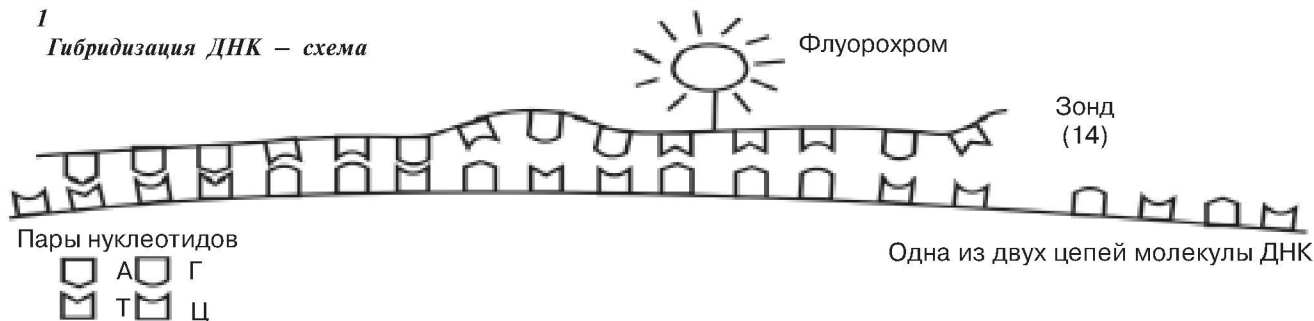


Подсвеченные гены

М. Литвинов

1
Гибридизация ДНК – схема



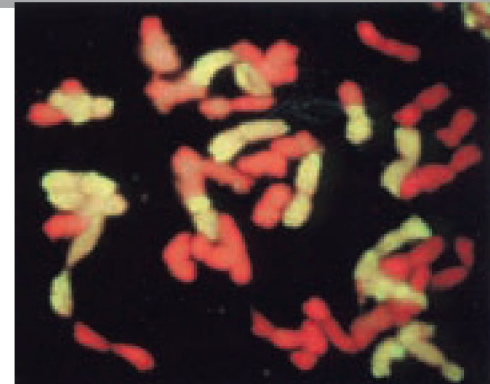
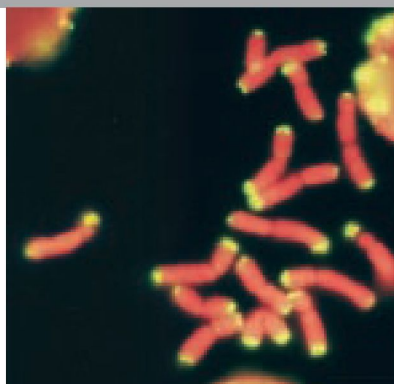
*Хоть острым взглядом нас природа одарила,
Но близок оного конец имеет сила.*

*Коль много микроскоп нам тайностей открыл,
Невидимых частиц и тонких в теле жил!*

М.В. Ломоносов

В микроскоп можно увидеть много интересного, однако, как ни старайся, гены не разглядишь. Для того чтобы выяснить, где они находятся в хромосомах, классические генетики проводили трудоемкие скрещивания, а молекулярные биологи разработали свои, весьма сложные способы. И все же в конце 80-х годов был придуман метод, который позволяет если не увидеть сами гены, то хотя бы зрительно определить их место в хромосомах, а иногда и подсчитать количество копий.

Этот метод по-английски называется FISH — Fluorescent In Situ Hybridization, что на русский язык можно перевести как флуоресцентная гибридизация на месте. Слово «fish» в



3
Тандемные повторы, заменяющие теломеры в клетках лука

английском языке означает также рыбу, и это было много раз обыграно в шутках ученых, для которых находка гена бывает такой же радостной, как и поимка золотой рыбки.

О методе гибридизации наш журнал рассказывал в № 11 за 1997 год. Напомним, что если последовательность нуклеотидов в двух участках (цепях) ДНК совпадает или почти совпадает, то есть они гомологичны, между ними возможна гибридизация (1). Проводят ее так: нагревают раствор с ДНК, и двойные спирали расходятся, а при охлаждении часть из них меняет партнера и образует комплекс (гибридуется) с гомологич-

4
Хромосомы тритикале – гибрида пшеницы и ржи

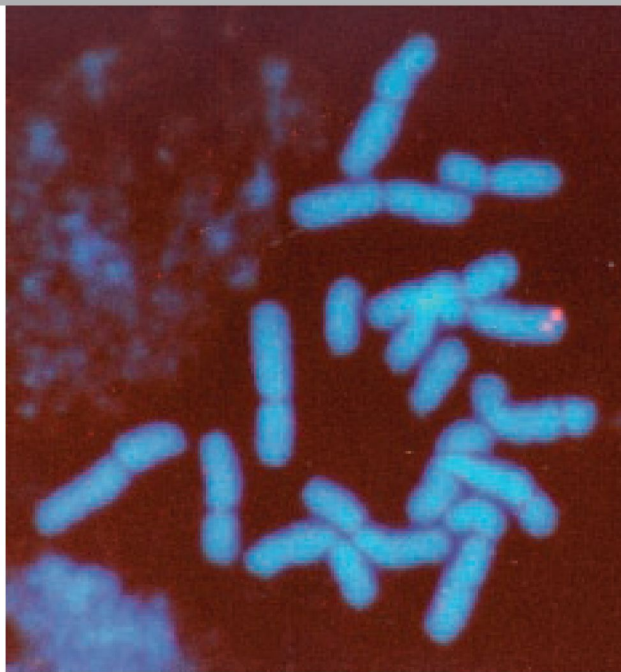
ным участком добавленной молекулы ДНК, которая называется зондом. К зонду прикрепляют молекулу флуоресцентного красителя, которая светится в ультрафиолете. Чувствительность методики можно повысить, если к зонду привязать белок, а на него напустить антитела с флуоресцентной меткой. На эти антитела сажают еще порцию меченых антител, и вся эта светящаяся куча мала дает хороший яркий сигнал. Конечно, при этом мы видим не ген, а его свечение, как с самолета ночью видна не сама дорога, а свет фонарей, но это не мешает разглядеть, есть ли искомый ген в хромосоме и в каком месте он находится.

Важно, что эта реакция происходит и в спирализованных хромосомах. Казалось бы, во время деления клетки молекулы ДНК в них так туго закручены и навиты на белки, что посторонняя молекула ни за что не проникнет в зазоры, тем более что для протекания реакции еще должны ра-

2
45S-ДНК в клетках хмеля находятся на концах одной из хромосом (зеленовато-желтое свечение). На конце еще одной хромосомы находятся гены 5S-ДНК (желтое свечение)



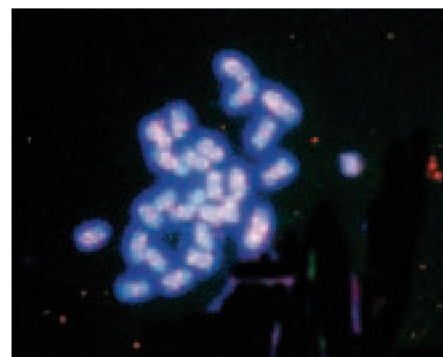
Длина среднего по величине гена — 340 нм (0,34 мкм), а толщина — 1,8 нм (0,018 мкм). Клетку печени человека невозможно увидеть глазами (ее диаметр около 20 мкм); ядро еще меньше (диаметр около 5 мкм), однако в нем содержится около тридцати тысяч генов вместе с межгенными участками, которые занимают в десятки раз больше места. Если растянуть нити ДНК, собранные в ядре клетки человека, их длина составит примерно полтора метра. У растений ДНК бывает в десятки раз больше, а ядра мало отличаются по размеру от ядер животных



5
Гены, встроенные в хромосомы лука-шалота. Две флюоресцирующие красные точки отмечают места гибридизации чужеродной ДНК на двух сестринских хроматидах



6
Ретротранспозоны в хромосомах тюльпана (пурпурная окраска)



7
Ретротранспозоны в хромосомах томатов (пурпурная окраска)

зойтись две половинки спирали. И действительно, гибридизация, особенно с большими зондами, в этом случае проходит не всегда. Однако если фрагмент небольшой, она обычно идет. Результат получается еще лучше, когда искомый участок повторяется много раз.

Клетке нужно очень много рибосомальной РНК, чтобы строить рибосомы и синтезировать на них белки. Часть этой РНК считывается с генов, которые обозначаются 45S-ДНК (число указывает скорость ее осаждения при ультрацентрифугировании). Она присутствует в клетке во множестве копий, и ее легко выявить с помощью FISH-реакции. На фотографии (2) зеленовато-желтым светится 45S-ДНК на конце одной из хромосом хмеля. Желтый цвет соответствует другим рибосомальным генам (5S-ДНК).

В геноме высших организмов много повторяющихся последовательностей, коротких и длинных. Функции одних

известны, а другие, возможно, совсем бесполезны. Еще один пример нужных повторов — это повторы на концах хромосом лука. Как, наверное, знает читатель, на концах хромосом у большинства организмов, обладающих настоящим ядром, находятся знаменитые теломеры. Это участки ДНК, нужные ферменту ДНК-полимеразе, чтобы не «свалиться» с края хромосомы при ее копировании. Во многих случаях теломеры отмеривают максимальное количество делений клетки. Лук — исключение, он обходится без теломер. Исследователи предполагают, что их роль у этого растения играют многократные повторы из 380 пар оснований каждый. На фотографии (3) они ярко светятся желтым на концах всех хромосом.

Что еще можно узнать, пометив гены или участки ДНК в хромосомах? Гибридизация помогает распознать интересующую нас хромосому или несколько хромосом. Для этого получают зонды, способные связываться с уни-

кальными участками этих хромосом, и проводят FISH. Это бывает важно, например, при отдаленной гибридизации (уже не молекул, а растений), когда хромосомы родительских особей могут непредсказуемо перемешаться. Среди хромосом тритикале, гибрида пшеницы и ржи, можно найти хромосомы обоих предков и гибридные хромосомы (4). (О межвидовом скрещивании см. статью А.Махрова в этом же номере.)

Очень полезен метод при генной инженерии, когда нужно выяснить, сколько экземпляров дополнительного гена встроилось и в какие места хромосом (5). Можно найти фрагменты, гомологичные гену интересующего нас белка, — вероятно, это гены родственных белков.

На фотографиях (6, 7) светящимися точками представлены ретротранспозоны — представители подвижных, или мобильных, элементов генома. Барбара Макклиток впервые об-



ФОТОИНФОРМАЦИЯ

наружила их у кукурузы, и это было крупным событием в биологии, хотя его значение осознали не сразу («Химия и жизнь», 2002, №5). Затем их нашли у дрозофил, дрожжей, мышей, людей и многих других представителей живой природы. В отличие от обычных генов, имеющих постоянный «адрес», мобильные элементы могут менять свое место в геноме. Когда это выяснилось, начали появляться гипотезы об их роли в передаче и изменении наследственной информации. Энтузиасты (или экстремисты) предполагали, что мобильные элементы могут переносить информацию между любыми живыми существами, не считаясь со степенью их родства — например, от бактерий к рыбам или от растений к человеку. Столь вольные перемещения не были обнаружены, однако значение странствующих элементов до сих пор не вполне ясно. Возможно, они путешествуют лишь в пределах одной клетки. Однако и в этом случае их роль может быть велика, если они захватывают и перемещают гены или хотя бы изменяют регуляцию их экспрессии. У мушек-дрозофил, например, подобные эле-

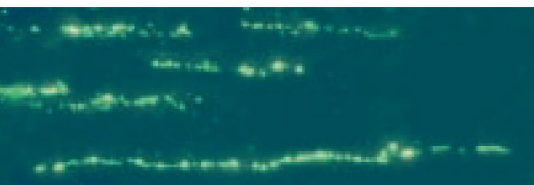


8
*Плаزمида —
кольцевая молекула
ДНК бактерий*

9
*Молекула
ДНК
фага лямбда*



10
*Гибридизация на «расчесанной»
молекуле — повторы в 380 п.н.
в хромосомах лука*



менты способны изменять цвет глаз, у кукурузы — окраску семян. Вероятно, они все-таки играют большую роль в эволюции, но это еще предстоит выяснить.

Ретротранспозоны отличаются от других подвижных элементов тем, что они содержат ген фермента — обратной транскриптазы, которая строит ДНК на основе РНК. Этим ретротранспозоны похожи на ретровирусы, самый знаменитый представитель которых — вирус иммунодефицита человека. В отличие от вирусов, ретротранспозоны не формируют заразных частиц, которые могут покинуть возрастившую их клетку и отправиться на завоевание новых.

У растений ретротранспозоны тоже есть и иногда составляют до половины генома. Последние данные говорят о том, что они играют центральную роль в эволюции функции генов и структуры генома. Возможно, меняя работу генов, они помогают растениям перенастроить обмен веществ, чтобы пережить стресс.

Для того чтобы выяснить роль ретротранспозонов, приходится определять их количество и место. В хромосомах тюльпана (6) ретротранспозоны (помечены пурпурным цветом) находятся в прицентромерных областях (в эухроматине). Голубым помечен гетерохроматин, который у тюльпана расположен на концах хромосом и в середине, рядом с центромерой. Он представляет собой малоактивную или неактивную часть генома. А вот у томатов ретротранспозоны расположены в серединах хромосомных плеч, в гетерохроматине (7).

На примере этих двух растений видно, как сильно может различаться организация хромосом и геномов вообще. Количество генов у тюльпана и томата примерно одинаково, но ДНК у первого раз в десять больше. И сгруппированы активные и неактивные гены в разных частях хромосом.

В хромосомах ДНК сложена очень компактно, и место гена можно определить весьма приблизительно: только на какой хромосоме и в какой области хромосомы (в середине, на конце) он находится. Для того чтобы точнее узнать место гена, нужно дополнить гибридизацию другими методами. Один из них называется молекулярным расчесыванием (по-английски — molecular combing).

Расчесывают ДНК струями жидкости. С хромосом удаляют белки, так что без них нити ДНК раскручиваются и расправляются, потом один их конец закрепляют на стекле и застав-

ляют раствор течь: наклоняют стеклышко или накрывают его другим. Потоки жидкости увлекают за собой молекулы и распрямляют их (эту операцию не всегда удается провести идеально). Затем можно покрасить ДНК флуоресцентным красителем, измерить ее длину и определить форму — замкнута она в кольцо (8) или разомкнута (9). В последнем случае ДНК фага лямбда служит стандартом длины, с помощью которого измеряют длину другой, неизвестной молекулы. Таким образом можно узнать, удалось ли вставить в плазмиду какой-то фрагмент ДНК, например ген. Эту операцию часто приходится проделывать молекулярным биологам и генным инженерам, а значит, им необходимо контролировать, успешно ли она закончилась.

На расчесанной молекуле можно намного точнее определить место гена, чем на нерасчесанной. Для этого нужно провести ее гибридизацию с зондом. На фотографии (10) светящиеся точки — уже знакомые нам повторы в 380 пар оснований, помеченные на расчесанных хромосомах лука. Видно, что между ними находятся вставки другой ДНК. Оценить расстояние помеченного участка от края молекулы, расстояние между генами, длину вставки можно с помощью другой молекулы стандартной длины или с помощью расчета. В расплетенной молекуле на один микрометр длины приходится 2,9 тысяч пар нуклеотидов (для сравнения, в нерасплетенной — 2–4 млн. пар нуклеотидов).

Фотографии получены на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии в исследовательском центре молекулярной генетики при Московской сельскохозяйственной академии им. К.А.Тимирязева и в центре молекулярно-генетических исследований «ГенКарТ».

Авторы фотографий:

кандидат биологических наук

Г.Карлов,

доктор биологических наук

Л.Хрусталева,

кандидат биологических наук

Т.Данилова,

кандидат биологических наук

Г.Андреева,

аспирант

И.Фесенко

