

Важнейшие методы молекулярной биологии и генной инженерии

План

1. История открытия нуклеиновых кислот. Строение, структура и свойства нуклеиновых кислот.
2. Центральная догма молекулярной биологии
3. Методы манипуляции и изучения ДНК и РНК. Рестрикционные эндонуклеазы. ДНК-лигазы
5. Разделение молекул ДНК: электрофорез в геле
6. Выявление определенной последовательности ДНК в смеси (гибридизация ДНК).
7. Клонирование ДНК :Репликация в бактериях. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
9. Секвенирование ДНК

1. Введение

Биология — самая быстро развивающаяся наука во второй половине XX и XXI веке. Связано это, в первую очередь, с появлением нового ее раздела — *молекулярной биологии*, подоплекой возникновения которой, в свою очередь, стало стремительное развитие физики, химии и физико-химических методов.

С помощью методов молекулярной биологии которых были сделаны многие открытия, известные не только в узких научных кругах, но и среди широкой публики. Они принесли множество Нобелевских премий как тем, кто их открыл, так и тем, кто их использовал. Многие из них применяются не только в биологии, но и в других областях: медицине, криминалистике, археологии.

Строение ДНК

Началом молекулярной биологии принято считать открытие структуры [ДНК](#) в 1953 году Джеймсом Уотсоном и Френсисом Криком, за что они (совместно с Морисом Уилкинсом) в 1962 году получили [Нобелевскую премию по физиологии и медицине](#).

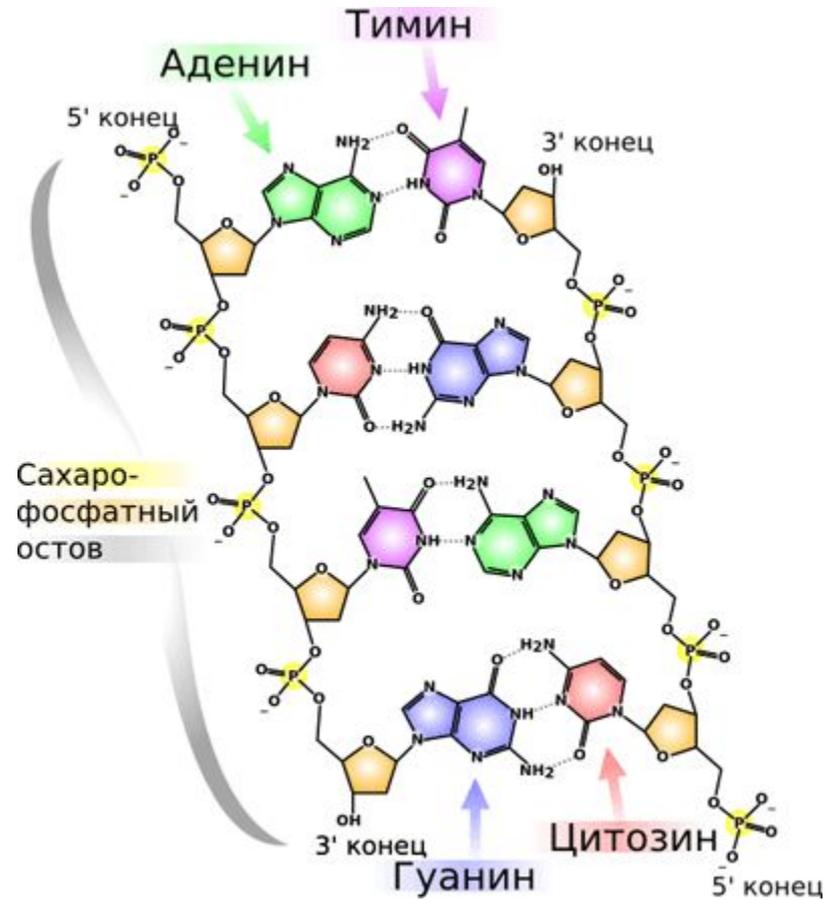
Они выяснили, что молекула ДНК представляет из себя две противоположно направленные цепочки полинуклеотидов, закрученных вокруг общей оси в двойную спираль, причем друг напротив друга в спирали всегда стоят определенные азотистые основания: напротив [гуанина](#) (Г или G) — [цитозин](#) (Ц или C), а напротив [аденина](#) (А) — [тимин](#) (Т) (рис. 1).

Это называют правилом [комплементарности](#): цепи удерживаются вместе за счет водородных связей, возникающих между нуклеотидами.

Водородная связь гораздо слабее ковалентной, с помощью которой нуклеотидные остатки соединяются между собой в одной цепи ДНК, формируя так называемый сахаро-фосфатный остов. Его так называют, поскольку в нем остатки сахара (дезоксирибозы) в нуклеотидах связаны друг с другом через остатки ортофосфорной кислоты — фосфаты.

Концы обеих цепей не равноценны: по порядковому номеру атома углерода в остатке сахара один из них называют 3', а другой — 5'. Синтез ДНК (как и РНК) в природе, как правило, идет от 5' к 3'-концу.

Рисунок 1. Схема строения двуцепочечной молекулы ДНК.



Однако ДНК не обязательно бывает двуцепочечной — иногда встречаются и одноцепочечные молекулы (например, в геномах некоторых вирусов). Это очень важно, поскольку, как будет рассказано ниже, двуцепочечные молекулы могут *денатурировать* на одноцепочечные, и, наоборот, одноцепочечные образовывать двуцепочечные.

Строение [РНК](#) аналогично (хотя обычно она состоит из одной цепи и часто образует комплементарные взаимодействия между участками одной молекулы), только вместо тимина в ее состав входит урацил, а вместо дезоксирибозы — рибоза

Центральная догма молекулярной биологии

Центральная догма молекулярной биологии, в первоначальном виде сформулирована [Фрэнсисом Криком](#).

В общем случае она гласит, что генетическая информация при реализации передается от нуклеиновых кислот к белку, но не наоборот. А точнее, возможна передача ДНК → ДНК ([репликация](#)), ДНК → РНК ([транскрипция](#)) и РНК → белок ([трансляция](#)).

Так же существуют значительно реже реализуемые пути, свойственные некоторым вирусам: РНК → ДНК ([обратная транскрипция](#)) и РНК → РНК (*репликация РНК*).

Белки состоят из аминокислотных остатков, последовательность которых закодирована в [генетическом коде](#) организма. Свойства кода: триплетность, вырожденность, неперекрываемость и универсальность.

Во второй половине XX века получили развитие технологии *рекомбинантной ДНК* (то есть, методы манипуляции ДНК, позволяющие различными способами изменять последовательность и состав нуклеотидов в молекуле).

Именно на их основе происходит развитие всех молекулярно-биологических методов и поныне, хотя они стали значительно сложнее, как идейно, так и технологически.

3. Методы манипуляции и изучения ДНК и РНК

Разрезание и сшивание ДНК осуществляется ферментами.

Ферменты — катализаторы белковой природы. Они очень эффективны: ускорение может составлять несколько порядков! Например, фермент *каталаза*, расщепляющий перекись водорода, ускоряет реакцию примерно на 12 порядков, то есть в триллион раз! В то же время неорганический катализатор — мелкодисперсная платина — ускоряет эту же реакцию только на шесть порядков, или в миллион раз. Однако за это приходится платить очень строгими условиями работы большинства из них.

Рестрикционные эндонуклеазы

Одним из первых и важнейших шагов молекулярной биологии стала возможность разрезать молекулы ДНК, причем в строго определенных местах. Этот метод был изобретен при изучении в 1950—1970-е годы такого феномена: некоторые виды бактерий при добавлении в среду чужеродной ДНК разрушали ее, в то время, как их собственная ДНК оставалась невредимой. Оказалось, что они для этого используют ферменты, позднее названные *рестрикционными нуклеазами* или [рестриктазами](#).

Существует множество видов рестриктаз: к 2007-му году их было известно более 3000.

Важным свойством каждого подобного фермента является его способность разрезать строго определенную — *целевую* — последовательность нуклеотидов ДНК .

Рестриктазы не воздействуют на собственную ДНК клетки, поскольку нуклеотиды в целевых последовательностях модифицированы так, что рестриктаза не может с ними работать. (Правда, иногда, наоборот, они могут разрезать *только* модифицированные последовательности — для борьбы с теми, кто модифицирует ДНК, защищаясь от вышеописанных рестриктаз.) .

Новые эндонуклеазы продолжают открывать и по сей день. Многие из них до сих пор не клонированы, то есть, не известны гены, которые их кодируют, и в качестве «фермента» используют некую очищенную фракцию белков, обладающую нужной каталитической активностью.

Новосибирская компания СибЭнзим долгое время успешно соревновалась с компанией New England Biolabs — признанным во всем мире лидером по поставке рестриказ.

За выделение первой рестриктазы, изучение ее свойств и первое применение для картирования хромосом Вернер Арбер ([Werner Arber](#)), Дэн Натанс ([Dan Nathans](#)) и Гамильтон Смит ([Hamilton Smith](#)) в 1978 году получили [Нобелевскую премию по физиологии и медицине](#).

ДНК-лигазы

Для создания новых молекул ДНК, разумеется, кроме разрезания, необходима еще и возможность сшивания двух цепей. Это делают с помощью ферментов, называемых [ДНК-лигазами](#), которые сшивают сахаро-фосфатный остов двух цепей ДНК.

4. Разделение молекул ДНК: электрофорез в геле

При обработке ДНК рестриктазами образуется смесь фрагментов.

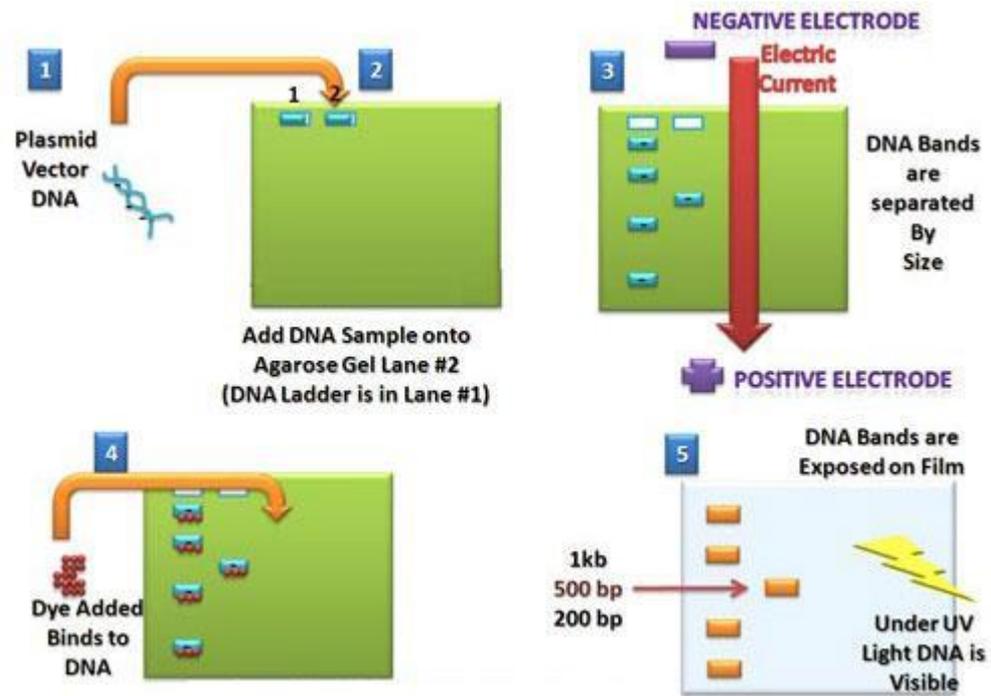
Поскольку любая молекула ДНК в водном растворе отрицательно заряжена, появляется возможность разделить смесь фрагментов ДНК различных размеров по их длине с помощью электрофореза.

ДНК помещают в гель (агарозный или полиакриламидный), и создают электрическое поле.

Из-за этого молекулы ДНК будут двигаться к положительному электроду (*аноду*), причем их скорости будут зависеть от длины молекулы: чем она длиннее, тем сильнее ей мешает двигаться гель и, соответственно, тем ниже скорость.

- После электрофореза смеси фрагментов ДНК разных длин в геле образуют полосы. С помощью маркеров (смесей фрагментов ДНК известных длин) можно установить длину молекул в образце.

Рис. Схема проведения электрофореза ДНК в агарозном геле.



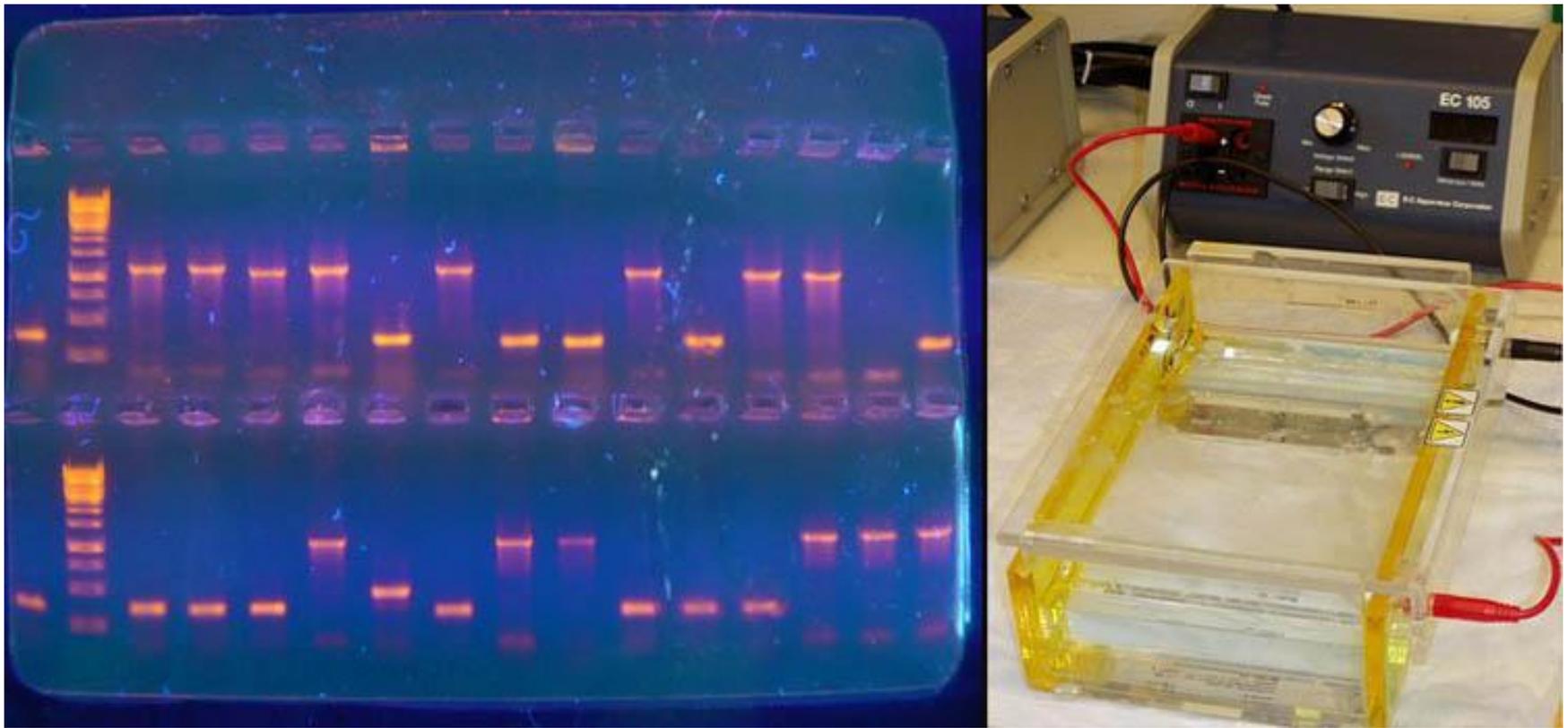
Визуализировать результаты форе́за можно двумя способами. Первый, наиболее часто используемый в последнее время — добавление в гель веществ, флуоресцирующих в присутствии ДНК (традиционно использовался довольно токсичный бромистый этидий; в последнее время в обиход входят более безопасные вещества).

Бромистый этидий светится оранжевым светом при облучении ультрафиолетом, причем при связывании с ДНК интенсивность свечения возрастает на несколько порядков.

Другой метод заключается в использовании радиоактивных изотопов, которые необходимо предварительно включить в состав анализируемой ДНК. В этом случае на гель сверху кладут фотопластинку, которая засвечивается над полосами ДНК за счет радиоактивного излучения (этот метод визуализации называют *авторадиографией*).

Кроме «обычного» электрофореза в пластине из геля, в некоторых случаях используют *капиллярный электрофорез*, который проводят в очень тонкой трубочке, наполненной гелем (обычно полиакриламидным). Разрешающая способность такого электрофореза значительно выше: с его помощью можно разделять молекулы ДНК, отличающиеся по длине всего *на один нуклеотид*.

Рис. Электрофорез в агарозном геле с использованием бромистого этидия для визуализации результатов в ультрафиолете (слева). Вторая слева дорожка — маркер с известными длинами фрагментов. Справа — Установка для проведения электрофореза в геле.



Выявление определенной последовательности ДНК в смеси (гибридизация ДНК)

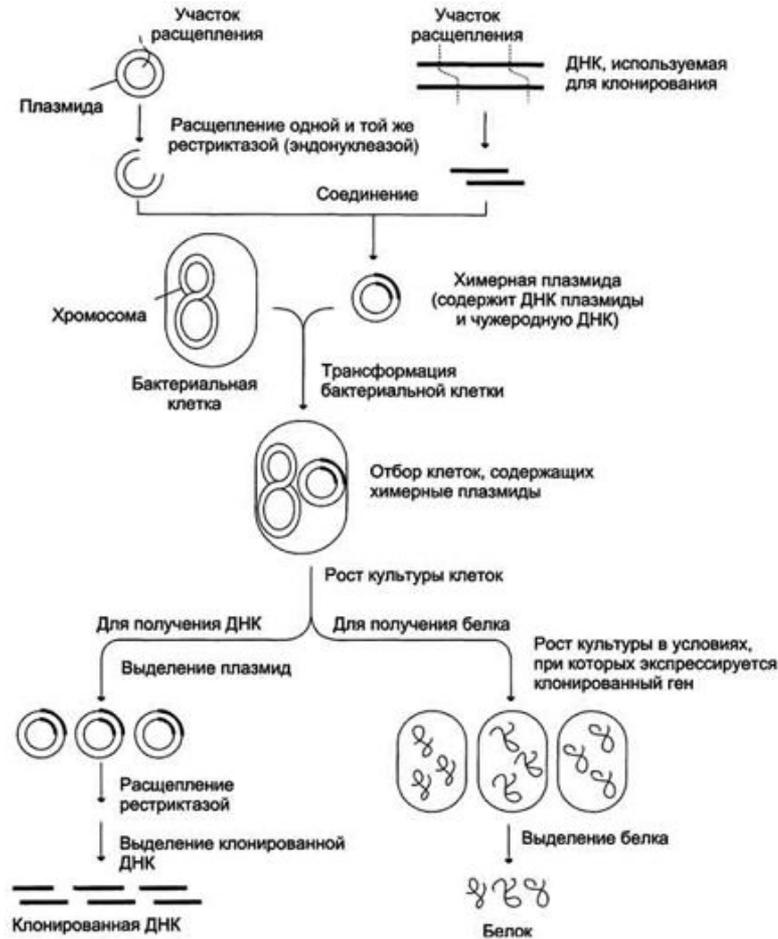
С помощью электрофореза можно узнать размер молекул ДНК в растворе, однако он ничего не скажет о последовательности нуклеотидов в них.

С помощью гибридизации ДНК можно понять, какая из полос содержит фрагмент со *строго определенной* последовательностью.

Гибридизация ДНК основана на образовании водородных связей между двумя цепями ДНК, приводящем к их соединению.

Сначала необходимо синтезировать *ДНК-зонд*, комплементарный той последовательности, которую мы ищем. Он обычно представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК длиной 10–1000 нуклеотидов. Из-за комплементарности зонд свяжется с необходимой последовательностью, а за счет флуоресцентной метки или радиоизотопов, встроенных в зонд, можно увидеть результаты.

Рис. Схема клонирования участка ДНК (гена) в бактериях.



Клонирование ДНК

В геноме любой ген занимает крайне маленькую длину (по сравнению со всей ДНК клетки).

Клонирование ДНК буквально означает создание большого числа копий определенного ее фрагмента. Именно за счет *амплификации* мы получаем возможность выделить участок ДНК и получить его в достаточном для изучения количестве.

Каким образом разделить фрагменты ДНК по длине и идентифицировать нужный — было рассказано выше. Теперь надо понять, каким образом можно копировать необходимый нам фрагмент.

Существует два основных метода: использование быстро делящихся организмов (обычно бактерий *Escherichia coli* — кишечной палочки — или дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) или проделать аналогичный процесс, но *in vitro* с помощью *полимеразной цепной реакции*.

Репликация в бактериях

Поскольку при каждом клеточном делении бактерии (как и любые другие клетки, не считая предшественников половых клеток) удваивают свою ДНК, это можно использовать для умножения количества *необходимой нам ДНК*.

Для того, чтобы внедрить наш фрагмент ДНК в бактерию, необходимо «вшить» его в специальный вектор, в качестве которого обычно используют бактериальную плазмиду (небольшую — относительно бактериальной хромосомы — кольцевую молекулу ДНК, реплицирующуюся отдельно от хромосомы).

У бактерий «дикого типа» часто встречаются подобные структуры: они часто переносятся между разными штаммами или даже видами бактерий. Чаще всего в них содержатся гены устойчивости к антибиотикам (именно из-за этого свойства их и открыли) или бактериофагам, а также гены, позволяющие клетке использовать более разнообразный субстрат. (Иногда же они «эгоистичны» и не несут никаких функций.) Именно такие плазмиды обычно и используют в молекулярно-генетических исследованиях.

В некоторых случаях (например, при изучении очень больших фрагментов ДНК) используют не плазмиду, а искусственную бактериальную хромосому.

В плазмиду с помощью рестриктаз и лигаз встраивают необходимый фрагмент ДНК, после чего добавляют ее в культуру бактерий при специальных условиях, обеспечивающих *трансформацию* — процесс активного захвата бактерией ДНК из внешней среды.

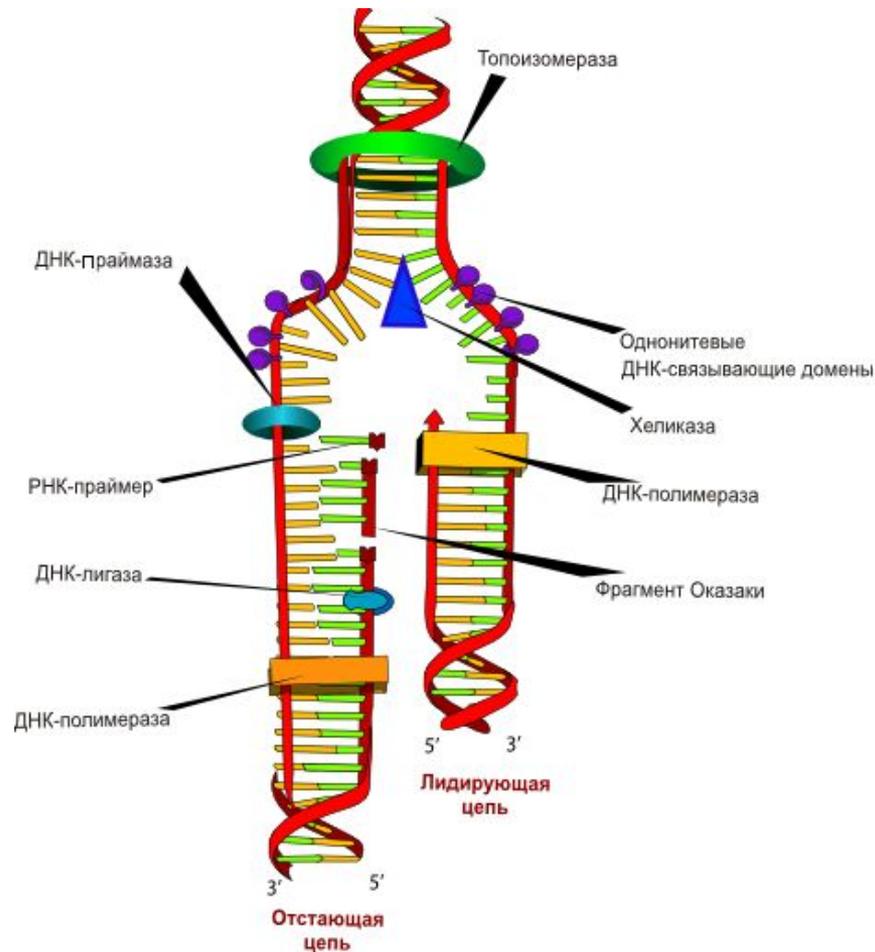
После этого проводят отбор бактерий, трансформация которых прошла успешно, добавляя соответствующий гену в плазмиде антибиотик: в живых остаются только клетки, несущие ген устойчивости (а, следовательно, и плазмиду).

Далее, после роста культуры клеток, из нее выделяют плазмиды, а из них с помощью рестриктаз выделяют «наш» фрагмент ДНК (или используя плазмиду целиком).

Если же ген вставили в плазмиду для того, чтобы получить его белковый продукт, необходимо обеспечить культуре условия для роста, а потом просто выделить требуемый белок.

Но в некоторых случаях этот метод давал сбои — например, так произошло с фактором свертывания крови VIII. Этот белок участвует в свертывании крови, и нарушения в его функциональности являются причиной одного из самых распространенных генетических заболеваний — гемофилии А. Раньше для лечения приходилось выделять этот белок из большого числа организмов, потому что не удавалось клонировать его для производства бактериями. Связано это было с тем, что его длина составляет около 180000 пар нуклеотидов, и он содержит много интронов (некодирующих фрагментов между кодирующими) — неудивительно, что ни в одну плазмиду этот ген не попал целиком.

Рис. Репликация ДНК — важнейший для живых организмов процесс, основа множества молекулярно-биологических методов.



5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция — молекулярно-биологический метод, позволяющий добиться колоссального (до 10^{12} раз) увеличения числа копий определенного фрагмента ДНК *in vitro*. Она была изобретена Кэри Муллисом (Kary Mullis) в 1983 году, за что в 1993 году он получил Нобелевскую премию по химии (совместно с М. Смитом.)

Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка ДНК, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

В отличие от репликации ДНК в клетках живых организмов, с помощью ПЦР амплифицируют сравнительно короткие участки ДНК (обычно, не более 3000 пар нуклеотидов, однако есть методы позволяющие «поднимать» до 20 тысяч пар нуклеотидов — так называемый Long Range PCR).

Фактически, ПЦР является искусственной многократной репликацией фрагмента ДНК. ДНК-полимеразы так устроены, что не могут синтезировать новую ДНК, просто имея в наличии матрицу и мономеры.

Для этого необходима еще и затравка (*праймер*), с которого они начинают синтез.

Праймер — это короткий одноцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты, комплементарный ДНК-матрице. При репликации в клетке такие праймеры синтезируются специальным ферментом *праймазой* и являются молекулами РНК, которые позже заменяются на ДНК.

- Однако в ПЦР используют искусственно синтезированные молекулы ДНК, поскольку в этом случае не нужна стадия удаления РНК и синтеза на их месте ДНК. В ПЦР праймеры ограничивают амплифицируемый участок с обеих сторон.

Как же ПЦР работает?

Изначально в реакционной смеси находятся: ДНК-матрица, праймеры, ДНК-полимераза, свободные нуклеозиды, а также некоторые другие вещества, улучшающие работу полимеразы.

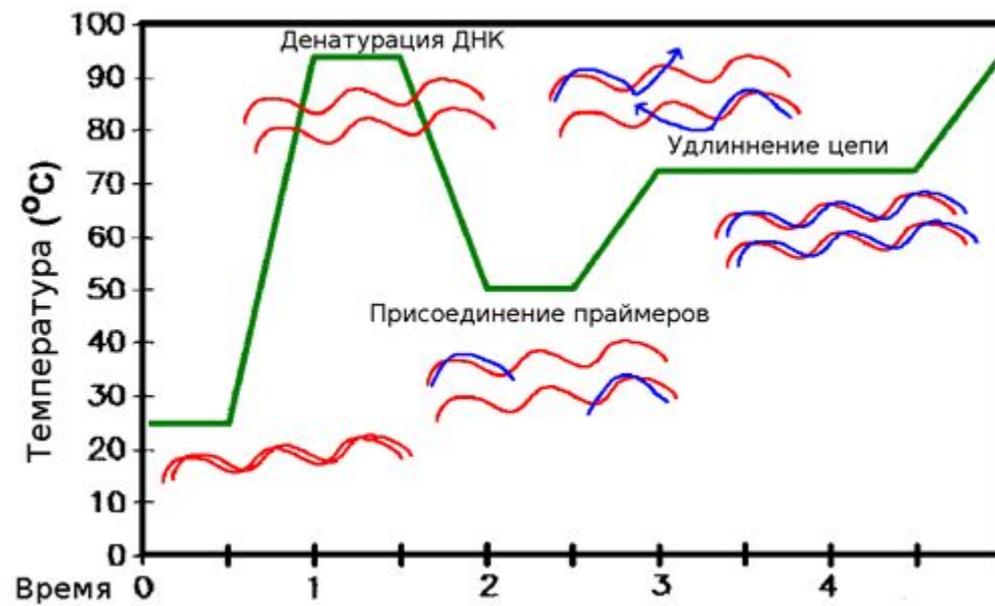
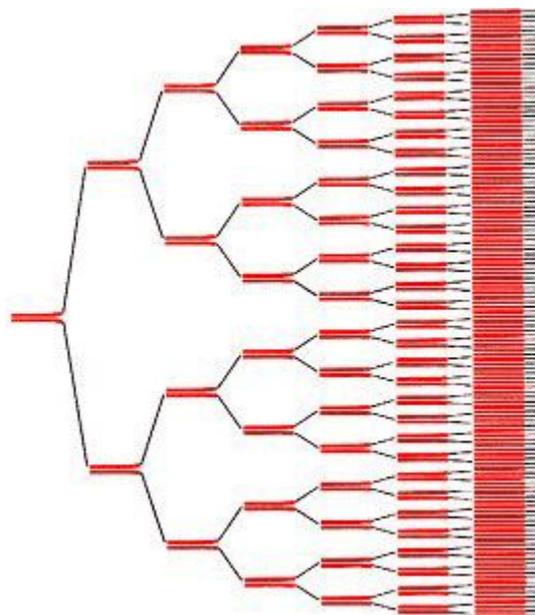


Рис. С каждым циклом ПЦР количество целевой ДНК удваивается.



Чтобы синтезировать ДНК, комплементарную матрице, необходимо, чтобы один из праймеров образовал с ней водородные связи (как говорят, «отжегся» на ней).

Но ведь матрица уже образует их со второй цепью! Значит, сначала необходимо расплавить ДНК, — то есть разрушить водородные связи. Делают это с помощью простого нагревания (до ≈ 95 °С) — стадия, называемая *денатурацией*.

Но теперь и праймеры из-за высокой температуры не могут отжечься на матрице! Тогда температуру понижают (50–65 °С), праймеры отжигаются, после чего температуру немного поднимают (до оптимума работы полимеразы, обычно, около 72 °С). И тогда полимеразы начинают синтезировать комплементарные матрице цепи ДНК — это называют *элонгацией*. После одного такого цикла количество копий необходимых фрагментов удвоилось. Однако ничто не мешает повторить это еще раз. И не один, а несколько десятков раз! И с каждым повтором количество копий нашего фрагмента ДНК будет удваиваться, ведь новосинтезированные молекулы тоже будут служить матрицами.

Увидеть результаты ПЦР очень просто: достаточно провести электрофорез реакционной смеси после ПЦР, и будет видна яркая полоса с полученными копиями.

Раньше полимеразу, инактивирующуюся при нагревании с каждым циклом, приходилось все время добавлять, но вскоре было предложено использовать термостабильную полимеразу из термофильных бактерий, которая выдерживает такой нагрев, что сильно упростило проведение ПЦР (чаще всего используют Taq-полимеразу из бактерии *Thermus aquaticus*

6. Секвенирование ДНК

Секвенирование — определение собственно нуклеотидной последовательности цепи в молекуле .
Определение нуклеотидной последовательности ДНК крайне важно для множества фундаментальных и прикладных задач. Особое место оно занимает в науке: для анализа результатов секвенирования геномов была, фактически, создана новая наука — [биоинформатика](#).
Секвенированием сейчас пользуются молекулярные биологи, генетики, биохимики, микробиологи, ботаники и зоологи, и, конечно же, эволюционисты: практически вся современная систематика основана на его результатах.
Секвенирование широко применяется в медицине как метод поиска наследственных заболеваний и изучения инфекций.

Существует множество различных методик секвенирования, но все методы можно разделить на две категории: «классические» и нового поколения.

Сейчас используется фактически только один «классический» метод — секвенирование по Сэнгеру^{*}, или метод терминаторов. По сравнению с новыми методами, у него есть важное преимущество: длина прочтения, то есть количество нуклеотидов в последовательности, которое можно получить за один раз, у него выше — до 1000 нуклеотидов. В то же время у самого «хорошего» в этом плане «нового» метода секвенирования — 454-500 нуклеотидов^{**}. Именно длина прочтения ограничивает возможности новых методов: оказывается крайне сложно «собрать» целый геном из фрагментов размером в несколько десятков нуклеотидов. Как минимум, для этого требуются суперкомпьютеры, а некоторые места в геноме разрешить оказывается просто невозможно, если они содержат высокоповторяющиеся последовательности.

Контрольные вопросы

1. Кем и когда была открыта структура ДНК?
2. Каково строение ДНК?
3. Дайте характеристику структурным уровням организации нуклеиновых кислот.
4. В чем заслуга Э.Чаргаффа?
5. В чем заслуга Д. Уотсона и Ф. Крика?
6. Кем была сформулирована центральная догма молекулярной биологии и как она гласит?
7. Как называется ДНК, в которой изменена последовательность нуклеотидов?
8. Дайте определения понятиям «гибридизация» и «амплификация».
9. Как называется фермент, катализирующий реакцию разрезания молекулы ДНК? Кем и когда она была впервые выделена ?
10. Какую роль играет фермент лигаза?
11. С помощью какого метода можно разделить смесь ДНК в водном растворе?
12. Какими способами можно визуализировать результаты электрофореза?
13. Что означает «клонирование» ДНК? Какие существуют методы клонирования?
14. Кем и когда была изобретена полимеразная цепная реакция?
15. В чем отличие ПЦР от репликации ДНК в клетках живых организмов?
16. Дайте определение понятию «праймер». Какова ее роль?
17. Перечислите основные компоненты необходимые для ПЦР?
18. Что такое секвенирование? Кем и когда впервые был открыт этот метод?