

Рестрикционный анализ ДНК человека – новые возможности в ДНК-диагностике

Категория: [Исследования геномной ДНК](#)

Просмотров: 26794

[Абдурашитов М. А*](#), Чернухин В. А., Томилов В. Н., Гончар Д. А., Дегтярев С. Х.

Медицинская генетика, Т.6, № 8, с 29-36, 2007

*Изучены возможности использования метода расщепления хромосомной ДНК человека эндонуклеазами рестрикции в работах по медицинской генетике. На основе ранее опубликованной работы по анализу геномов млекопитающих *in silico* рассчитаны диаграммы распределения фрагментов хромосомной ДНК человека при ее расщеплении по 15 нуклеотидным последовательностям, которые являются сайтами узнавания рестриктаз. Проведен анализ первичной структуры Alu- и LINE1-повторов ДНК и построены диаграммы распределения фрагментов ДНК повторов при ее расщеплении по этим 15 нуклеотидным последовательностям. При этом показано, что диаграммы распределения получаемых низкомолекулярных фрагментов хромосомной ДНК соответствуют диаграммам распределения фрагментов Alu-повторов, тогда как картины распределения высокомолекулярных фрагментов аналогичны диаграммам распределения LINE1-повторов. Получены картины гидролиза ДНК человека соответствующими эндонуклеазами рестрикции и проведено сравнение теоретических диаграмм распределения фрагментов и экспериментально полученных результатов. Обсуждаются перспективы применения сайт-специфических эндонуклеаз в ДНК-диагностике.*

Введение

В результате недавно законченных работ по программе «Геном Человека» была определена первичная структура геномной ДНК человека более чем на 95% [1]. В настоящее время эти данные постоянно обновляются и доля установленной первичной структуры возрастает. Ранее нами был предложен несложный метод проведения рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico*, основываясь на имеющихся данные по первичной структуре ДНК [2]. Этот метод позволяет рассчитывать диаграммы распределения фрагментов, получаемых при расщеплении хромосомной ДНК по коротким нуклеотидным последовательностям, которые являются сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции (ЭР). Сравнение таких диаграмм с

экспериментальными данными по гидролизу хромосомной ДНК крысы, мыши и человека несколькими эндонуклеазами рестрикции показало соответствие картин рестрикции *in vitro* и *in silico* [2]. В данной работе исследовалось расщепление хромосомной ДНК человека по более широкому спектру сайтов узнавания.

Целями настоящей работы являлось:

1. построение диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении геномной ДНК человека по 15 сайтам узнавания рестриктаз, включая 4-х, 5-ти и 6-ти нуклеотидные последовательности;
2. разработка метода анализа нуклеотидных последовательностей Alu- и LINE1-повторов, присутствующих в геноме человека;
3. получение диаграмм распределения фрагментов, образуемых при расщеплении Alu- и LINE1-повторов по выбранным 15 сайтам узнавания рестриктаз;
4. гидролиз хромосомной ДНК человека соответствующими эндонуклеазами рестрикции;
5. сравнение полученных теоретических данных и экспериментальных результатов расщепления ДНК.

Материалы и методы

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов крови человека

Выделение ДНК проводилось по методике [3] с некоторыми модификациями как описано ниже. Каждый препарат донорской крови немедленно смешивали с 6% ЭДТА в соотношении 9:1. К 5 мл смеси добавляли равный объём раствора, содержащего 0,9% NaCl и 3% желатин, осторожно перемешивали, переворачивая пробирку, и оставляли в термостате при 37 °С в течение 30 мин. Верхнюю отстоявшуюся прозрачную фазу переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин при 20 °С. Супернатант удаляли и осадок клеток аккуратно промывали в 2 мл буфера А (0,1 М Трис-НCl, pH 7,5; 0,1 М NaCl; 30 mM MgCl₂) в течение 5 мин, аккуратно переворачивая пробирку. Смесь вновь центрифугировали при 7200 g в течение 10 мин при 20 °С и удаляли надосадочную жидкость путем осторожного отсасывания. Осадок промытых клеток аккуратно ресуспендировали в 2 мл лизирующего буфера В (10 mM ЭДТА; 0,1 М NaCl; 50 mM Трис-НCl, pH 8,0), с добавлением 0,5% SDS, 0,01 мг/мл протеиназы К; 0,01 мг/мл РНКазы А и инкубировали в термостате при 37 °С в течение ночи (18 ч). Затем к инкубационной смеси добавляли раствор 4М NaCl до концентрации 0,1 М и 2 мл фенола, насыщенного 10 mM Трис-НCl (pH 8,0), и инкубировали при комнатной температуре и мягком перемешивании в течение 10 мин. Смесь центрифугировали при 11000 g в течение 2 мин при 20 °С. Верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 2 мл смеси, состоящей из равных объёмов фенола, насыщенного 10 mM Трис-НCl (pH 8,0) и хлороформ-изоамилового

спирта (в пропорции 24:1). Далее повторяли экстракцию и центрифугирование как описано выше, после чего к водной фазе добавляли 2 мл хлороформ-изоамилового спирта (в пропорции 24:1) и ещё раз повторяли экстракцию и центрифугирование.

Затем водную фазу помещали в центрифужную пробирку, добавляли раствор 4 М NaCl до концентрации 0,1 М и охлаждали на льду. При медленном помешивании к водной фазе добавляли охлаждённый до 0 °С изопропанол до выпадения осадка. Осадок ДНК собирали стеклянной палочкой, промывали 70% этанолом и осторожно подсушивали в слабом токе стерильного воздуха 3-6 мин, не допуская полного высыхания. Осадок ДНК оставляли растворяться в 1-1,5 мл стерильного буфера TE (10mM Tris HCl pH 7,0; 1mM EDTA) при 24 °C в течение суток.

Гидролиз хромосомной ДНК

В работе использовали следующие эндонуклеазы рестрикции производства НПО “СибЭнзим” (в скобках указан сайт узнавания соответствующей рестриктазы):

1) AluI (5'- AGCT-3'), 2) AsuHPI (5'-GGTGA-3' и 5'-TCACC-3'), 3) Bpu10I (5'-CCTNAGC-3'и 5'-GCTNAGG-3'), 4) BstDEI (5'-CTNAG-3'), 5) Bst2UI (5'-CCWGG-3'), 6) BstSCI (5'-CCNGG-3'), 7) BstMAI (5'-GTCTC-3'и 5'-GAGAC-3'), 8) HinfI (5'-GANTC-3'), 9) BssECI (5'-CCNNGG-3'), 10) FauNDI (5'-CATATG-3'), 11) XbaI (5'-TCTAGA-3'), 12) MroXI (5'-GAANNNTTC-3'), 13) KpnI (5'-GGTACC-3'), 14) Msp20I (5'-TGGCCA-3'), 15) AspA2I (5'-CCTAGG-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.

Перед проведением реакции гидролиза все препараты ДНК обрабатывали рибонуклеазой А (0,1 мг/мл) 10 минут при комнатной температуре и диализовали в трубках DispoDialyzer MWCO 50,000 (“Sigma”, США) против 100 объемов буфера TE (10 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) при 4°C в течение 20 часов.

Электрофорез

Для выявления фрагментов ДНК длиной от 40 до 500 пар оснований (п.о.) использовали электрофорез в 8% полиакриламидном геле (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 фрагментов в диапазоне 200-2000 п.о. использовали 1,5% легкоплавкую агарозу “Low melting point” («Sigma», USA). При этом на гель наносили 3 мкг гидролизованной ДНК на дорожку. Во всех случаях для электрофореза применяли трис-ацетатный буфер (40 мМ Трис-ацетат, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Нуклеотидные последовательности генома и повторов

Последовательность ДНК человека была получена с ресурса [Ensembl](#) (версия от 2 июня 2006 года). Последовательности Alu- и LINE1-повторов были извлечены из базы данных нуклеотидной последовательности генома человека (версия - март 2006 г.) с помощью сервиса [Table Browser](#) [4]. Полученная выборка Alu-повторов состояла из 1193407 последовательностей с общей длиной ~350 млн. п.о. Выборка LINE1-повторов включала в себя 927393 последовательности с общей длиной ~510 млн. п.о.

Консенсусные последовательности подсемейств Alu-повторов взяты из [базы данных Repbase Update](#) [5].

Построение теоретически рассчитанных диаграмм распределения фрагментов ДНК

Построение теоретических графиков зависимости суммарной массы рестрикционных фрагментов фиксированной длины (в п.о.) от их длины проводили согласно описанной методике [2]. Вертикальные диаграммы распределения строились, как описано в работе [6].

Анализ последовательностей из семейств повторов и построение диаграмм распределения фрагментов проводился с помощью метода, описанного ранее [2], модифицированного для этой цели, как описано ниже. В каждой из последовательностей изучаемой выборки проводились поиск сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции и определение длин фрагментов, образуемых при ее расщеплении. Концевые фрагменты с обеих сторон последовательности при этом не учитывались. Затем подсчитывалось общее число фрагментов ДНК данной длины в диапазоне 1-6000 п.о. и суммарное количество п.о. для всех фрагментов заданной длины. Расчеты проводились на обычном персональном компьютере класса AMD 64.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение экспериментальных и расчетных данных по расщеплению хромосомной ДНК человека

Ранее нами были получены диаграммы распределения фрагментов при расщеплении хромосомной ДНК человека по сайтам узнавания рестриктаз HaeIII (GGCC), MspI (CCGG), Kzo9I (GATC) и Bst2UI (CCWGG) и показано хорошее соответствие между расчетными данными и результатами экспериментов по гидролизу этими ферментами ДНК крысы, мыши и человека [2]. В настоящей работе мы проводили построение диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении хромосомной ДНК человека по более широкому спектру сайтов узнавания, включая и шестинуклеотидные последовательности. При этом, в соответствии с предложенным ранее методом [6], диаграммы распределения строились с использованием арктангенсоидной шкалы, имитирующей разделение получаемых фрагментов электрофорезом в

агарозном геле. Из всех полученных диаграмм были выбраны те из них, которые характеризуются наличием пиков высотой 5,5 и более млн. пар оснований, что, как было показано ранее, является пороговой величиной для появления соответствующих полос при анализе продуктов расщепления ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле [6].

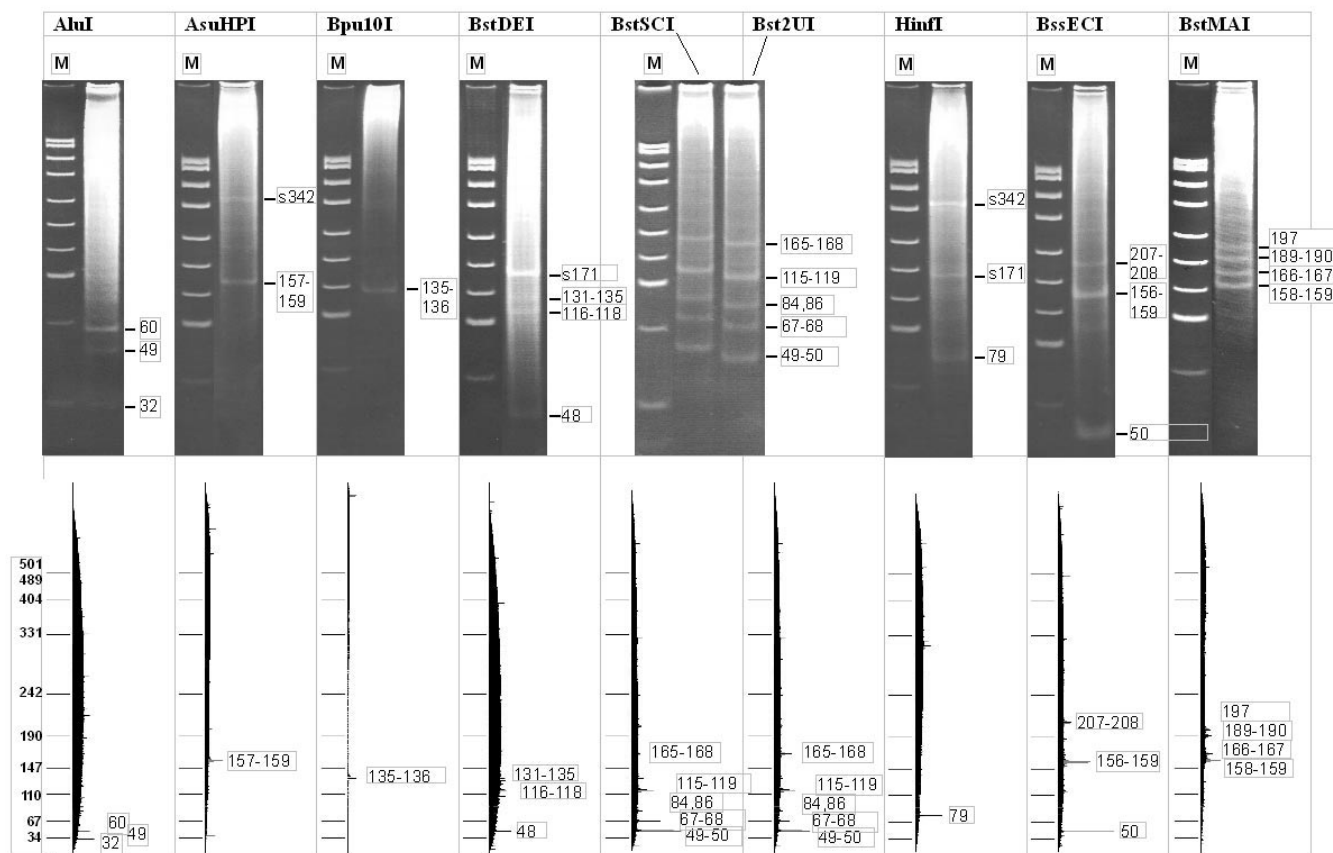


Рис. 1. Сравнение электрофореграмм (8% ПААГ) и диаграмм распределения суммарных длин фрагментов. Указаны длины фрагментов с пиковыми значениями, которые выявляются на электрофореграммах.

М – маркер длин фрагментов ДНК “SE 1 kb” (слева в нижнем ряду указаны длины фрагментов этого маркера).

На рисунках 1 и 6 приведены выбранные диаграммы расщепления ДНК по 9 нуклеотидным последовательностям длиной 4-5 п.о., являющимися сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. Восемь из представленных на рисунке диаграмм соответствуют расщеплению ДНК по сайтам узнавания мелкощеплящих ферментов AluI, AsuHPI, Bst2UI, BstSCI, BstDEI, BssECI, BstMAI и HinfI. Кроме того, диаграмма расщепления по последовательности узнавания фермента Bpu10I с шестинуклеотидным сайтом узнавания также имеет один фрагмент с величиной пика 5,5 млн п.о. На рис. 1 также представлены экспериментальные результаты гидролиза хромосомной

ДНК человека соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

При сравнении диаграмм видно, что наибольшее пиковое значение имеет фрагмент 50 п.о., получаемый при гидролизе ДНК ферментом BssECI. На фотографии геля отчетливо виден соответствующий фрагмент, а также фрагменты 156-159 п.о. и 207-208 п.о., дающие меньшие пики на диаграмме. Также хорошо видны фрагменты 49-50 п.о., 67-68 п.о., 84-86 п.о., 115-119 п.о. и 165-168 п.о., получаемые при гидролизе ДНК ферментом Bst2UI и ранее описанные нами [2]. При этом, фермент BstSCI, который имеет схожий сайт узнавания, дает аналогичную картину гидролиза. Следует, однако, отметить заметный сдвиг вверх картины гидролиза ДНК ферментом BstSCI по сравнению с данными по расщеплению ДНК ферментом Bst2UI. Аномальная подвижность в полиакриламидном геле фрагментов ДНК, получаемых при гидролизе BstSCI, была подтверждена отдельно (данные не приводятся) и, вероятно, связано с наличием протяженных 5'-выступающих концов. Анализ остальных диаграмм выявил единичные пиковые фрагменты длиной 79 п.о., 157-159 п.о. и 135-136 п.о., видимые на фотографиях гелей при гидролизе ДНК ферментами HinfI, AsuHPI и Bpu10I, соответственно. При гидролизе ДНК ферментом BstDEI появляются полосы, соответствующие фрагментам 48 п.о. и 116-118 п.о. На картине гидролиза ДНК ферментом HinfI хорошо видны фрагменты 171 и 342 п.о., являющиеся продуктами расщепления α -сателлитной ДНК [7]. Фрагмент сателлитной ДНК длиной 342 п.о. виден также при обработке ДНК ферментом AsuHPI, тогда как фрагмент длиной 171 п.о. – при гидролизе рестриктазой BstDEI. Отчетливая и характерная картина гидролиза наблюдается при расщеплении ДНК ферментом BstMAI. В этом случае также наблюдается соответствие эксперимента с теоретически рассчитанной диаграммой, дающей набор фрагментов с длиной 158-159 п.о., 166-167 п.о., 189-190 п.о. и 197 п.о. Теоретическое расщепление ДНК по последовательности AGCT приводит к образованию трех значимых пиковых фрагментов с размерами 32, 49 и 60 п.о. и соответствующие полосы видны на картине гидролиза ДНК ферментом AluI.

Таким образом, как видно из сравнения фотографий геля и полученных диаграмм, для мелкощепляющих ферментов наблюдается хорошее соответствие между теоретическими и экспериментальными данными по расщеплению ДНК.

Рис. 2. Сравнение электрофореграмм (1,5% легкоплавкая агароза) и диаграмм распределения суммарных длин фрагментов. Указаны длины фрагментов с пиковыми значениями, которые выявляются на электрофореграммах. “sat” – фрагменты, предположительно выщепляющиеся из сателлитной ДНК.

М – маркер длин фрагментов ДНК pUC19/MspI (слева в нижнем ряду указаны длины фрагментов этого маркера).

На рисунках 2 и 7 представлены картины гидролиза ДНК человека и соответствующие диаграммы расщепления ДНК ферментами AspA2I, FauNDI, KpnI, Msp20I, MroXI и XbaI. На фотографиях гелей отчетливо видны полосы, получаемые при гидролизе ДНК вышеуказанными эндонуклеазами рестрикции. При этом, как видно на рис.2 и 4, присутствующие на диаграммах пики фрагментов ДНК не превышают 4 млн. п.о, однако их длины соответствуют экспериментально полученным результатам. В частности, на фотографиях видны полосы, соответствующие фрагментам 636 п.о. (гидролиз ферментом AspA2I), 852 п.о. и 420 п.о. (гидролиз ферментом Msp20I), 1205 п.о., 1561 п.о. и 1791 п.о. (гидролиз ферментом KpnI), 1153 п.о. (гидролиз ферментом FauNDI), 1368 п.о. (гидролиз ферментом XbaI) и 1301 п.о. (гидролиз ферментом MroXI).

Ранее [6] мы обсуждали влияние двух факторов, влияющих на визуализацию фрагментов ДНК в экспериментах. Первый фактор - это наличие кластеров фрагментов близкой длины, отличающихся по размерам более чем на 1-2 нуклеотида, что приводит к перекрыванию полос на фотографии геля и визуализации даже небольших пиков на диаграмме. Этим, видимо, объясняется появление полосы фрагмента 636 п.о. при гидролизе ферментом AspA2I, так как анализ данных на диаграмме показывает, что сумма фрагментов ДНК размерами 631-638 п.о. превышает величину 7 млн п.о. Для KpnI гидролизата сумма длин получаемых фрагментов размерами 1559-1569 п.о. и 1199 – 1214 п.о. в обоих случаях превышает величину 5,5 млн п.о. При этом, появление полосы в районе 1800 п.о. может быть связано, скорее, с гидролизом сателлитной ДНК, чем с наличием фрагмента 1791 п.о., так как в этом районе нет значительного количества близких по размерам фрагментов, чтобы обеспечить его визуализацию. Этим же эффектом перекрывания близлежащих полос объясняется визуализация на фотографиях гелей следующих фрагментов: 1)852 п.о. (сумма длин близлежащих фрагментов приблизительно 9 млн п.о.) и 420 п.о. (~5,7 млн п.о.) при гидролизе ЭР Msp20I, 2)1153 п.о. (~7,5 млн. п.о.) при гидролизе ЭР FauNDI, 3)1368 п.о. (~8,5 млн) при гидролизе ЭР XbaI, 4)1301 п.о. (~9,8 млн. п.о.) при гидролизе ЭР MroXI. Таким образом, наблюдаемые экспериментально полосы могут соответствовать как отдельным фрагментам определенной длины (как, например, фрагмент 50 п.о., получаемый при гидролизе ДНК ферментом BssECI), так и кластеру близких по длине фрагментов, что характерно для визуализации фрагментов хромосомной ДНК человека в агарозных гелях. Аналогичное явление визуализации кластера фрагментов было ранее нами описано при расщеплении геномной ДНК крысы [6].

Другим фактором, влияющим на визуализацию фрагментов в эксперименте, является наличие общего фона ДНК. Этот фон соответствует основной кривой теоретической диаграммы и образуется при расщеплении всей ДНК, а не ее основных повторов [6]. Наличие такого фона видно, например, как на диаграмме расщепления ДНК по сайту CTNAG, так и на фотографии геля при гидролизе ДНК ферментом BstDEI, имеющим этот сайт узнавания. При этом фоновым пятном ДНК маскируется фрагмент 342 п.о., являющийся продуктом гидролиза сателлитной ДНК и хорошо видимый на фотографии геля при гидролизе ДНК ферментами AsuHPI и HinfI (рис.1).

Картина гидролиза ДНК ферментами MroXI и XbaI (за исключением фрагментов 1301 п.о. и 1368 п.о., обсуждаемых выше) не соответствует диаграммам расщепления ДНК. Это, по-видимому, объясняется специфической картиной гидролиза α -сателлитной ДНК человека этими ферментами. Ранее было показано [8], что при расщеплении такой ДНК, могут образовываться не только характерные полосы в районе 171 (мономер) и 342 (димер) п.о.(видимые при гидролизе ДНК ферментами AsuHPI и HinfI), но и фрагменты величиной до 2000 и более п.о. Это явление объясняется наличием в геноме олигомерных α -сателлитных повторов, составленных из нескольких звеньев и различающихся по нуклеотидному составу, и ранее было описано для случая фермента XbaI [8]. В наших экспериментах помимо XbaI гидролиз хромосомной ДНК с образованием высокомолекулярных сателлитных фрагментов наблюдается при использовании ферментов KpnI и MroXI. Однако отсутствие первичной структуры таких высокомолекулярных сателлитных ДНК в базах данных не позволило нам подтвердить расчетами полученные экспериментальные данные.

Анализ семейств Alu- и LINE1-повторов в геномной ДНК человека.

Наличие пиков в диаграммах распределения фрагментов ДНК и соответствующих им полос при анализе продуктов гидролиза в геле, очевидно, связано с присутствием в геномной ДНК огромного количества повторов. Как известно, две группы повторов ДНК наиболее часто встречаются в геноме человека: Alu-повторы [9, 10] и повторы семейства LINE1 (L1-повторы, [11, 12]). Из [базы данных](#) нуклеотидной последовательности генома человека были извлечены две представительные выборки последовательностей, относящиеся к повторам этих двух семейств. Исходя из данных о количестве копий ДНК-повторов в геноме человека [1], можно предположить, что пики на полученных нами диаграммах распределения связаны с наличием выявленных фрагментов ДНК в Alu- или LINE1-повторах генома человека. Ранее мы показали, что диаграммы распределения фрагментов, получаемых при расщеплении геномной ДНК крысы, практически полностью совпадают с картиной расщепления обобщенного LINE1-повтора крысы [6]. К сожалению, подобных данных по обобщенной структуре LINE1-повтора человека нами обнаружено не было. Поэтому нами был проведен поиск сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции во всех фрагментах имеющейся выборки из более чем 900000 LINE1-элементов с последующим построением диаграммы распределения фрагментов ДНК в данной выборке как описано в разделе "Материалы и методы". Аналогичным образом проводилось построение диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении выборки Alu-повторов (детально описано в [13]). На рисунках представлены полученные диаграммы расщепления Alu-повторов по сайтам AGCT (AluI) и CCWGG (Bst2UI) (рис.3) и LINE1-повторов по сайтам GGTACC (KpnI) и TGGCCA (Msp20I) (рис.4).

Рис. 3. Сравнение диаграмм распределения суммарной длины фрагментов, получаемых при расщеплении геномной ДНК и выборки Alu-повторов по сайтам узнавания ЭР AluI (AGCT) и Bst2UI (CCWGG). По оси абсцисс указаны длины фрагментов (п.о.), по оси ординат – сумма всех длин фрагментов данного размера (п.о.).

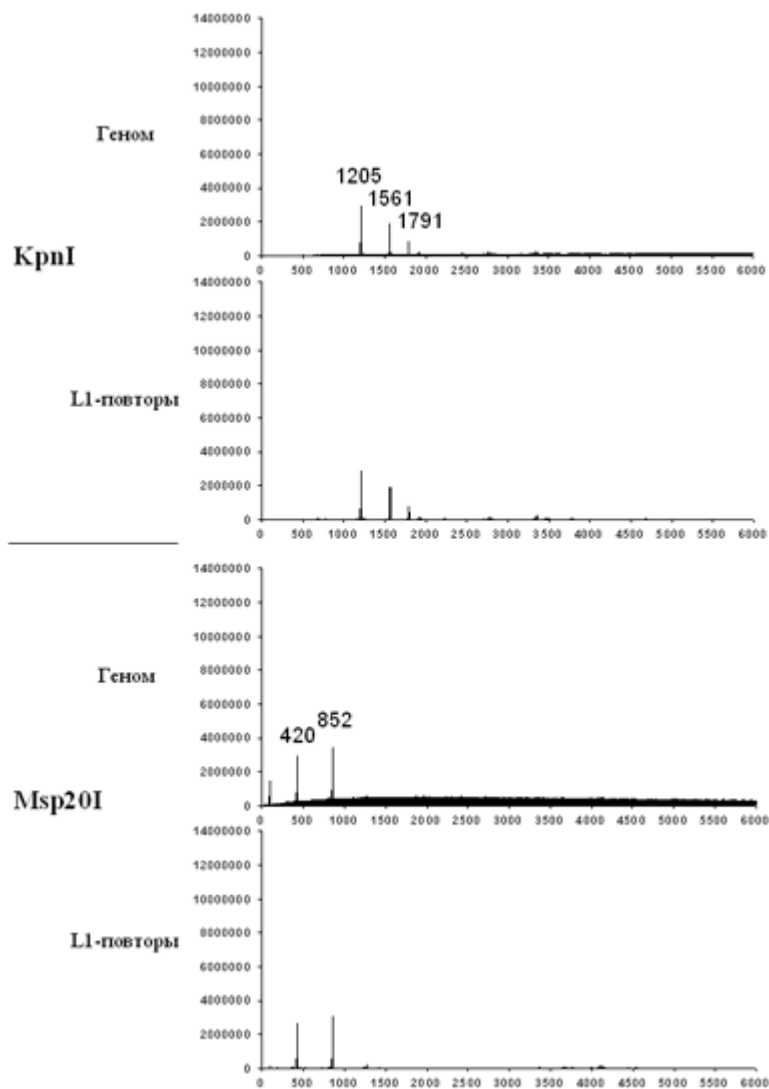


Рис. 4. Сравнение диаграмм распределения суммарной длины фрагментов, получаемых при расщеплении геномной ДНК и выборки LINE1-повторов по сайтам узнавания ЭР KpnI (GGTACC) и Msp20I (TGGCCA). По оси абсцисс указаны длины фрагментов (п.о.), по оси ординат – сумма всех длин фрагментов данного размера (п.о.).

Сравнение диаграмм (рис. 3) показало, что картины распределения пиков на диаграмме расщепления ДНК генома и выборки Alu-повторов по сайтам AGCT и CCWGG схожи. Сходство также наблюдается при расщеплении ДНК генома и выборки LINE1-повторов по сайтам GGTACC и TGGCCA (рис. 4). При этом, высота любого пика на диаграмме распределения фрагментов ДНК, полученных при расщеплении ДНК-повторов, соответствует высоте этого пика на диаграмме для всей геномной ДНК с вычетом фонового значения на этом участке. Фоновое

значение образуется в результате расщепления остальной геномной ДНК (прежде всего, неповторяющейся). Характер распределения длин фрагментов, образующих фон, зависит от ряда параметров, таких как GC-содержание геномной ДНК и сайта узнавания, частоты встречаемости определенных динуклеотидных последовательностей в геноме и обсуждался нами ранее [6].

Построение диаграмм расщепления геномной ДНК, Alu- и LINE1-повторов, подобных приведенным на рис. 3 и 4, было также проведено для остальных ЭР, использовавшихся в данной работе. Как и в случае с ферментами AluI, Bst2UI, KpnI и Msp20I, пики на диаграммах расщепления геномной ДНК совпали с пиками при расщеплении либо Alu-, либо LINE1-повторов. В таблице 1 собраны полученные результаты, где каждый из анализируемых пиков на диаграмме расщепления геномной ДНК соотнесен с пиками, полученными из Alu- или LINE1-повторов.

Из данных, приведенных в таблице 1 видно, что в случае больших размеров фрагментов (более 200 п.о.) наблюдаемые на диаграммах пики образуются из LINE1-повторов. Это, очевидно, связано с тем, что размеры LINE1-повторов составляют более 6000 п.о., тогда как Alu-повторы имеют в основном длину менее 300 п.о и образование больших фрагментов ДНК из них невозможно. Ранее аналогичную картину мы наблюдали при изучении расщепления геномной ДНК крысы, где также практически все фрагменты размерами более 200 п.о. соответствовали таковым, получаемым при расщеплении обобщенного LINE1-повтора крысы [6].

Однако, как следует из данных таблицы 1, в рассмотренных примерах пики фрагментов меньшей длины образуются исключительно из Alu-повторов. Отсутствие коротких фрагментов, образуемых L1-повторами, по-видимому, связано с тем, что большинство L1-повторов представлены в геноме в основном в виде делеционных вариантов, представляющих собой короткие фрагменты исходного полноразмерного варианта [1, 12]. Число L1-элементов длиной около 6000 п.о. составляет лишь около 15% от всех последовательностей, аннотированных как L1-элементы в геноме человека [12]. Даже те фрагменты L1-повторов, которые видны в эксперименте на рис. 2, представлены невысокими пиковыми значениями на диаграммах (не превышающие 4 млн. п.о.) и визуализируются на агарозных гелях вследствие образования кластеров фрагментов. Ввиду отсутствия значительных повторов в структуре самого L1-элемента, образование низкомолекулярных фрагментов из L1-повтора будет происходить в таких же количествах, как и высокомолекулярных. Это исключает их визуализацию вследствие пропорционального уменьшения суммарного количества пар оснований. Следует также отметить, что в акриламидных гелях практически невозможен эффект кластеризации фрагментов ДНК, который в сущности и объясняет проявления фрагментов ДНК с малыми пиковыми значениями на агарозных гелях. При этом, визуализация небольших фрагментов, получаемых из Alu-повторов, обусловлена заметно большим количеством таких повторов по сравнению с L1-элементами.

Рис. 5. Определение подсемейств Alu-повторов, расщепление которых приводит к образованию видимых фрагментов при гидролизе ЭР AluI человеческой ДНК. Внизу символами “*” обозначены общие для всех последовательностей нуклеотидные остатки. Серым цветом выделены сайты узнавания AluI. Сверху приведены длины фрагментов, которые образуются при расщеплении ЭР AluI.

Отдельно следует остановиться на диаграмме расщепления геномной ДНК человека по последовательности AGCT, являющейся сайтом узнавания фермента AluI. Из литературных данных известно, что Alu-повторы содержат лишь один общий для всех подсемейств сайт AGCT [10]. В нашей работе показано наличие трех отчетливых пиков фрагментов размерами 60, 49 и 32 п.о. как на диаграммах расщепления ДНК по сайту AGCT (рис. 3), так и при гидролизе геномной ДНК человека ферментом AluI (рис. 1). Мы провели дополнительный анализ ряда высококопийных подсемейств семейства Alu-повторов (рис. 5). Из приведенного множественного выравнивания видно, что помимо одного общего сайта AGCT, некоторые подсемейства ДНК-повторов содержат второй сайт AluI, расщепление по которому может привести к появлению фрагментов ожидаемых длин. В частности, фрагмент длиной 60 п.о. будет выщепляться из повторов подсемейства AluJo, 49 п.о. - из повторов подсемейства AluY, 32 п.о. - из повторов подсемейства AluSc. Согласно [14], AluJo- и AluY-повторы действительно представлены в геноме человека в значительном количестве - около 145000 и 128000 копий, соответственно. Число копий AluSc-повторов существенно меньше (около 49000), что недостаточно для визуализации фрагмента 32 п.о. в эксперименте. Однако реальное число Alu-повторов, содержащих фрагмент 32 п.о., значительно выше и обсуждается нами отдельно [13].

Таким образом, наличие пиков в диаграммах расщепления геномной ДНК человека связано с наличием в ней большого числа повторов. Наибольший вклад в картину гидролиза ДНК человека вносит расщепление LINE1- и Alu-повторов, а также расщепление сателлитной ДНК, которое приводит к образованию отчетливых полос на геле.

В случае ДНК крысы все фрагменты, получаемые при расщеплении геномной ДНК, в целом соответствуют фрагментам, полученным при расщеплении только LINE1-повторов [6]. Такое отличие диаграмм распределения фрагментов ДНК крысы и человека, видимо, связано с тем, что аналог Alu-повторов у крысы (B1-повтор) [15] представлен в геномной ДНК крысы приблизительно в 7 раз меньших количествах, чем Alu-повторы в человеческом геноме [1]. Помимо этого, относительное количество LINE1-повторов в геноме крысы (~23%) выше, чем в геноме человека (~17%) [1, 15].

Предложенный метод рестрикционного анализа геномной ДНК может найти применение в ДНК-диагностике. Он не требует сложных и дорогих приборов и может использоваться в обычных медико-генетических лабораториях, оборудованных для стандартных анализов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Применение ферментов HaeIII и Kzo9I, предложенных ранее [2], а также 15-ти эндонуклеаз рестрикции, использованных в данной работы, позволяет получать характерные картины расщепления ДНК по 17 сайтам. Безусловно, в последующих работах этот список эндонуклеаз рестрикции будет дополнен другими ферментами. Интересным представляется также сравнительный анализ картин расщепления ДНК ферментами с одинаковой специфичностью, но разной чувствительностью к метилированию. И, наконец, наиболее перспективным нам представляется определение статуса метилирования LINE1-, Alu-повторов и сателлитной ДНК предложенным методом с помощью недавно обнаруженных в нашей лаборатории метил-зависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз [16], [17], [18], [19].

Фермент	Пиковые значения размеров фрагментов на диаграммах	Семейство повторов		
		L1	Alu	α-сателлит
AluI	60		+	
	49		+	
	32		+	
AsuHPI	342			+
	171			+
	157-159		+	
Bpu10I	135-136		+	
BstDEI	171			+
	131-135		+	
	116-118		+	
	48		+	
BstSCI	165-168		+	
	115-119		+	
	84, 86		+	
	67-68		+	
	49-50		+	
Bst2UI	165-168		+	
	115-119		+	
	84, 86		+	
	67-68		+	
	49-50		+	
Hinfl	342			+
	171			+
	79		+	
BssECI	207-208		+	
	156-159		+	
	50		+	
BstMAI	197-200		+	
	189-190		+	
	166-167		+	
	158-159		+	

FauNDI	1153	+		
XbaI	1368	+		
	846	+		
MroXI	1301	+		
KpnI	1791	+		
	1561	+		
	1205	+		
Msp20I	852	+		
	420	+		
AspA2I	636	+		

Таблица 1.Локализация положения пиковых фрагментов в ДНК-повторах

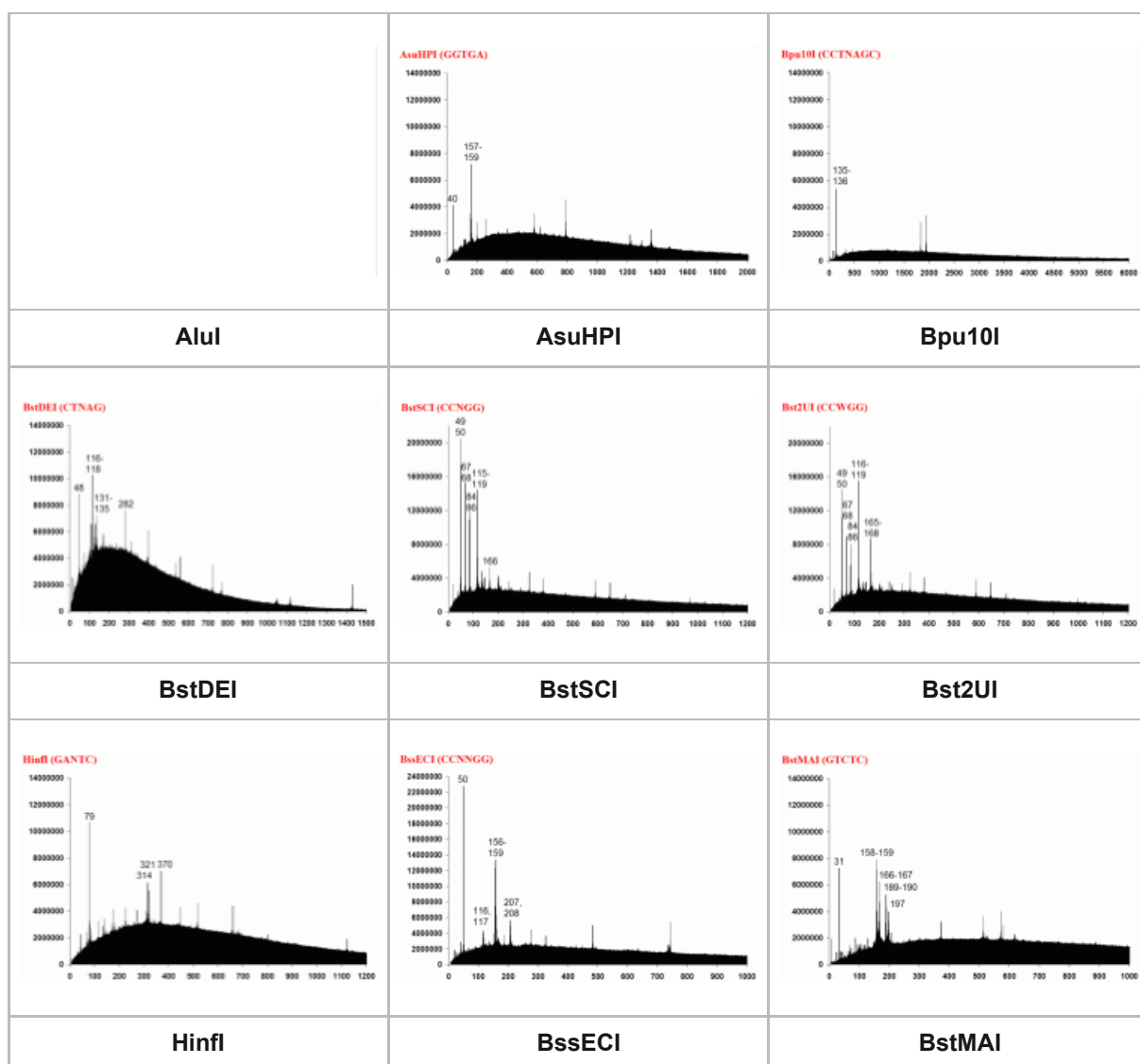


Рис. 6. Диаграммы распределения длин фрагментов ДНК (п.о.) в зависимости от размера фрагмента (п.о.)

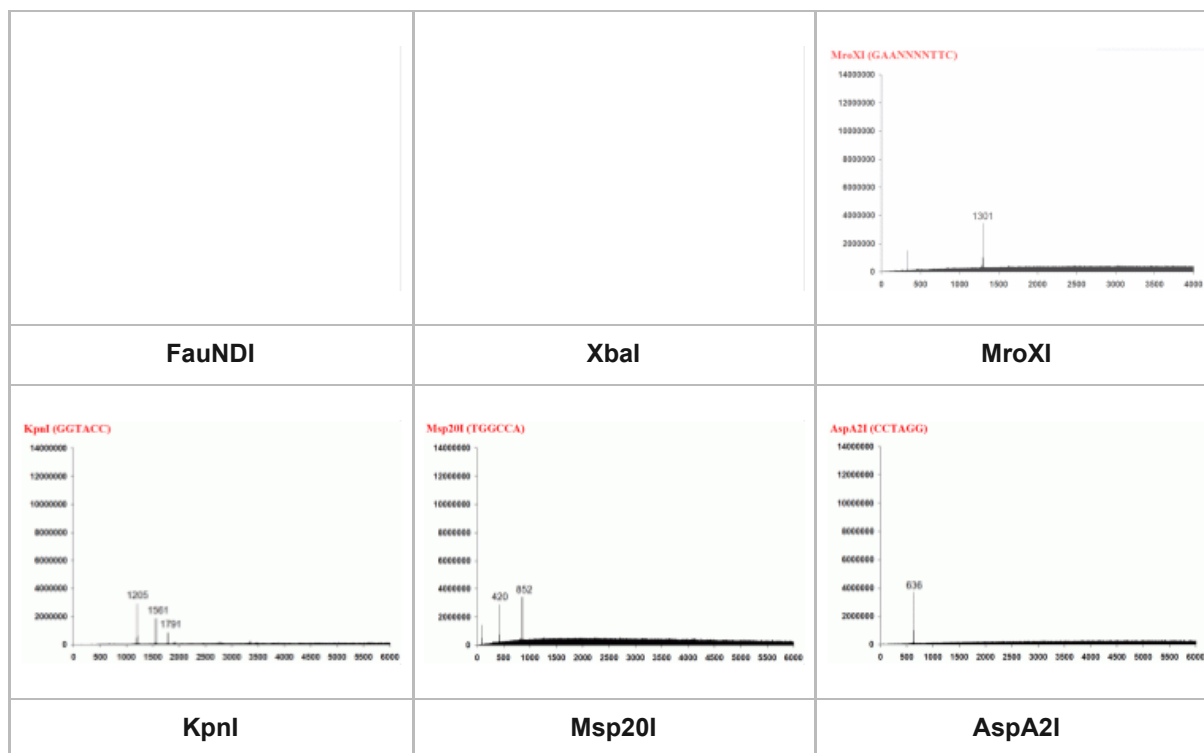


Рис. 7. Диаграммы распределения длин фрагментов ДНК (п.о.) в зависимости от размера фрагмента (п.о.)

Благодарности

Авторы благодарят Нестерова А.Е. за помощь в выделении ДНК

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. // Nature. – 2001. – Vol. 409. – P. 860-921.
2. Абдурашитов М. А., Томилов В. Н., Чернухин В. А., Гончар Д. А., Дегтярёв 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. ([Онлайн-версия](#))
3. Lindblom B., Holmlund G. Rapid DNA purification for restriction fragment length polymorphism analysis. // Gene Anal. Tech. – 1988. – Vol. 5. – P. 97-101.
4. Kuhn RM, Karolchik D, Zweig AS, Trumbower H, Thomas DJ, Thakkapallayil A, Sugnet CW, Stanke M, Smith KE, Siepel A, Rosenbloom KR, Rhead B, Raney BJ, Pohl A, Pedersen JS, Hsu F, Hinrichs AS, Harte RA, Diekhans M, Clawson H, Bejerano G, Barber GP, Baertsch R, Haussler

- D, Kent, WJ. The UCSC Genome Browser database: update 2007. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D668-73.
5. Jurka J., Kapitonov V. V., Pavlicek A., Klonowski P., Kohany O., Walichiewicz J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. // *Cytogenetic and Genome Research.* – 2005. – Vol. 110. – P. 462-467.
 6. Чернухин В. А., Абдурашитов М. А., Томилов В. Н., Гончар Д. А., Дегтярев С. Х. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК крысы *in vitro* и *in silico*. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. – 2006. – Т. 2 №3. – С. 39-46. ([Онлайн-версия](#))
 7. Choo K. H., Vissel B., Nagy A., Earle E., Kalitsis P. A survey of the genomic distribution of α -satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol. 19. – P. 1179-1182.
 8. Thompson J. D., Sylvester J. E., Gonzalez I. L., Costanzi C. C., Gillespie D. Definition of a second dimeric subfamily of human α -satellite DNA. // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – Vol. 17. – P. 2769-2782.
 9. Хитринская И. Ю., Степанов В. А., Пузырев В. П. Alu-повторы в геноме человека. // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37 №3. – С. 382-391.
 10. Houck C. M., Rinehart F. P., Schmid C. W. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. // *J. Mol. Biol.* – 1979. – Vol. 132. – P. 289-306.
 11. Ostertag E. M., Kazazian H. H. Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. // *Annu. Rev. Genet.* – 2001. – Vol. 35. – P. 501-538.
 12. Szak S. T., Pickeral O. K., Makalowski W., Boguski M. S., Landsman D., Boeke J. D. Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. // *Genome Biology.* – 2002. – Vol. 3. – research0052.1-research0052.18.
 13. Abdurashitov M.A., Tomilov V.N., Chernukhin V.A., Degtyarev S.Kh.. Construction of the physical map of human Alu repeats cleavage by restriction endonucleases. In press
 14. Grover D., Kannan K., Brahmachari S. K., Mukerji M. ALU-ring elements in the primate genomes. // *Genetica.* – 2005. – Vol. 124. – P. 273-289.
 15. Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. // *Nature.* – 2004. – Vol. 428. – P. 493-521.
 16. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции Bis I из *Bacillus subtilis* T30 узнаёт метилированную последовательность ДНК 5'-G(m5C)[^]NGC-3'. // Биотехнология. – 2005. – № 3. – С. 22-26. ([Онлайн-версия](#))
 17. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции Glal узнает метилированную последовательность 5'-G(5mC)[^]GC-3'. // Биотехнология. – 2006 – №4. – С.31-35. ([Онлайн-версия](#))
 18. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза Glul узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)[^]NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN[^](5mC)G-5'. // ([Онлайн-версия](#))
 19. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза Bisl узнает последовательность ДНК 5'-G(5mC)N[^]GC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов. // ([Онлайн-версия](#))