

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ХРОМОСОМНОЙ ДНК КРЫСЫ *IN VITRO* И *IN SILICO*

В.А. ЧЕРНУХИН*, М.А. АБДУРАШИТОВ, В.Н. ТОМИЛОВ, Д.А. ГОНЧАР, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

На основе ранее предложенного метода рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* рассчитаны диаграммы распределения фрагментов хромосомной ДНК крысы при ее расщеплении по более чем 25 нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. При проведении рестрикционного анализа *in vitro* получены картины электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях продуктов гидролиза ДНК крысы всеми этими ферментами. Проведено сравнение теоретически рассчитанных диаграмм распределения фрагментов и экспериментально полученных данных по гидролизу ДНК соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

Ключевые слова: ДНК-повторы, рестрикционный анализ, эукариотический геном, крысы Спрейг-Доули.

В настоящее время первичная структура ДНК крысы определена более чем на 90% [1] и эти данные постоянно обновляются. В предыдущей работе нами был предложен несложный метод проведения рестрикционного анализа ДНК млекопитающих *in silico* путем построения диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении хромосомной ДНК по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции. Для последовательностей ДНК 5'-CCWGG-3', 5'-GATC-3', 5'-GGCC-3' и 5'-CCGG-3' были получены такие диаграммы расщепления хромосомной ДНК крысы, мыши и человека. Сравнение теоретических расчетов с экспериментальными результатами по гидролизу хромосомных ДНК эндонуклеазами рестрикции Bst2UI, Kzo9I, HaeIII и MspI, имеющими эти сайты узнавания, показало хорошее соответствие картин рестрикции *in vitro* и *in silico* [2]. В данной работе исследовалось расщепление хромосомной ДНК крысы по более широкому спектру сайтов узнавания.

Целью настоящей работы явилось получение диаграмм распределения фрагментов при расщеплении хромосомной ДНК крысы по более чем 25 сайтам узнавания, включая 4-, 5- и 6-нуклеотидные последовательности, и сравнение полученных данных с результатами гидролиза ДНК соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

Материалы и методы

Хромосомная ДНК крысы. В экспериментах использовали крыс-самцов линии Спрейг-Доули в возрасте 3–4 месяца разведения вивария ИЦиГ СО РАН. Выделение хромосомной ДНК из печени крыс проводили по методике [3] с некоторыми модификациями, как описано ниже.

Печень крыс немедленно после забоя животного замораживали в жидком азоте. Кусочки ткани переносили в фарфоровую ступку и растирали под слоем жидкого азота до состояния однородного порошка. 0,5–1 г порошка ткани равномерно высыпали в коническую колбу объемом 50 мл, содержащую 5 мл лизирующего буфера (100 мМ ЭДТА pH 8,0; 0,5% SDS; 40 мкг/мкл протеиназы К). Раствор осторожно перемешивали и инкубировали 3 часа при 55 °С.

В колбу добавляли 5 мл фенола, насыщенного 10 мМ Трис-НСl (pH 8,0) и инкубировали при комнатной температуре и постоянном покачивании в течение 15 мин.

Смесь переносили в стакан и центрифугировали на 4000 об/мин. в течение 5 мин. при 20 °С. Верхнюю водную фазу переносили в коническую колбу пипеткой с использованием обрезанного ножницами наконечника. В колбу добавляли 5 мл смеси в равных объемах — фенол (насыщенный 10 мМ Трис-НСl (pH 8,0) и раствор А (смесь хлороформ/изоамиловый спирт в пропорции 24:1) и повторяли экстракцию и центрифугирование, как описано выше, после чего к водной фазе добавляли

* Автор для переписки:

© 2006 г. Чернухин Валерий Алексеевич,
сотрудник НПО «СибЭнзим»,
630117 Новосибирск, ул. Ак. Тимакова 2/12,
Тел. (3833) 33-49-91,
E-mail: valera@sibenzyme.ru

5 мл раствора А и еще раз повторяли экстракцию и центрифугирование.

Затем водную фазу помещали в стакан объемом 50 мл и охлаждали на льду. При медленном помешивании тонкой стеклянной палочкой к водной фазе добавляли по каплям охлажденный до 0 °С изопропанол. В момент резкого уменьшения вязкости раствора добавление изопропанола прекращали.

Геномную ДНК в виде вязких гелеобразных нитей собирали, «наматывая» на стеклянную палочку. Палочку с ДНК осторожно промывали 70% этанолом и подсушивали в слабом токе стерильного воздуха 3–6 мин., не допуская полного высыхания. После подсушивания палочку в стерильных условиях помещали в 1–1,5 мл буфера TE (10 mM Трис-НСl pH 7,0; 1 mM ЭДТА) в пробирки объемом 1,5 мл. Растворение проводили при 4 °С в течение 1 суток.

Гидролиз хромосомной ДНК. В работе использовали следующие эндонуклеазы рестрикции производства НПО «СибЭнзим» (в скобках указан сайт узнавания соответствующей рестриктазы):

1) PvuII (5'-CAGCTG-3'), 2) VspI (5'-ATTAAT-3'), 3) PciI (5'-ACATGT-3'), 4) Ksp22I (5'-TGATCA-3'), 5) HindIII (5'-AAGCTT-3'), 6) EcoRI (5'-GAATTC-3'), 7) Bpu10I (5'-CCTNAGC-3' и 5'-GCTNAGG-3'), 8) PctI (5'-GAATGC-3' и 5'-GCATTC-3'), 9) Bse3DI (5'-GCAATG-3' и 5'-CATTGC-3'), 10) SfaNI (5'-GCATC-3' и 5'-GATGC-3'), 11) Bse21I (5'-CCTNAGG-3'), 12) BstV2I (5'-GAAGAC-3' и 5'-GTCTTC-3'), 13) Bst6I (5'-CTCTTC-3' и 5'-GAAGAG-3'), 14) MspI (5'-CCGG-3'), 15) AluI (5'-AGCT-3'), 16) Kzo9I (5'-GATC-3'), 17) TaqI (5'-TCGA-3'), 18) RsaI (5'-GTAC-3'), 19) FatI (5'-CATG-3'), 20) Tru9I (5'-TTAA-3'), 21) Sse9I (5'-AATT-3'), 22) BstDEI (5'-CTNAG-3'), 23) HaeIII (5'-GGCC-3'), 24) AspS9I (5'-GGNCC-3'), 25) Fsp4HI (5'-GCNGC-3'), 26) BspAC (5'-CCGC-3' и 5'-GCGG-3'), 27) HpaII (5'-CCGG-3'), 28) HspAI (5'-GCGC-3'), 29) BstFN (5'-CGCG-3').

ДНК в количестве 6 мкг расщепляли в 40 мкл реакционной смеси в рекомендуемых производителем SE-буферах для рестрикции ДНК при оптимальных температурах в течение 3 ч.

Электрофорез. Для разделения фрагментов ДНК длиной от 40 до 600 п.о. использовали электрофорез в 8% ПААГ в камере Hoefer SE 600/SE 660 (Amersham USA). Толщина используемого геля — 1,5 мм, длина — 140 мм. На гель наносили 6 мкг гидролизованной

ДНК на дорожку. Электрофорез проводили в течение 5 часов при напряжении 140 В.

Для выявления более крупных продуктов фрагментов ДНК в диапазоне 500–10000 п.о. использовался электрофорез в 1% агарозе «Type I-A, Low EEO» («Sigma», USA), при этом на гель наносили 3 мкг гидролизованной ДНК на дорожку.

Во всех случаях для электрофореза применяли трис-ацетатный буфер (40 mM Трис-ацетат, pH 8,0, 1 mM ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Данные о нуклеотидной последовательности. Последовательность ДНК крысы была получена с ресурса <ftp://ftp.ensembl.org/pub/> (версия от 2 июня 2006 года).

Программное обеспечение. Построение диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении ДНК по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции, в виде зависимости суммарной массы фрагментов фиксированной длины, выраженной в парах оснований, от длины фрагментов (в парах оснований) проводили по методике, описанной нами ранее [2].

Результаты и обсуждение

Ранее нами были получены диаграммы распределения фрагментов при расщеплении хромосомной ДНК крысы по сайтам узнавания рестриктаз HaeIII (5'-GGCC-3'), MspI (5'-CCGG-3'), Kzo9I (5'-GATC-3') и Bst2UI (5'-CCWGG-3') и показано хорошее соответствие между расчетными данными и результатами экспериментов по гидролизу ДНК этими ферментами [2]. В настоящей работе мы проводили построение диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении хромосомной ДНК крысы по более широкому спектру сайтов узнавания, включая и шестинуклеотидные последовательности. При этом, в соответствии с предложенным ранее методом [2], диаграммы распределения строились с использованием арктангенсоидной шкалы, имитирующей разделение получаемых фрагментов электрофорезом в агарозном геле. На рисунке 1а приведены диаграммы расщепления ДНК в основном по шестинуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания как хорошо известных ферментов (HindIII и EcoRI), так и редко используемых (SfaNI и другие). Для представления на рисунке были выбраны только те диаграммы, которые характеризуются наличием пиков высотой 5,5 и более млн. пар оснований,

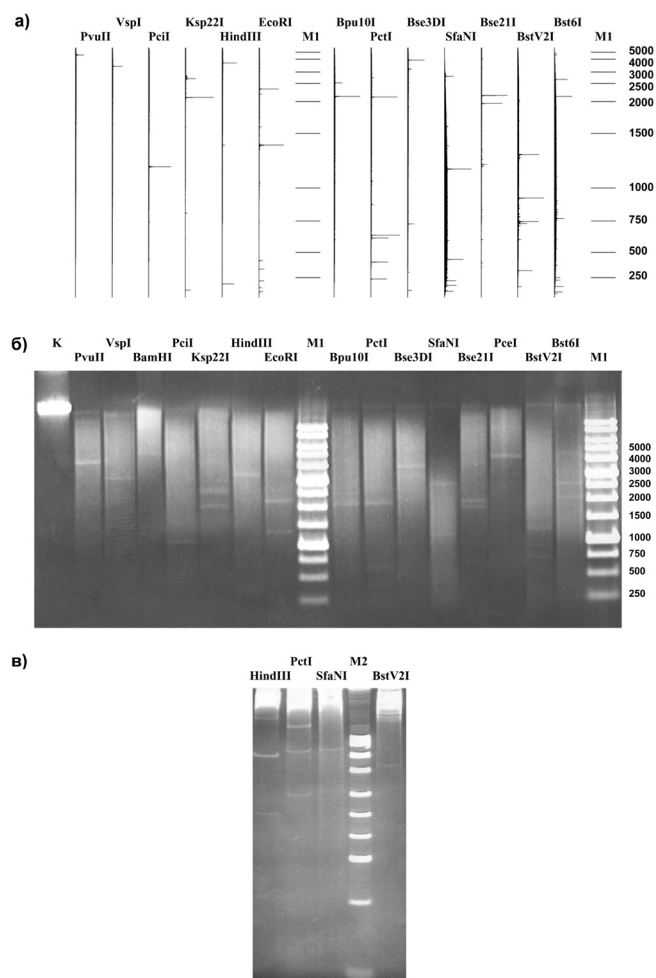


Рис. 1.

а) Диаграммы распределения фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении геномной ДНК крысы по нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. Название каждого фермента указано над соответствующей диаграммой. В центре и справа приведены рассчитанные электрофореграммы распределения маркеров молекулярных масс фрагментов ДНК.

б) Анализ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции. Электрофорез в 1% агарозе. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля; M1 — маркер длин фрагментов SE 1kb.

в) Анализ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции. Электрофорез в ПААГ. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля; M2 — маркер длин фрагментов pUC19/MspI

что, как было показано ранее [2], является пороговой величиной для появления соответствующих полос при анализе продуктов расщепления ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. В таблице 1 собраны данные

по 26 таким пиковым фрагментам. Как видно из данной таблицы, в большинстве случаев наличие пиков такой высоты объясняется присутствием нескольких фрагментов с размерами, отличающимися на 1–2 нуклеотида, для которых, в соответствии с предложенным методом [2], и вычислялось суммарное значение высоты пика. Образование кластеров таких фрагментов, минимально отличающихся друг от друга размерами, связано, по-видимому, с делециями и инсерциями в повторах ДНК [4], при расщеплении которых и образуются полосы ДНК, видимые на агарозных и акриламидных гелях [2, 5, 6, 7]. Непосредственный анализ ДНК-повторов представляется более простым методом получения картины рестрикции *in silico*, однако ввиду достаточно высокой вариабельности нуклеотидной последовательности в этих участках ДНК, его применение едва ли корректно. Для сравнения мы провели анализ усредненной первичной структуры наиболее полного (6914 п.о.) LINE1 повтора ДНК крысы [8], имеющейся в базе данных ДНК-повторов [<http://www.girinst.org/replib/>] и эти данные представлены в последнем столбце таблицы 1. Как видно из таблицы, наблюдается достаточно высокое соответствие данных, полученных при анализе геномной ДНК и LINE1 повтора. Однако для ряда сайтов расчетные данные, полученные предложенным нами методом, отличаются от данных анализа LINE1 повтора. В частности, в последнем случае оказался пропущенным один из VspI сайтов; наблюдается отличие в размерах PvuII фрагмента и верхних фрагментов Ksp22I и SfaNI гидролизатов ДНК. Кроме того, анализ LINE1 повтора не позволяет оценить количество получаемых фрагментов ДНК и тем самым предсказать их визуализацию в эксперименте. Например, низкомолекулярные фрагменты в гидролизатах EcoRI, SfaNI, BstV2I и ряда других ферментов, получаемые при анализе LINE1 повтора, дают невысокие пики в диаграммах и, как будет показано в дальнейшем, не видны на фотографиях электрофореграмм.

На рисунке 1б приведены экспериментальные данные по рестрикционному анализу хромосомной ДНК крысы *in vitro*.

Сравнение расчетных данных в третьем столбце таблицы 1 с экспериментальными результатами показывает, что все указанные фрагменты присутствуют в виде полос на фотографии агарозного геля. В частности, экспериментально наблюдается наличие полос соответствующей молекулярной массы при гидролизе ДНК крысы ферментами PvuII, VspI, PciI, Ksp22I, HindIII, EcoRI, Bpu10I, PciI, Bse3DI, SfaNI, Bse21I, BstV2I и Bst6I.

Таблица 1

Расчетные длины фрагментов, образующихся при расщеплении геномной ДНК крысы по различным последовательностям нуклеотидов, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции

Эндонуклеаза рестрикции	Сайт узнавания	Длины пиковых фрагментов, п.о.	Длины фрагментов, получаемых при расщеплении повтора L1_RN
PvuII	CAGCTG	4549,4550	4685
VspI	ATTAAT	3361,3362	_*
PciI	ACATGT	1171,1172	1172
Ksp22I	TGATCA	2678,2679 2094,2095	2814, 2095 , 101
HindIII	AAGCTT	3626,3627 179**	3627 , 179
EcoRI	GAATTC	2316,2317,2318 1372,1373	2318 , 1373 , 213, 131, 83, 66, 66
Bpu10I	CCTNAGC	2116,2117	2117
PctI	GAATGC	2105,2106 641, 619 413 236	2106 , 641 , 625, 413 , 236
Bse3DI	GCAATG	3908,3909	3917, 96
SfaNI	GCATC	2786,2787 1151 437	2922, 1170, 418, 161, 85, 76
Bse21I	CCTNAGG	2140,2142 1960,1961,1962	2142 1962 , 1325
BstV2I	GAAGAC	1279,1280 924 747 327	1266 924 , 867 761, 605, 327 , 158
Bst6I	CTCTTC	2656,2657 2115,2116	2657 2116 , 904, 362, 224, 147, 52

Примечание:

* в консенсусной последовательности повтора L1_RN имеется только один сайт VspI.

** фрагмент с пиковым значением 4,7 млн. п.о.

Жирным шрифтом в 4-м столбце выделены фрагменты, либо совпадающие, либо отличающиеся на 1–2 нуклеотида от соответствующих фрагментов, указанных в 3-м столбце

На рисунке 16 на дорожках 4 и 15 представлены картины гидролиза хромосомной ДНК ферментами *Bam*HI и *Pce*I, соответственно. Эти ферменты отсутствуют в таблице 1, так как расщепление по сайтам узнавания *Bam*HI и *Pce*I не дает диаграмм с высокими пиковыми значениями. Однако, как видно из рисунка 16, гидролиз ДНК этими ферментами также приводит к появлению полосы ДНК на электрофореграмме в районе 4500–5000 п.о., особенно хорошо заметной в случае *Pce*I. Кроме того, на дорожке 17 при гидролизе ДНК ферментом *Bst*6I заметно наличие дополнительной полосы в районе 4500–5000 пар оснований, представленной небольшим пиком на рисунке 1 и потому отсутствующей в таблице 1.

Детальный анализ диаграмм расщепления ДНК по сайтам узнавания ферментов *Bam*HI, *Bst*6I и *Pce*I показывает, что во всех трех случаях в области 4500–5000 пар оснований располагается сразу несколько фрагментов, различающиеся размерами в пределах 200 п.о. и имеющие невысокие пиковые значения (данные не приводятся). В этом случае появление полосы на геле, вероятно, связано с невысокой разрешающей способностью электрофореза для фрагментов размерами 4500–5000 пар оснований и может быть следствием перекрытия нескольких небольших пиков. Этим же можно объяснить утолщение верхней полосы, соответствующей фрагментам 2678–2679 п.о., при гидролизе ДНК ферментом *Ksp*22I.

Из таблицы 1 видно, что, согласно полученным диаграммам, среди продуктов расщепления ДНК крысы ферментами *Hind*III, *Pct*I, *Sfa*NI и *Bst*V2I есть низкомолекулярные фрагменты. Для их анализа проводился электрофорез в ПААГ, который, кроме того, позволяет визуализировать фрагменты с меньшим пиковым значением, так как на дорожку в геле наносится большее количество ДНК. На рисунке 1в представлены полученные электрофореграммы разделения в ПААГ продуктов гидролиза ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции *Hind*III, *Pct*I, *Sfa*NI и *Bst*V2I. Расщепление ДНК ферментом *Hind*III приводит к образованию фрагмента 179 п.о., присутствующего в таблице 1, и дополнительного фрагмента размерами 370 пар оснований, образующегося при гидролизе сателлитной ДНК, в которой имеется сайт узнавания фермента *Hind*III [6]. На рисунке 1в. видны также все остальные низкомолекулярные фрагменты, присутствующие в 3-м столбце таблицы 1. *Pct*I образует дубль 641 и 619, а также фрагменты 413 и 236 пар оснований, *Sfa*NI выщепляет фрагмент 437 пар оснований и *Bst*V2I — фрагмент 327 пар оснований. Другие

низкомолекулярные фрагменты, которые дает анализ *LINE*1 повтора для сайтов узнавания данных ферментов, в эксперименте не обнаруживаются, что свидетельствует не в пользу использования данных по повторам при построении диаграмм расщепления ДНК.

На рисунке 2а изображены диаграммы расщепления ДНК в основном по четырехнуклеотидным последовательностям ДНК, а числами на них указаны размеры фрагментов с пиковыми значениями более 5,5 млн п.о. По сравнению с диаграммами на рисунке 1, в данном случае наблюдается образование существенно большего количества фрагментов ДНК, что приводит к появлению базовой кривой распределения фрагментов и пиков на ее фоне. Образование пиков, как было показано выше, связано с расщеплением *LINE*1 повторов, тогда как появление базовой кривой — результат расщепления остальной геномной ДНК. Вид этой кривой варьируется в зависимости от анализируемой нуклеотидной последовательности, а для сайтов узнавания ферментов *Alu*I, *Fat*I, *Tru*9I, *Sse*9I и *Bst*DEI количество фрагментов в диапазоне длин от 50 до 500 п.о. существенно выше, чем для остальных.

На рисунке 2б представлены результаты электрофореза продуктов гидролиза ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции с сайтами узнавания, представленными на рисунке 2а. Из сравнения рисунков 2а и 2б видно, что появление базовой кривой распределения фрагментов на диаграммах коррелирует с наличием областей окрашенного пятна ДНК на соответствующих фотографиях гелей. Образование такого пятна затрудняет визуализацию отдельных фрагментов ДНК, имеющих пиковые значения на диаграммах. В связи с этим на диаграммах на рисунке 2а числами обозначены размеры только тех фрагментов, которые находятся вне таких затемнений. Сравнение данных, приведенных на рисунках 2а и 2б, показывает, что наблюдается соответствие более чем 25 пиковых значений длин фрагментов, полученных на диаграммах, и полос, видимых на фотографии геля. В частности, как ранее было показано нами [2], при гидролизе ферментами *Msp*I и *Hae*III появляются хорошо различаемые полосы, соответствующие пикам 5537+5538 и 404+405 п.о. в первом случае, и 1173, 863, 697, 575+588, а также 370 п.о. (сателлитная ДНК) — во втором случае. При обработке ДНК ферментами *Alu*I, *Kzo*9I и *Taq*I заметно появление полос, соответствующих фрагменту 1127 п.о., двойному фрагменту 752 и 768 п.о. и двоянному пику 1187 и 1233 п.о., соответственно. Гидролиз ДНК ферментами *Rsa*I, *Fat*I и *Tru*9I дает по несколько слабых полос, соответствующих пикам 1650, 989, 802 и 555 в первом случае, 1007 и 832 п.о. — во втором случае и 703; 573–575 и

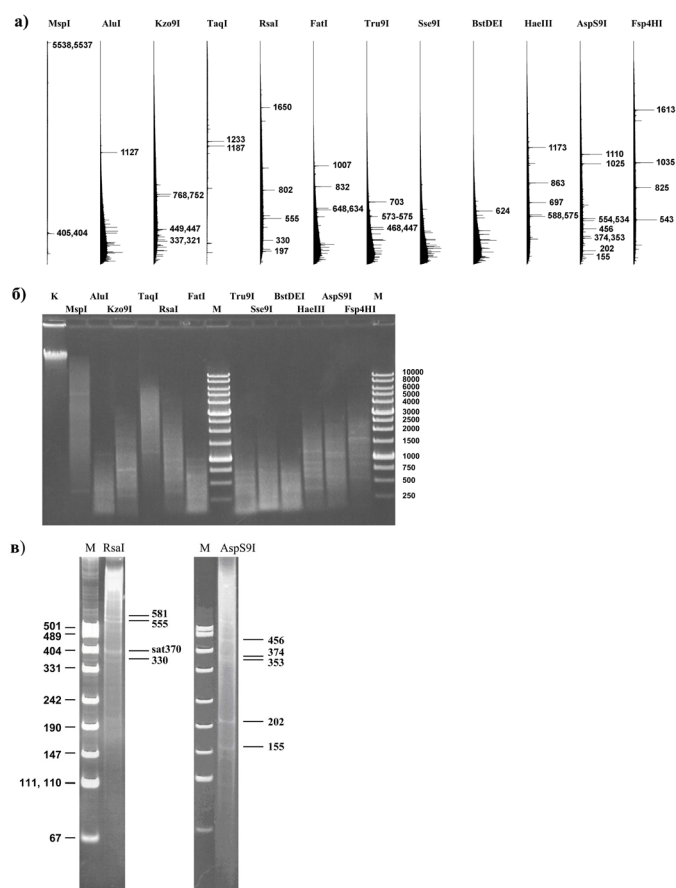


Рис. 2.

а) Диаграммы распределения фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении геномной ДНК крысы по нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. Название каждого фермента указано над соответствующей диаграммой. В центре и справа приведены рассчитанные электрофореграммы распределения маркеров молекулярных масс фрагментов ДНК.

б) Анализ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции. Электрофорез в 1% агарозе. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля. М1 — маркер длин фрагментов SE 1kb.

в) Электрофорез хромосомной ДНК крысы в ПААГ после обработки эндонуклеазами рестрикции RsaI и AspS9I. М — маркер длин фрагментов pUC19/MspI

447–468 — в третьем. Гидролиз ДНК ферментами Sse9I и BstDEI не дает четко определяемых полос ввиду их перекрытия с пятном низкомолекулярных фрагментов. Расщепление ферментом AspS9I приводит к появлению дискретных полос, соответствующих пикам 1025+1100 п.о. и 534+554 п.о., а фермент Fsp4HI дает фрагмент 1613 п.о. и менее заметные фрагменты 1463, 1035, 825 и 543 п.о. Как видно на рисунке 2а, невысокие значения базовой кривой в районе меньше 600 п.о., необходимые

для визуализации фрагментов в ПААГ, наблюдаются при расщеплении ДНК по сайтам узнавания ферментов AspS9I, Fsp4HI, HaeIII, Kzo9I, MspI, RsaI и TaqI.

Результаты электрофореза в ПААГ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы ферментами HaeIII, Kzo9I и MspI были получены и обсуждались нами ранее [2]. В случае остальных ферментов соответствующие пики на диаграммах есть только при расщеплении ДНК ферментами AspS9I и RsaI. На рисунке 2в представлены данные электрофореза в ПААГ продуктов расщепления ДНК крысы ферментами AspS9I и RsaI. В первом случае видны полосы, соответствующие фрагментам 456, 374, 353, 202 и 155 п.о., а во втором — 581, 555 и фрагмент сателлитной ДНК длиной 370 п.о. [6].

Как видно из приведенных на рисунке 2б данных, расщепление ДНК рестриктазами TaqI, RsaI и FatI, имеющими сайты узнавания с одинаковым GC составом, приводит к различной глубине гидролиза и расположению пятна ДНК. Соответственно базовые кривые для сайтов узнавания этих ферментов на рисунке 2а также существенно отличаются друг от друга.

Можно выделить несколько особенностей хромосомной ДНК крысы, от которых зависит глубина гидролиза рестриктазами с одинаковым набором нуклеотидов в сайте узнавания.

1. *Блокирование гидролиза геномной ДНК метилированием CG-динуклеотидов.* По имеющимся оценкам, в геномах млекопитающих 70–80% всех CG-пар метилировано [9]. На рисунке 3 приведены результаты расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции, содержащими динуклеотид CG в сайте узнавания, в частности, ферментами BspACI (5'-CCGC-3' и 5'GCGG-3'), BstFNI (5'-CGCG-3'), HspAI (5'-GCGC-3'), HpaII и MspI (5'-CCGG-3'). Как видно из рисунка, ферменты BspACI, BstFNI, HspAI и HpaII расщепляют геномную ДНК незначительно, тогда как MspI, который способен расщеплять сайт 5'-CmCGG-3', существенно гидролизует ДНК. Таким образом, из всех проанализированных нами ферментов с CG-динуклеотидом в составе сайта узнавания только MspI и TaqI, который также нечувствителен к метилированию цитозина в сайте узнавания, эффективно расщепляют хромосомную ДНК (рис. 2б и 3).

Кроме того, гидролиз ДНК некоторыми ферментами может быть затруднен в результате перекрытия сайта узнавания с CG-метилированным динуклеотидом. Так, при обработке сателлитной ДНК крысы часть сайтов узнавания ферментов HinfI (5'-GANTC-3') и EcoRI (5'-GAATTC-3') содержит метилированный цитозин и

такой сайт гидролизуются с существенно меньшей скоростью, чем немодифицированный сайт узнавания [5].

2. *GC-состав. Геномная ДНК крысы является АТ-богатой и доля GC-пар составляет 40% [10]).* Поэтому более глубокий гидролиз должен наблюдаться для рестриктаз, у которых в сайте узнавания доля GC-пар меньше. Как видно из рисунка 2, *Tru9I* и *Sse9I*, у которых в сайте узнавания содержатся только АТ-пары, дают более глубокий гидролиз, чем *ЭР*, содержащие в сайте узнавания только GC-пары (например, *HaeIII* и *Asp9I*).

3. *Наличие в сайте узнавания высокочастотных и низкочастотных динуклеотидов.* Частота встречаемости некоторых динуклеотидных пар существенно отличается от средней статистически ожидаемой. Этим можно объяснить различие средней длины образуемых рестрикционных фрагментов при гидролизе ДНК ферментами, у которых сайт узнавания имеет один и тот же GC-состав.

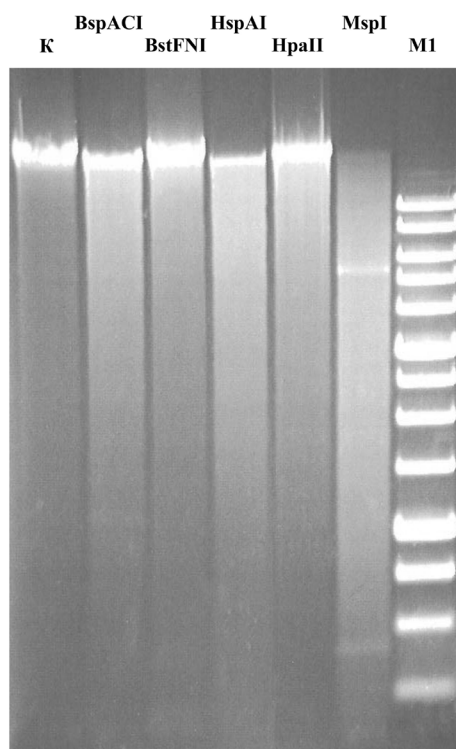


Рис. 3. Расщепление геномной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции с сайтами узнавания, содержащими CG-динуклеотид. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля. M1 — маркер длин фрагментов SE 1kb.

Так, при гидролизе ДНК эндонуклеазой рестрикции *TaqI* (сайт узнавания TCGA) глубина гидролиза хромосомной ДНК существенно меньше, чем при гид-

ролизе ферментами *Kzo9I* (GATC) и *RsaI* (GTAC), хотя GC-состав сайтов узнавания всех этих ферментов одинаков. Этот результат можно объяснить тем, что в хромосомных ДНК эукариот частота встречаемости динуклеотида CG в пять раз ниже по сравнению со статистически ожидаемой частотой [11]. Низкая частота встречаемости CG-пары обусловлена, по-видимому, высокой скоростью перехода образующегося в этом динуклеотиде 5-метилцитозина в тимин в результате реакции спонтанного дезаминирования [12].

Аналогичным образом можно объяснить различие в глубине гидролиза ДНК ферментами *HaeIII* (сайт узнавания 5'-GGCC-3') и *MspI* (сайт узнавания 5'-CCGG-3') на рисунке 16. Действительно, хотя последовательности узнавания обоих ферментов состоят только из GC-пар, в сайте узнавания *MspI* присутствует низкочастотный динуклеотид CG, наличие которого приводит к меньшей глубине гидролиза ДНК ферментом *MspI* чем рестриктазой *HaeIII*.

Обратная ситуация наблюдается для динуклеотидов TG, CA, AG и CT. Эти динуклеотиды в хромосомной ДНК эукариот представлены с более высокой частотой по сравнению со среднестатистическим значением встречаемости [13, 14]. Этим можно объяснить глубокий гидролиз, который наблюдается на рисунке 26 для ферментов *FatI* (сайт узнавания CATG), *AluI* (сайт узнавания AGCT) и *BstDEI* (сайт узнавания CTNAG). В сайте узнавания этих эндонуклеаз рестрикции находятся сразу по два высокочастотных динуклеотида (CA и TG — для *FatI*, AG и CT — для *AluI* и *BstDEI*).

Заключение

Для широкого спектра последовательностей узнавания эндонуклеаз рестрикции получены диаграммы расщепления хромосомной ДНК крысы, а также проведены эксперименты по гидролизу ДНК соответствующими ферментами. Теоретически показано существование более чем 50 пиковых значений фрагментов (или кластеров фрагментов) ДНК при расщепления по 25 нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания рестриктаз. Установлено, что предложенный метод расчета позволяет получать более достоверные картины рестрикции ДНК крысы *in silico*, чем прямой анализ обобщенной первичной структуры ДНК-повтора LINE1. Эксперименты по электрофоретическому разделению продуктов гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции проводились в агарозном или акриламидном геле, в зависимости от полученной диаграммы. Проведенное в

работе сравнение рассчитанных диаграмм распределения фрагментов ДНК крысы и полученных картин рестрикционного анализа ДНК соответствующими ферментами показывает хорошее соответствие полученных теоретических и экспериментальных данных.

Авторы благодарят к.б.н. Каледина В.И. за помощь в работе с животными и к.б.н. Васильева Г.В. за помощь в выделении ДНК.

Литература

1. Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution // *Nature*. — 2004. — Vol. 428. — P. 493–521.
2. Томилов В.Н., Чернухин В.А., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих in silico // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. — 2006 — Т. 2. — № 3. — С. 29–38.
3. Дашкевич В.С., Дымищ Г.М., Салганик Р.И., Уланов Б.П. О дестабилизации вторичной структуры ДНК регенерирующей печени крыс в процессе репликации // *Молекулярная биология*. — 1972. — Т. 6. — № 5. — С. 689–697.
4. Southern E.M. Base sequence and evolution of guinea-pig alpha-satellite DNA // *Nature (Lond)*. — 1970. — Vol. 227. — P. 794–798.
5. Philippsen P., Streeck R.E., Zachau H.G. Defined fragments of calf, human, and rat DNA produced by restriction nucleases // *European J. of Biochemistry* — 1974. — Vol. 45. — P. 479–488.
6. Pech M., Igo-Kemenes T., Zachau H.G. Nucleotide sequence of highly repetitive component of rat DNA // *Nucl. Acids Res.* — 1979. — P. 417–432.
7. Horz W., Hess I., Zachau H.G. Highly regular arrangement of restriction nuclease sensitivity site in rodent satellite DNAs // *European J. of Biochemistry*. — 1974. — Vol. 45. — P. 501–512.
8. Soares, M.B., Schon, E., Efstratiadis A. Rat LINE1: The origin and evolution of long interspersed middle repetitive DNA elements // *J. of Molecular Evol.* — 1985. — Vol. 22. — P. 117–133.
9. Ehrlich M., Gama S.M., Huang L.H., Midgett R.M., Kuo K.C., McCune R.A., and Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells // *Nucl. Acids Res.* — 1982. — Vol. 10. — P. 2709–2721.
10. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. Справочник по биохимии. — Киев: Наукова думка, 1971.
11. Schorderet D.F., and Gartler S.M. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1992. — Vol. 89. — P. 957–961.
12. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. — 1993. — Vol. 362. — P. 709–715.
13. Ohno S. Universal rule for coding sequence construction: TA/CG deficiency-TG/CT excess // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1988. — Vol. 85. — P. 9630–9634.
14. Yomo T., Ohno S. Concordant evolution of coding and noncoding regions of DNA made possible by the universal rule of TA/CG deficiency-TG/CT excess // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1989. — Vol. 86. — P. 8452–8456.

Принятые сокращения

ЭР — эндонуклеаза рестрикции,
п.о. — пара оснований,
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота,
ПААГ — полиакриламидный гель.

COMPARATIVE RESTRICTION ANALYSIS OF THE RAT CHROMOSOME DNA CLEAVAGE IN VITRO AND IN SILICO

V.A. CHERNUKHIN, M.A. ABDURASHITOV, V.N. TOMILOV, D.A. GONCHAR,
S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

Theoretical diagrams of Sprague-Dawley rat chromosomal DNA cleavage in more than 25 different nucleotide sequences has been obtained based on earlier proposed method of mammalian genome restriction analysis in silico. Restriction analysis in vitro has been performed to get DNA digestions by restriction endonucleases with respective recognition sequences. Comparison of theoretical DNA cleavage diagrams and experimental patterns of DNA hydrolysis with restriction endonucleases has been done.

Keywords: repetitive DNA elements, restriction analysis, eukaryotic genome, Sprague-Dawley rats.