

Картирование ДНК методом атомно-силовой микроскопии.

Д.В.Клинов, В.В.Прохоров, Т.Неретина, В.В.Демин, Д.И.Черный, Е.Д.Свердлов

Институт биоорганической химии РАН

Картирование ДНК является важным способом изучения структурно-функциональной организации геномов. Задача картирования состоит в локализации каких-либо маркеров на исследуемом фрагменте генома, т.е. создания карты распределения маркера.

Картирование может быть проведено методами электронной и атомно-силовой микроскопии при наблюдении индивидуальных молекул ДНК. Эти методы позволяют картировать функциональные и структурные особенности геномной ДНК. Так, с помощью электронной микроскопии можно картировать делеции, вставки, изучать экзон-интронную структуру, картировать промоторы, терминаторы, участки регуляции синтеза РНК, репликоны и т. д.¹.

АСМ является более мобильным и удобным в сравнении с ЭМ методом, использование его при картировании сайт-специфических маркеров на ДНК является перспективным, однако на сегодня работ по картированию ДНК при помощи АСМ практически нет.

LTR (длинные концевые повторы) ретровирусов представляет собой комплекс регуляторных элементов, организованных в трех функциональных районах U3, R и U5 и включающих в себя промоторы, энхансеры, сайты начала транскрипции и сигналы полиаденилирования. Их биологическая функция пока не до конца ясна, тем не менее имеются данные об участии этих элементов в регуляции генов, канцерогенезе, иммунорепрессии², поэтому картирование этих элементов и окружающих их последовательностей является весьма актуальной задачей.

В данной работе мы предлагаем метод картирования последовательностей LTR, клонированных в плазмидный вектор или в составе космиды, с помощью Р-петель, наблюдаемых в АСМ. Р-петли были сформированы короткими, 300-400 н.о. синтезированными *in vitro* последовательностями РНК, комплементарными U3 и U5 областям LTR человеческого эндогенного ретровируса K10 (HERV-K10). Выбор Р-петель обусловлен тем, что выход ДНК:РНК гибридов достаточно высок как для длинных РНК-зондов, так и для относительно коротких (может достигать 100 %).

Был произведен контроль - ДНК подвергалась процедуре формирования Р-петель, но без добавления РНК-зонда. Представленные на рис. 1 молекулы не имели никаких особенностей, напоминающих Р-петли.

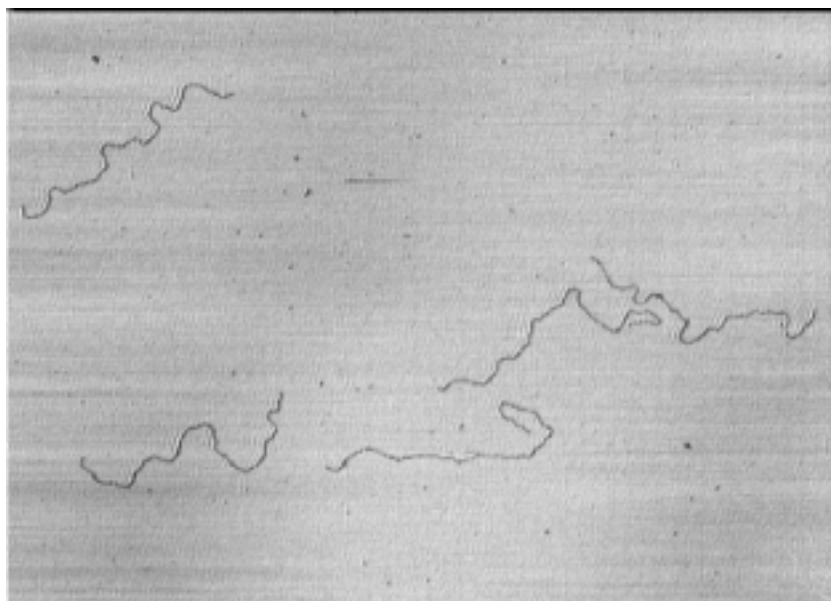


Рис. 1 Контрольное АСМ-изображение молекул рGEM39, лианеризованных по сайту ScaI после нагревания в 70% формамиде и охлаждения с последующей фиксацией глукселем, но без РНК-зонда (аналогично процедуре формирования Р-петель)

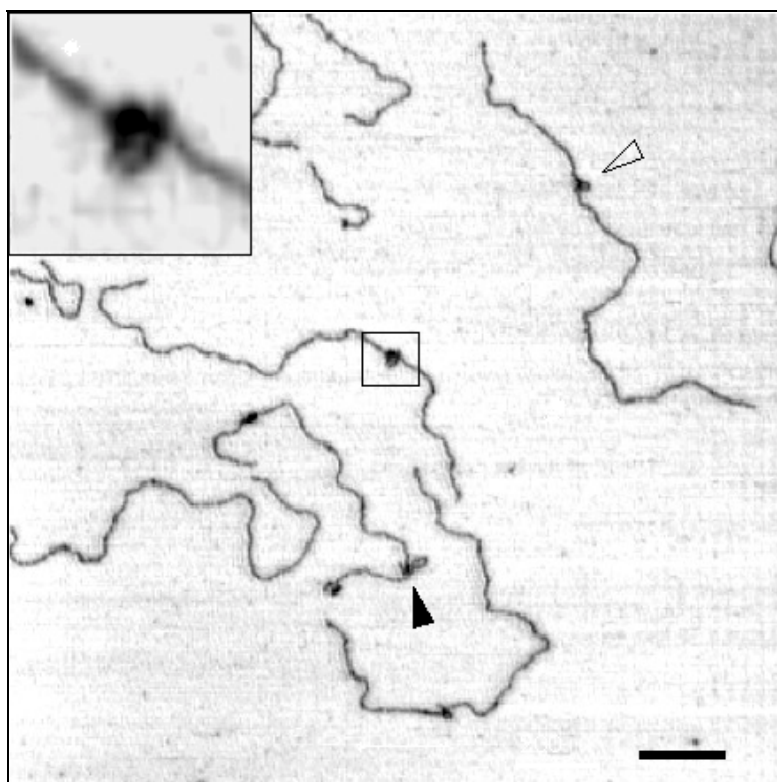


Рис. 2. Характерное АСМ-изображение молекул, несущих петли, сформированные U5 зондом без фиксации глукселем. Темная стрелка указывает на петлю с меньшей степенью вытеснения, светлая - с большей. В левом верхнем углу приведено увеличенное изображение неструктурированной глобулы, состоящей из Р-петли с частично вытесненным -РНК-зондом. Длина отрезка соответствует 200 nm.

Ранее при помощи АСМ Р-петли не исследовались. Поэтому, на первом этапе необходимо было изучить их характерную форму и возможность их идентификации. Оказалось, что наблюдаемый вид Р-петли зависит от длины РНК в гетеродуплексе: Р-петли образованные короткими зондами, длиной не более 100-150 оснований, имеют вид неструктурированных глобул (поперечный размер глобулы составлял 36 ± 3 nm, а высота около 2.7 ± 0.3 nm (рис. 2)), тогда как Р-петли образованные более протяженными зондами имеют характерный подковообразный вид (рис 3). Существенно, что во втором случае удастся полностью проследить ход гибрида в дуплексе и определить его длину.

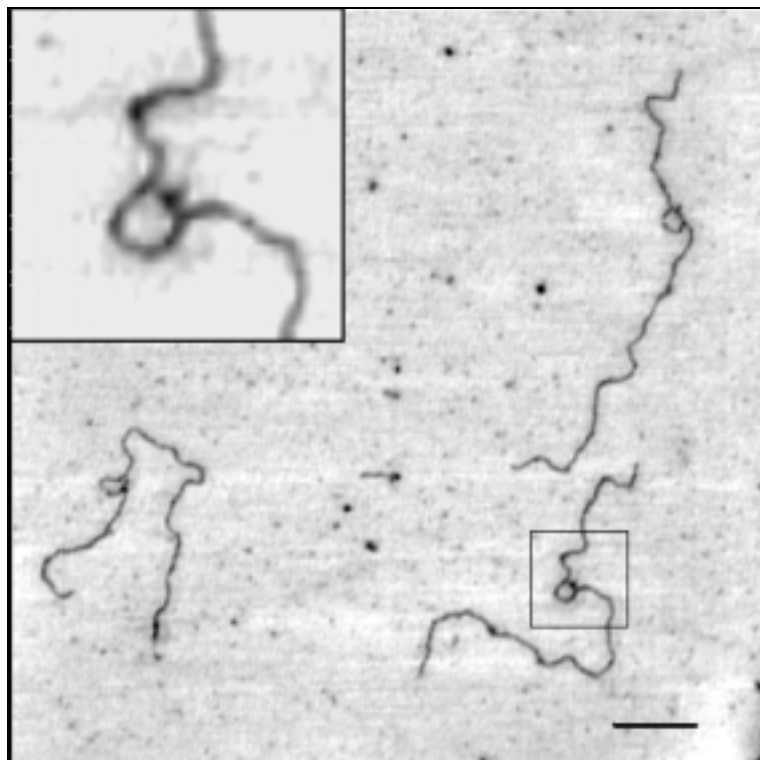
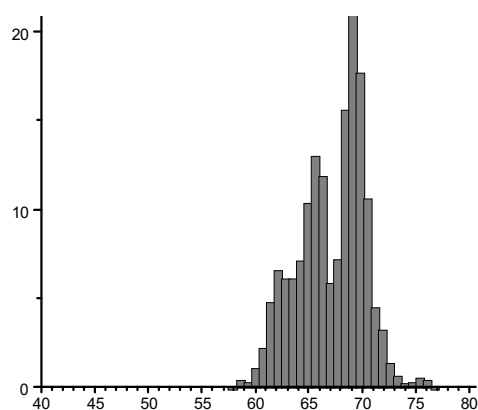


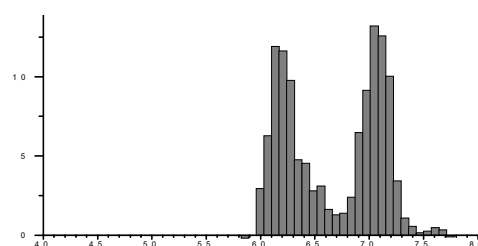
Рис. 3 Характерное АСМ-изображение молекул ДНК, содержащих Р-петли, сформированные U5 зондом, фиксированные глиоксалем. В левом верхнем углу приведено увеличенное изображение Р-петли. Длина отрезка соответствует 200 nm.

Подковообразная форма Р-петли обусловлена, скорее всего, коллапсом одноцепочечного участка ДНК вытесненной цепи в присутствии ионов Mg^{2+} , необходимых для приготовления образцов для АСМ. В результате коллапса стягиваются противоположные концы Р-петли. В отсутствие химической фиксации происходит частичное вытеснение РНК из Р-петли при удалении формамида и приготовлении образца, что приводит к тому, что большая часть Р-петель имеет вид неструктурированных глобул, хотя некоторые Р-петли имеют подковообразную форму. АСМ-изображения Р-петель обрабатывались с помощью специально написанной программы (Г. М. Савельева, 1997 см. материалы и методы). Измерялась длина молекулы

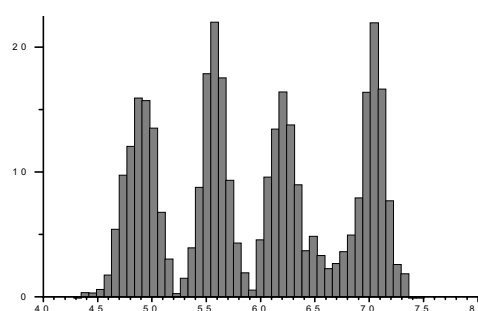
ДНК и расстояние от конца молекулы до начала и конца Р-петли. За начало отсчета брался наиболее удаленный от Р-петли конец молекулы. Длина в нанометрах пересчитывалась в % относительно длины молекулы, нормированные молекулы суммировались в гистограмму, с учетом ориентации.



а)



б)



↑ в) ↑ ↑ ↑

Рис. 4. а) Гистограмма распределения положения концов Р-петель, сформированных зондом U5 без фиксации глиоксалем. б) Гистограмма распределения концов Р-петель, фиксированных глиоксалем, для зонда U5. в) Гистограмма распределения концов Р-петель, сформированных одновременно U5 и U3 зондами, фиксированных глиоксалем. Теоретические положения Р-петель (с учетом того, что РНК:ДНК гибриды короче ДНК:ДНК участков примерно на 17%) указаны стрелками.

На рис. 4б приведена гистограмма распределения границ Р-петель, полученная для зонда U5. Положения границ равны $61.9 \% \pm 1.15 \%$ и $70.75 \% \pm 1.15 \%$, и соответствуют 3' и 5' концам зонда, что с точностью 0.5 % (19 п. о.) согласуются с ожидаемыми значениями (с учетом того, что РНК:ДНК гибриды короче ДНК:ДНК участков примерно на 17%).

На рис 4а приведена гистограмма распределения границ Р-петель для зонда U5, без фиксации глиоксалем. Точность определения картируемого участка в этом случае заметно ниже.

При картировании LTR ставится задача определения не только положения искомой последовательности, но и ее ориентации относительно концов молекулы. Для этих целей была произведена одновременная гибридизация с двумя зондами на начало и конец LTR.

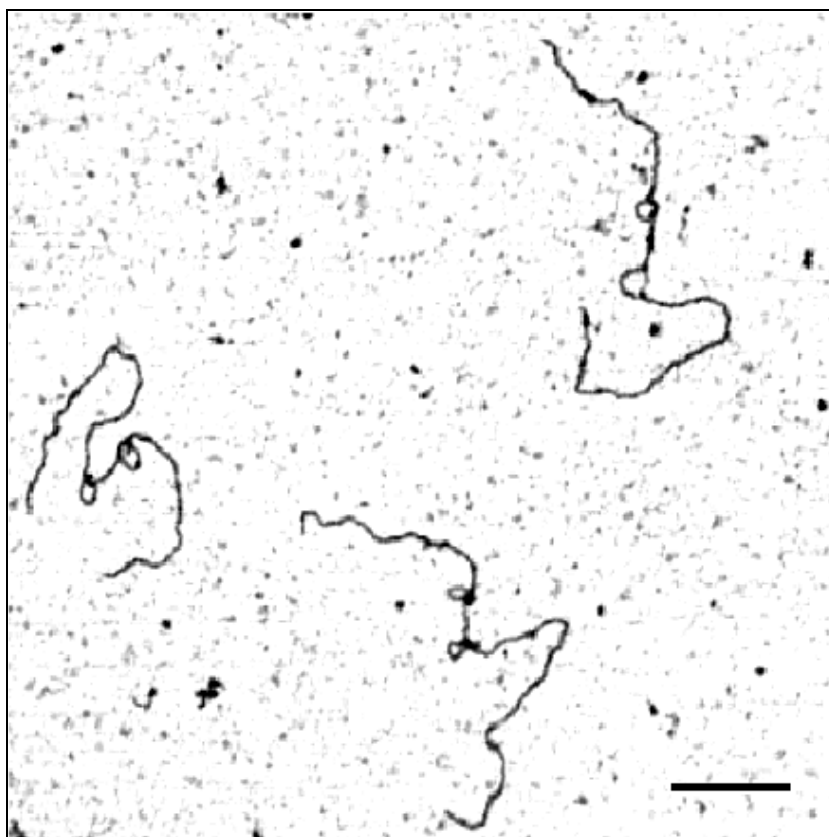


Рис. 5 Характерное изображение молекул ДНК, содержащих Р-петли, сформированные одновременно U5 и U3 зондами. Длина отрезка соответствует 200 nm.

На рис. 4в приведена гистограмма распределения границ Р-петель, сформированных одновременно двумя зондами U5 и U3. Выход молекул ДНК с двумя полноразмерными Р-петлями составлял около 70% и 75% для незафиксированных и зафиксированных

глиоксалем образцов, соответственно, но для построения гистограмм были использованы только молекулы с двумя Р-петлями, имеющими характерную подковообразную форму. Экспериментальные величины хорошо согласуются с ожидаемыми теоретическими значениями, указанными стрелками.

Формирование Р-петель одновременно двумя зондами дает ряд преимуществ благодаря тому, что зонды имеют разную длину (345 н.о. и 380 н.о.): уже из одной гистограммы можно однозначно определить как положение, так и ориентацию LTR (рис 4в). Кроме того, в результате этой гибридизации появляется характерная структура, состоящая из двух близко расположенных петель (рис 5). Наличие такой структуры существенно облегчает поиск и картирование искомой последовательности, LTR в нашем случае. Данное обстоятельство особенно существенно при анализе длинных молекул таких, как космидная ДНК. С другой стороны число зондов может быть увеличено до трех, четырех и более, что позволит находить и картировать одновременно не только близкородственные последовательности, в том числе и LTR, но и другие, уникальные последовательности относительно друг друга.

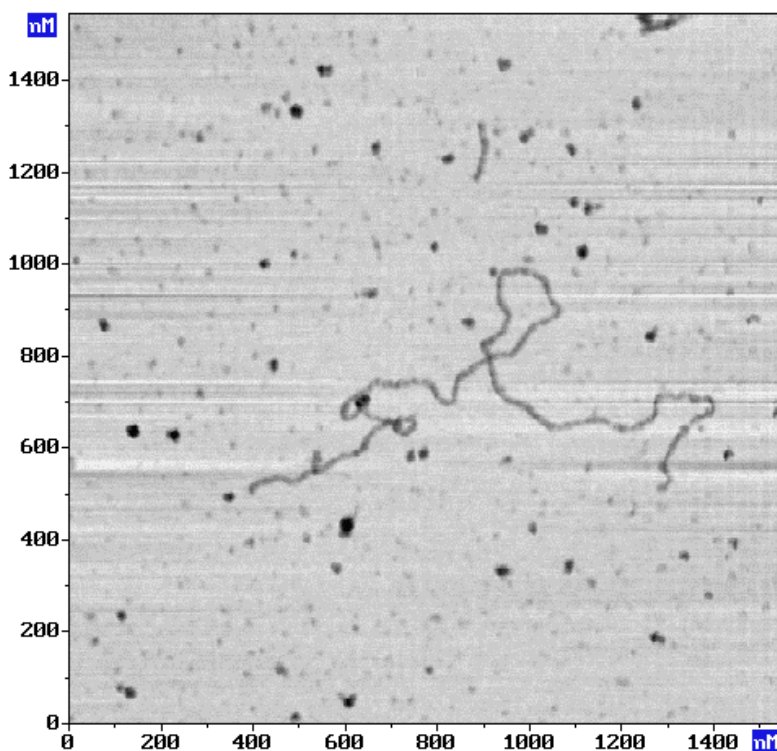


Рис. 6 АСМ-изображение Р-петель, образованных при неполной гомологии на плазмиде 373 EcoR ~ 8 k b. p

Все последовательности LTR, встречающиеся в человеческом геноме, делятся на несколько классов по степени гомологии. Внутри одного класса степень гомологии может достигать 90-98%. В рамках данной работы было проведено исследование влияния гомологии РНК-зонда на образование Р-петель. Ранее Р-петли наблюдали при 60%-ой

гомологии, однако некомплементарный участок располагался на конце РНК-зонда и не принимал участие в формировании Р-петли. В нашем случае несовпадения последовательности распределены равномерно по всей длине зонда. На рис. 6 представлено АСМ-изображение плазмидной ДНК (373 EcoR, длина \approx 8 тыс. п. о.) с образованными Р-петлями при степени гомологии зонда и матрицы \approx 95%. Предварительные данные показывают, что возможно использование одних и тех же зондов для картирования родственных последовательностей (с частичной гомологией). При степени гомологии 75% Р-петли не были получены (в качестве матрицы использовалась плазида 181 Pst, длина \approx 8 тыс. п. о.).

Результаты данной работы показали применимость метода АСМ для картирования ДНК. Ряд существенных преимуществ, таких как возможность получать изображения в цифровом виде, и исключение этапа оттенения образцов платиной, ускоряют получение данных в несколько раз по сравнению с классической электронной микроскопией.

¹ Brack, C. DNA electron microscopy. *Crit. rev. Biochem.*, 1981, 10, 113-169

² Lower, R., Lower, J., Kurth, R.. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 1996, 5177-5184.