7	5	3	9	5	5	
B		3	4	5	0	5	3	3	
C			3	4	2	5	3	4	
D				7	3	12	7	8	
E					2	8	4	5	
F						3	2	2	
G							7	12	
H								4	

В Количество семей, необходимое для картирования гетерогенного доминантного признака

(Для карты с точностью 20 сМ)



Рис. 4. Иллюстрация принципа симультанного скрининга и возможностей такого подхода для картирования генетически гетерогенных признаков. В случае (А) гипотетический геном разделен на 9 фрагментов (А, В...I), фланкированных полностью информативными ПДРФ-маркерами. Во второй строке приведены данные по «наблюдаемым» кроссинговерам для гена доминантного заболевания, «полученные» на основе анализа двадцати информативных мейозов. Для трех различных гипотез о локализации гена болезни даны ожидаемые количества кроссинговеров. Третья гипотеза о равновероятности местонахождения гена, заболевания во фрагментах В и F наилучшим образом согласуется с данными, но это нас не устраивает. В случае (Б) для тех же фрагментов мы записываем количество мейозов, при которых признак рекомбинирует одновременно с двумя фрагментами данной пары. В этом случае пара фрагментов В и F выявляется более четко. В и G демонстрируют количество семей с тремя пораженными, необходимое для картирования гена, ответственного за гетерогенный рецессивный признак и гетерогенный доминантный признак соответственно. В обоих случаях частоты генов, ответственных за признак, принимаются одинаковыми. Кривая «Поиск» относится к доказательству наличия сцепления для данного набора участков по результатам симультанного скрининга; кривая «Доказательство» относится к последующему доказательству вклада каждого из локусов. Кривая «Без карты» относится к использованию каждого из методов в отдельности. Фазы считаются известными только для ПДРФ-маркеров и доминантных признаков, но не для рецессивных признаков.

Фенокопии сказываются на анализе сцепления таким же образом, как и гетерогенность: наряду с семьями, в которых выявляется сцепление с маркером, обнаруживаются семьи, в которых расщепление затрагивает разные локусы. В случае независимости возникновения фенокопий в общей популяции можно повысить генетическую информативность семей, введя требование о большем количестве содержащихся в них больных индивидов. Так, генетическая этиология более вероятна для семьи, где пять близких родственников болеют раком молочной железы, нежели для семьи, где больных всего двое. Однако этот аргумент теряет значение, если фенокопии появляются в семейных кластерах, к примеру, вследствие сходных условий проживания. В этом случае необходимо попытаться собрать однородную выборку семей, в которых сегрегирует генетическая форма этого заболевания, и анализировать ее на основе стратегии, описанной выше для генетической гетерогенности. Если предполагаются и генетическая гетерогенность, и фенокопии, симультантный скрининг может быть модифицирован с учетом коррекции на долю «несцепленных» семей.

В любом случае слишком большая доля фенокопий в выборке значительно затруднит всякую попытку найти сцепление.

7. Осложнения: генетические взаимодействия

Некоторые признаки являются результатом генетического взаимодействия аллелей более чем одного локуса. Среди низших организмов это подтверждается множеством фактов, чего не скажешь о человеке. К примеру, известно, что проявление α -талассемии частично подавляется наличием β -формы. Предполагается также, что по крайней мере некоторые из заболеваний, демонстрирующие частичную ассоциацию с генотипом HLA, могут быть обусловлены также и другими локусами.

Результатом генетического взаимодействия является и так называемый синтетический признак. Такой признак обусловлен несколькими «взаимодействующими» локусами, т. е. проявляется только при наличии соответствующих аллелей по всем вовлеченным локусам, в противном случае развивается абсолютно нормальный фенотип. По некоторым локусам мутантные аллели могут доминировать, по другим — быть рецессивными. Часть аллелей может встречаться редко, в то время как другие обнаруживаются в популяции с высокой частотой. Распространенность такого признака будет отражать произведение частот мутаций по всем локусам, участвующим в его детерминации.

Одна из возможных проблем при картировании локусов, вовлеченных во взаимодействие, заключается в том, что некоторые родители могут быть гомозиготными по одному из компонент-

ных локусов, хотя и не будут проявлять интересующий признак из-за отсутствия нужного генотипа по другим локусам. Так как большой ребенок мог унаследовать любую из хромосом такого родителя, то для данной семьи не удастся установить сцепление с определенным локусом. Анализ такого заболевания позволяет утверждать, что картина похожа на случай, когда в выборке имеется большая доля семей с негенетической природой заболевания.

Однако проблема гомозиготности родителей становится значительной только при достаточно высокой частоте соответствующего аллеля по данному локусу. По существу, успешно могут быть картированы только те компонентные локусы, в которых аллели, обуславливающие заболевание, встречаются с низкой частотой ($<10\%$).

Иногда следует учитывать параметры, минимизирующие эффект гомозиготности родителей. К примеру, изучение семей с очень большой долей пораженных sibсов может быть нежелательным: в такой семье более вероятно, что один или оба родителя гомозиготны по одному или более компонентным локусам.

Кроме проблемы гомозиготности родителей существует еще одно осложнение при картировании генетического взаимодействия: здоровые дети значительно затрудняют любую попытку картировать отдельный компонентный локус. Если ребенок и наследует по какому-то локусу аллель, ответственный за заболевание, он может не унаследовать саму болезнь, если не унаследует всех необходимых для данного заболевания аллелей по другим локусам. (Всякий компонентный локус вызывает заболевание, только с низкой пенетрантностью.) Таким образом, как было отмечено выше, генотипы здоровых детей не могут рассматриваться как свидетельство против сцепления с возможным локусом; полагаться стоит только на генотипы больных детей.

Если предположить, что больные дети являются следствием исключительно генетических причин и что частота аллелей невелика, то анализ сцепления становится относительно простым.

1. Для рецессивного компонентного локуса картирование происходит как и в моногенном случае: признак будет сегрегировать совместно с каждым из рецессивных компонентных локусов; требуется такое же количество семей с заданным числом больных индивидов.

2. Для доминантного компонентного локуса единственное отличие от моногенного случая заключается в том, что нельзя сказать, какой из двух родителей привносит аллель, ответственный за болезнь. Вследствие этого необходимо количество семей большее, чем для случая простого моногенного наследования (рис. 5).

8. Полигенное наследование

Известно, что наследование некоторых признаков характеризуется такими генетическими феноменами, как гетерогенность, неполная пенетрантность или интегрирующее взаимодействие. Наиболее сложное наследование — полигенное, при котором аллели нескольких разных локусов взаимодействуют друг с другом по принципу аддитивности, обуславливая таким образом риск проявления признака или заболевания. Каждый добавочный «плохой» аллель увеличивает предрасположенность индивида, но ни один из локусов не является существенным для

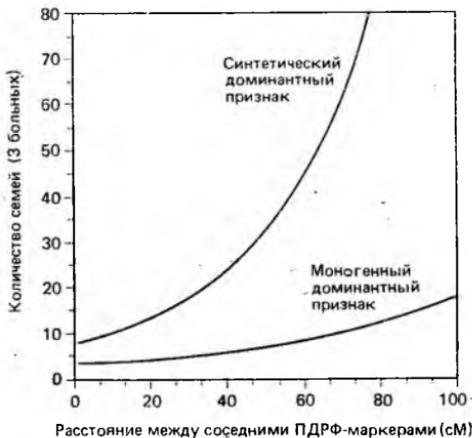


Рис. 5. Количество семей, необходимое для картирования компонентного доминантного аллеля, участвующего в развитии заболевания в случае модели генного взаимодействия. Считаются неизвестными и родитель, от которого унаследован данный аллель, и фаза этого аллеля с маркером. Частота аллеля в общей популяции не превышает 5%, поэтому один из родителей рассматривается как гетерозигота, а другой — как нормальная гомозигота (см. текст). Для сравнения также показано количество семей, необходимое для случая, когда за признак отвечает доминантный аллель одного гена.

этиологии данного заболевания. Поэтому в данном случае невозможно по фенотипу определить генотип. Расчеты показывают, что картирование полигенных заболеваний в общей популяции людей бесперспективно. Тем не менее для поиска полигенных факторов при скрещивании линий животных, отличающихся по физиологическим признакам, были разработаны методы, использующие весь потенциал полной карты ПДРФ-маркеров. Подобные исследования могут выявить специфические локусы, которые в дальнейшем следует изучать более прямыми методами у человека.

9. Картирование редких рецессивных признаков

В случае многих заболеваний трудно подобрать достаточное количество семей с несколькими больными индивидами для проведения традиционного анализа сцепления. Многие рецессивные нарушения, имеющие медицинскую или биологическую значимость, очень редки и возникают случайно у отдельных индивидов или в малых группах. Даже для распространенных заболеваний подбор семей с несколькими больными может быть сложной задачей, если болезнь приводит к гибели в раннем возрасте.

Недавно для картирования редких рецессивных заболеваний был описан эффективный подход, названный *картированием по гомозиготности*. При этом используется ДНК больных детей от близкородственных браков [24]. В 1902 году Гэррод [39] заметил, что значительную часть его больных алкаптонурией составляли дети от браков между родственниками. Почти сразу же Бэтсон предложил объяснение, основанное на законах Менделя и состоявшее в том, что близкородственные браки предоставляют наилучшую возможность для рецессивного аллеля перейти в гомозиготное состояние. Действительно, чем реже болезнь, тем большей будет доля инбредных браков среди родителей больных детей: если частота аллеля, ответственного за данное заболевание в данной популяции, есть q , то вероятность его гомозиготности в целой популяции пропорциональна q^2 , но пропорциональна q в инбредной популяции. Значительная область хромосомы, фланкирующая предполагаемый локус заболевания, также переходит в гомозиготное состояние «по происхождению». Для ребенка от брака двоюродных родственников среднестатистический размер этой области гомозиготности «по происхождению» достигает приблизительно 28 сМ. Отсюда следует стратегия поиска локуса, ответственного за болезнь: необходимо найти область, неизменно гомозиготную «по происхождению», у больных детей от близкородственного брака.

Если бы существовала возможность достоверного выявления гомозиготности «по происхождению», можно было бы установить сцепление с тем или иным заболеванием на основе данных всего лишь по трем больным потомкам от брака двоюродных сибсов. Это возможно, поскольку вероятность того, что искомый участок будет гомозиготным «по происхождению» у данного ребенка, равна 1 (не учитывая редкий случай, когда сегрегирует и второй аллель), а вероятность того, что случайный участок будет гомозиготен «по происхождению», равна $1/16$ — коэффициенту инбридинга при браке двоюродных родственников. Поэтому отношение шансов за правильность выбора фраг-

мента составит 16:1. Если установлено, что искомый участок гомозиготен «по происхождению» у трех независимых детей от данного инбредного брака, отношение вероятностей составит 16^3 , или 4096:1, что превышает общепринятый порог правдоподобия 1000:1.

Конечно, невозможно с высокой точностью распознавать гомозиготность «по происхождению». Однако можно использовать плотную карту сцепления на основе ПДРФ для поиска района, в котором многие прилегающие ПДРФ-маркеры становятся гомозиготными. Эффективность этого метода будет зависеть от плотности используемых маркеров рестрикции и уровня их полиморфизма (т. е. вероятности того, что они будут гомозиготными в общей популяции). Рис. 6 показывает количество потомков от брака двоюродных и троюродных сибсов, необходимое для картирования гомогенного рецессивного заболевания. Если использовать карту ПДРФ с полиморфными локусами на каждые 5 сМ, для обнаружения сцепления понадобится менее 20 инбредных детей в таких браках. Для относительно редких рецессивных заболеваний метод гомозиготного картирования может оказаться лучшим.

Хотя такая точная карта сцепления на основе ПДРФ-маркеров пока недоступна, при существующих темпах прогресса ее удастся получить в ближайших нескольких лет. Поэтому сбор образцов ДНК больных детей от браков двоюродных и троюродных родственников представляется уже целесообразным. (Более далекое родство супругов оказывается менее информативным, так как требуется очень плотная карта ПДРФ-маркеров для выявления более коротких районов гомозиготности «по происхождению», кроме того, при далеком родстве повышается вероятность того, что заболевание вызвано не гомозиготностью, а внедрением в родословную второго мутантного аллеля.) Генетики, интересующиеся картированием сцепления, должны проявить особый интерес к тем странам, где близкородственные браки все еще распространены. В качестве примера: одна треть всех браков в индийском штате Андра — Прадеш заключается между дядей (со стороны матери) и племянницей [24].

10. Заключение

Использование ПДРФ-маркеров в генетике человека революционизировало эту отрасль знаний. Стало возможным картировать и в конечном счете клонировать гены, ответственные за признаки и болезни человека, почти таким же способом, как это делается для экспериментальных животных. Единственное остающееся ограничение заключается в том, что такие признаки требуют особого внимания, так как нет возможности применять к ним традиционные экспериментальные подходы.

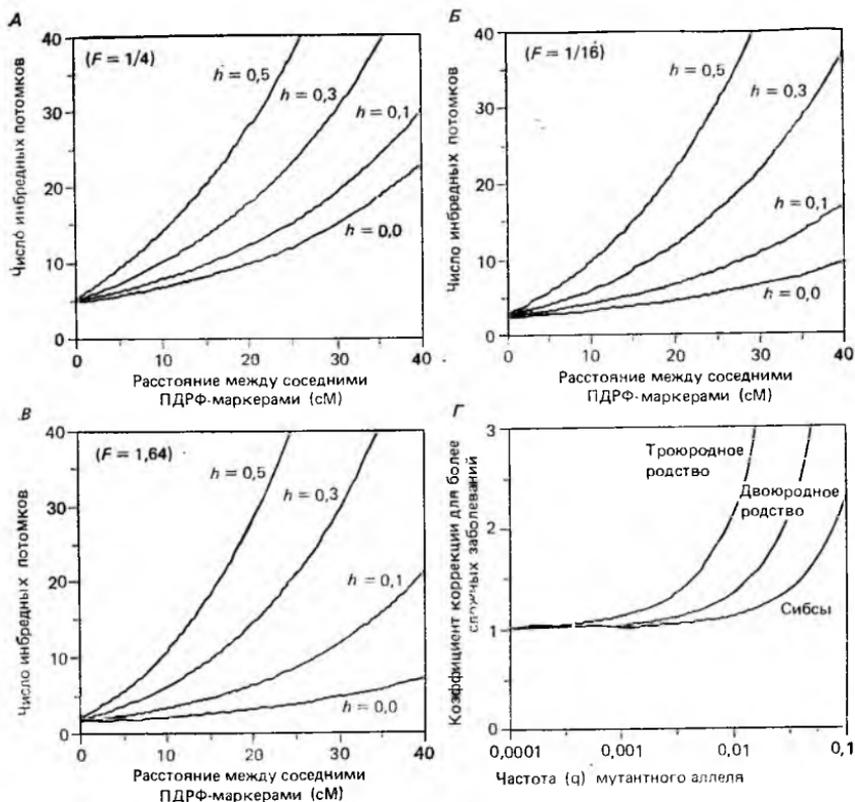


Рис. 6. Число потомков от инбредного брака, необходимое для картирования по гомозиготности редкого ($q=0$) рецессивного заболевания как функция расстояния между соседними ПДРФ-маркерами и степени полиморфизма каждого из них. Четыре кривые соответствуют ПДРФ-маркерам, выявляемым в общей популяции как гомозиготные с вероятностью 50%, 30%, 10% и 0% (предельный случай). А. Потомство от брака между сибсами; Б. Потомство от брака между двоюродными сибсами; В. Потомство от брака троюродных родственников. Если заболевание не является редким, то необходимые количества следует помножить на аппроксимирующий коэффициент коррекции (Γ). (Значение данного коэффициента является точным, когда расстояние между соседними маркерами (d)=0 и уровень гомозиготности (b)=0; для других случаев наблюдаемые отличия незначительны.)

Используя весь потенциал полной карты сцепления ПДРФ-маркеров человеческого генома, можно разработать альтернативные подходы, позволяющие преодолеть эти генетические затруднения. При настоящих темпах картирования ПДРФ надежда получить такую карту в ближайшие два года кажется оправданной. В будущем при планировании анализа сцеплений исследователи, рассматривая возможные пути преодоления генетических сложностей, могут рассчитывать на доступность кар-

ты ПДРФ-маркеров. Некоторые из таких подходов были описаны выше.

Как, должно быть, уже заметил читатель, «оптимальный» подход к изучению сцепления зависит в некоторой степени от точного знания природы генетических трудностей, которые предстоит преодолеть (к примеру, количество различных локусов, ответственных за гетерогенное нарушение; уровень фенотипичности). Однако не часто такие подробности можно с точностью заранее определить. Следует начинать изучение сцепления с выявления на основе имеющихся данных спектра возможных осложнений. Далее следует определить доступный популяционный материал (включая большие родословные, изолированные популяции, детей от близкородственных браков) и арсенал медицинских методов (включая клинические методы дифференциации фенотипов), который можно использовать для упрощения задачи. Затем, основываясь на допущениях, принятых для различных типов наследования, следует вычислить количество различных семей, необходимое для картирования признака. В конечном счете проводится подбор семей, готовятся препараты ДНК, которые анализируют по большому количеству ПДРФ. Если предположения о генетической этиологии заболевания верны, то вероятность обнаружения сцепления велика. Если же признак в действительности более сложен, чем это предполагалось, сцепление не будет обнаружено. Отрицательный ответ при поиске по всему геному докажет по крайней мере, что заболевание более сложно, чем исходно предполагалось.

Таким образом, используя весь потенциал карты сцепления человеческого генома, построенной на основе ПДРФ, можно расширить область изучения наследственности человека, выйдя за рамки набора признаков, наследуемых исключительно по законам Менделя. В ходе подобных исследований может быть разрешен широкий круг медицинских вопросов, а также достигнут общий прогресс в исследованиях в области биологии млекопитающих.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность Дэвиду Ботштейну за сотрудничество в разработке всех описанных выше методов, а также Национальному научному фонду (DCB-8611317) и Институту медико-биологических исследований в Уайтхеде.

Литература

1. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980) Am. J. Hum. Genet., 32, 314.

2. Willard H., Skolnick M., Pearson P. L., Mandel J. L. (1985) *Cytogenet. Cell Genet.*, **40**, 360.
3. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. (1987) *Science*, **235**, 1616.
4. Conference Proceedings, Human Gene Mapping 9 (1988) *Cytogenet. Cell Genet.*, **46**, 1.
5. Davis K. E., Pearson P. L., Harper P. S., Murray J. N., O'Brien T., Sarfarazi M., Williamson R. (1983) *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2303.
6. Gusella J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., Naylor S. L., Anderson M. A., Tanzi R. E., Watkins P. C., Ottina K., Wallace M. R., Sakaguchi A. Y., Young A. B., Shoulson I., Bonilla E., Martin J. B. (1983) *Nature*, **306**, 234.
7. Tsiu L.-C., Buchwald M., Barker D., Braman J. C., Knowlton R., Schumm J. W., Eiberg H., Mohr I., Kennedy D., Plausic N., Zsiga M., Markiewicz D., Akots G., Brown V., Helms C., Gravius T., Parker C., Rediker K., Donis-Keller H. (1985) *Science*, **230**, 1054.
8. Knowlton R. G., Cohen-Haguenuer O., Van Cong N., Frezal J., Brown V. A., Barker D., Braman J. C., Schumm J. M., Tsiu L.-C., Buchwald M., Donis-Keller H. (1985) *Nature*, **318**, 381.
9. Wainwright B. J., Scambler P. J., Schmidtke J., Watson E. A., Law H. Y., Farrall M., Cooke H. J., Eiberg H., Williamson R. (1985) *Nature*, **318**, 384.
10. White R., Woodward S., Leppert M., O'Connell P., Hoff M., Herbst J., Lalouel J.-M., Dean M., Van de Woude G. (1985) *Nature*, **318**, 382.
11. Reders S. T., Breuning M. H., Davies K. E., Nicholls R. D., Jarman A. P., Higgs D. R., Pearson P. L., Weatherall D. J. (1985) *Nature*, **317**, 542.
12. Cavenee W. K., Hansen M. F., Nordenskiöld M., Kock E., Maumenu I., Squire J. A., Phillips R. A., Gallie B. L. (1985) *Science*, **228**, 501.
13. St. George-Hyslop P. H., Tanzi R. E., Polinsky R. J., Haines J. L., Nee L., Watkins P. C., Myers R. H., Feldman R. G., Pollen D., Drachman D., Growdon J., Bruni A., Foncin J.-F., Salmon D., Frommelt P., Amaducci L., Sorbi S., Piacentini S., Stewart G. D., Hobbs W. J., Conneally P. M., Gusella J. F. (1987) *Science*, **235**, 885.
14. Egeland J. A., Gerhard D. S., Pauls D. L., Sussex J. N., Kidd K. K., Allen C. R., Hostetter A. M., Housman D. E. (1987) *Nature*, **325**, 783.
15. Barker D., Wright E., Nguyen K., Cannon L., Fain P., Goldgar D., Bishop D. T., Carey J., Baty B., Kivlin J., Willard H., Waye J. S., Greig G., Leinwand L., Nakamura Y., O'Connell P., Leppert M., Lalouel J.-M., White R., Skolnick M. (1987) *Science*, **236**, 1100.
16. Seizinger B. R., Rouleau G. A., Ozeluis L. J., Lane A. H., Faryniarz A. G., Chao M. V., Huson S., Korf B. R., Parry D. M., Pericak-Vance M. A., Collins F. S., Hobbs W. J., Falcone B. G., Iannazzi J. A., Roy J. C., St. George-Hyslop P. H., Tanzi R. E., Bothwell M. A., Upadhyaya M., Harper P., Goldstein A. E., Hoover D. L., Bader J. L., Spence M. A., Mulvihill J. J., Aylsworth A. S., Vance J. M., Rossenwasser G. O. D., Gaskell P. C., Roses A. D., Martuza R. L., Breakfield X. O., Gusella J. F. (1987) *Cell*, **49**, 589.
17. Mathew C. G. P., Chin K. S., Easton D. F., Thorpe K., Carter C., Liou G. J., Fong S.-L., Bridges C. D. B., Haak H., Kruseman A. C. N., Schifter S., Hansen H. H., Telenius H., Telenius-Berg M., Ponder B. A. J. (1987) *Nature*, **328**, 527.
18. Simpson N. E., Kidd K. K., Goodfellow P. J., McDermid H., Myers S., Kidd J. R., Jackson C. E., Duncan A. M. V., Farrer L. A., Brasch K., Castiglione C., Genel M., Gertner J., Greenberg C. R., Gusella J. F., Holden J. J. A., White B. N. (1987) *Nature*, **328**, 528.

19. *Bodmer W. F., Bailey C. J., Bodmer J., Bussey H. J. R., Ellis A., Gorman P., Lucibello F. C., Munday V. A., Rider S. H., Scambler P., Sheer D., Solomon E., Spurr N. K.* (1987) *Nature*, **328**, 614.
20. *Donis-Keller H., Green P., Helms C., Cartinhour S., Weiffenbach B., Stephens K., Keith T. P., Bowden D. W., Smith D. R., Lander E. S., Botstein D., Akots G., Rediker K. S., Gravius T., Brown V. A., Rising M. B., Parker C., Powers J. A., Wait D. E., Kauffman E. R., Bricker A., Phipps P., Muller-Kahle H., Fulton T. R., Ng S., Schumm J. W., Braman J. C., Knowlton R. G., Barker D. F., Crooks S. M., Lincoln S., Daly M., Abrahamson J.* (1987) *Cell*, **51**, 3197.
21. *White R., Lalouel J. M., O'Connell P., Nakamura Y., Leppert M., Lathrop M.* (1987) Booklet printed by Howard Hughes Medical Institute.
22. *Lander E. S., Botstein D.* (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**, 49.
23. *Lander E. S., Botstein D.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7353.
24. *Lander E. S., Botstein D.* (1987) *Science*, **236**, 1567.
25. *Ott J.* (1986) In: *Human Genetic Diseases — A Practical Approach*. Davies K. E. (ed.), IRL Press, Oxford, p. 19.
26. *Morton N. E.* (1955) *Am. J. Hum. Genet.*, **7**, 277.
27. *Blass J. P., Gibson G. E.* (1977) *N. Engl. J. Med.*, **297**, 1367.
28. *Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Frederickson D. S., Goldstein J. L., Brown M. S.* (1983) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York.
29. *Morton N.* (1956) *Am. J. Hum. Genet.*, **8**, 80.
30. *Bird T. D., Giblett E. R., Chnace P. F., Sumi S. M., Kraft G. H.* (1983) *Ann. Neurol.*, **14**, 679.
31. *Dyck P. J., Ott J., Moore S. B., Swanson C. J., Lambert E. H.* (1983) *Mayo Clin. Proc.*, **58**, 430.
32. *Hodgkinson S., Sherrington R., Gurling H., Marchbanks R., Reeders S., Mallet J., McInnis M., Petursson H., Brynjolfsson J.* (1987) *Nature*, **325**, 805.
33. *Detera-Wadleigh S. D., Berrettini W. H., Goldin L. R., Boorman D., Anderson S., Gershon E.* (1987) *Nature*, **325**, 806.
34. *Jaspers N. G. J., DeWit J., Regulski M. R., Bootsma D.* (1982) *Cancer Res.*, **42**, 335.
35. *Jaspers N. G. J., Painter R. B., Paterson M. C., Kidson C., Inoue T.* (1985) In: *Ataxia-telangiectasia: Genetics, Neuropathology, and Immunology of a Degenerative Disease of Childhood*. Gatti R. A., Swift M. (eds), A. R. Liss, New York, p. 147.
36. *Keijzer W., Jaspers N. G. J., Abrahams P. J., Taylor A. M. R., Arlett C. F., Takebe H., Kimmont P. D. S., Bootsma D.* (1979) *Mutat. Res.*, **62**, 183.
37. *Trevor-Roper P. D.* (1952) *Br. J. Ophthalmol.*, **36**, 107.
38. *Rouleau G. A., Wertelecki W., Haines J. L., Hobbs W. J., Trofatter J. A., Seizinger B. R., Martuza R. L., Superneau D. W., Conneally P. M., Gusella J. F.* (1987) *Nature*, **329**, 246.
39. *Garrod A. E.* (1902) *Lancet*, **11**, 1616.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агарозные блок-вставки 59, 70—71
— гранулы 60
Акриламид 155
Альбинизм, генетическая гетерогенность 225
Альцгеймера болезнь 215, 222
Аминоптерин 11
Амплификация геномной последовательности 183—184
Амплифицированные сегменты ДНК, секвенирование 184
Анализ правдоподобия и сцепления 216
Антигены клеточной поверхности 12
Антитела, использование в различных методах 12
— как селективный фактор 12
Атаксия-телеангиэктазия 225
- Библиотеки в λ -фагах 36
— геномные 98
— кленов-связок 116—121
— космидные, создание 33
— «прыжков» 96, 98—99, 106, 114—116
— — схема создания 120
Блок-вставки 59, 70—71
— приготовление 63—67
Блотинг после пульс-электрофореза 78—79
Болезни доминантные и рецессивные 224
— полигенные, картирование 233
— с простым типом наследования 219
Буфер для гибридизации 147
— — РНКазной реакции 148
— — транскрипции 147
— — электрофореза 155, 201
- Вектор(ы) при картировании 32, 50
— *Lorist* 50
— λ Ch3A Δ lac, рестрикционная карта 109
Вернике — *Корсакова* синдром 222
- Вильямса* опухоль 9
Вирус Сендай 13
- Гели (гель), анализ 147
— для электрофореза 73
— заливка 72, 73
— оптимизирующие 163—165
— параллельно-градиентные, приготовление 159
— перегрузка 83
— перпендикулярно-градиентные, приготовление 156—157
— сиквенсные 149
— OFAGE 103
Гель-электрофорез денатурирующий, градиентный (ДГГЭ) 123—174
— и перенос ДНК 199
Генетическая гетерогенность 224
Генетическое сцепление, метод анализа 204
Геномные отпечатки, применение 210—211
Гентингтона болезнь 215, 220
Ген(ы), перенос, опосредованный ДНК 26—29
— — опосредованный хромосомами (CMGT) 9, 10, 22—26
— — с помощью мини-клеток (MMGT) 9, 10, 12, 16—22, 24
— супрессорных гРНК 107
Гибридизационные зонды 192
Гибридизация при пульс-электрофорезе 78, 80
Гибриды клеточные, методика получения 13
Гипервариабельные участки (ГВР) 191
Глицериновый шок 29
Грибы, выделение ДНК 69
- Дактилоскопия геномная 191—212
ДГГЭ см. Гель-электрофорез, денатурирующий, градиентный
Денхардта раствор 61

- ДНК больших размеров, пульс-электрофорез 58—93
 — выделение из космид 37
 — — из лямбда-клонов 40
 — — из различных клеток 68—70
 — выявление единичных нуклеотидных замен 133
 — геномная, выделение 33
 — гипервариабельные районы (ГВР) 191
 — для электрофореза, приготовление образцов 200
 — космидная, микро- и миниэкстракция 37—38
 — котранфекция и трансфекция см. Котранфекция и Трансфекция
 — обнаружение единичных нуклеотидных замен 123—174
 — одноцепочечная, получение 169, 187
 — плавление в гелях 130
 — получение 58
 — — фрагментов желаемого типа 101
 — фага M13, мечение 198
 ДНК-зонды одноцепочечные, синтез 167—168
 Дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) 50—51
 Дюшенна мышечная дистрофия 215
 Зимобуферный раствор 63
 Зимолиза 63
 Зондирование 53
 Зонд(ы) для выявления нуклеотидных замен 166
 — — геномной дактилоскопии 192
 — на основе минисателлитов 192—195
 — — — гена III фаза M13 198
 — при картировании 50
 Камера-люсида 54, 55
 Карта (карты) генетического сцепления генома человека 218
 — окончательное заполнение (закрытие карты) 50
 — *C. elegans* 55, 57
 — pGC1 и pGC2 170
 Картирование по гомозиготности 234
 — простых менделевских признаков 234
 — рестрикционное 31—57
 — сложно наследуемых признаков 214—237
 Клетки, селекция см. Селекция клеток
 — слияние см. Слияние клеток
 — растений, виды ДНК 69
 Клонирование и скрининг 108—111
 Клон(ы), анализ 37—46
 — селекция для картирования 33
 — Lorist 50
 Колонии, отбор при случайном распределении 53
 — Lorist 51
 Колцемид 16
 «Компетентные» клетки 26, 28
 Космиды, библиотеки см. Библиотеки космидные
 — выделение ДНК 37
 — упаковочные смеси 35
 — Lorist и конструирование зондов 50
 Котранфекция ДНК 28
 Культивирование клеток, условия 10
 Лигирование ДНК 104—105, 108
 Лимфоциты, выделение ДНК 68
 Лод-балла величина 220
 — — влияние генетической гетерогенности 225
 Луи-Бар синдром 225
 Лямбда-клоны и закрытие карты 50
 Максама — Гилберта метод 185
 Маниакально-депрессивный психоз (МДП) 222, 225, 227
 Менделевские заболевания 214
 Метгемоглобинемия наследственная 225
 Метод геномной дактилоскопии 203
 — геномных отпечатков 193
 — двойного расщепления 40
 — отпечатков пальцев 32
 — SMT см. Перенос генов, опосредованный хромосомами
 — MMTG 9, 10, 12, 16—22, 24
 Метотрексат 11
 Микроуклеация, метод 21
 Мини-клетки, методы очистки 20—21
 — при переносе генов 16
 Минисателлиты 192, 195, 202
 Мышечная дистрофия Дюшенна 215
 Нейрофиброматозы 226
 Нуклеотидные замены, зонды для обнаружения 166
 «Обратная генетика» 95
 Онкогены, активирование 13
 Отжиг, необходимые реактивы 147
 ПДРФ 123, 124, 205, 214—220
 Пенетрантность неполная 220

- Переклонирование штаммов, схема 112
 Перенос генов, опосредованный хромосомами (CMGT) 9, 10, 22
 — по Саузерну 201
 Пигментная ксеродерма 225
 Плазмиды pGC1 и pGC2, карты 170
 Полнценное наследование 233
 Поликистоз почек 215
 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 138—141, 176—189
 Полипоз семейные 215
 Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 10
 Полуселекция 11
 Программа CONTIC9 47, 49
 — MAPSUB 48
 — RANC15 49
 — TAPS и TARD 47
 Прокариоты, выделение ДНК 69
 Протеиназа K 148
 «Прыжки» (по хромосоме) 95—121
 — последовательные 113
 Психоз биполярный аффективный 215
 Пульс-электрофорез (ПЭФ) 58—93

 Раствор(ы) акриламида 155
 — денатурирующий 155
 — для гибридизации 61
 — — лизиса клеток 61
 — — нанесения образцов на гель 149, 156
 — — слияния клеток 13
 — — CMGT 23
 — — DMGT 27
 — используемые при картировании 56
 — нейтральный для нанесения на гель 156
 — EEP 61
 — 2FC 148
Рейклингхаузена нейрофиброматоз 215, 226
 Рестриктаза NotI 99
 Рестрикционная карта 109
 Рестрикционные сегменты, полиморфизм длины *см.* ПДРФ
 Ретинобластома 215, 222
 РНКазное сцепление 124—128, 144
 РНК-зонды, получение 144—145
 — синтез, методы 149
 Розеткообразование 12

 Сегрегационный анализ, практические аспекты 208—209
 Секвенирование ДНК 184—189
 Селекция клеток, методы 11—13
 — при переносе генов 25

 Скрининг генома симультанный 228—230
 — при создании библиотеки «прыжков» 108—111
 Слияние клеток, методики 13—16
 Среда NAT 11
 Статистические расчеты 206
 Сцепление генетическое, анализ 216, 219
 — — генома человека 218
 Сэнгера метод 185

 ТЕМЕД 156
 Трансфекция 16, 27

 Фаг M13 194, 197—199, 203
 Фенокопии 224
 Фермент рестрикции 199
 Фиколл, растворы для MMT 17, 19
 Филт(р) (ы) для клонирования 51
 — найлоновые, удаление проб 203
 — отмывка 201
 Фингерпринт-гели 43, 45
 — получение 40
 — радиоавтограф 43
 Флуоресцентный сортер (FACS) 28
 ФМСФ (фенилметилсульфоилфторид) 62
 Фосфат кальция при трансфекции ДНК 27
 Фотографирование при пульс-электрофорезе 78—79

 Хорея Гентингтона 227
 «Хромосомные прыжки» *см.* Прыжки по хромосоме
 Хромосомы (хромосома), выделение 23
 — дрожжевая искусственная (YAC)
 — перенос 24
 Хромосома 21 человека 58

 Цитохалазин В 16

Шарко — Маритуса болезнь 225

 Электрофорез в полиакриламидном геле 44
 — перпендикулярно-градиентный, денатурирующий 161
 — — оптимизирующий 159
 Эллиптоцитоз 225
 Эмфизема легких 229
 Эндокринная неоплазия множественная типа 2А 215
 Энцефалопатия 222

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ

- Arabidopsis thaliana* 56
Bacillus 68
Caenorhabditis elegans 32, 33, 36, 40,
50, 55, 57, 70
Chlamydomonas 70
Drosophila 70
Escherichia coli 12, 35, 55, 56, 58, 61,
65, 66, 68, 121, 141, 178
Giardia lamblia 64
Haemophilus 68
Halobacterium 68—69
Legionella 68
Leishmania 64
Mycobacterium 68
Plasmodium falciparum 64
Rhodobacter capsulatus 55
Saccharomyces cerevisiae 56, 63, 69,
85, 87
Salmonella 68
Schizosaccharomyces pombe 63, 66, 69
Streptomyces 68
Thermus aquaticus 141, 143, 178
Trypanosoma brucei 64

ОГЛАВЛЕНИЕ

От редакции	5
Предисловие	6
Список сокращений	7
Глава 1. Методы переноса генетического материала в клетки млекопитающих. П. Гудфеллоу, К. Причард, Г. Бантинг	8
1. Введение	8
2. Общие положения	10
2.1. Необходимые условия	10
2.2. Селекция	11
3. Слияние целых клеток	13
3.1. Введение	13
3.2. Получение клеточных гибридов с помощью слияния, индуцированного ПЭГ (основная методика)	13
3.3. Возможные ошибки и варианты	14
4. Перенос генов с помощью миии-клеток (MMGT)	16
4.1. Введение	16
4.2. Метод MMGT	17
4.3. Очистка миии-клеток	20
4.4. Возможные ошибки и варианты методики	21
5. Перенос генов, опосредованный хромосомами (CMGT)	22
5.1. Введение	22
5.2. Выделение хромосом	23
5.3. Перенос хромосом	24
5.4. Предварительная селекция	25
5.5. Возможные ошибки и варианты методики	25
6. Перенос генов, опосредованный ДНК	26
6.1. Введение	26
6.2. Трансфекция ДНК с использованием фосфата кальция	27
6.3. Совместный перенос (котрансфекция) и предварительная селекция	28
6.4. Возможные ошибки и варианты методики	28
7. Заключение	29
Литература	29
Глава 2. Рестрикционное картирование. А. Колсон, Дж. Салстон	31
1. Введение	31
2. Стратегия	31
2.1. Сравнение клонов	31
2.2. Векторы	32
2.3. Селекция клонов	33
3. Экспериментальная часть	33
3.1. Создание библиотеки	33
3.2. Анализ клонов	37
3.3. Обработка результатов	46

3.4. Окончательное заполнение карты (закрытие карты)	50
4. Заключение	55
4.1. Карта <i>C. elegans</i>	55
4.2. Картирование других организмов	55
5. Прописи растворов	56
Литература	57
Глава 3. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. К. Смит, С. Клке, Ч. Кантор	58
1. Введение	58
2. Приготовление образцов ДНК	58
2.1. Приготовление вставок с образцами ДНК простейших	67
2.2. Выделение ДНК из культивируемых клеток и лимфоцитов	68
2.3. Выделение ДНК из клеток прокариот	68
2.4. Выделение ДНК из клеток грибов	69
2.5. Выделение ДНК из растительных клеток	69
3. Работа с агарозными блок-вставками, содержащими образцы ДНК	70
3.1. Ферментативная обработка	70
4. Пульс-электрофорез (ПЭФ)	71
4.1. Заливка геля и нанесение образцов	72
4.2. Подбор эффективных условий разделения	74
5. Фотографирование, блоттинг и гибридизация	78
5.1. Фотографирование и блоттинг	79
5.2. Гибридизация	80
6. Приложение	81
Литература	93
Глава 4. Прыжки по хромосоме. Ф. Коллинз	95
1. Введение	95
2. Область применения метода	96
3. Стандартные библиотеки «прыжков»	98
3.1. Типы «прыжков»	98
3.2. Принцип создания стандартных библиотек	99
3.3. Получение ДНК-фрагментов желаемого размера	101
3.4. Циклизация	104
3.5. Клонирование и скрининг	108
3.6. Анализ клонов	111
3.7. Последовательные «прыжки»	113
4. Специфические библиотеки «прыжков»	114
4.1. Принцип метода	114
4.2. Методика создания библиотеки	114
5. Библиотеки клонов-связок	116
5.1. Принцип конструирования	116
5.2. Методика получения <i>NotI</i> -библиотеки клонов-связок	116
5.3. Использование ДНК из сортированных хромосом	118
6. Возможные усовершенствования	118
Литература	121
Глава 5. Обнаружение единичных нуклеотидных замен в ДНК: расщепление РНКазой и денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Р. Майерс, В. Шеффилд, Д. Кокс	123
1. Введение	123
2. Общее описание методов	124
2.1. РНКазное расщепление	124
2.2. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез	128
2.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	138

3. Предварительные процедуры	141
4. Полимеразная цепная реакция	141
4.1. Материалы	142
4.2. Методы	143
5. Метод РНКазного расщепления	144
5.1. Материалы	145
5.2. Методы	149
6. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез	153
6.1. Гель-электрофоретическая система	153
6.2. Подготовительные эксперименты: перпендикулярно-градиентный и оптимизирующий электрофорезы	159
6.3. Приготовление зондов для анализа при помощи ДГГЭ	166
6.4. Обнаружение единичных нуклеотидных замен при помощи денатурирующего градиентного гель-электрофореза	173
Литература	174
Глава 6. Полимеразная цепная реакция. <i>Р. Саики, У. Гиленстен, Г. Эрлих</i>	176
1. Введение	176
2. Основные методики	178
2.1. Оборудование	178
2.2. Компоненты реакции	179
2.3. Параметры температурных циклов	180
3. Амплификация геномной последовательности «вручную»	182
4. Прямое секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК	184
4.1. Секвенирование двухцепочечных образцов	186
4.2. Секвенирование одноцепочечных фрагментов ДНК	186
5. Заключение	189
Литература	189
Глава 7. Геномная дактилоскопия. <i>Р. Уэллс</i>	191
1. Введение	191
2. Гибридизационные зонды для геномной дактилоскопии	192
2.1. Зонды на основе минисателлитов	192
2.2. M13	196
3. Гель-электрофорез и перенос ДНК	199
3.1. Выбор фермента рестрикции	199
3.2. Приготовление образцов ДНК для электрофореза	200
3.3. Условия электрофореза	200
3.4. Перенос по Саузерну	201
4. Условия гибридизации и отмывки фильтров	201
4.1. Минисателлиты	202
4.2. Метод геномной дактилоскопии с использованием M13	203
4.3. Радиоавтография	203
4.4. Удаление проб с нейлоновых фильтров	204
5. Использование метода геномной дактилоскопии в анализе генетического сцепления	204
5.1. Обоснование метода	204
5.2. Статистические расчеты	206
5.3. Практические аспекты сегрегационного анализа	208
6. Другие применения метода геномных отпечатков	210
6.1. Определение структуры родословной	210
6.2. Сравнения в пределах одного организма	212
Литература	212

Глава 8. Картирование сложно наследуемых признаков человека. <i>Э. Ландер</i>	214
1. Введение	214
2. Основы анализа сцепления	216
3. Карта генетического сцепления генома человека	218
4. Планирование анализа сцепления для болезней с простым типом наследования	219
5. Осложнения: неполная пенетрантность и ошибки клинической диагностики	220
6. Осложнения: генетическая гетерогенность и фенокопии	224
7. Осложнения: генетические взаимодействия	231
8. Полигенное наследование	233
9. Картирование редких рецессивных признаков	234
10. Заключение	235
Литература	237
Предметный указатель	240
Указатель латинских названий	243

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир»

Учебное издание

Г. Бантинг, Ч. Кантор, Ф. Коллинз и др.

АНАЛИЗ ГЕНОМА. МЕТОДЫ

Под редакцией К. Дейвнса

Зав. редакцией М. Д. Гроздова
Ст. научн. редактор М. Р. Погосбекова
Мл. научн. редактор М. С. Карнюшина
Художник А. В. Захаров
Художественный редактор А. Я. Мусия
Технический редактор А. Л. Гулина
Корректор Н. А. Мистрюкова

ИБ № 7437

Сдано в набор 23.7.90. Подписано к печати 4.12.90. Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 1. Печать высокая. Гарнитура Латинская. Объем 7,75 бум. л. Усл. печ. л. 15,5. Усл. кр.-отт. 15,5. Уч.-изд. л. 15,61. Изд. № 4/7654. Тираж 5000 экз. Зак. 434. Цена 3 р. 40 к.

Издательство «Мир»

В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета СССР по печати.

129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Государственного комитета СССР по печати. 113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.

