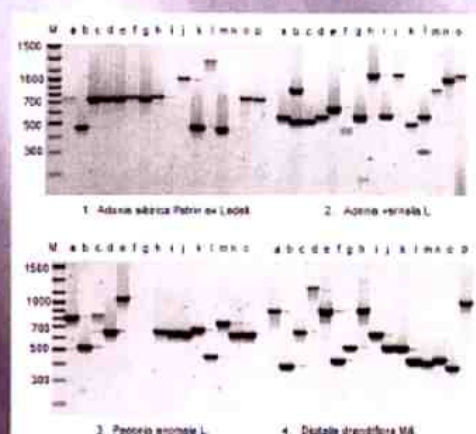


АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ



	2320	2330	2340	2680	2690	2700
1	CTTTC	CAACTTTAATA	CCAATGAAGTA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
2	TTTTCA	ACTCTAA---	CCAGTGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
3	CTTCCA	CACTCAG---	CCAGTGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
4	CTTCCA	CACTCAC---	CCAATGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
5	TAATCCA	CAATCAA---	ACTGTGAAGTA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
6	TAATCCA	CAATCAA---	ACTGTGAAGCA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
7	TAATCCA	CAGTCTA---	ACAATGAATCA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
8	TATCAAT	GCTGGAG---	ATGAGACCCCA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
9	TAATCCA	CAATCAA---	ACTGTGAAGTA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
10	TAATCCA	CAGTCTA---	ACAATGAATCA	AATGCAGCAGAGGAGAA	GTAGAA	GTATAAGA
		A			B	C

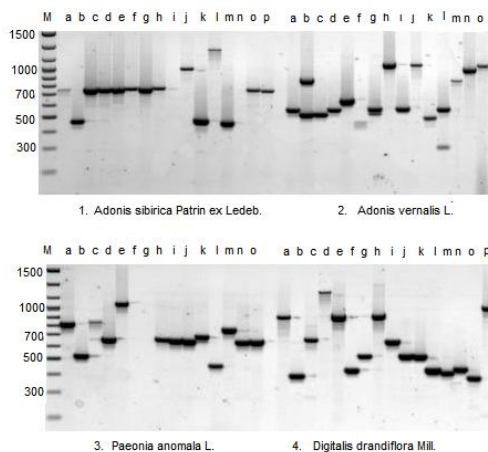
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет
Естественнонаучный институт

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ

Под общей редакцией С.В. Боронниковой

*Допущено методическим советом Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве учебного пособия для студентов
биологического факультета, обучающихся по направлению «Биология»*



Пермь 2013

УДК 577.21

ББК 28.04

А 43

Коллектив авторов:

С. В. Боронникова, Е. Г. Плотникова, А. В. Назаров, Н. Л. Шибанова,
М. А. Данилова, Н. Н. Бельтюкова, Т. Н. Лисина, И. В. Бобошина, Е. В. Сайдакова, Ю. С. Нечаева

Под общей редакцией С. В. Боронниковой

А 43 **Актуальные** проблемы генетики: учеб. пособие / колл.
авт.; под общ. ред. С. В. Боронниковой; Перм. гос. нац.
исслед. ун-т. – Пермь, 2013. – 126 с.: ил.

ISBN 978-5-7944-2278-8

Учебное пособие посвящено современным методам молекулярно-генетического анализа, актуальным направлениям генетических исследований и прикладным аспектам генетики. Представлены научно-методические основы метода ПЦР в реальном времени и определения нуклеотидных последовательностей или секвенирования ДНК, приведены конкретные примеры использования этих методов и компьютерного анализа полученных данных в учебном процессе.

Освоение материала учебного пособия позволит студентам, обучающимся по направлению «Биология», сформировать профессиональную компетенцию «демонстрацию знаний об основных закономерностях, современных достижениях и проблемах генетики».

Предназначено для бакалавров, магистрантов и аспирантов биологических специальностей вузов, предметом научных интересов которых служит общая и молекулярная генетика, молекулярная биология, геномика и биоинформатика.

УДК 577.21

ББК 28.04

Печатается по решению Ученого совета Естественнонаучного института и
Ученого совета биологического факультета Пермского государственного национального
исследовательского университета

Рецензенты: кафедра ботаники, генетики, физиологии растений и биотехнологий Перм.
гос. сельскохозяйств. акад. им. Д.Н. Прянишникова; ведущий науч. сотр.
лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов Ин-та экологии и
генетики микроорганизмов УрО РАН, д-р биол. наук *Г.В. Смирнова*

ISBN 978-5-7944-2278-8

© Коллектив авторов, 2013

© Пермский государственный национальный
исследовательский университет, 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
РАЗДЕЛ 1. Современные методы молекулярно-генетического анализа.....	7
1.1. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ, Real-time PCR) (Сайдакова Е.В.).....	7
1.1.1. Общие принципы метода.....	7
1.1.2. Детекция продуктов амплификации.....	9
1.1.3. Обработка экспериментальных данных.....	14
1.1.4. Применение метода ПЦР-РВ.....	16
1.2. Определение нуклеотидной последовательности или секвенирование ДНК (Плотникова Е.Г.).....	17
1.2.1. Секвенирование ДНК по Максому и Гилберту: метод химической деградации.....	17
1.2.2. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод ферментативной деградации.....	18
1.2.3. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: «дидезокси метод».....	20
1.2.4. Автоматическое секвенирование ДНК.....	22
1.3. Новые технологии секвенирования ДНК (Плотникова Е.Г.).....	24
1.3.1. Высокопроизводительное секвенирование ДНК.....	24
1.3.2. Принцип и основные этапы пиросеквенирования ДНК.....	25
1.3.3. Возможности и достижения технологии пиросеквенирования.....	30
1.3.4. Новые достижения с использованием технологии пиросеквенирования (Roche 454 Life Sciences).....	34
1.3.5. Перспективы развития технологии секвенирования (геномные секвенаторы Illumina и Life Technologies).....	38
1.3.6. Технология секвенирования ДНК Ion Torrent.....	39
1.3.7. Платформы ДНК-секвенирования 3-го поколения.....	41
РАЗДЕЛ 2. Актуальные направления генетических исследований.....	43
2.1. Мобильные генетические элементы (Боронникова С.В.).....	43
2.1.1. Строение и механизмы перемещения ретротранспозонов.....	43
2.1.2. Структурная и функциональная роль мобильных генетических элементов.....	46
2.1.3. Молекулярно-генетические маркеры на основе ретротранспозонов.....	49

2.2. Биоинформационный анализ (Данилова М.А.).....	56
2.3. Генетический контроль мейоза (Шибанова Н.Л.).....	59
РАЗДЕЛ 3. Прикладные аспекты генетики	66
3.1. Генотерапия (Нечаева Ю.С.).....	66
3.2. Фармакогенетика (Бельтюкова Н.Н.).....	73
3.3. Анализ ДНК в криминалистике (Бобошина И.В.).....	78
3.4. Экологическая генетика (Назаров А.В.).....	87
3.4.1. Предмет экологической генетики.....	87
3.4.2. Эколого-генетические модели.....	89
3.4.3. Биологические факторы мутагенеза.....	90
3.4.5. Генетика устойчивости/чувствительности к факторам среды (экогенетика)	95
3.4.6. Генетическая токсикология.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
Список литературы.....	104
Список использованных сокращений.....	112
ПРИЛОЖЕНИЯ	114
Приложение 1. Определение количества кольцевых ДНК Т-клеточного рецептора человека методом ПЦР в реальном времени (Сайдакова Е.В.)	114
Приложение 2. Выравнивание секвенированных последовательностей. Определение однонуклеотидных замен, делеций и вставок (Лисина Т.Н.).....	116
Приложение 3. Новые технологии секвенирования ДНК (оборудование и этапы секвенирования в схемах) (Плотникова Е.В.).....	120
Сведения об авторах.....	125

*Знать последовательность своей ДНК
не менее важно, чем иметь автомобиль.*

Джеймс Уотсон
(Пушино, 20 февраля 2011 г.)

Введение

С начала второго тысячелетия после расшифровки геномов многих организмов и генома человека ученые оперируют не отдельными биологическими молекулами, а крупными массивами генов, пытаются понять гармонию сложнейшей системы взаимодействий геномов, их продуктов, клеточных культур и систем сигнализации. Большую роль при изучении последовательностей геномов сыграли бурно развивающиеся методы ПЦР, ПЦР в реальном времени и определение нуклеотидной последовательности или секвенирование ДНК.

Темп накопления геномной информации в настоящее время очень высок. В этой области ученые не успевают обобщить новую информацию, важнейшие изменения концепций, новейшие направления и методы исследований. Целью данного учебного пособия является помощь студентам в изучении основных закономерностей генетики с использованием современных методов молекулярно-генетического анализа, ее достижений и актуальных проблем.

Из современных методов генетики и геномики лидирует структурно-функциональный анализ уже расшифрованных и интенсивно изучаемых геномов. Большую роль в динамичности геномов играют мобильные генетические элементы. Научный поиск направлен от молекул к клеткам, органам и к целым организмам. Рассмотрены современные тенденции в изучении генетического контроля мейоза, одного из основных процессов деления клеток, играющего ключевую роль при половом размножении организмов. В области прикладных исследований перспективны и интересны междисциплинарные направления, например на стыке генетики и медицины нового поколения – генотерапия, фармакогенетика, диагностика предрасположенности к болезням. В судмедэкспертизе успешно применяется

молекулярно-генетическая идентификация личности, развиваются новые технологии экспресс-диагностики. Благодаря научной школе академика РАН С.Г. Инге-Вечтомова достойное место в науке Российской Федерации занимает направление экологической генетики. Значительное внимание в учебном пособии уделено биоинформационному анализу биологических данных.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность рецензентам и коллегам за их замечания, пожелания и дополнения. Сердечно благодарим доцента Университета Хельсинки к.б.н. Р.Н. Календаря за консультации и представленные для главы 2.1 схемы строения мобильных генетических элементов. Благодарим студентов за проявленный интерес к прикладным аспектам генетики и активное участие в обсуждении проблем современных генетических исследований.

Некоторые схемы, фотографии и таблицы были взяты из других изданий, авторам и издателям которых мы глубоко благодарны. Приведенные рисунки и фотографии взяты из следующих источников:

глава 1.2.2:

рис. 10:

<http://molbiol.ru/protocol/sequenceob01.gif>

глава 2.1:

рис. 13: <http://labcfg.ibch.ru/HomeRus.html>

глава 2.2:

<http://www.ebi.ac.uk/>

глава 2.3:

рис. 15: [http://kzdocs.docdat.com/docs/index - 348.html?page = 4](http://kzdocs.docdat.com/docs/index-348.html?page=4)

Приложение 3, главы 1.2 и 1.3:

<http://biomics.ru>

<http://ru.wikipedia.org>

<http://biomolecula.ru>

<http://molbiol.ru>

<http://www.pressebox.com>

<http://bioinformatics.ru>

<http://www.genomics.cn>

РАЗДЕЛ 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

1.1. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ или Real Time PCR)

1.1.1. Общие принципы метода

Полимеразная цепная реакция с возможностью регистрации накопления продуктов амплификации в ходе эксперимента, т.е. в реальном времени, уверенно занимает лидирующие позиции среди методов научно-исследовательских и диагностических ПЦР-лабораторий. Широкое внедрение в область практического применения обусловлено рядом преимуществ по сравнению с классической ПЦР, основным из которых является возможность проведения количественного анализа последовательностей ДНК и РНК. Детекция результатов производится во время реакции, а не после завершения, что позволяет исключить стадию электрофореза, тем самым уменьшив общую продолжительность процесса и снизив риск контаминации. Разрешающая способность метода ПЦР-РВ значительно выше той, которую можно получить при помощи гель-электрофореза. Использование же специально разработанных математических методов анализа позволяет проводить автоматическую интерпретацию полученных результатов и снимает проблему субъективной оценки электрофореграмм. Базовый принцип ПЦР-РВ не значительно отличается от принципа классической ПЦР. Исследуемой матрицей может являться как ДНК, так и РНК. Последняя переводится в кДНК методом обратной транскрипции, после чего искомая последовательность многократно умножается в ходе повторяющихся циклов реакции. В случае с ДНК обратной транскрипции не требуется. Однако есть два фундаментальных отличия классической ПЦР и реакции в реальном времени. Во-первых, детекция и количественный анализ числа ампликонов происходит непосредственно во время эксперимента благодаря использованию флуоресцентных репортеров. Во-вторых, оценка аккумуляции продуктов реакции производится в ходе каждого цикла, а не по конечной точке. Основной набор реактивов,

необходимых для проведения эксперимента в реальном времени, идентичен используемому в классической ПЦР. Однако следует помнить, что помимо базовых реакционных смесей требуется генератор репортерной флуоресценции, выбор которого зависит от дизайна эксперимента. Так как репортер генерирует флуоресцентный сигнал только при связывании с ампликонами, увеличение детектируемого сигнала пропорционально количеству продукта реакции. Детекция интенсивности флуоресцентного сигнала в каждом круге амплификации позволяет с высокой точностью установить момент начала экспоненциальной фазы реакции (C_t). Номер порогового цикла зависит от количества целевой последовательности в исследуемом образце. Проще говоря, чем больше искомой последовательности содержится в пробе, тем раньше наступит пороговый цикл амплификации. Базовые принципы эксперимента рассмотрим на примере результатов ПЦР-РВ с тремя неизвестными исследуемыми образцами (рис.1). На графике видно, что ранняя стадия амплификационной реакции (чаще всего 3 – 15-й циклы) не характеризуется приростом флуоресцентного сигнала. Это явление называют фоновой флуоресценцией или базовой линией. После начала экспоненциальной фазы реакции происходит быстрое нарастание интенсивности флуоресцентного сигнала. В начале этой фазы устанавливается пороговая линия, которая, пересекая амплификационные кривые, определяет пороговый цикл амплификации (рис.1). На рисунке отображена базовая линия, в которой не происходит прироста флуоресценции.

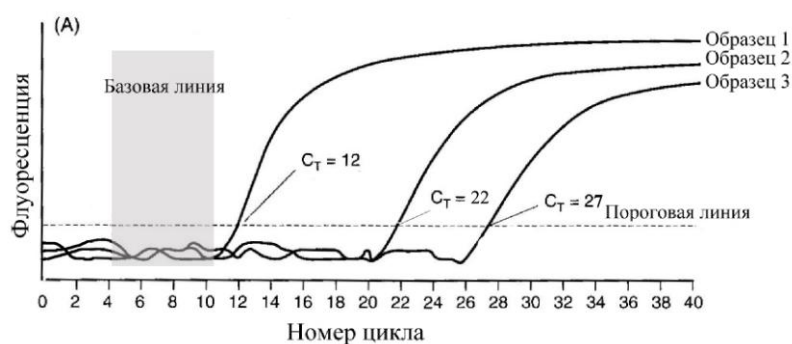


Рис. 1. График амплификации: флуоресцентный сигнал изображен относительно цикла реакции

Экстраполируя значения C_t (точки пересечения амплификационной кривой и пороговой линии) на стандартную кривую, можно рассчитать количество молекул в исследуемом образце (рис. 2).

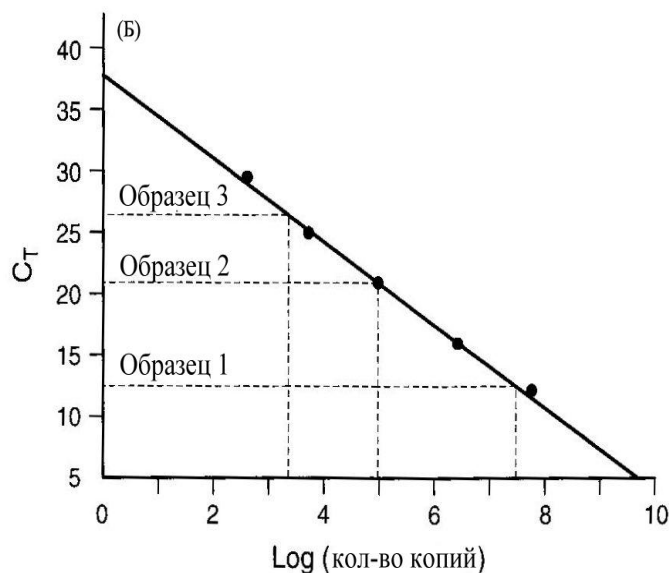


Рис. 2. Стандартная кривая, построенная в координатных осях «флуоресценция – десятичные логарифмы концентраций известных образцов». Стартовая концентрация (количество копий) в образцах 1, 2 и 3 может быть определена на основе их значений C_t : образец 1 содержит больше копий искомой последовательности, чем образцы 2 и 3

Для регистрации накопления продуктов реакции используются специальные приборы – детектирующие амплификаторы, способные при помощи оптического модуля фиксировать силу флуоресцентного сигнала в реакционной пробирке (Ребриков, Трофимов, 2006).

1.1.2. Детекция продуктов амплификации

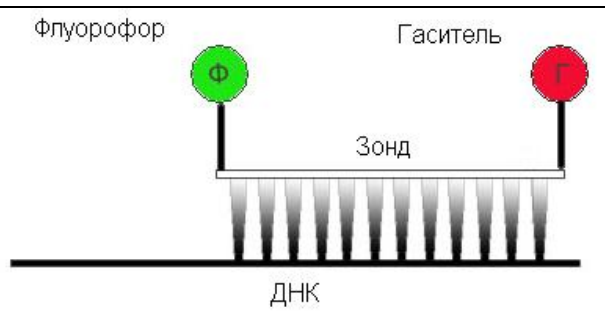
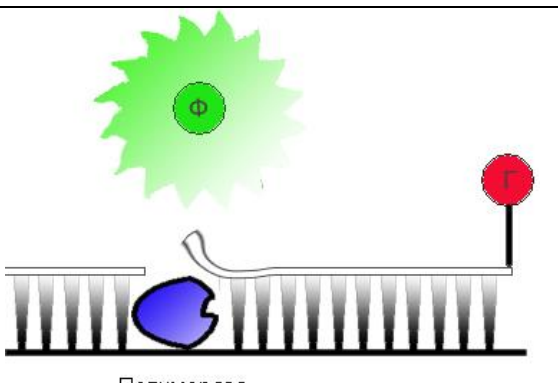
На сегодняшний день существуют два основных принципа генерации репортерной флуоресценции в ПЦР–РВ: олигонуклеотидные зонды, меченые флуоресцентными красками, и интеркалирующие флуоресцентные красители. На основе этих принципов разработан целый ряд разнообразных подходов. Далее рассмотрены наиболее часто используемые из этих подходов.

TaqMan-зонды (TaqMan Assay)

В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды (короткие олигонуклеотиды

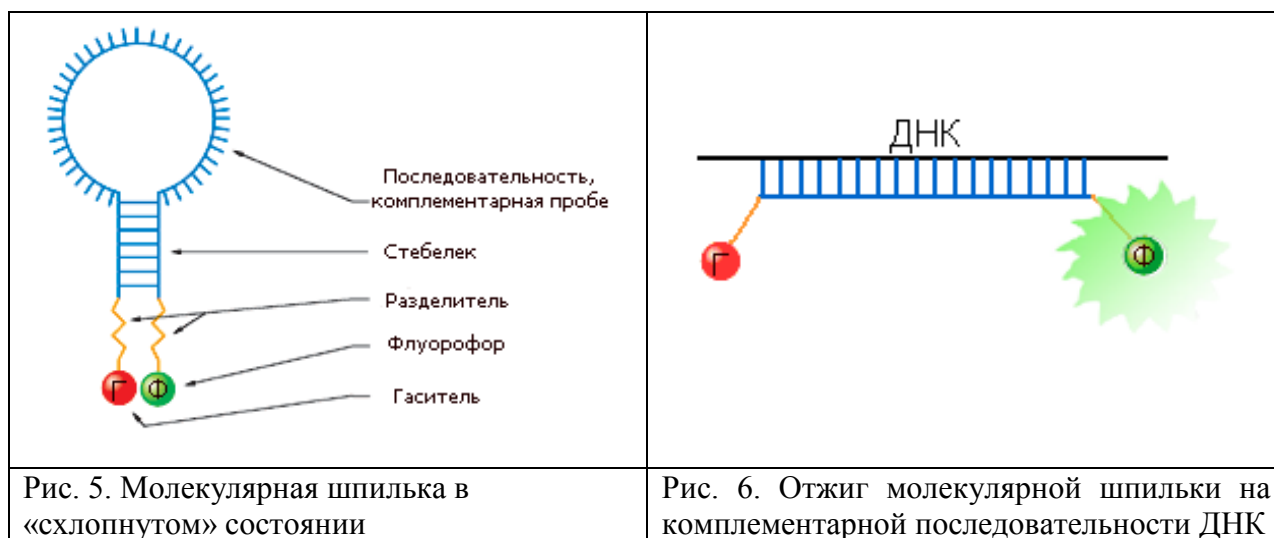
длиной 20 – 30 оснований), в состав которых входит флуоресцентная метка в 5'-положении, гаситель флуоресценции и фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды комплементарны последовательности внутри амплифицируемого элемента. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу. В таком состоянии зонд не светится (рис. 3).

В ходе ПЦР (во время стадии отжига праймеров) олигонуклеотид специфически прижигается (комплементарно присоединяется) к амплифицируемой области. При этом чем больше продуктов амплификации образуется в ходе ПЦР, тем больше молекул зондов свяжется с соответствующими ампликонами. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, когда наткнется на зонд, начинает расщеплять его благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности. Флуоресцентная метка, пришитая к первому основанию зонда, отщепляется и начинает удаляться от гасителя (рис. 4). Из-за пространственного разобщения гаситель больше не может поглощать свечение флуорофора. Метка разгорается, и общий фон флуоресценции реакционной смеси увеличивается. Очевидно, что чем больше ампликонов было наработано в ходе ПЦР на определенный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

	
Рис. 3. TaqMan зонд: Ф- флуоресцентная метка, Г- гаситель	Рис. 4. Отщепление флуоресцентной метки от зонда

*Зонды с комплементарными концевыми последовательностями
(Molecular beacons)*

Данный метод отличается от предыдущего тем, что концевые последовательности зонда представляют собой взаимно комплементарные области. В растворе они “схлопываются” и образуют шпильки (Tyagi, Kramer 1996). Внутренняя часть зондов содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную амплифицируемому элементу. При отжиге праймеров зонды, не присоединившиеся к ДНК матрице, остаются в "схлопнутом" состоянии. Ввиду близости флуорофора и гасителя свечение отсутствует (рис. 5). Зонды, которые отжигаются на матрицу, разворачиваются. Флуоресцентная метка и гаситель расходятся в разные стороны. Из-за пространственного разобщения двух меток, как и в прошлом случае, интенсивность свечения флуорофора увеличивается (рис. 6).



Зонды с резонансным переносом энергии (LightCycler assay)

Данный способ отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу двух разных ДНК-зондов (Bernard et al., 1999). Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первого зонда, ко второму флуорофору, находящемуся на 5'-конце второго зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида (рис. 7).

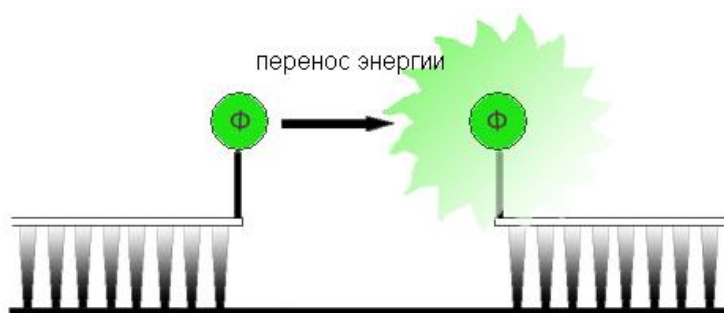


Рис. 7. Перенос энергии с метки на метку при использовании LightCycler зондов

При одновременном связывании обоих зондов с ДНК-матрицей излучение, испускаемое первым флуорофором, передается на второй флуорофор. А уже его излучение детектируется прибором. Таким образом, возрастает специфичность анализа.

Интеркалирующие агенты

Ряд интеркалирующих (внедряющихся) красителей, таких как бромистый этидий и SYBR Green I, находясь в несвязанной форме, не излучают флуоресценцию. Однако количество испускаемого ими света значительно возрастает при встраивании в двуцепочечные молекулы ДНК (Higuchi, 1993). Эта особенность позволяет наблюдать за накоплением продуктов амплификации (рис. 8).

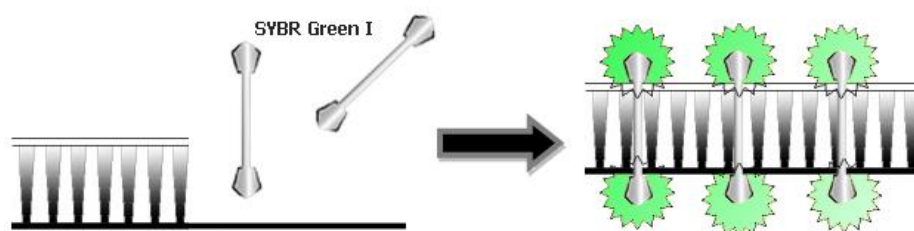


Рис. 8. Возрастание уровня флуоресценция SYBR Green I при связывании с ДНК

Важно отметить, что увеличение флуоресценции при проведении ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями может быть обусловлено накоплением как специфического, так и неспецифического продукта амплификации (праймер-димеры, шмер). Для получения корректных результатов необходимо дополнительное изучение полученных ампликонов с помощью построения так называемых "кривых плавления" – "melting curves" (рис. 9). На графике сплошной линией обозначено снижение уровня флуоресценции (рис. 9) при

постепенном повышении температуры реакционной смеси. Четко видны две позиции, в которых сила свечения резко падает. Это свидетельствует о наличии двух разных по длине и GC-составу ампликонов в одной реакционной смеси. Пунктирной линией изображен результат математической обработки (производная функции) значений флуоресценции. Хорошо видны два пика, соответствующие двум разным ампликонам.

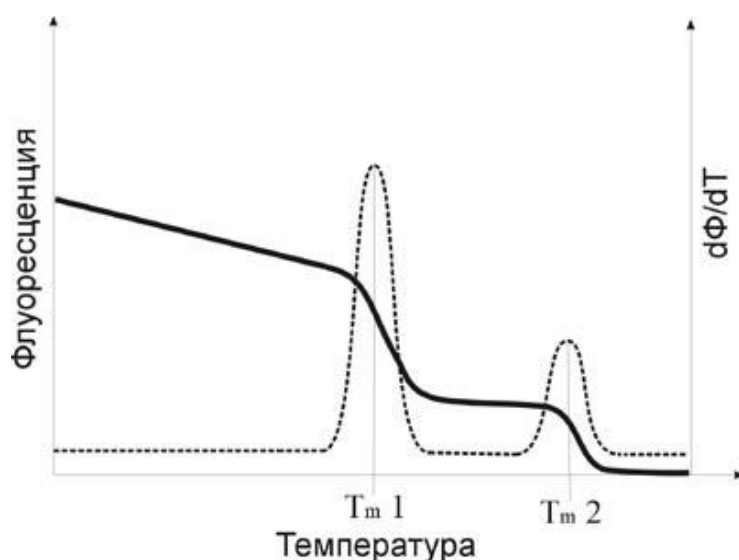


Рис. 9. График кривой плавления

После окончания ПЦР–РВ реакционную смесь постепенно нагревают и непрерывно измеряют флуоресценцию в каждой пробирке. Когда реакционная смесь достигает температуры плавления (T_m) продукта амплификации, флуоресценция резко снижается. При этом каждое резкое уменьшение уровня флуоресценции соответствует числу различных фрагментов, получаемых на электрофореze, т.е. числу разных типов ампликонов. Для облегчения работы с полученной информацией проводят дифференциальный анализ кривой плавления.

Применение кривых плавления не ограничивается детекцией количества продуктов амплификации. При использовании этого метода можно различать точечные мутации внутри ампликонов. Наличие таких мутаций способно привести к изменению температуры плавления продуктов реакции и к изменениям в графике кривой плавления (Bernard et al., 1999).

1.1.2. Обработка экспериментальных данных

Существуют два широко применяемых метода для обработки результатов, полученных при проведении ПЦР–РВ: абсолютный и относительный количественный анализы. Абсолютный количественный анализ позволяет рассчитать число копий искомого гена в образце при экстраполяции C_t неизвестного образца на стандартную кривую. Относительный количественный анализ дает возможность определить количество искомого гена относительно другой – референсной последовательности (Livak, Schmittgen, 2001). У каждого из методов есть свои преимущества. Выбор зависит от целей, которые ставит перед собой исследователь.

Абсолютный количественный анализ

Для определения количества искомым последовательностей в образце используется стандартная калибровочная кривая. Чаще всего она представляет собой серию десятикратных разведений специально созданной плазмиды со специфической вставкой. Исследователь должен точно знать количество молекул в каждом из разведений. По результатам амплификации строится график «номер порогового цикла – десятичный логарифм концентрации стандартов». Значения C_t неизвестных проб экстраполируются на стандартную кривую. Так происходит расчет количества молекул в исследуемых образцах (Leong et al., 2007).

Относительный количественный анализ

Одним из наиболее распространенных методов относительного количественного анализа является метод « $2^{-\Delta\Delta C_t}$ », требующий для расчетов данные о пороговом цикле амплификации не только целевой последовательности, но и дополнительного – референсного гена (Schmittgen et al., 2000). В выборе референса существуют определенные ограничения. Для того чтобы использование той или иной последовательности было правомерным, эффективность ее амплификации должна совпадать с таковой

целевого ампликона (Livak, Schmittgen 2001). Эффективность амплификации – величина, характеризующая прирост количества матрицы в каждом цикле (Трофимов и др., 2008). Графически она будет выражаться в тангенсе угла наклона прямой, построенной в координатах «концентрация матрицы – C_t ». Метод « $2^{-\Delta\Delta C_t}$ » применяется для расчетов только тогда, когда эффективности амплификации искомого и референсного генов одинаковы.

Для постановки реакции потребуется стандартный калибратор – некий усредненный образец, возможно смесь ДНК или РНК. При постановке реакции определяются C_t целевого и референсного генов в калибраторе и неизвестном образце.

При использовании данного метода количество образца рассчитывается по формуле

$$\text{Количество образца} = 2^{-\Delta\Delta C_t},$$

где C -количество образца.

Для того чтобы разобраться в математической основе метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$, следует рассмотреть вопрос о том, откуда была получена данная формула.

Уравнение, описывающее экспоненциальную фазу амплификации:

$$x_n = x_0 * (1 + E_x)^n, \quad (1)$$

где x_n - количество определяемых молекул в момент цикла n ; x_0 – начальное количество искомым молекул; E_x – эффективность амплификации; n – количество циклов.

Пороговый цикл (C_t) – это цикл, в котором амплификационная кривая, выражающая интенсивность флуоресценции, пересекает пороговую линию реакции. Значение порогового цикла обратно пропорционально начальной концентрации определяемого вещества (чем больше концентрация, тем меньше значение C_t).

$$x_T = x_0 * (1 + E_x)^{C_{T,x}} = K_x, \quad (2)$$

где x_T – количество молекул в C_t ; K_x – константа.

Формула для референсного гена:

$$R_T = R_0 * (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \quad (3)$$

где R_T – количество молекул в C_t ; R_0 – начальное количество копий; E_R – эффективность амплификации референсного гена; K_R – константа.

$$\frac{x_T}{R_T} = \frac{x_0 * (1 + E_x)^{C_{T,x}}}{R_0 * (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K, \quad (4)$$

K не обязательно равна 1.

Предположим, что $E_x = E_R = E$, тогда

$$\frac{x_0}{R_0} * (1 + E)^{C_{T,x} - C_{T,R}} = K \quad \text{или} \quad x_n = (1 + E)^{\Delta C_t} = K, \quad (5)$$

где x_n – нормализованное количество мишени.

Преобразуем:

$$x_n = K * (1 + E)^{-\Delta C_t}. \quad (6)$$

Делим нормализованную мишень (q) на нормализованный калибратор (cb):

$$\frac{X_{n,q}}{X_{n,cb}} = \frac{K * (1 + E)^{-\Delta C_{t,q}}}{K * (1 + E)^{-\Delta C_{t,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_t} \quad (7)$$

Здесь $-\Delta \Delta C_t = -(\Delta C_{t,q} - \Delta C_{t,cb})$.

Если эффективность амплификации равна 1, то

$$\text{количество образца} = 2^{-\Delta \Delta C_t}.$$

Выбор метода для анализа результатов ПЦР–РВ зависит от целей и задач каждой конкретной постановки (Dhanasekaran et al., 2010; Vandesompele et al., 2002).

1.1.4. Применение метода ПЦР-РВ

Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени нашел применение во многих сферах человеческой деятельности. В клинической

медицине и методом ПЦР-РВ проводят диагностику инфекционных, онкологических и наследственных заболеваний. В молекулярной биологии проводят клонирование генов, секвенирование ДНК/РНК, генотипирование, в том числе HLA-типирование, детекцию мутаций. Этот метод используют в персонализированной медицине, установлении отцовства, ветеринарии, судебно-медицинской экспертизе, при определении трансгенных организмов в пищевой промышленности, при контроле состояния окружающей среды и т.д. (Gachon et al., 2004; Giuliatti et al., 2001; Panelli et al., 2002; Sandberg et al., 2003; Weller et al., 2000).

1.2. Определение нуклеотидной последовательности или секвенирование ДНК

1.2.1. Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической деградации

Для решения задач современной биологии и диагностики в медицине необходимы знания нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК живых организмов. В связи с этим возникает потребность, в дешевых и быстрых методиках секвенирования. Слово «секвенирование» происходит от английского *sequence*, «последовательность», и означает определение последовательности ДНК или РНК, содержащих до сотен миллионов звеньев мономеров (нуклеотидов).

Технологии ДНК-секвенирования появились благодаря «пионерским» работам ученых Уолтера Гилберта (Maxam, Gilbert, 1977) и Фредерика Сенгера (Sanger, Coulson, 1975) в 70-х годах прошлого века.

В 1976 году А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования, основанный на специфической химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченого с одного конца (Maxam, Gilbert, 1977). Препарат меченой ДНК разделяли на четыре аликвоты и каждую обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. Ученые предложили модифицировать пуриновые основания диметилсульфатом.

При этом происходит метилирование адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых - по азоту в положении 7. Обработка образца ДНК соляной кислотой при 0°C приводит к выщеплению метиладенина. Последующая инкубация при температуре 90°C в щелочной среде вызывает разрыв сахарно-фосфатной цепи ДНК в местах выщепления оснований. Обработка пиперидином приводит к гидролизу образца по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания модифицируют гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин; если обработку вести в присутствии 2М NaCl, то модифицируется лишь цитозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осуществляется пиперидином. Условия реакций авторы подбирали таким образом, чтобы в итоге получить полный набор субфрагментов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

1.2.2. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод ферментативной деградации

Первым методом прямого ферментативного секвенирования ДНК стал метод, предложенный Ф. Сэнгером и Д. Коулсоном в 1975 г. (Sanger, Coulson, 1975). В качестве матрицы в реакции полимеразного копирования использовался одноцепочечный фрагмент ДНК, в качестве праймеров – синтетические олигонуклеотиды или природные субфрагменты, получаемые при гидролизе рестрицирующими эндонуклеазами, а в качестве фермента – фрагмент Кленова ДНК полимеразы I (PolI) из *E.coli*. Метод включал два этапа. Сначала в ограниченных условиях проводили полимеразную реакцию в присутствии всех четырех типов dNTP (один из них был мечен по альфа-положению фосфата), получая на выходе набор продуктов неполного копирования матричного фрагмента. Смесь очищали от несвязавшихся дезоксинуклеозидтрифосфатов и делили на восемь частей. Затем в "плюс"-системе проводили четыре реакции в присутствии каждого из четырех типов

нуклеотидов, а в "минус"-системе – в отсутствие каждого из них. В результате в "минус"-системе терминация происходила перед dNTP данного типа, а в "плюс"-системе – после него. Полученные таким образом восемь образцов разделяли с помощью электрофореза, "считывали" сигнал и определяли последовательность исходной ДНК (рис. 10).

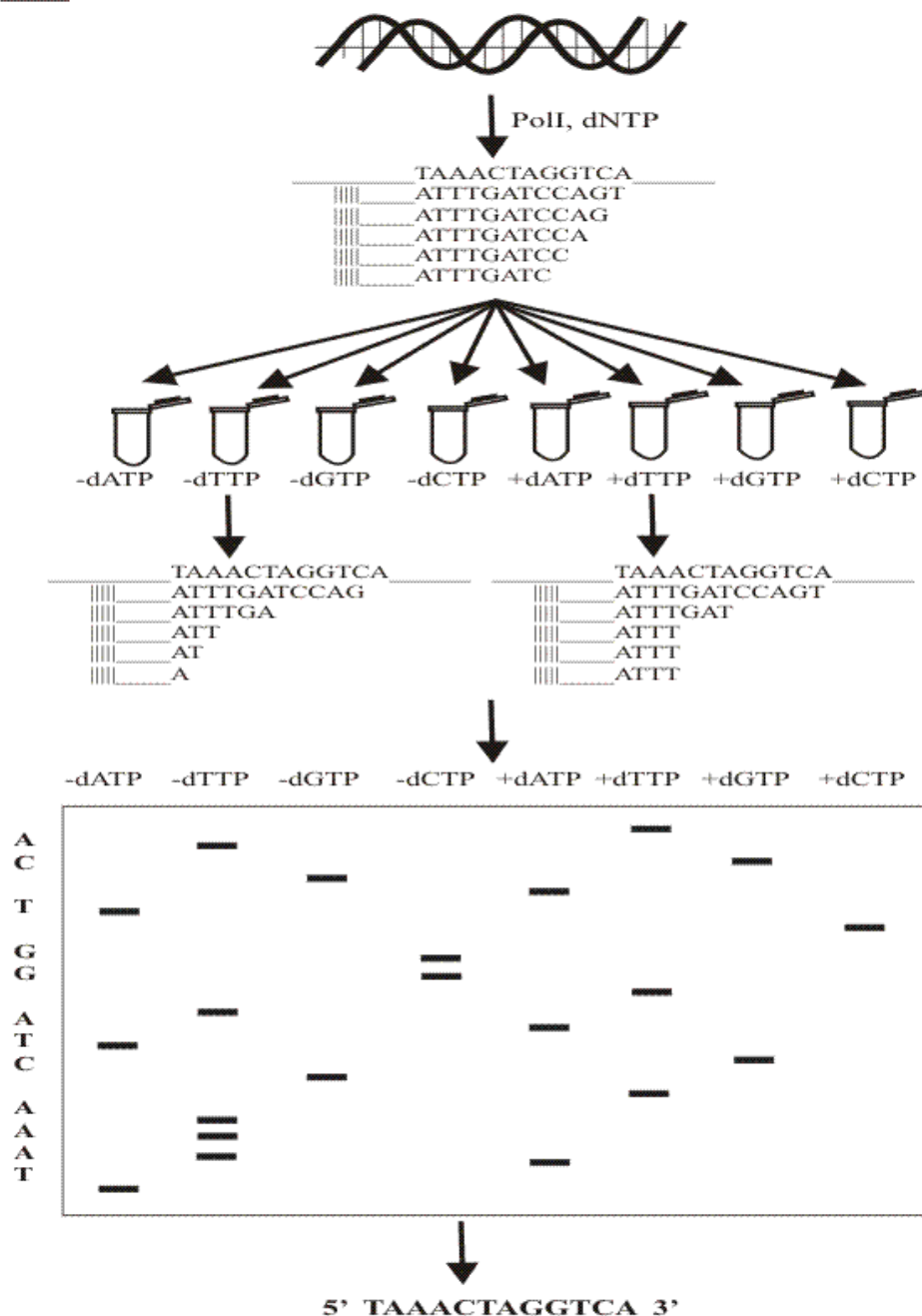


Рис. 10. Метод прямого ферментативного секвенирования ДНК (<http://molbiol.ru/protocol/sequenceob01.gif>)

Этим способом была секвенирована короткая ДНК фага фХ174, состоящая из 5386 нуклеотидных пар.

1.2.3. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: «дидезокси метод»

Самым востребованным и распространенным способом секвенирования ДНК на сегодняшний день является «метод терминации цепи», или «дидезокси метод», разработанный Фредериком Сэнгером (Sanger et al., 1997). Дешевизна, точность, а также сравнительная простота автоматизации делает этот метод своеобразным «золотым стандартом» среди всех существующих способов определения последовательности нуклеотидных остатков ДНК. С использованием этого метода впервые был расшифрован весь геном человека, и именно метод Сэнгера до сих пор является рутинным в повседневной лабораторной практике. В основе метода тоже лежало ферментативное копирование с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из *E.coli*. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивали добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP (один из которых был радиоактивно мечен по альфа положению фосфата) еще и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы (рис. 11).

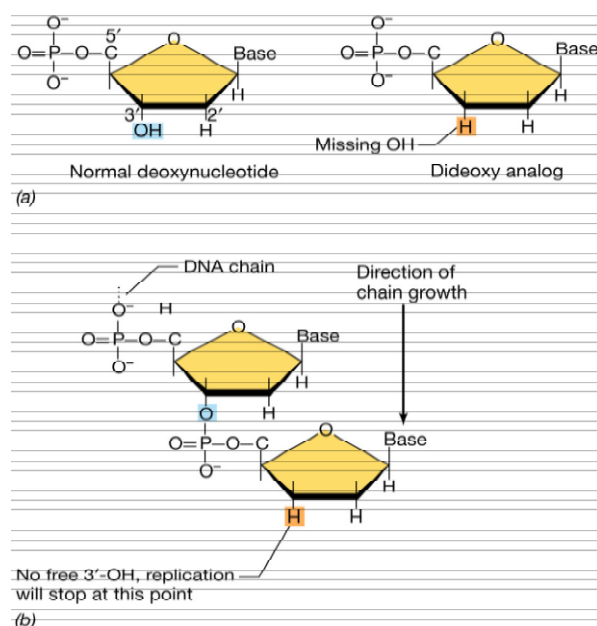


Рис. 11. Дидезоксинуклеозидтрифосфат (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP)

Отношение концентраций dNTP/ddNTP авторы подбирали экспериментально, так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требовалось провести четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой из реакций. После этого полученные продукты разгонялись в полиакриламидном геле на соседних дорожках и по расположению полос определялась последовательность нуклеотидов (рис. 12).

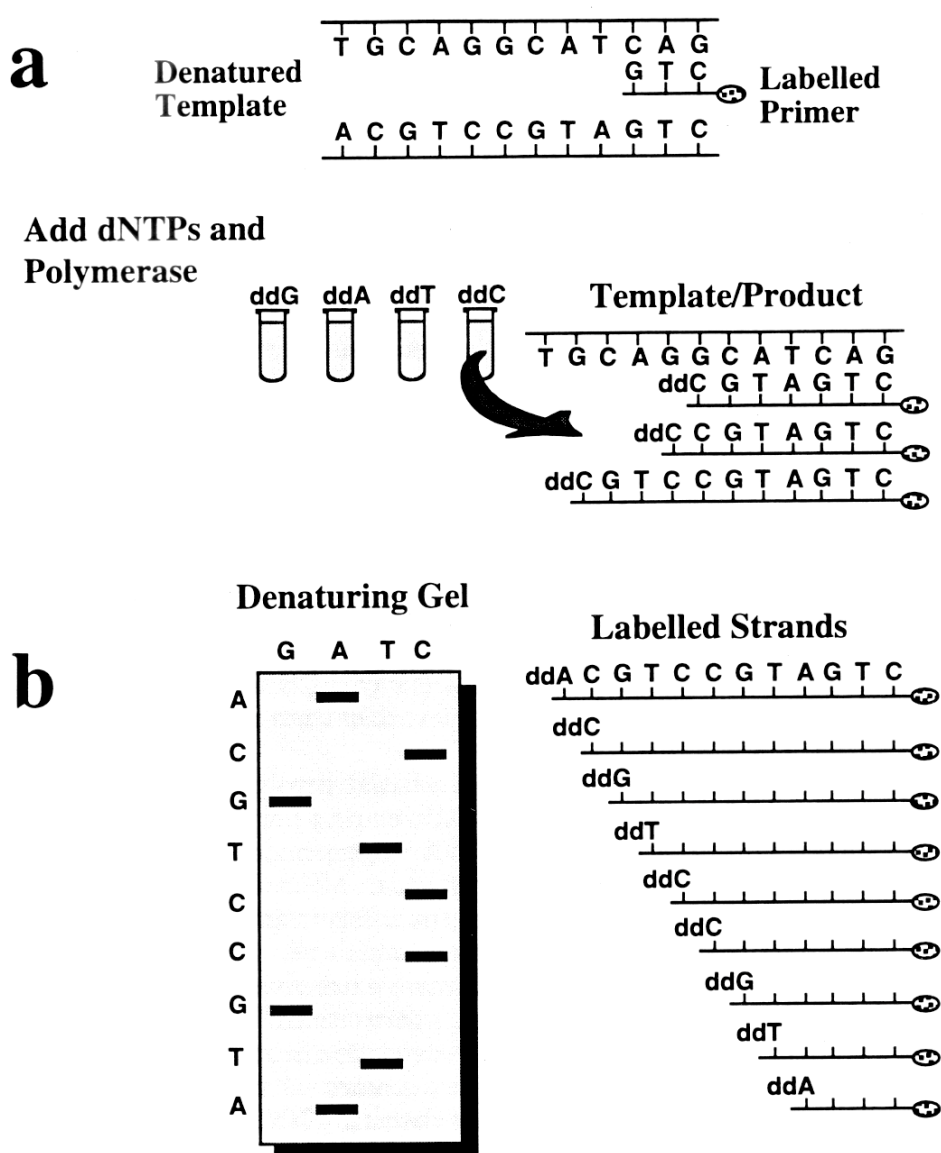


Рис. 12. Схема секвенирования ДНК по Сэнгеру («дидезокси метод»): **a** – ферментативная (терминирующая) реакция; **b** – электрофоретическое разделение фрагментов ДНК

1.2.4. Автоматическое секвенирование ДНК

В основе автоматического секвенирования лежит уже упоминавшийся выше метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP. Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: 1) проведение терминирующих реакций; 2) разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченых фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующий обсчет собранных данных. Таким образом, автоматическое секвенирование идеологически отличается от ручного секвенирования только типом используемой метки. Раньше вместо флуоресцентных маркеров для мечения использовался радиоактивный изотоп фосфора ^{32}P , что делало всю процедуру не особенно полезной для здоровья.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции согласно следующим схемам: 1) меченый праймер (четыре разных красителя) и немеченые терминаторы; 2) меченый праймер (один краситель) и немеченые терминаторы; 3) меченые терминаторы (каждый тип терминатора своим красителем) и немеченый праймер. Использование меченых праймеров предполагает проведение четырех независимых реакций (отдельно с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образца. Использование меченых терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется единственный краситель, то разделение продуктов сиквенсовой реакции в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красок позволяет разгонять продукты реакции(й) на одной дорожке.

Первый автоматический секвенатор ДНК был разработан в 1987 году фирмой Applied Biosystems (США). А наиболее успешной моделью в начале 90-х стал прибор ABI 373 (Applied Biosystems). В этой модели используется одновременная детекция четырех красителей-флуорофоров (TAMRA, FAM,

ROX, JOE), возбуждаемых излучением аргонового лазера. Лазер генерирует непрерывное излучение в сине-зеленой области спектра в диапазоне 488-514 нм. Разделение фрагментов проводится в геле толщиной 0.4 мм. Возбуждение флуорофора и следующая за этим эмиссия флуоресценции происходят при прохождении меченым фрагментом ДНК зоны сканирования. Для уменьшения эффекта перекрывания спектров эмиссии получаемый сигнал пропускается через колесо с четырьмя последовательно заменяемыми фильтрами. В результате первичные данные представляют собой наборы из четырех чисел (в соответствии с сигналом, прошедшим через каждый из фильтров) для каждой точки сканирования (по ширине геля), собранные через равные интервалы времени в течение всего электрофореза.

На смену прибора ABI 373 пришел секвенатор ABI Prism 377. Основное новшество этой машины заключается в замене оптической фильтрации флуоресценции, которая использовалась в ABI 373 для разделения спектров испускания красителей, на "виртуальную" фильтрацию. В процессе сканирования эмиссия флуоресценции отделяется от отраженного света лазера, рассеивается посредством дифракционной решетки (это позволяет разложить исходный световой пучок на спектральные составляющие) и, наконец, фиксируется CCD-камерой. В итоге кванты света преобразуются в пиксели во всем промежутке спектра от 514 до 680 нм. Какой именно набор пикселей преобразовать в пик на хроматограмме задается заранее через интерфейс программы Data Collection в зависимости от используемых флуорофоров и способа введения метки. Выпускается несколько модификаций ABI 377. Самый простой вариант обеспечивает автоматический обсчет 18 образцов, самый продвинутый – 96 образцов. Расстояние до точки сканирования (т.е. дистанция разгонки) может варьировать в зависимости от размеров используемых стекол и составлять 12, 36 или 48 см (при толщине геля 0.2 или 0.4 мм). Максимально возможный размер определяемых фрагментов – 800-900 нуклеотидов.

Схожая технология записи и обработки данных используется в другом секвенаторе фирмы Applied Biosystems – ABI Prism 310. Это однокапиллярный

секвенатор, способный в автоматическом режиме последовательно просканировать 96 образцов. Полный цикл для каждого из них составляет приблизительно полтора часа и включает: электрокинетическую инъекцию образца в капилляр, электрофорез, возбуждение/детекцию эмиссии флуоресценции и смену полимерного материала в капилляре перед инъекцией следующего образца. За указанное время ABI 310 способен прочесть приблизительно 450 нуклеотидов.

ABI Prism 310 стал пионером капиллярной технологии в секвенировании. Нынешнее поколение капиллярных секвенаторов представляет собой уже мультикапиллярные машины, некоторые из которых демонстрируют гораздо более высокую производительность даже в сравнении с ABI 377 (http://molbiol.ru/protocol/13_03.html).

В зависимости от поставленных задач можно остановить свой выбор на восьмикapиллярном Beckman CEQ 2000 (Beckman Coulter), двадцатичетырехкапиллярном секвенаторе ABI Prism 3500XL или 96 капиллярных ABI Prism 3700 и MegaBACE 1000 (Amersham-Pharmacia-Biotech-Molecular Dynamics).

1.3. Новые технологии секвенирования ДНК

1.3.1. Высокопроизводительное секвенирование ДНК

Новое поколение технологий расшифровки последовательности ДНК, позволяющее осуществлять прочтение генетических текстов с беспрецедентной скоростью и производительностью, нашло широкое применение в биомедицинских исследованиях и стало предпосылкой для впечатляющих научных достижений.

Высокопроизводительное секвенирование ДНК в настоящее время является, пожалуй, одной из самых стремительно развивающихся технологий, имеющих на вооружении современной молекулярной биологии. Гонка за геномом ценой в 1000 \$, набирающая все больше участников из числа

крупнейших биотехнологических и фармацевтических корпораций и небольших компаний из университетов, уже подарила ученым не одно поколение систем, способных читать человеческие геномы с высокой точностью, в рекордно сжатые сроки и по баснословно низкой (в сравнении с проектом «Геном человека») цене.

Большинство новых технологических разработок секвенирования ДНК направлено на миниатюризацию, мультиплексирование (в данном случае параллельное соединение низкопроизводительных блоков системы для повышения общей производительности) и автоматизацию процесса секвенирования. Все они могут быть разделены на два класса. Первый объединяет методы «секвенирования синтезом», в которых основания определяются по мере того как они встраиваются в растущую цепь ДНК. Ко второму классу относятся технологии расшифровки последовательности оснований единичной молекулы ДНК. Некоторые из них достаточно экзотичны – как, например, чтение нуклеотидных остатков ДНК электронным или оптическим способом по мере того, как молекула «протискивается» через нанопору. Длинный перечень улучшений системы капиллярного электрофореза в сочетании с возрастающей автоматизацией и усовершенствованием программного обеспечения позволили снизить стоимость секвенирования в 13 раз с тех пор, как первые автоматические секвенаторы появились в прошлом десятилетии.

Но все это выглядит несколько бледно на фоне возможностей новых технологий секвенирования (NSJ – Next Generation Sequencing, http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing#Next-generation_methods).

1.3.2. Принцип и основные этапы пиросеквенирования ДНК

Технология, разработанная компанией 454 Life Sciences, называется пирофосфатным секвенированием, или пиросеквенированием. Сама идея пиросеквенирования, надо сказать, не нова: она возникла еще в начале 90-х

годов прошлого века, но тогда заявивший о себе метод не сумел вытеснить традиционный «дидезокси метод» Сэнгера. Однако разработчики из 454 Life Sciences дополнили его возможностями современных нанотехнологий, и, как сказали бы любители диамата, количество перешло в качество. Поэтому точнее будет назвать метод «пиросеквенированием ДНК в плотно сфабрикованных пиколитровых реакторах».

Весь геном, все его молекулы ДНК, случайным образом фрагментируются на кусочки по 300–500 пар оснований. Затем комплементарные цепи фрагмента разделяются, к каждой цепи фрагментов пришивается одинаковый для всех олигонуклеотид-«адаптер», который позволяет отдельным цепям налипать на пластиковые бусинки. (Последовательность этого олигонуклеотида позволяет позднее, в процессе секвенирования, распознавать ДНК-матрицу.) При этом смесь разъединённых на комплементарные цепи фрагментов разбавляют таким образом, что каждая бусинка получает лишь по одной (!) индивидуальной цепи. Каждая бусинка оказывается заключённой в капельку, окружённую маслом и содержащую смесь для осуществления полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая и проходит отдельно в каждой капельке эмульсии (так называемая эмульсионная ПЦР, эПЦР). Это приводит к «клональной амплификации» цепей ДНК, а проще говоря, к тому, что на поверхности бусинки удерживается уже не одна, а около 10 млн копий («клонов») уникальной ДНК-матрицы. Далее эмульсия разрушается, вновь двуцепочечные фрагменты ДНК (образовавшиеся в ходе ПЦР) разделяются и бусинки, несущие одноцепочечные копии ДНК-матрицы, помещаются в лунки «предметного стекла» – слайда особой конструкции. Каждая лунка такого слайда образует отдельный пиколитровый «реактор», в котором и будет происходить реакция секвенирования.

Слайд представляет собой срез блока, полученного путем нескольких раундов вытягивания и сплавления оптических волокон. В результате каждой итерации диаметр индивидуальных волокон уменьшается по мере того, как волокна формируют пучки шестигранной упаковки увеличивающегося

поперечного диаметра. Каждое волокно имеет сердечник диаметром 44 мкм, окруженный 2-3 мкм слоем плакировки (оболочки). Затем сердечники вытравливаются, и в результате получаются лунки ≈ 55 мкм глубиной, с расстоянием ≈ 50 мкм между центрами соседних лунок. Объем таких «реакторов» – 75 пиколитров; плотность размещения на поверхности слайда – 480 лунок на квадратный миллиметр. Каждый слайд несет около 1,6 млн лунок, в каждую из которых попадает одна (!) бусинка с ДНК-матрицей. Слайд помещается в проточную камеру таким образом, что над отверстиями лунок создается канал высотой 300 мкм, по которому в лунки поступают необходимые реактивы.

Доставляемые в проточную камеру реактивы текут в слое, перпендикулярном оси лунок. Такая конфигурация позволяет одновременно осуществлять реакции на бусинках, несущих ДНК-матрицы, внутри отдельных лунок. Добавление и удаление реагентов и продуктов реакции происходит за счет конвекционного и диффузионного переноса. Временные рамки диффузии между потоком и лунками составляют порядка 10 секунд и зависят от высоты проточной камеры и глубины лунок. Глубина лунок тщательным образом рассчитана исходя из следующих соображений:

- 1) лунки должны быть достаточно глубокими, чтобы бусинки, несущие ДНК-матрицу, не выскакивали из них под действием конвекции;
- 2) лунки, должны быть достаточно глубокими, чтобы исключить диффузию продуктов реакции из лунок, где имело место включение нуклеотида, в лунки, где включения не произошло (см. ниже);
- 3) лунки должны быть мелкими на столько, на сколько требуется для осуществления быстрой диффузии нуклеотидов в лунку и быстрого вымывания оставшихся нуклеотидов и продуктов реакции в конце каждого цикла, что, в свою очередь, необходимо для обеспечения высокой продуктивности секвенирования и снижения расходов реактивов.

Помимо бусинок с ДНК-матрицей, в каждую лунку «насыпают» еще бусинок помельче – каждая с «сидящими» на ее поверхности (иммобилизованными) ферментами, необходимыми для пирофосфатного секвенирования. Нуклеотиды (одного вида за раз) и другие реактивы, необходимые для реакции секвенирования, подаются последовательно в проточную камеру, куда помещается слайд. Каждый раз, когда определенный нуклеотид встраивается в растущую цепь ДНК в какой-нибудь из лунок, в ней высвобождается молекула пирофосфата, которая, в свою очередь, является необходимым предшественником компонента другой ферментативной реакции. Ее катализирует особый фермент, люцифераза светлячка *Photinus pyralis*. Но для ее осуществления необходим аденозинтрифосфат (АТФ). Новообразованный пирофосфат превращается в лунке в АТФ под действием еще одного фермента — АТФ-сульфуриказы. И тогда люцифераза окисляет люциферин до оксилуциферина, а эта реакция сопровождается хемилюминесценцией – по-простому, маленькой вспышкой света. Дно слайда находится в оптическом контакте с оптико-волоконным световодом, подключенным к прибору с зарядовой связью (CCD-сенсор, *charge coupled device*). Это позволяет регистрировать излучаемые фотоны со дна каждой индивидуальной лунки, в которой произошло встраивание известного нуклеотида (общая схема пиросеквенирования дана в прил. 3, рис. 1).

Связывая зарегистрированные от каждой лунки вспышки с типом нуклеотида, присутствующего в проточной камере в данный момент времени, компьютер последовательно отслеживает рост цепочек ДНК в сотнях тысяч лунок одновременно. Время, необходимое для протекания ферментативной реакции, производящей детектируемую «вспышку», составляет порядка 0,02–1,5 секунд. Скорость реакции определяется скоростью массопереноса, что оставляет место для улучшений за счет ускорения доставки реактивов. После поступления в проточную камеру каждого нуклеотида она промывается раствором, содержащим фермент апиразу. Таким образом, перед тем, как

«запустить» в камеру следующий нуклеотид, из всех лунок удаляются любые нуклеотиды, оставшиеся там от предыдущего раунда.

Включение того или иного нуклеотида детектируется в результате высвобождения неорганического пирофосфата и последующего излучения света. Определить лунки, содержащие бусинки с ДНК-матрицей, можно, прочитав «последовательность-ключ» адаптерного олигонуклеотида, пришитого к началу каждой ДНК-матрицы. Из регистрируемого сигнала вычитается уровень фона, затем сигнал нормализуется и корректируется. Интенсивность нормализованного сигнала для каждой конкретной лунки во время поступления в проточную камеру определенного нуклеотида пропорциональна числу встроенных нуклеотидов, если таковые имеются. Линейность зависимости сохраняется для гомополимеров длиной как минимум в восемь нуклеотидов. При таком секвенировании синтезом очень небольшое число ДНК-матриц на каждой бусинке теряет синхронизм, т. е. вырываются вперед или начинают отставать от других матриц. Причиной этого прежде всего являются остающиеся в лунке нуклеотиды или неполное удлинение цепи. Исправление таких сдвигов необходимо, поскольку потеря синхронизма создает кумулятивный эффект, значительно снижающий качество прочтения при увеличении его длины.

Исходя из подробной модели лежащих в основе этого эффекта физических процессов сотрудники компании 454 разработали особый алгоритм, позволяющий оценивать и вносить поправки на «перелет» и неполную достройку цепи, происходящие в отдельных лунках.

Перед тем, как составить и «записать» окончательную последовательность прочитанной ДНК, из всего массива данных для дальнейшей работы необходимо отобрать высококачественные прочтения и отбросить некачественные. Отбор основывается на наблюдении, что в прочтениях низкого качества велика доля сигналов, не позволяющих отличить циклы, в течение которых произошло включение нуклеотида, от циклов без включения. Такие двусмысленные сигналы – причина ошибок

в записи последовательности отдельных прочтений. Чтобы увеличить число пригодных для использования прочтений, компанией 454 была разработана особая мера, позволяющая оценивать *ab initio* вероятность правильного определения нуклеотида в каждой конкретной позиции отдельных прочтений.

Высокая точность расшифровки последовательности достигается тем, что система осуществляет многочисленное прочтение одного и того же фрагмента, что позволяет построить единую обобщенную (так называемую консенсусную) последовательность. Отдельные прочтения одного и того же участка ДНК выравниваются относительно друг друга исходя из интенсивности сигналов в момент протекания через камеру того или иного нуклеотида, а не на основе последовательности этих прочтений. Затем соответствующие сигналы усредняют и только тогда записывают полученную последовательность. Такой подход значительно улучшает качество расшифровки последовательности и предоставляет возможность оценки ее качества.

Схема Roche (454) Genome Sequencer FLX (2007) представлена в прил.3, рис.2, 3.

1.3.3. Возможности и достижения технологии пиросеквенирования

В 2005 году ученые из фирмы 454 Life Sciences, используя свою технологию, сумели расшифровать 600 000-нуклеотидный геном бактерии *Mycoplasma genitalium* с точностью 99.4%, а также 2 100 000-нуклеотидный геном *Streptococcus pneumoniae*.

В статье, где впервые был представлен и опробован новый метод (Margulies *et al.*, 2005), сообщается, что весь геном *Mycoplasma genitalium* был прочтен за один раз(!). Сначала весь геном был фрагментирован и превращен в библиотеку кусочков ДНК, как описано выше (труд одного человека на протяжении 4 часов). После полимеразной цепной реакции в эмульсии (эПЦР) и помещения полученных бусинок с ДНК-матрицами на 60 мм² слайд (на что одному сотруднику потребовалось 6 часов) процесс

завершился 4-часовой автоматической работой инструмента, состоящей из 42 циклов. В результате сборки прочитанных последовательностей (каждый около 108 пар оснований) были получены 25 отдельных непрерывных фрагментов, так называемых *контигов*, средней длиной в 22,4 тысяч пар оснований. Эти фрагменты покрыли около 96,54% всего генома микоплазмы. Из оставшихся не прочтенными 4,6% генома 3% приходились на неразрешимые повторы. Таким образом, за один раз было секвенировано 99.5% уникальной последовательности генома.

Первые проекты с участием инструмента Roche 454 GS20 заключались лишь в «перечитывании» (ресеквенировании, *resequencing*) уже расшифрованных бактериальных геномов и подкреплении дополнительными данными уже идущих больших «Сэнгеровских проектов».

В то же время исследования в области метагеномики, помимо работы с огромными массивами данных, порою бóльшими, чем геном человека, страдали от искажений, вносимых на стадиях конструирования библиотек и клонирования фрагментов для секвенирования. В этом смысле технология 454, сочетающая эПЦР и пиросеквенирование, обладает неоспоримым преимуществом перед методом Сэнгера. Эмульсионная ПЦР позволяет амплифицировать без всяких предпочтений единичные молекулы ДНК, заключая их в капельку эмульсии и устраняя конкуренцию со стороны других ДНК-матриц за ограниченное число ДНК-полимераз. Пиросеквенирование, в свою очередь, осуществляет параллельное прочтение этих матриц со световым сигналом на выходе, который может считываться компьютером. Первые подобные исследования, опубликованные в 2006 году, показали необыкновенную гибкость метода нового поколения, использованного при изучении микробного многообразия подземных экосистем глубокой шахты (Edwards et al., 2006), глубоководных морских экосистем (Sogin et al., 2006), морских вирусных «сообществ» («виромов») в нескольких океанах (Angly et al., 2006). Прибор для секвенирования ДНК нового поколения может производить за сутки столько же данных, сколько несколько сотен

сэнгеровских капиллярных секвенаторов, но управляется одним человеком (прил.3, рис. 2).

На клеточном уровне секвенирование нового поколения (здесь и далее речь идёт не только о пиросеквенировании, но и о других новых методах секвенирования синтезом) впервые позволяет учёным идентифицировать мутации в любом организме для всего генома. Так были найдены аллели, отвечающие за устойчивость к антибиотику у *Mycobacterium tuberculosis* (Andries et al., 2005), а также идентифицированы все мутации в геноме размером в 9 млн пар оснований у штамма бактерии, эволюционировавшей на протяжении 1000 поколений (Velicer et al., 2006). Эти ранние попытки продемонстрировали не только способность новой технологии обнаруживать мутации и ошибки в опубликованных научных статьях, но и связанные с ее использованием трудности, такие как ошибки прочтения гомополимерных последовательностей при пиросеквенировании (454) или быстрое уменьшение качества прочтения ближе к 3'-концу последовательности в системах с короткой длиной индивидуальных прочтений (Solexa или SOLiD от Applied Biosystem).

Раньше для преодоления этих трудностей данные, полученные пиросеквенированием, дополняли информацией, полученной классическим сэнгеровским путем (Goldberg et al., 2006). Но поскольку стоимость и затраты, требуемые сэнгеровской составляющей эксперимента, остаются отталкивающе высокими, многие лаборатории сегодня полагаются только на методы нового поколения, обычно сочетая относительно длинные прочтения пиросеквенирования с короткими, но дешевыми (а значит, и многочисленными) прочтениями, осуществляемыми системами Solexa и SOLiD. Такое сочетание различных платформ позволяет производить независимую оценку качества их работы, а также проверять эталонные последовательности, хранящиеся в общественных базах данных.

Получение большого количества последовательностей ДНК из различных близкородственных организмов движет вперед и развивает подход, названный

повторным секвенированием (resequencing), в котором работа с последовательностями ведется иначе, чем при сборке свежесеквенированного генома. При повторном секвенировании сборка направляется уже имеющейся под рукой эталонной последовательностью и поэтому требует значительно меньшего покрытия (8–12 кратного), чем при сборке генома *de novo* (25–70-ти кратного). Этот подход был применен в работе по расшифровке 10 митохондриальных геномов млекопитающих (Gilbert et al., 2007), которая сделала возможными исследования в области генетики популяций, основанные не на коротких отрезках последовательности, а на полных геномах митохондрий. В настоящий момент многочисленные проекты по расшифровке микробных геномов ведутся не только для расширения списка доступных геномов, но и для проведения будущих сравнительных исследований, сопоставляющих генотип и фенотип организма на геномном уровне.

Далеко может продвинуться также работа по изучению организмов, которая не предусмотрена в планах по геномному секвенированию, благодаря возможностям новых методов секвенирования напрямую расшифровывать последовательности транскриптов (точнее, кДНК – ДНК-копий матричных РНК) в клетке. Изучение транскриптов посредством прямого секвенирования обладает рядом преимуществ перед методом гибридизации на ДНК-микрочипах. Главное здесь то, что секвенирование не требует знаний о геномной последовательности организма *a priori*, поскольку последовательность транскрипта можно немедленно сравнить с эталонной последовательностью близкородственного вида из базы данных, используя стандартные алгоритмы биоинформатики. Знание последовательностей транскриптов может в корне изменить исследования организмов, геномы которых сегодня не стоят в очереди на расшифровку, а в ряде случаев никогда там и не окажутся. Первые работы в этой области показали, что существует возможность сопоставлять последовательности (кДНК и геномные, соответственно) двух таких далеких друг от друга видов, как бобовое *Meticago truncatula* и растение-эталон *Arabidopsis thaliana* (Cheung et al., 2006). Также

было обнаружено множество не описанных ранее транскриптов кукурузы *Zea mays* (Ohtsu et al., 2007).

Прямой анализ транскриптов поможет обойти проблему, которая связана с организмами, обладающими непомерно большими геномами. Несмотря на успешную расшифровку вирусных, бактериальных и больших геномов млекопитающих, метод Сэнгера оставил задачу по расшифровке геномов полиплоидных растений своим преемникам. Эти гигантские геномы, частенько принадлежащие важным хозяйственным растениям (например, геном пшеницы составляет 16 млрд пар оснований), делали все предыдущие попытки по расшифровке бесплодными. Однако перспектива дешевого секвенирования экспрессируемых участков генома (т.е. транскриптов) позволяет надеяться на успешное изучение геномов растений хотя бы на функциональном уровне.

И наконец, новые методы секвенирования имеют практическое применение и в медицине. Например, в генетике раковых заболеваний, специфические раковые аллели могут быть отслежены в тканях посредством высокопроизводительного секвенирования геномной ДНК в тех случаях, когда метод Сэнгера терпит поражение (Thomas et al., 2007). И здесь большим преимуществом нового метода оборачивается многократное прочтение последовательности.

1.3.4. Новые достижения с использованием технологии пиросеквенирования (Roche 454 Life Sciences)

(<http://molbiol.ru/forums/lofiversion/index.php/t13511.html>)

Пример 1. Исследовательский консорциум объявил о значительном прогрессе в заполнении пробелов и открытии новых генов в референсной последовательности генома человека.

(<http://www.pressebox.com/pressrelease/roche-diagnostics-gmbh/Research-Consortium-Announces-Significant-Progress-to-Close-Gaps-and-Uncover-Novel-Genes-in-the-Human-Reference-Genome-Sequence/boxid/576146>).

Технология получения длинных последовательностей высокого качества

открывает доступ к ранее несеквенированным участкам референсного генома человека.

Компания Roche анонсировала, что консорциум, включающий исследователей из Университета штата Пенсильвания, Национального центра биотехнологической информации, Исследовательского института Оклендского детского госпиталя и Roche 454 Life Sciences, работает над новой полной сборкой *de novo* генома человека с целью расширения и дополнения референсной последовательности генома человека. Команда представила последние результаты работы на конгрессе «Достижения геномной биологии и технологии» (AGBT) в Марко-Айленде, Флорида. Под руководством Стефана Шустера (Stephan Schuster), профессора Университета штата Пенсильвания, консорциум занимается анализом и сборкой референсного генома человека RP11. Работа направлена на заполнение пробелов в исследовании референсного генома человека с помощью секвенатора новой модели 454 GS FLX+ (Roche). Данная сборка *de novo* стала самой полной из существующих для референсного генома человека, полученных с помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS). Протяженность и смыкание новой сборки соответствует сборкам, полученным ранее с помощью метода Сэнгера, включая геном J. Craig Venter (HuRef), опубликованный в 2007 году. Всего новая сборка перекрывает полностью 76 остававшихся пробелов и 13 новых участков повторов; выявлены 36 млн оснований новой геномной последовательности.

“Я удовлетворен прогрессом в нашем проекте и высоким качеством сборки последовательности даже на этом раннем этапе, – заявил Стефан Шустер (Stephan Schuster). – Технология 454 Sequencing доказала возможность секвенирования полного генома человека с покрытием и протяженностью считывания, подобным секвенированию референсных геномов методом Сэнгера”.

Данная черновая сборка была получена на основе гибрида длинных последовательностей 18X 454 GS FLX+ и коротких последовательностей 7.5X полученных на платформах Illumina MiSeq и HiSeq. Сборка генома *de novo*

была выполнена с помощью программы Roche 454 GS De Novo Assembler (Newbler). Ожидается, что значительные усилия, прилагаемые в настоящее время для добавления новых последовательностей и применения разных стратегий биоинформатики, позволят повысить смыкаемость сборки и качество конечных результатов, которые будут открыты для научного сообщества.

О геноме RP11 и референсной последовательности генома человека

Для проекта «Геном человека» (HGP), опубликованного в 2001 году, исследователи собирали образцы ДНК от большого числа доноров, мужчин и женщин. Только несколько из большого числа собранных образцов были использованы в качестве источника ДНК для проекта, при этом доноры ДНК были зашифрованы, чтобы ни доноры, ни исследователи не знали, чья ДНК была подвергнута секвенированию. По соображениям качества большая часть (~70%) референсной последовательности генома человека (обозначаемой в настоящее время как GRCh37), изначально полученной в проекте HGP и используемой теперь в работе Консорциума референсного генома, была получена от одного анонимного донора мужчины из Буффало, штат Нью-Йорк, методом секвенирования случайных перекрывающихся фрагментов (shotgun) клонов из библиотеки “RP11” ВАС. Образцы этой оригинальной ДНК использовали в данном новом проекте сборки, образцы были предоставлены доктором Pieter de Jong из Исследовательского института Оклендского детского госпиталя.

На текущий момент черновая сборка перекрывает значительное число пробелов, существовавших в референсной последовательности генома человека, и выявила 36 млн оснований новых последовательностей, включая новые гены, имеющие потенциальное биологическое значение.

“Мы горды тем, что смогли сделать вклад в такой важный проект с помощью уникальной технологии секвенирования, позволяющей получать длинные прочтения, – заявил Дэн Забровски (Dan Zabrowski), глава Roche Applied Science. – Этот проект продемонстрировал результативность объединения инновационных технологий секвенирования и сборки

последовательностей”.

Пример 2. Путем 454 секвенирования 16S рРНК в метагеномном исследовании были установлены механизмы взаимодействия между кишечной микрофлорой и хорошо известной связью между употреблением красного мяса и заболеванием сердца (Koeth et al., 2013).

Установлено, что бактерии, формирующие микробиом человека, значительно влияют на метаболизм пищи. Последние исследования, проведенные в Кливлендской клинике (Огайо, США), показали, что триметиламин N-оксид (ТМАО), связанный с развитием заболеваний сердца и атеросклероза в экспериментах на мышах, вырабатывается при расщеплении бактериями, обитающими в кишечнике, L-карнитина, содержащегося в большом количестве в красном мясе.

В ходе исследования 77 добровольцев, включая 26 веганов и вегетарианцев, употребляли в пищу большие филейные стейки. Было выявлено увеличение уровней ТМАО через несколько часов после поедания мяса только у лиц, употреблявших мясо регулярно, у веганов и вегетарианцев подъем уровней ТМАО отсутствовал. После того, как участники эксперимента получали антибиотики, уничтожавшие кишечную микрофлору, после поедания мяса уровни ТМАО не повышались. Таким образом, установлено, что конверсия L-карнитина в ТМАО происходила только в присутствии бактерий.

С помощью технологии 454 был проведен анализ микробиома участников исследования, основанный на метагеномном анализе 16S рРНК, выделенной из образцов стула. Оказалось, что микробиом веганов и вегетарианцев значительно отличался от микробиома лиц, регулярно употреблявших мясо, что коррелировало с уровнями ТМАО в плазме.

Эксперименты на мышах, сопровождавшиеся секвенированием 16S рРНК, показали, что скармливание L-карнитина повышало в два раза риск развития атеросклеротических бляшек только у мышей, имевших нормальную микрофлору. После удаления микрофлоры с помощью антибиотиков, добавление в корм L-карнитина не приводило к образованию

атеросклеротических бляшек. Таким образом, анализ кишечной микробиоты способствует пониманию механизмов, лежащих в основе хорошо известной связи между высокими уровнями потребления красного мяса и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний.

1.3.5. Перспективы развития технологии секвенирования (геномные секвенаторы Illumina и Life Technologies)

Несмотря на то, что новые методы секвенирования ДНК позволили оптимизировать большое количество всевозможных исследований, что было невозможно еще в недалеком прошлом, ученым и инженерам, занимающимся разработкой этих технологий, равно как и компаниям, продвигающим эти технологии на рынке, предстоит многое сделать в этом направлении. Прежде всего необходимо снизить стоимость: ее уменьшение на один-два порядка сделает возможной персональную геномику, цель которой — повторное секвенирование индивидуальных геномов по цене, не превышающей \$ 1000. Вместе с этим снижение процента ошибок будет также горячо приветствоваться не только для методов следующего поколения, но и для метода Сэнгера, остающегося востребованным и в обозримом будущем. Возможно, появятся искусственно изменённые специализированные ДНК-полимеразы, предоставляющие информацию о последовательности ДНК в виде испускаемого светового сигнала. По мере снижения стоимости технологий количество накапливаемой информации будет расти лавинообразно, что может создать «узкое место» в исследованиях. Поэтому часть усилий по разработке новых технологий секвенирования необходимо направить на развитие биоинформатических методических приемов.

В настоящее время производительность некоторых секвенаторов измеряется уже сотнями миллиардов пар оснований, что позволяет подобным приборам сканировать индивидуальный геном человека всего за несколько дней. В результате стоимость заказного секвенирования геномов уже к

середине 2011 года понизилась до \$ 5000 (при заказе секвенирования 10 и более образцов).

Для полногеномного секвенирования, которое необходимо для персонализации медицины, сегодня на рынке доминируют геномные секвенаторы двух компаний – Illumina и Life Technologies. Это флуоресцентные секвенаторы последнего поколения (прил. 3, рис. 4) HiSeq 1000 и HiSeq 2000 (Illumina) и SOLID 5500 и 5500xl (Life Technologies).

Подобные приборы являются специализированными флуоресцентными микроскопами, способными сканировать при большом увеличении тысячи полей зрения, объединять их в общую панорамную картину и определять спектральные характеристики флуоресценции микронных объектов, общее количество которых может достигать миллиарда. Стоимость флуоресцентных секвенаторов измеряется сотнями тысяч долларов, причем объемы получаемой ими информации настолько велики, что для обработки данных необходим специальный мощный сервер.

Высокая производительность медлительных флуоресцентных технологий хороша для полногеномного секвенирования, необходимого для персонализации медицины. Это одна из главных задач медицины будущего, но имеется множество менее амбициозных задач, для решения которых требуются экспрессные и дешевые секвенаторы. До недавних пор эту нишу занимали пиросеквенаторы компании Roche, но сейчас их быстро вытесняет появившийся в продаже в начале 2011 года полупроводниковый секвенатор PGM (Personal Genome Machine), разработанный компанией Ion Torrent. Приборы подобного типа и необходимые для их работы реагенты могут заметно подешеветь уже в ближайшем будущем.

1.3.6. Технология секвенирования ДНК Ion Torrent

Компания Ion Torrent в конце 2010 года выпустила первый полупроводниковый секвенатор PGM (прил. 3, рис. 5). «Сердцем» такого

прибора является небольшой полупроводниковый чип (прил. 3, рис. 7), на поверхности которого располагаются более миллиона pH-чувствительных микросенсоров. Основные стадии полупроводникового секвенирования показаны на рис. 6 в прил. 3.

Включение нуклеотидов в ДНК вызывает небольшое снижение pH в прилегающих к микросенсорам лунках, что позволяет читать нуклеотидные последовательности по наличию или отсутствию изменения pH при пропускании через проточную ячейку индивидуальных субстратов ДНК-полимеразы (дезоксинуклеозидтрифосфатов dATP, dGTP, dTTP и dCTP).

Подробно описание технологии полупроводникового секвенирования приведено в статье «Секвенирование по Ротбергу. (Потенциал полупроводникового секвенирования)» (Зубов, 2013).

Первым образцом, исследованным с помощью инновационной технологии Ion Torrent, стал геном бактерии *Escherichia coli*, а точнее, ее патогенного энтерогеморрагического штамма O104:H4 (Cheung et al., 2011; имеет ген потенциально смертоносного Shiga-токсина), мгновенно распространившегося по Европе не без помощи печально известных испанских огурцов-убийц (killer-gurken aus Spanien). Эта вспышка, унесшая 40 жизней и отправившая в больницы тысячи людей, была взята под контроль эпидемиологами во многом благодаря беспрецедентной скорости, с которой была получена последовательность ДНК *E. coli* O104:H4. Знание генома патогена было необходимо врачам для разработки действенных методов диагностики и лечения инфекционного заболевания. Как только последовательность ДНК была получена, были разработаны тест-системы для выявления штамма с помощью количественной ПЦР.

В 8:30 утра 30 мая был запущен секвенатор Ion Torrent PGM™ в лаборатории корпорации Life Technologies в Дармштате, а уже в 19:29 в University Hospital Muenster была завершена разработка тест-систем. Спустя несколько дней, геном был независимо прочитан на таком же приборе в лаборатории Пекинского геномного института, а затем доработан и уточнен

с использованием данных, полученных на более мощных (но не столь скоростных) платформах Roche 454 и Illumina HiSeq. Микрочип, используемый в приборе Ion Torrent PGMTM для секвенирования ДНК, изображен на рис. 7 в прил. 3.

Стоит отметить, что на сегодняшний день это единственная технология секвенирования, никоим образом не задеиствующая свет. Все другие современные технологии в основе своей опираются на флуоресценцию (Сэнгер, SOLiD, Illumina, Pacific Biosciences, Helicos) или люминесценцию (Roche 454, пиросеквенирование). Потенциально это многократно снижает накладные расходы (не требуются дорогостоящие флуоресцентные реактивы), что и является одним из главных преимуществ технологии (<http://bioinformatics.ru/Misc/genseq-roadmap.html>).

1.3.7. Платформы ДНК-секвенирования 3-го поколения

В настоящее время появились и активно развиваются платформы ДНК-секвенирования "третьего поколения" (NGS-3), представленные приборами Helicos Heliscope (Helicos BioScience Corporation), PacBio RS SMRT (Pacific Biosciences) и MinION (Oxford Nanopore). Третье поколение отличается от второго тем, что первичная амплификация ДНК больше не требуется. Исследуемая ДНК секвенируется непосредственно на уровне одной молекулы с использованием специально созданных полимераз. Преимуществом этого подхода является то, что удастся избежать проблем, связанных с накоплением ошибок, возникающих при амплификации ДНК. Принцип работы одного из приборов «третьего поколения» секвенатора PacBio (Pacific Biosciences) очень похож на принцип работы технологии Illumina, но у него по-другому устроен метод детектирования – специальные «решетки» позволяют уловить сигналы от отдельных молекул (метод получил название SMRT, single molecule real time sequencing) (прил. 3, рис. 8). Это позволяет ускорить процесс, уместить больше ридов на одной подложке (нужно меньше клонировать ДНК, не нужно выращивать большие кластеры) и существенно увеличить длину надёжно

прочитываемых последовательностей ДНК. Таким образом, наличие множества платформ и значительное снижение стоимости секвенирования приведут к тому, что технологии нового поколения внесут основной вклад в развитие фундаментальной биологии и практической медицины в будущем. Стоимость в размере \$ 1000 за секвенирование одного генома позволит распространить метод полногеномного секвенирования и войти в обычную практику клинической диагностики (Service, 2006). Полногеномное секвенирование, как ожидается, станет основой для новой области медицины – так называемой индивидуальной, или персональной, медицины (personalized medicine) (Kahvejian et al, 2008; Boguski et al, 2009). Целью индивидуальной медицины станет интеграция клинических симптомов, индивидуальной и семейной истории болезней и последовательности ДНК пациента в медицину нового уровня, которая будет индивидуальна и уникальна (Diamandis et al, 2010).

РАЗДЕЛ 2. АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Мобильные генетические элементы

2.1.1. *Строение и механизмы перемещения ретротранспозонов*

Перемещающиеся элементы в геноме кукурузы впервые установила Барбара Мак Клинтон (McClintok, 1956). ДНК мобильных элементов у дрозофилы была выделена и клонирована группами Г.П. Георгиева и В.А. Гвоздева в СССР и Д. Хогнесса в США. В русскоязычной литературе мобильные элементы были названы МДГ (мобильные диспергированные гены), а в англоязычной – *copia*-подобные элементы. В настоящее время элементы такого типа принято называть ретротранспозонами (Ilyin et al., 1978; Любомирская, Ильин, 1999).

Обычно мобильные элементы подразделяют на две основные категории, или два класса, в зависимости от механизма их транспозиции, ретротранспозоны (1-й класс) и ДНК-транспозоны (2-й класс). Традиционно ретротранспозоны, в свою очередь, делят на два основных подкласса, в зависимости от того, содержат ли они на своих концах ДКП (длинные концевые повторы) или LTR (Long Terminal Repeats). Эти подклассы называют соответственно, ДКП-содержащими (LTR-ретротранспозоны) и ДКП-несодержащими (не-LTR-ретротранспозоны) элементами, или повторами типа LINE (Long Interspersed Elements). ДКП могут иметь разную длину в разных семействах мобильных элементов (от нескольких сот до двух тысяч нуклеотидов) и кодируют информацию, необходимую для прямой и обратной транскрипции данного элемента и внедрение его ДНКовой копии в геном хозяина (Евгеньев, 2007).

LTR-ретротранспозоны по своей структуре похожи на проретровирусы позвоночных, но значительно разнообразнее их. Ретроэлементы содержат «тело» размером 5-8 тыс. п.н., ограниченное прямыми длинными концевыми

повторами, обычно содержащими по 300-400 п.н. Количество копий этих элементов, принадлежащих к одному семейству, достаточно постоянно для вида, но варьирует от нескольких копий до сотен тысяч копий в зависимости от типа ретротранспозона. Ретротранспозоны, относящиеся к разным семействам, не имеют протяженных гомологий нуклеотидных последовательностей ни в ДКП, ни в «теле». В составе «тела» элемента (рис. 13) обнаруживаются открытые рамки считывания (*ORF*) для обратной транскриптазы и нуклеазы (интегразы). Они содержат одну, две, реже три *ORF*, которые обычно кодируют продукты *gag* и *pol* (протеаза, или PR, обратная транскриптаза, или RT, интегразы, или IN, и РНКазы H).

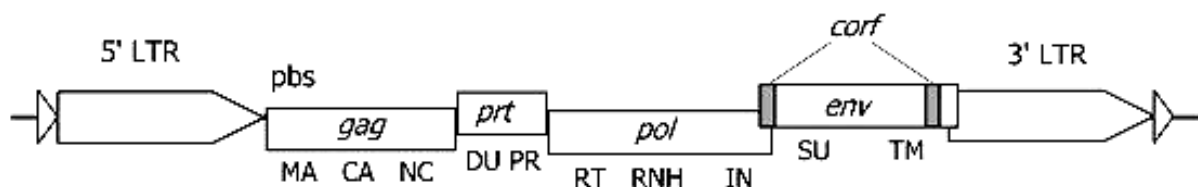


Рис. 13. Общая схема LTR ретротранспозона (<http://labcfg.ibch.ru/HomeRus.html>).

Белыми прямоугольниками обозначены *ORF* (открытые рамки считывания), соответствующие ретровирусным генам: **gag** - group specific antigen кодирует белок основного капсида (**CA**), белок ядерного капсида (**NC**) и белок матрикса (**MA**); **prt** - кодирует дУТФазу (**DU**) и протеазу (**PR**); **pol** - полимеразы кодирует обратную транскриптазу (**RT**), РНКазу H (**RNH**) и интегразу (**IN**); **env** - липопротеиновая оболочка кодирует трансмембранный (**TM**) и поверхностный (**SU**) белки. Черными прямоугольниками обозначен ген **corf**, кодирующий вспомогательный белок **CORF**. **PBS** - участок связывания тРНК затравки; **LTR** - длинный концевой повтор. Белые треугольники по краям обозначают дубликации сайта мишени (**TSD**)

По принципу организации области *pol* LTR-ретротранспозоны из самых разных организмов делятся на две обширные эволюционно связанные между собой группы. В группе *Ty1-copia* ген интегразы предшествует гену обратной транскриптазы, а в группе *gypsy*, как и у проретровирусов, домен интегразы следует за доменами обратной транскриптазы и РНКазы H (Archipova et al., 2003).

Ретротранспозоны используют как промежуточный этап жизненного цикла копирование своей РНК в ДНК с помощью обратной транскрипции в ДНК-

копию, которая встраивается в ДНК хозяина с помощью интегразы (Kumar, Bennetzen, 1999; Wicker et al., 2007). Последовательности ретротранспозонов несут регуляторные сайты (промоторы), опознаваемые ядерными факторами инициализации транскрипции для синтеза РНК, полимеразы II и III. Фермент, осуществляющий эту реакцию синтеза ДНК на РНК, называют обратной транскриптазой или (в русской литературе) ревертазой. Обратная транскриптаза не только ведет синтез нити ДНК на РНК, но и осуществляет синтез второй комплементарной нити ДНК, а РНК-матрица распадается и удаляется. Двунитевая ДНК синтезируется в цитоплазме, а затем перемещается в ядро и может встроиться в геном.

Ретротранспозон как обычный ген стабильно наследуется в ряду поколений. ДКП необходимы для транскрипции ретротранспозона и его репликации. Левый повтор содержит промотор, с которым взаимодействует РНК-полимераза, начинающая синтез РНК. Синтезированная молекула РНК, равно как и РНК из вирусной частицы, заразившей клетку, транслируется с образованием белков-ферментов, необходимых для синтеза ДНК ретротранспозона и его внедрения в геном, а также белков самой вирусной частицы. Для встраивания (интеграции) ДНК ретротранспозона необходим фермент интегразы, разрезающий ДНК-мишень и сходный по механизму своего действия с транспозазой. Наличие ДКП не только обеспечивает транскрипцию, но и полноценную репликацию провируса с двумя ДКП (Гвоздев, 1998).

Большая часть последовательностей ретротранспозонов инактивирована мутациями и транскрибируется только частично. У разных видов конкретные ретротранспозоны могут быть полностью неактивными, редко активными или постоянно активными (Kalendar et al., 2000).

Ретротранспозоны обнаружены как в активном эухроматине, так и в функционально неактивном гетерохроматине. Способность этих элементов перемещаться по геному и встраиваться в различные места обуславливает изменения функционирования соседствующих с ними генов (Ananiev et al., 1978; Любомирская, Ильин, 1999).

2.1.2. Структурная и функциональная роль мобильных генетических элементов

Обычно перемещения мобильных элементов не направлены и довольно редки. Они происходят с частотой около $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-8}$, о чем можно судить по частоте ревертирования мутантов, возникших в результате внедрения этих элементов в непосредственной близости от генов или внутрь конкретных генов. Естественно, что появление точечных мутаций – главное и наиболее заметное проявление множественных транспозиций мобильных элементов. Этим, однако, отнюдь не исчерпываются возможные последствия "транспозиционных взрывов" (Gerasimova et al., 1985). Другое весьма распространенное проявление массовых транспозиций мобильных элементов – появление различных хромосомных перестроек в результате эктопического гомологического спаривания между копиями мобильных элементов, принадлежащими к одному и тому же семейству и находящимися в разных местах генома (Arkhipova et al., 2003). Именно такие масштабные перестройки генома, ведущие к его реорганизации, могут быть примером "макромутаций" и служить источником коренной трансформации генома вида-хозяина и в некоторых случаях приводить к возникновению новых репродуктивно изолированных форм (Евгеньев, 2007).

Встраивание ретротранспозонов рядом с геном может повлечь неожиданно экспрессию гена в той ткани и на той стадии развития организма, когда ген обычно не экспрессируется. У растений нуклеотидные последовательности нескольких внедрившихся друг в друга ретротранспозонов могут составить протяженный регуляторный район (около 500 нуклеотидных пар). Например, это показано для гена, определяющего развитие пыльца. Ретротранспозоны, как и транспозоны, предпочтительно внедряются в регуляторные области гена: там, где нарушена строгая нуклеосомная структура и где участки ДНК более доступны для транспозаз и интеграз, осуществляющих ферментативный процесс перемещения. Это обстоятельство и приводит к тому, что подвижные

элементы играют столь большую роль в изменчивости и эволюции регуляторных районов генов (Гвоздев, 1998).

Структурная и функциональная роль ретротранспозонов состоит в том, что они могут препятствовать укорачиванию хромосомы. Ретротранспозоны перемещаются, образуя повторяющуюся структуру, в которой элементы соединены друг с другом по типу "голова к хвосту". Сначала на РНК-транскрипте, как на матрице, с помощью ревертазы строится комплементарная нить ДНК, а затем, после удаления РНК-матрицы, достраивается другая. Повреждения одной из комплементарных нитей ДНК могут быть устранены за счет удаления этого участка и его ресинтеза с использованием неповрежденной комплементарной нити ДНК. Однако если клетка лишена обычной системы заживления двухнитевого разрыва, то в качестве замены может быть использована подвижная ДНК. Оказалось, что в роли такой подвижной ДНК может выступать реплицирующаяся ДНК ретротранспозонов. В этом случае спасательную функцию осуществляет класс ретротранспозонов, содержащих ДКП. Это позволяет хромосоме сохранить целостность и не утратить концевой фрагмента. При этом брешь в двухнитевой спирали ДНК будет заменена вставкой из ретротранспозона, т.е. исходная нуклеотидная последовательность не будет восстановлена (Гвоздев, 1998).

В.А. Гвоздев и Л.З. Кайданов сформулировали представление о системе транспозиций МДГ-элементов, имеющих адаптивное значение. Приспособительный смысл перемещений мобильных элементов заключается, согласно их гипотезе, в регулярном влиянии на экспрессию соседних генов. Доказательства изменения транскрипции в результате внедрения ретротранспозонов получены на дрозофиле, дрожжах и других объектах (Кайданов, 1996). Ввиду того, что объектами проводимого нами анализа литературных данных являются растения, эти и ряд других интереснейших фактов остаются вне нашего анализа.

В среднем доля мобильных элементов в геноме пропорциональна его размеру, большие геномы, как правило, содержат большую долю (Vitte, Panaud,

2005). В целом подвижные элементы обычно составляют 10-30% всей ДНК. У растений, как недавно выяснилось, подвижные элементы составляют более половины генома (Гвоздев, 1998). В некоторых случаях количество копий ретротранспозонов может составлять до 90% ядерного генома (Kumar, Bennetzen, 1999).

Помимо характерного соотношения различных классов мобильных элементов в геномах разных организмов, интересно, что в ряде случаев наблюдается видо- или, скорее, группоспецифичность для отдельных семейств мобильных элементов. В дальнейшем оказалось, что этот факт, установленный на заре открытия мобильных элементов, отражает общую тенденцию: часто то или иное семейство мобильных элементов встречается только у родственных видов данной группы, а в некоторых случаях ограничено одним видом. Описаны случаи широкого распространения одного и того же семейства мобильных элементов у отдаленно родственных организмов. Это может свидетельствовать о возникновении этого элемента в общем предке или о высокой "инфекционности" данного элемента, способного повторно "заражать" геномы разных неродственных организмов, в том числе и с помощью горизонтального переноса. К последнему типу, очевидно, относится *gypsy*, представляющий собой настоящий ретровирус (Arkhipova et al., 1995).

В больших по размеру геномах растений также доминируют ретроэлементы, которые представлены у растений, в основном, разнообразными ДКП-содержащими мобильными элементами. На их долю в геноме кукурузы приходится 50%, а в геноме пшеницы и лилейных – 90%. Сейчас очевидно, что именно за счет мобильных элементов происходили резкие изменения размеров генома у многих растений, таких как хлопок и многие злаки (Vitte, Panaud, 2005). Исследования последних лет показали, что ретротранспозоны играют ключевую роль в эволюции геномов растений и именно содержание мобильных элементов геноме определяет поразительную разницу в размерах генома филогенетически близких видов растений.

2.1.3. Молекулярно-генетические маркеры на основе ретротранспозонов

Широкая представленность в геномах эукариот является одной из причин использования ретротранспозонов или их структурных элементов для молекулярного маркирования геномов. Последовательности LTR-ретротранспозонов используются для выявления полиморфизма между исследуемыми формами одного вида с помощью ПЦР фингерпринта – IRAP, REMAP и SSAP методами (Kalendar et al., 1999; Kalendar, Schulman, 2006). В Alu-PCR (SINE-PCR) геномов млекопитающих (Рябинина и др., 2008) используют участки между короткими ретротранспозонами без LTR – SINEs (Short Interspersed Elements).

В настоящее время методы RAPD, ISSR, AFLP и SSR легли в основу создания новых типов молекулярно-генетических маркеров, использующих последовательности ретротранспозонов для анализа геномов. На основе RAPD, при использовании в качестве праймеров коротких последовательностей ретротранспозонов, возник метод IRAP. ISSR получил свое продолжение в REMAP, в котором используются оба варианта праймеров – из ретротранспозона и микросателлита. AFLP привел к возникновению более специализированного метода, основанного на последовательностях ретротранспозонов – SSAP. И, наконец, полиморфизм микросателлитных локусов, SSR, с использованием локус-специфичных праймеров к флангам микросателлитного повтора, привел к развитию метода RBIP, в котором используют праймеры, фланкирующие сайты ретротранспозиции. В принципе, такого развития этих методов можно было бы ожидать, поскольку большинство продуктов RAPD, ISSR и AFLP амплификации обнаруживались последовательности, соответствующие ретротранспозонам. RAPD использует праймеры с произвольной последовательностью, ISSR уже использует более специализированные праймеры, увеличивая воспроизводимость и делая метод более целенаправленным. AFLP также более специализированный метод, чем

RAPD, и полиморфизм исследуется в сайтах рестрикции. И, наконец-то, с помощью SSR анализируется только один известный локус в геноме.

Широкая представленность в геномах ретротранспозирующих элементов позволяет использовать их последовательности в качестве молекулярно-генетических маркеров. К настоящему времени разработано несколько типов молекулярно-генетических маркеров с использованием последовательностей ретротранспозонов.

Метод SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism) явился модификацией метода AFLP. Принцип (Waugh at al., 1997) SSAP состоит в следующем: геномная ДНК исследуемых образцов расщепляется рестриктазами PstI и MseI, получают фрагменты с выступающими 3'-концами. Затем рестрицированная ДНК лигируется с PstI и MseI адапторами. Первая полимеразная цепная реакция (преамплификация) проводится с праймерами от PstI и MseI адапторов, т.е. амплифицируются все возможные комбинации сочетания этих адапторов в рестрицированной геномной ДНК. После первой ПЦР образуется большое количество продуктов амплификации фрагментов ДНК, локализованных между праймерами и адапторами. ПЦР продукты разбавляются и используются для второй, селективной, ПЦР. Вторая ПЦР проводится с меченым праймером к LTR и любым праймером адапторов либо с PstI или MseI. Во второй ПЦР можно использовать праймеры к адаптору с дополнительными нуклеотидами на 3'-конце, например, один, два или три нуклеотида, некомплементарные адаптору. Продукты амплификации после второй ПЦР образуются в результате амплификации фрагмента ДНК между LTR и адаптором. Получение продуктов амплификации между только LTR последовательностями принципиально возможно, но, как правило, расстояние между двумя ретротранспозонами длиннее обычно получаемых размеров ПЦР продуктов (2.5 кб – 3.0 кб). А продукты амплификации между адапторами не будут выявляться, поскольку используется метка только для LTR-праймера. Электрофорез после второй ПЦР проводят в полиакриламидном геле или в секвенаторе, если использовалась флуоресцентная метка. К достоинствам

метода относится высокий уровень полиморфизма и хорошая, стабильная воспроизводимость спектров продуктов амплификации. Полиморфизм, выявляемый SSAP, выше, чем при использовании метода AFLP у одних и тех же исследуемых образцов. Этот метод имеет те же недостатки, что и AFLP. К ним относится многоступенчатость метода и технические трудности, связанные с этим. Метод дорогой и требует дорогих реактивов и приборов. В случае неполной рестрикции геномной ДНК (необходимо высокое качество выделенной ДНК образца) и/или лигирования адапторов возможно возникновение ложного полиморфизма (Глазко, Глазко, 2003).

Полиморфизм SSAP маркеров может быть обусловлен как событиями ретротранспозиции, так и точечными мутациями в области рестрикции или в комплементарной последовательности LTR-праймера. Поэтому невозможно быть уверенным в том, что «появление» или «исчезновение» продукта амплификации в образце обусловлены ретротранспозицией. Данный метод и праймеры могут быть использованы для исследования близкородственных видов, поскольку наиболее распространенные ретротранспозоны обычно достаточно консервативны у видов одного семейства, особенно их концевые участки LTR (Waugh at al., 1997). Так, например, последовательность ретротранспозона BARE-1 обнаруживается не только у ячменя, но и у других видов трибы *Hordeum* (Vicient et al., 2001). Очень многие ретротранспозоны одного вида находятся и в нуклеотидных последовательностях других родственных видов, некоторые ретротранспозоны обнаруживаются и у достаточно удаленных видов (Kalendar et al., 2008). Это легко определяется в секвенированных последовательностях GenBank.

Следующий метод – IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – метод амплификации (рис. 14) геномной ДНК между близкорасположенными последовательностями ретротранспозонов (Kalendar et al., 1999).

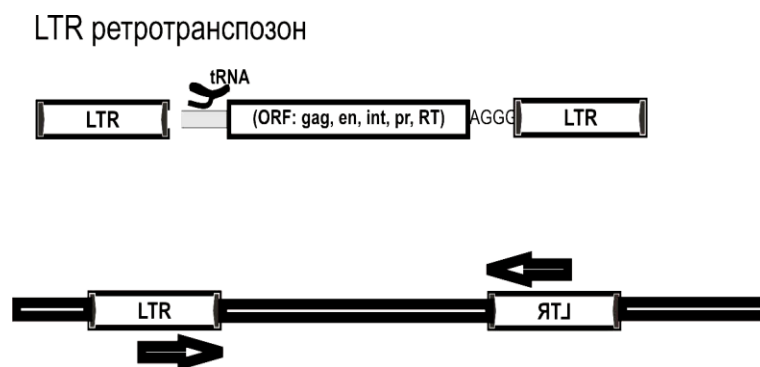


Рис. 14. Общая схема ретротранспозона и IRAP-амплификация между повторами последовательностей ретротранспозонов (Kalendar et al., 1999; Kalendar et al., 2006)

Продукт ПЦР-амплификации геномной ДНК является стабильным генетическим IRAP-маркером. Полиморфизм в данном случае связан либо с мутацией в участке связывания праймера, либо с уникальным биологическим процессом – ретротранспозицией, в результате встраивания ретротранспозона в новый участок геномной ДНК без потери первоначального участка.

Метод имеет несколько вариантов. В первом варианте IRAP используется единственный праймер из LTR. Продукты амплификации образуются между двумя инвертированными LTR с одинаковой последовательностью, т.е. в одной цепи 5'-конец одного LTR ориентирован к 3'-концу другого LTR. Если центральная часть ретротранспозона длиннее обычного размера ПЦР продуктов (около 3 кб), то ПЦР будет проходить только между двумя LTR из разных ретротранспозиций. В этом случае соседние LTR должны располагаться в инвертированном положении. В другом варианте IRAP используются два разных праймера к инвертированным LTR: один праймер с 5'-конца, а другой с 3'-конца LTR, ориентированные в разные стороны от ретротранспозона. В данном случае соседние LTR располагаются как прямые длинные повторы. И, наконец, в третьем варианте IRAP используются праймеры к LTR из разных ретротранспозонов в различной ориентации (Kalendar et al., 1999; Kalendar et al., 2000).

REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) – полимеразная цепная реакция между праймером к фрагменту LTR-ретротранспозона и праймером из рядом расположенного, простого

микросателлитного повтора (SSR-праймер). В данном случае позиция амплифицируемого фрагмента ретротранспозона «заякоривается» путем использования праймера к микросателлитному локусу. Например, у растений удобным оказывается использование праймера к LTR и праймера к микросателлиту (5'-CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA G) с единичным селективным нуклеотидом на 3'-конце праймера. В REMAP применяют варианты LTR праймеров как для 5'-конца, так и для 3'-конца LTR, как и в IRAP. К преимуществу этих двух методов можно отнести их относительную простоту и возможность очень большого количества комбинаций праймеров из различных ретротранспозонов и микросателлитов (REMAP). Поскольку в геномах растений и животных выявляют все большее количество ретротранспозонов, потенциальная информативность (количество локусов и их полиморфизм) методов IRAP и REMAP очень велика. Последовательности праймеров к LTR подбираются из консервативных и концевых участков LTR. Большинство LTR на 5' и 3'-концах имеют консервативные последовательности, необходимые для ретротранспозиции. В основном праймеры подбираются к концам LTR таким образом, чтобы амплифицированные продукты были достаточно удобны для ПЦР и электрофореза (как уже упоминалось, максимальная длина амплифицированные ПЦР-продуктов для *Tag*-полимеразы, как правило, не превышает 3 кб). Возможно, использовать праймеры к различным консервативным участкам LTR или центральной, кодирующей части ретротранспозона, поскольку в геномах присутствует большое количество неполноценных ретротранспозонных последовательностей, образованных, в частности, вследствие рекомбинации геномной ДНК (Kalendar et al., 1999).

Получаемый полиморфизм продуктов амплификации с помощью IRAP и REMAP не уступает SSAP, а даже превосходит его, но оба метода несравнимо проще и удобнее, чем SSAP и AFLP. Новые продукты амплификации при IRAP образуются в результате переноса одного ретротранспозона в позицию, расположенную рядом с другим ретротранспозоном. Они могут принадлежать

разным или одному и тому же ретротранспозону. Последовательность между ретротранспозонами может быть представлена, в свою очередь, последовательностью другого ретротранспозона; может быть кодирующей или не кодирующей. Большинство ретротранспозиции происходит в повторы и, как правило, в других ретротранспозонах (Shirasu, 2000). Некоторые ретротранспозоны равномерно распределяются по длине генома, такие как, в частности, BARE-1. Это показано с помощью гибридизации *in situ* с пробами из LTR и кодирующей части ретротранспозона. Некоторые короткие ретротранспозоны достаточно часто локализуются вблизи кодирующих последовательностей (Shirasu, 2000).

В то же время продукты REMAP амплификации фланкируются микросателлитной последовательностью. Известно, что микросателлиты располагаются как вблизи генов, так и в не кодирующей ДНК. Вероятность более равномерного распределения по хромосомам REMAP-маркеров выше, чем IRAP-маркеров, поэтому REMAP-метод может иметь более широкое применение. Эти методы были использованы для исследования полиморфизма и генетических структур сортов *H. vulgare* и видов семейства *Hordeum* (Kalendar et al., 1999; 2003; Vicient et al., 2005), с применением праймеров к ретротранспозону ячменя BARE-1. Экспериментальные исследования показали их высокую эффективность и удобство для выявления молекулярных маркеров у растений. Получены данные о том, что основные продукты REMAP-амплификации образуются в результате амплификации фрагментов только между ретротранспозонным и микросателлитным праймерами. Количество IRAP- или ISSR-продуктов амплификации, образованных соответственно только с помощью микросателлитного праймера или только праймера к фрагменту ретротранспозона, в REMAP очень незначительно. Следует учитывать также, что более короткие продукты ПЦР легче амплифицируются, чем длинные, и что расстояние между двумя ретротранспозонами или двумя микросателлитами длиннее, чем расстояние между ретротранспозоном и микросателлитом. При сравнении амплификации с использованием пары

праймера LTR и микросателлитом, а также единичным праймером с LTR и единичным ISSR-праймером показано, что в последних двух случаях продукты ПЦР длинные (2000-4000 пар оснований), тогда для REMAP длина продуктов ПЦР составляет от 200 до 4000 пар оснований (Kalendar et al., 1999; Kalendar et al., 2006).

В методах SSAP, IRAP и REMAP рассматриваются молекулярно-генетические маркеры, которые, как правило, обладают доминантным характером наследования продуктов амплификации, поскольку их наличие не позволяет отличать гомозиготу от гетерозиготы. Разработан еще один метод, основанный на использовании праймеров к последовательностям ретротранспозонов – RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms). Он позволяет исследовать кодоминантные аллельные варианты (Flavell et al., 1998). Его принцип основан на мультилокусной ПЦР, в которой используются пара праймеров, фланкирующих участок ДНК до ретротранспозиции, и праймер к LTR-ретротранспозону, который встроен в данный участок между первыми двумя праймерами. В результате ПЦР будет амплифицироваться один из вариантов фрагментов, фланкированных парой праймеров, поскольку последовательность между LTR слишком длинная для ПЦР между сайтами геномной ДНК с ретротранспозоном внутри. Этот метод выявляет полиморфизм только для данного полиморфного локуса. К его достоинствам относят кодоминантность полиморфных вариантов, возможность использования для анализа большого количества сортов. Главный же недостаток – необходимы клонирование и секвенирование последовательностей участка ДНК до и после ретротранспозиции. Это относительно сложная и дорогостоящая процедура. Возможно ее облегчение, например секвенирование полиморфных продуктов ПЦР после IRAP, REMAP или SSAP и использование затем инвертной ПЦР для полиморфного участка полиморфного продукта. Инвертная ПЦР также является достаточно трудоемким процессом, требующим дополнительного анализа клонов, их секвенирования и проверочной ПЦР. RBIP-метод удобен для анализа

гетерозиготных популяций, так как будут амплифицироваться оба аллеля данного локуса. При наличии большого числа RBIP-маркеров удобно исследовать родословные сортов. Метод перспективен, но дорог и трудоемок (Flavell et al., 1998).

2.2. Биоинформационный анализ

Биоинформатика – одна из наиболее молодых и одна из наиболее быстро развивающихся отраслей биологии, она оформилась только в 70-е годы XX века, но процесс накопления данных нарастает лавинообразно. По определению Европейского биоинформационного института (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/>) под биоинформатикой понимается применение компьютерных технологий для администрирования и анализа биологических последовательностей. Информация о последовательностях заносится в базы данных. Ежегодно появляются новые программные средства для компьютерного анализа последовательностей, модифицируются базы данных, корректируются задачи.

Самым известным веб-ресурсом в области биоинформатики является NCBI, которая содержит $9 \cdot 10^7$ последовательностей ДНК и РНК. Сейчас уже не вызывает сомнений тенденция укрупнения и консолидации многочисленных баз данных в мощные структуры, отличающиеся стандартизированным подходом к хранению, форматированию и классификации информации. Это значительно повысило эффективность использования банков данных и увеличило достоверность получаемых результатов.

Значительная часть выявленных к настоящему времени нуклеотидных последовательностей представлена короткими отрезками последовательностей (200 – 500 нуклеотидов), которые называются EST (Expressed Sequence Tags). EST или маркеры экспрессированных последовательностей используются для оценки уровня экспрессии. Эти отрезки выделены в особые базы данных по экспрессии генов; таким образом, эти БД содержат данные по уровням экспрессии мРНК. Обычная запись базы данных EST содержит обязательные

поля: ткань-источник и/или внутриклеточное расположение, стадию развития, условия роста и количественный анализ уровня экспрессии. При достаточном количестве данных можно охарактеризовать какую-либо ткань или группу клеток на разных стадиях развития и при разных уровнях биологической активности. Выявленный характеристический набор экспрессируемых генов называется профилем экспрессии.

Самая важная роль сравнения профилей экспрессии - это сравнение клетки в нормальном и паталогическом состоянии. А. Леск (2002) выделяет 6 вариантов возможного использования сравнения профилей экспрессии:

- 1) ключ к функции и механизму действия продуктов генов;
- 2) исследование, как организмы координируют контроль над метаболическими процессами в различных условиях;
- 3) анализ вариаций в активизации генов на разных стадиях клеточного цикла или развития организма;
- 4) изучение механизмов бактериальной устойчивости к антибиотикам и выбору потенциальных мишеней для действия медикамента;
- 5) изучение механизмов ответа на заражение паразитами;
- 6) изучение механизмов ответа на медикаменты разных типов и дозировок для проведения эффективной терапии.

EST широко используются для описания новых генов и для составления геномных карт. Самая известная на сегодняшний день база данных маркеров экспрессированных последовательностей dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>) также является одной из наиболее быстро пополняемых (табл. 1).

Таблица 1

Наполняемость базы данных dbEST (2002 – 2013 гг.)

Виды с наибольшим числом записей в dbEST	Число записей в 2002 г. (А. Леск, 2002)	Число записей в 2013 г.
человек	3 733 147	8 863 664
мышь	2 077 301	4 936 700
крыса	316 344	1 138 916

Однако надо понимать, что использование маркеров экспрессированных последовательностей имеет некоторые ограничения. Например, при использовании dbEST можно столкнуться с проблемами, характерными для баз биологических последовательностей в целом: избыточностью и повторяемостью. В dbEST могут содержаться десятки копий одного и того же гена, каждая под своим идентификационным номером. Эта проблема решается с помощью UniGene database – эта база данных автоматически «собирает» все копии в уникальный кластер. Еще одна проблема – сложное выделение мРНК из некоторых клеток и тканей, поэтому из поля зрения выпадают некоторые специфичные для этих клеток гены.

В последние годы биоинформатика столкнулась с информацией нового уровня, что породило новые проблемы. Современные NGS-технологии (Next-Generation Sequencing) позволяют сместить фокусировку объекта исследования с уровня отдельных генов до уровня метагенома. С 2006 года (т.е. с появлением первой NGS-платформы) накопление данных о биологических последовательной пошло такими темпами, что существующие алгоритмы и компьютерные методики обработки данных не справляются с постоянно растущим объемом информации. Переход к новому стандарту обработки и хранения информации в базах данных не способен решить эту проблему эффективно, так как практически невозможно подвести под новый стандарт огромный массив данных, накопленных ранее. Сложности не исчерпываются проблемой хранения информации в базах данных биологических последовательностей. Так, увеличение скорости секвенирования влечет за собой появление все более коротких ридов, а это на сегодняшний день серьезный барьер для последующей сборки отдельных фрагментов последовательности в исходную целую цепочку и источник существенно большего числа ошибок, особенно по сравнению с использовавшимся ранее методом Сэнгера.

Свои сложности есть на каждом этапе обработки данных. Одной из первых задач компьютерного анализа является распознавание и удаление

«шума» - избыточных последовательностей, содержащих ошибки и дублирующуюся информацию. С этой задачей справляются такие программы, как PyroNoise и Denoiser. Следующий этап – это распознавание и удаление химер-рекомбинантов между родительскими последовательностями. Для этого успешно используются алгоритмы UCHIME, ChimeraSlayer, Dechifer.

Установление филогенетических связей и аннотирование генома также потребовали создания новых и модификации ранее существующих программ. Сейчас программ, использующих различный математический аппарат, построенных на различных алгоритмах, так много, что выбрать программную оболочку, оптимальную для конкретной задачи, достаточно сложно. Вот, к примеру, неполный перечень программ для таксономической классификации: MEGAN, SOrt-ITEMS, MG-RAST, CARMA, MetaPhyler, AMPHORA, PhyloPythia, Phymm, NBC, TACOA, TaxSOM. Некоторые из этих программ высоко специализированы, другие позволяют решать сразу несколько задач, например, MG-RAST используется также и для функциональной аннотации последовательностей.

Еще одно перспективное и бурно развивающееся направление биоинформатики – фармакоинформатика и медицинская биоинформатика. Значительный объем данных касается медицинских исследований, человеческих заболеваний различной этиологии, перечня лекарственных препаратов и их взаимодействия с организмом. Частично эта информация исключена из свободного доступа, так как защищена правом собственности крупных фармацевтических холдингов.

2.3. Генетический контроль мейоза

Основу роста, развития и преемственности жизни на Земле составляют процессы деления клеток. У многоклеточных организмов с половым размножением выделяют два основных типа деления – митоз и мейоз.

Мейоз (от греч. *meiosis* – уменьшение) является универсальным

явлением, характерным для всех эукариотических организмов. Данный тип деления характеризуется редукцией (уменьшением) числа хромосом и переходом клетки из диплоидного в гаплоидное состояния. Мейоз лежит в основе законов наследования Г. Менделя и хромосомной теории наследственности. Во время этого деления происходит чрезвычайно важный генетический процесс, который заключается в обмене участками между гомологичными хромосомами, или кроссинговер.

Рост интереса к мейозу, который наблюдался в конце 60-х годов XX века, был связан с тем, что одни и те же контролируемые генами ферменты могут принимать участие в процессах редупликации ДНК, обмене ее участками и ее чувствительности к повреждающим воздействиям. В последние годы ряд ученых развивают оригинальную теорию, суть которой заключается в следующем. Мейоз у высших организмов является гарантом стабильности генетического кода, так как в процессе деления пары гомологичных хромосом тесно соприкасаются и происходит проверка нитей ДНК на точность и восстановление повреждений, затрагивающих сразу обе нити (Голубовская, 2013).

Схема мейоза у растений, грибов и животных является весьма консервативной. Это связано с тем, что данный процесс управляется специфическими генами, что было подтверждено после секвенирования геномов модельных объектов, которые используются для изучения генного контроля мейоза: *Saccharomyces cerevisiae*, затем *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* и, наконец, человека (Богданов, Коломиец, 2007).

Можно выделить не менее семи ключевых этапов мейоза, которые находятся под контролем генов: запуск мейоза или переключение деления с митоза на мейоз; попарное сближение и синапсис гомологов; обмен участками гомологичных хромосом, или кроссинговер; образование хиазм; расхождение гомологов; инициация второго деления; собственно разделение клетки надвое (Корженевская, Степанов, 2008; Голубовская, 2013).

Существуют мутации, которые изменяют ход мейоза, и среди них

выделяют мутации специфических генов мейоза. У таких модельных организмов, как дрожжи и дрозофила, известны многие десятки таких генов. Предполагается, что мейоз у всех организмов должен управляться сотнями генов, среди которых есть гены, общие для митоза и мейоза (общие гены клеточного деления), и гены, специфические для каждого из этих типов делений (Богданов, Коломиец, 2007).

Общая схема системы генетического контроля клеточных делений представлена на рис. 15.

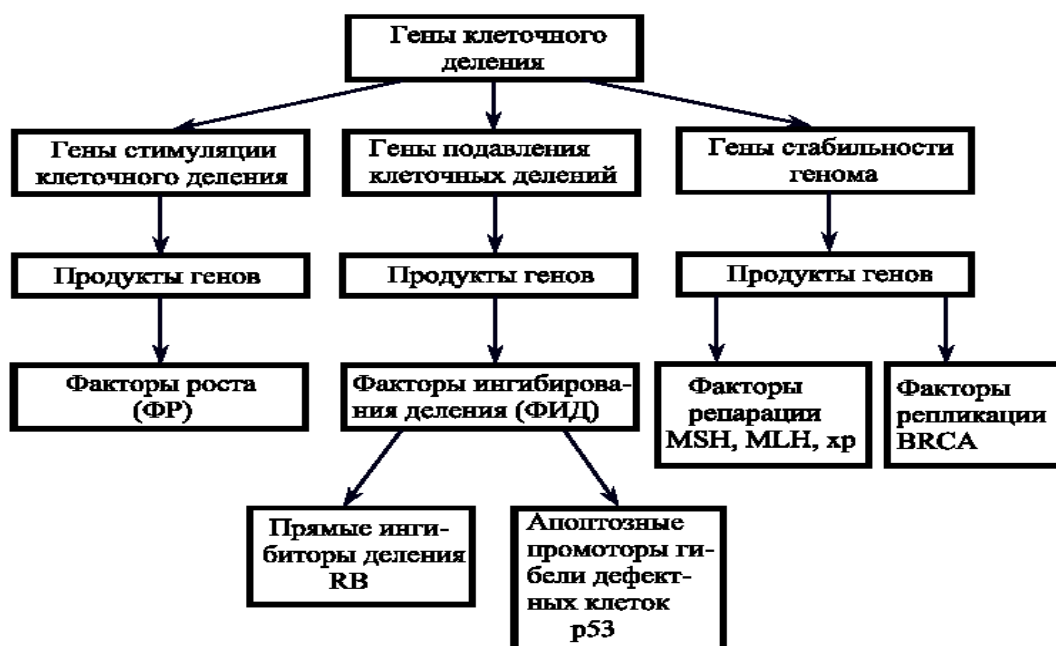


Рис. 15. Система генетического контроля клеточных делений (Корженевская, Степанов, 2008)

Представление о числе уже выявленных специфических генов мейоза у разных организмов дает табл. 2 (Богданов, Коломиец, 2007).

Среди мутаций генов мейоза наблюдаются фенотипически одинаковые у разных организмов. Это позволяет говорить о гомологических рядах изменчивости признаков мейоза в широком диапазоне таксонов, вплоть до царств, и в том смысле, который придавал этому понятию Н.И. Вавилов. Однако возможно, что более правильно будет говорить о гомоморфности таких признаков. Установлено, что гены, кодирующие белки синаптонемного комплекса и ряд других генов мейоза, являются негомологичными у грибов и

млекопитающих, хотя их продукты (структурные белки синаптонемного комплекса и хромосом) выполняют одинаковые функции.

Таблица 2

Число выявленных специфических генов мейоза у разных организмов

Объект	Число известных генов мейоза	
	всего	изученных на молекулярном уровне
Дрожжи <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	~ 360	~ 300
Плодовая мушка <i>Drosophila melanogaster</i>	~ 320	~ 120
Кукуруза <i>Zea mays</i>	~ 50	7
Рожь <i>Secale cereale</i>	21	-
Резушка <i>Arabidopsis thaliana</i>	~ 20	~ 10-12

Гомология генов считается существенной, если последовательность пар нуклеотидов совпадает не менее чем на 80%. Подобная гомология характерна для генов, кодирующих ферменты, т.е. метаболизм мейотических клеток, и, как правило, прослеживается в пределах таксономического класса, но она отсутствует у генов структурных белков синаптонемного комплекса (Богданов, Коломиец, 2007).

То, что разные стадии мейоза находятся под генетическим контролем, подтверждается неодинаковым протеканием мейоза у разных полов. В качестве примера можно привести плодовую мушку дрозофилу. У самцов этих мух отсутствует плотная конъюгация хромосом, не образуются синаптонемный комплекс и хиазмы, а следовательно, не происходит обменов между гомологами и хромосомы расходятся в мейозе I по принципу touch-and-go, в то время как все эти процессы в норме наблюдаются у самок.

К началу 2000 года описаны более 80 генов, специфически контролирующих ход мейоза и мейотической рекомбинации у *D. melanogaster*. Гены мейоза дрозофилы можно классифицировать по их функциям: влияющие на формирование предпосылок рекомбинации и на сам процесс кроссинговера;

контролирующие расхождение хромосом в I делении мейоза отдельно у самок и самцов; контролирующие расхождение хромосом во II делении у обоих полов. Также имеются плеiotропно действующие гены мейоза. Существуют мейотические гены, контролирующие митоз (или наоборот), и гены, функционирующие в ходе репарации ДНК в соматических клетках и вовлеченные в "обслуживание" мейоза (Гришаева, Богданов, 2000; Инге-Вечтомов, 2010).

Известны мутации, которые приводят к нарушениям в протекании процессов мейоза и расхождения хромосом только у самок *D. melanogaster* или у обоих полов этого объекта. Существует несколько десятков генов, мутации в которых нарушают конъюгацию всех хромосом у самок. Мутации более 10 генов затрудняют обмены между гомологичными хромосомами и одновременно нарушают нормальное расхождение гомологов в мейозе I. Также известны мутации, которые нарушают только расхождение всех хромосом в первом делении или отдельных хромосом во втором делении. Такие мутации приводят к нерасхождению хромосом или к их потерям (Инге-Вечтомов, 2010).

Найденные у кукурузы мутации затрагивают почти все ключевые моменты мейоза. *Mei*-мутации расположены в самых разных хромосомах. Определение того, относится ли мутация к одному или разным генам, требует специального теста на аллелизм. Случаи повторного нахождения аллельных вариантов того или иного гена, как, например, для гена *am1*, запускающего мейоз, или для гена *po1*, контролирующего окончание второго деления, по всей видимости, указывают на малое число генов, контролирующих данный ключевой этап мейоза.

Поиск у кукурузы *mei*-мутаций проводится с использованием двух методов искусственного мутагенеза, первый из которых химический, когда клетки подвергаются воздействию определенных веществ. Второй подход подразумевал использование линий с транспозонами, которые способны перемещаться по хромосомам и вызывать изменения самых разных генов (Голубовская, 2013).

Установлено, что у амейотического мутанта кукурузы блокирован сам переход материнских клеток микроспор от митотических делений к мейотическим. Мутанты с нарушениями профазы I делятся на две категории: 1) те, у которых нарушена конъюгация хромосом и образуется много унивалентов в профазе I, и 2) те, у которых хромосомы приобретают способность к неспецифическим взаимодействиям — «клейкость» хромосом, в дальнейшем приводящая к образованию «мостов» и разрывов при расхождении хромосом к полюсам в анафазе I. Известны также мутанты, у которых нарушено расхождение отдельных хромосом в анафазе II. Плейотропные эффекты этой мутации (*afd*) проявляются как в первом, так и во втором делениях мейоза (Инге-Вечтомов, 2010).

Сравнивая картины световой и электронной микроскопии мутанта кукурузы *dsy1* и нормы, можно сделать вывод, что при мутации нарушены самые ранние стадии синапсиса, а именно опознавание гомологов. Анализ ряда других десинаптических мутаций показал, что у них синаптонемный комплекс начинает распадаться преждевременно, что и приводит к аномалиям расхождения.

Анализ двойных мутантов в потомстве гибридов кукурузы по разным *mei*-мутациям позволяет установить, действуют ли гены независимо или между ними наблюдается взаимодействие. Ген, который вступает в действие раньше, блокирует проявление более позднего гена. Сочетая разные мутации, можно выяснить последовательность вступления генов. Исследование набора двойных мутантов у кукурузы позволило выстроить последовательность действия генов в мейозе следующим образом: сигнал к запуску мейоза (ген *am1*); сигнал к началу первого деления мейоза (*afd1*); узнавание гомологичных хромосом (*dsy1*); серия генов десинапсиса (Голубовская, 2013).

Первый систематический поиск *mei*-мутаций был сделан на дрозофиле в 1968-1972 гг. Значительное число мутантов с нарушенным мейозом известно у растений, таких как кукуруза, рожь, пшеница, томат, горох и др. Серия транспозонных *mei*-мутаций, полученная в ходе работ, открывает перспективу

молекулярно-генетического клонирования генов мейоза у высших организмов (Инге-Вечтомов, 2010; Голубовская, 2013).

Прикладные аспекты генного контроля поведения хромосом в мейозе очевидны для медицины и селекции. Даже незначительные нарушения в расхождении хромосом в мейозе ведут к нарушению баланса генов и, как следствие, к аномалиям развития и плодовитости. В качестве примера можно привести нарушение в мейозе, которое приводит к задержке в расхождении 21-й пары хромосом, что ведет к болезни Дауна. Среди нарушений, вызывающих стерильность у мужчин, значительную долю составляют мутации мейоза.

В наступившую эру генетической инженерии, когда появляется возможность пересаживать фрагменты с нужными генами от хромосом одного вида к хромосомам другого, нельзя заранее предсказать, как созданная генно-инженерная конструкция будет стабильно передаваться через гаметы. Знание действия генов мейоза позволит контролировать этот процесс (Голубовская, 2013).

РАЗДЕЛ 3. ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ

3.1. Генотерапия

Генотерапия – это раздел медицинской генетики, разрабатывающий в эксперименте возможные методы лечения наследственных болезней (Большой медицинский словарь, 2000). Кроме этого, генотерапия определяется как лечение (коррекция) заболеваний (наследственных, многофакторных, приобретенных (инфекционных), онкологических) путем введения в ткани или клетки больного чужеродной (отсутствующей у него) генетической информации (генов) с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций (Современная энциклопедия, 2013)

Концепция генотерапии, по-видимому, появилась сразу после открытия явления трансформации у бактерий и изучения механизмов трансформации клеток животных опухолеобразующими вирусами. Такие вирусы могут осуществлять стабильное внедрение генетического материала в геном клетки хозяина, поэтому было предложено использовать их в качестве векторов для доставки желаемой генетической информации в геном клеток. Предполагалось, что такие векторы могут в случае необходимости компенсировать изменения генома.

Реальностью генная коррекция соматических клеток стала после 1980-х годов, когда были разработаны методы получения изолированных генов, созданы эукариотические экспрессирующие векторы, стали обычными переносы генов у мышей и других животных. Исторически генная терапия нацеливалась на лечение наследственных генетических заболеваний, однако после ее применения, по крайней мере, теоретически, расширилось. В настоящее время генную терапию рассматривают как потенциально универсальный подход к лечению широкого спектра заболеваний, начиная от наследственных, генетических и заканчивая инфекционными заболеваниями. «Лечение генами» - коррекция дефекта путем введения полноценного работающего гена (кДНК).

Краткая история развития генотерапии такова. В 1980 году Мартин Клайн изучал талассемию и рекомбинантный ген бета-гемоглобина и пытался лечить двух пациентов. К сожалению, лечение прошло без успеха, но и без вреда. По этическим причинам наблюдательный совет UCLA (University of California, Los Angeles – Калифорнийский Университет в Лос Анджелесе) запретил подобные эксперименты. Первые клинические испытания методов генной терапии были проведены 22 мая 1989 года с целью генетического маркирования опухоль-инфильтрующих лимфоцитов в случае прогрессирующей меланомы. Первым моногенным наследственным заболеванием, при лечении которого применялись методы генной терапии, являлся наследственный иммунодефицит, обусловленный мутацией в гене аденозиндезаминазы (*ada*). В Бетесде (США) 14 сентября 1990 года четырехлетней девочке, страдающей этим достаточно редким заболеванием (1:100 000), были пересажены ее собственные лимфоциты, предварительно трансформированные вне организма геном *ada* (ген *ada* + ген *neo* + ретровирусный вектор). Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедура была повторена с интервалом 3-5 месяцев (Culver, 1994). За три года терапии в общей сложности проведены 23 внутривенные трансфузии *ada*-трансформированных Т-лимфоцитов без видимых неблагоприятных эффектов. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни и не бояться случайных инфекций.

После этого началось лечение моногенных заболеваний: *ada* – синдром, эмфизема легких, цистифиброз, гемофилия А и В, талласемия, фенилкетонурия, семейная гиперхолестеринемия, гипотиреоз. На следующем этапе развития генотерапии представляли особый интерес такие заболевания, как сахарный диабет, гипертоническая болезнь, коронарные заболевания, онкологические заболевания, артрит, астма, шизофрения.

Для реализации целей генной терапии по основным подходам можно выделить различные виды генотерапии. По основной стратегии лечения

применение генной терапии может быть разделено на: внесение нормального, здорового гена в клетки, дефектные по этому гену (например, при наследственных болезнях); подавление патологической функции гена внутри клетки; усиление иммунного ответа аутологичных клеток реципиента *ex vivo* с последующим возвратом их в организм. Основываясь на типе клеток-мишеней, генную терапию можно разделить на соматическую генную терапию, у которой объектом служат соматические клетки, и фетальную генную терапию, объектом которой служат клетки плода. В основе действия генно-терапевтических препаратов лежит принцип лечения болезни с помощью генов, переносимых в клетки организма больного. Привнесение генного материала в организм реципиента может быть осуществлено непосредственно помощью вирусных векторов или невирусных систем либо в виде предварительно генетически модифицированных (*ex vivo*) клеток (например, донорских стволовых клеток пуповинной крови или аутологичных стволовых клеток костного мозга).

Процедуру генотерапии можно разделить на три основных этапа: генно-инженерный — получение нужных продуктов (рекомбинантных ДНК и векторов, модифицированных клеток), доставку их в организм реципиента в виде инъекций, аэрозолей или с помощью клеточной трансплантации и, наконец, клинические испытания и лечение.

Существуют две стратегии коррекции генетических дефектов: генная терапия половых и соматических клеток; заместительная и корректирующая генотерапия. При первой стратегии наиболее радикальным и эффективным используемым способом является замена дефектного гена в половых клетках. В этом случае существуют как практические сложности (низкая эффективность встраивания), так и серьезные этические проблемы. Так же генотерапия проводится в соматических клетках. По второй стратегии выделяют два подхода: корректирующая (исправляющая) терапия (замена дефектного гена нормальным) и заместительная терапия, а именно ведение дополнительной копии(й) гена, которая функционально (но не физически) замещают дефектный ген. Оба подхода проводятся по коррекции фенотипа. Эта стратегия является

корректирующей в отношении фенотипа. Стратегия вставки здорового гена в клетки, дефектные по этому гену, используется в тех случаях, когда клетки, которые нужно вылечить, потеряли функцию какого-либо гена, и для лечения надо эту функцию восстановить. Тогда в клетку организма, в которой утрачена функция, нужно доставить ген, способный обеспечивать недостающую функцию. Этот подход может быть использован, например, при рецессивных наследственных заболеваниях.

Существуют несколько механизмов коррекции генетических дефектов:

1. Коррекция утраченной функции клетки путем доставки в клетку «здорового» гена, который «компенсирует» неработающий ген клетки.
2. Подавление избыточной функции клетки. Этот механизм применяют когда клетка приобретает несвойственную ей в норме функцию (деление при опухолевых заболеваниях, репликацию чужеродного генома при вирусных инфекциях).
3. Усиление иммунного ответа. Введение информации в клетки, которые осуществляют иммунный ответ, либо в клетки, против которых нужно усилить ответ (например, модификация антигенов опухолевых клеток).

Решающим условием успешной генотерапии является обеспечение эффективной доставки, т.е. трансфекции (в широком смысле) или трансдукции (при использовании вирусных векторов), чужеродного гена в клетки-мишени, обеспечение длительного функционирования его в этих клетках и создание условий для полноценной работы гена (его экспрессии). *Ex vivo* – трансформация клеток вне организма (*in vitro*) и перенос трансформированных клеток в организм. *In vivo* – в организме человека, когда производится перенос в клетки *in situ*.

Трансфекция может проводиться с использованием чистой ("голой" — *naked*) ДНК, встроенной в соответствующую плазмиду, или комплексированной ДНК (плазмидная ДНК, соединенная с солями, белками (трансферрин), органическими полимерами (DEAE-декстран - диэтиламиноэтилдекстран, полилизин), липосомами или частицами золота,

или ДНК в составе вирусных частиц, предварительно лишенных способности к репликации). Основные методы доставки чужеродных генов в клетки разделяются на химические (осаждение фосфатом Са), физические (электропорация, микроинъекции, бомбардировка частицами золота, простая инъекция) и биологические (вирусные и невирусные векторы). В этих методах рассматриваются трансдукция, интеграция, экспрессия, доставка гена в культуру клеток и в ткани. Только вирусные векторы или генетические конструкции, включающие вирусные последовательности, способны к активной трансдукции, а в некоторых случаях и к длительной экспрессии чужеродных генов. Другие характеристики существующих векторных систем (стабильность интеграции, регулируемая экспрессия, безопасность) все еще нуждаются в серьезных доработках.

Вирусные векторы занимают 95% всех генотерапевтических протоколов. Для них характерна положительная способность к интеграции в геном (ретровирусы), иницирование специфического типа клеток (специфика взаимодействия поверхностных белков с рецепторами клетки) и отрицательная потенциальная патогенность.

Генно-инженерные модификации предусматривают удаление патогенов вируса, замену их встраиваемым геном человека. В этом случае остаются гены, отвечающие за упаковку и экспрессию генома вируса. Они дефектны по репликации (только один раунд инфекции без последующего распространения). Ретровирусные векторы встраиваются благодаря обратной транскрипции. Возможны экспрессия вирусных онкогенов или активация онкогенов клетки при интеграции в геном хозяина. Большинство из них непатогенны, так как интеграция происходит только в пролиферирующие клетки. Размер вставки – до 9 кб (небольшой ген или фрагмент кДНК). Специфичность к типу клеток демонстрирует ген *env*. Расширение специфичности обуславливает замена *env* экотопных (определенный тип клеток) на *env* амфмтопных (широкий спектр рецепторов).

Векторы на основе HIV:

1. Аденовирусные векторы (2цДНК). Для них характерен низкий уровень интеграции и транзиторная экспрессия.
2. Аденоассоциированный вирус (1цДНК). Для него характерен низкий уровень интеграции, но длительная экспрессия. Для транскрипции и трансляции требует белки вирусов-хелперов (аденовирусов или герпес-вирусов), что приводит к определенному риску (опасность инфекции хелпером).
3. Герпес-вирус (HSV) обладает большим геномом – 150 кб, низкой трансдукцией и слабой экспрессией. У него есть особенность в сложности генома (не всегда удается подавить репликацию и иммунный ответ хозяина).

У невирусных векторов также есть положительные и отрицательные стороны. Преимуществом этих векторов является то, что нет опасности патогенного действия и повреждения генома клетки. Недостатки: низкая эффективность доставки в клетку и малая длительность экспрессии трансгена.

Существуют три комплекса ДНК с биологическими или химическими структурами, обеспечивающими проникновение в ядро:

1. Липосомы, которые взаимодействуют с липидным слоем мембраны.
2. Рецептор-опосредованный эндоцитоз (комплекс ДНК-белки, ДНК-вирусная капсида). Строится из ДНК, поликатиона (полилизина) и антитела, специфичного к поверхностному белку клетки (либо капсида).
3. Искусственные хромосомы млекопитающих (MAC, Mammalian Artificial Chromosomes), аналогичные YAC (Yeast Artificial Chromosome – искусственные хромосомы дрожжей) и BAC (Bacterial Artificial Chromosome – бактериальные искусственные хромосомы).

Использование антисенс-олигонуклеотидов является еще одним подходом генной терапии.

В 1978 году было показано, что тринадцатизвенный олигонуклеотид, комплементарный мРНК вируса саркомы Рауса, может ингибировать

репликацию вируса. Это было начало нового подхода, направленного на модификацию экспрессии гена. Олигонуклеотид, комплементарный к определенной мРНК проникает в клетку и связывается с этой мРНК. В результате трансляция этой мРНК ингибируется специфически. Это может быть вирусная мРНК, и тогда репликация вируса будет ингибирована. Это может быть мРНК онкогена, экспрессия которого приводит к опухоли. Идеологически подход похож на стратегию, используемую, когда экспрессию гена подавляют с помощью антисенс РНК. Но есть и существенная разница. Антисенс РНК в генно-терапевтическом смысле постоянно экспрессируется клеткой, в которую для этого вводится специальная генетическая конструкция. Ген этой антисмысловой РНК после введения в клетку становится частью ее генома и поэтому подавляет синтез смысловой РНК изнутри. Антисмысловой же олигонуклеотид приходит в клетку извне. Его постоянно нужно добавлять, чтобы сделать его действие эффективным. Однако, поскольку действие олигонуклеотида также направлено на продукт экспрессии гена внутри клетки, этот подход можно рассматривать как генно-терапевтический. Этот подход очень прост: он не требует сложных конструкций для своего осуществления, можно надеяться на высокую специфичность благодаря тому, что можно синтезировать олигонуклеотиды с последовательностями, встречающимися всего один раз во всем геноме и, следовательно, абсолютно специфически взаимодействующимися с мРНК заданного гена. Однако данный подход сталкивается с рядом проблем. Оказалось, что олигонуклеотиды природной структуры недостаточно стабильны, когда вводятся в организм, возникают проблемы с проницаемостью мембран клеток для олигонуклеотидов, со специфичностью связывания с нужной мишенью, поскольку олигонуклеотиды могут связываться не только со строго комплементарными последовательностями, но и с частично комплементарными.

Генотерапия с помощью антисенс-олигонуклеотидов может проводиться по двум способам: фармакологическая терапия (с помощью ингибиторов АПФ) и генотерапия (на основе антисенс-блокировки мРНК ангиотензиногена).

На настоящий момент существуют два новейших подхода в генотерапии – это РНК-интерференция (непрямая коррекция генетических нарушений) и прямая коррекция генетических нарушений (гомологическое замещение малым фрагментом (SFHR)).

3.2. Фармокогенетика

Фармакогенетика – раздел медицинской генетики и фармакологии, изучающий характер реакций организма на лекарственные средства в зависимости от наследственных факторов. Концепцию фармакогенетики предложил в 1958 году Ф.Фогель и определил область ее исследований: роль генетических факторов в индивидуальной реакции организма человека на лекарственные препараты и неблагоприятные экологические воздействия (Фогель, Мотульски, 1990). Эти генетические особенности пациента, как правило, представляют собой полиморфные участки генов, контролирующих белки, участвующие в фармакокинетике или фармакодинамике лекарственных средств. К первой группе относятся гены, кодирующие ферменты биотрансформации и гены транспортеров, участвующих во всасывании, распределении и выведении лекарственных средств из организма.

В настоящее время активно изучается роль генов, контролирующих синтез и работу ферментов биотрансформации лекарственных средств, в частности изоферментов цитохрома Р-450 (CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) и ферментов II фазы биотрансформации. Н. П. Дубинин (1975) рассматривал фармакогенетику как комплексную биологическую дисциплину, объединяющую медицину, общую генетику, генетику человека, фармакологию, молекулярную биологию и молекулярную генетику. Ксенобиотики – чужеродные (не синтезированные организмом человека) химические соединения. Метаболизм (биотрансформация) ксенобиотиков находится под генетическим контролем.

В метаболизме ксенобиотиков участвуют около 30 ферментов. В нем

различают две фазы: модификация, создающая или освобождающая функциональные группы; конъюгация – присоединение к последним других групп или молекул. Наиболее часто метаболизм происходит именно в такой последовательности, но при наличии в молекуле ксенобиотика функциональных групп он может сразу же подвергнуться конъюгации. Обычно обе фазы, особенно при совместном действии, приводят к увеличению гидрофильности и снижению активности и токсичности молекулы. Третьей фазой (уже не метаболизма, а выведения ксенобиотиков) можно считать связывание и выведение самих ксенобиотиков и их метаболитов из клетки, а затем из организма.

В **первой фазе** наиболее важной является локализованная в мембранах эндоплазматической сети система цитохрома Р-450, называемая также микросомальной системой метаболизма или монооксигеназной системой. Ее основной функцией является образование в молекуле гидрофильных функциональных групп с детоксикацией десятков тысяч веществ. Важными достоинствами системы являются локализация и высокая мощность на главных путях поступления ксенобиотиков в организм – пищевом (печень и желудочно-кишечный тракт) и дыхательном (легкие) – и многообразие путей метаболизма: гидроксилирование (бензол, фенол, полициклические ароматические углеводороды, барбитураты), эпоксидирование (полициклические ароматические углеводороды), окисление по сере (аминазин) и азоту (аминазин, никотин), восстановление нитро-(нитробензол, левомецитин) и азогрупп (сульфасалазин), деалкилирование по азоту (морфин, амидопирин), кислороду (кофеин, колхицин) и сере (6-метилтиопурин) и десульфурация (паратин, тиобарбитал).

Рассмотрим функциональные особенности полиморфизма основных генов суперсемейств цитохромов СYP-450, принимающих участие в метаболизме лекарств.

Семейство Р-450 СYP1 метаболизирует сравнительно небольшую часть ксенобиотиков, самые важные из которых представлены полициклическими

ароматическими углеводородами (ПАУ) – основными компонентами табачного дыма. особенно важная роль в этом принадлежит генам *CYP1A1* и *CYP1A2*, локализованные в 15-й хромосоме человека. Экспрессию обоих генов регулирует комплекс, образуемый Ah-рецептором с индуцирующей молекулой ПАУ, который проникает в ядро и специфически стимулирует экспрессию этих генов (Генетический паспорт..., 2009).

Семейство P-450 CYP2 представлено группой функционально наиболее значимых ферментов, метаболизирующих огромное количество различных препаратов. Их активность обнаруживает выраженную зависимость от генетического полиморфизма (Генетический паспорт..., 2009).

Подсемейство CYP2A является наиболее важным изоферментом данного подсемейства. Ген *CYP2A6* локализован в 19-й хромосоме в локусе 19q13.2, принимает участие в биоактивации компонентов табачного дыма – нитрозаминов, вызывающих рак легких (Кукес, 2007).

Подсемейство CYP2B. Все ферменты этого подсемейства индуцируются фенотербиталом. Наиболее значимым ферментом является *CYP2B6*, который метаболизирует многие цитостатики (циклофосамид), противовирусные препараты (эфавиренц и невирапин), антидепрессанты (бупропион), анестетики (пропофол), а также участвует в метаболизме эндогенных стероидов. Ген *CYP2B6* локализован в том же локусе, что и ген *CYP2A6* (Кукес, 2007).

Подсемейство CYP2C играют ключевую роль в метаболизме многих лекарств. Общим свойством этих изоферментов является наличие 4-гидролазной активности в отношении противосудорожного препарата мефенитоина (Кукес, 2007).

Особенно важным для клинической фармакогенетики является тестирование полиморфизма гена *CYP2C9*, локализованного в локусе 10q24. Ген является главным метаболитом ингибиторов ангиотензиновых рецепторов (лозартана и ирберсартана). Его субстратами (Кукес, 2007) также являются антикоагулянты (варфарин), сахароснижающие препараты (глипизид), противосудорожные препараты (фенитоин, диазепам),

антидепрессанты (амитриптилин, кломипрамин, имипрамин), ингибиторы протонных помп (омепразол)/

Основные функции **второй фазы** – увеличение гидрофильности и снижение токсичности ксенобиотиков. Самые важные ферменты второй фазы относятся к классу трансфераз. Наиболее широка и многообразна активность семейства глутатионтрансфераз, метаболизирующих тысячи ксенобиотиков. Большинство этих ферментов находится в гиалоплазме, но один из них локализован в мембранах эндоплазматической сети и митохондрий, другой - в хроматине. Основная реакция – конъюгация с восстановленным глутатионом – протекает в двух вариантах: присоединение к субстрату (алкены и эпоксиды) полной молекулы глутатиона и нуклеофильное замещение по электрофильным атомам С (галоген- и нитроалканы), N (тринитроглицерин), S (тиоцианаты и дисульфиды) или Р (метилпаратион).

При дальнейшем метаболизме глутатионовые конъюгаты переходят в меркаптуровые кислоты или меркаптаны. Кроме того, глутатионтрансферазы восстанавливают органические гидроперекиси в спирты и изомеризуют некоторые стероиды и простагландины.

Глюкоронилтрансферазы. Одним из путей нейтрализации токсических продуктов, возникших вследствие действия ферментов I фазы биотрансформации, является глюконирование – присоединение к субстрату УДФ-глюкороновой кислоты. Этот процесс осуществляют ферменты УДФ-глюкоронилтрансферазы, из которых наиболее значимыми являются два изофермента – *UGT1* и *UGT2*. Эти ферменты принимают участие в метаболизме билирубина, различных гормонов (тироксин, трийодтиронин), морфина, хлорамфеникола и других соединений (Кукес, 2007).

Ацетилтрансферазы. За ацетилирование отвечают два фермента – *NAT1* и *NAT2*. Изучение полиморфизма гена *NAT1* только начинается, тогда как важная роль гена *NAT2* в фармакогенетике доказана. Ген *NAT2* локализован в локусе 8p23.1-p21.3, отвечает за ацетилирование большей части ариламинов. В настоящее время известно 36 аллелей этого гена, которые различаются

сочетанием 12 миссенс-мутаций, 4 «молчащих» мутаций и делеций одного нуклеотида, приводящих к сдвигу рамки считывания (Артамонов, 2004).

В настоящее время установлена ассоциация полиморфизма гена *NAT2* с различными мультифакториальными заболеваниями и с различной чувствительностью к лекарственным препаратам (Neber, 1997) .

Тиопуринметилтрансфераза (ТПМТ) – фермент, катализирующий реакцию S-метилирования, основной путь метаболизма таких сильных цитостатиков, как 6-меркаптопурин, азатиоприн и 6-тиогуанин. Ген *TPMT* локализован в 6-й хромосоме в локусе 6q22.3. Идентификация точечных мутаций в гене *TPMT* у пациентов с низкой активностью фермента ТПМТ позволила предположить, что именно они ассоциированы с потерей активности белка и, соответственно, приводят к нарушению метаболизма 6-меркаптопурина в организме этих пациентов (Генетический паспорт..., 2009).

Эпоксидгидролазы осуществляют водную конъюгацию. Большая часть реакций катализируется микросомальной эпоксидгидролазой – *EPHX1*.

Ген *EPHX1* локализован в хромосоме 1, в локусе 1q42.1. Наличие индивидуальных различий в активности этого фермента определяется существованием генетического полиморфизма гена *EPHX1* (Баранов, 2000), который обусловлен однонуклеотидными заменами в 3-м экзоне (Мутация Т337С (Тур113His), генотип S/S) и в 4-м экзоне (мутация А415G (His139Agr)б генотип F/F).

Глютатионтрансферазы обеспечивают конъюгацию SH2 группы глутамата с органическими электрофильными ксенобиотиками, в том числе и многочисленными повреждающими веществами, широко представленными в атмосфере индустриально загрязненных городов (Генетический паспорт..., 2009).

Ген *GSTM1* – один из генов суперсемейства глютатионтрансфераз класса μ , локализован в локусе 1p13.3, где он входит в состав кластера генов семейства *GSTM5 – GSTM4 – GSTM2 – GSTM2 – GSTM1 – GSTM3*. *GSTM1* кодирует белок, участвующий в глютатионопосредованной детоксикации и играет ключевую

роль в обеспечении резистентности клеток к продуктам перекисного окисления жиров, алкилирования белков, к свободным радикалам, предотвращая, таким образом, нарушение ДНК (Генетический паспорт..., 2009).

Ген *GSTP1* – один из генов суперсемейства глутатионтрансфераз класса π , локализован в локусе 11q13, кодирует белок, участвующий в глутатионопосредованном связывании гидрофобных и электрофильных соединений (Генетический паспорт..., 2009). Функционирование всех ферментов второй фазы ограничивается тем, что они метаболизируют только те вещества, которые имеют функциональные группы. Именно поэтому эти ферменты чаще включаются после образования или освобождения функциональных групп ферментами первой фазы, то есть во второй фазе метаболизма ксенобиотиков. Однако трансферазы имеют важные достоинства: они есть во всех клетках, поэтому функционируют при любых путях поступления ксенобиотиков в организм; осуществляют или завершают детоксикацию, а иногда исправляют ошибки первой фазы. Так, они обезвреживают токсичные метаболиты – полициклические ароматические углеводороды (канцерогены), хлороформа (фосген), парацетамола. Правда, теперь обнаружено, что и эти ферменты могут токсифицировать некоторые ксенобиотики, но это встречается реже, чем для системы цитохрома P-450.

3.3. Анализ ДНК в криминалистике

Внедрение биологических методов анализа в процесс судебной экспертизы имеет давнюю историю. Появление метода генной идентификации человека в 1987 году стало революцией в криминалистике и судебной медицине. В 1870 году французский антрополог Альфонс Бертильон создал систему измерений и описания некоторых частей тела. Эти измерения сводились к формуле, которая теоретически соответствовала только одному индивиду и никому другому. Однако она была довольно громоздкой и ее

вытеснила дактилоскопия – идентификация личности по отпечаткам пальцев, которые не изменяются в течение человеческой жизни. Первая система классификации отпечатков была создана британским антропологом Френсисом Гальтоном. В своей книге "Фингерпринтс" ("Отпечатки пальцев" 1892 г.) Ф. Гальтон установил индивидуальность и постоянство отпечатков пальцев и выделил элементы для их описания. В 1892 году, в Аргентине, метод британского антрополога впервые был применен на практике для идентификации личности преступника. В начале XX века в ряде стран был начат систематический сбор отпечатков пальцев для криминалистической идентификации. Стандартом признания отпечатков идентичными было совпадение 12 деталей узоров на пальцах. Развитие науки привело к появлению новых методов установления личности – анализу групп крови и позже, с 1987 года, молекулярно-генетического идентификационного анализа, традиционно называемого геномной (генетической) "дактилоскопией", или генотипированием. Первым человеком, который догадался, каким образом можно идентифицировать личность с использованием методов молекулярной генетики, был английский профессор Алек Джеффрис, опубликовавший в журнале "Nature" свою статью «Индивидуально-специфичные "отпечатки пальцев" ДНК человека» в июле 1985 года. Термин "отпечатки пальцев", или "фингерпринт", был употреблен им иносказательно и к традиционной дактилоскопии отношения не имеет. Описанный Джеффрисом метод основан на способности бактериальных ферментов, называемых ферментами рестрикции, рестрикционными эндонуклеазами или рестриктазами, распознавать строго определенные последовательности ДНК и разрезать ее по областям распознавания. Этот факт был известен давно, однако английский ученый впервые обнаружил, что длина образующихся фрагментов различается для разных людей, отсюда и принятое название данного метода - полиморфизм длины фрагментов рестрикции (*RFLP*, Restriction Fragment Length Polymorphism).

В России исследования по геномной дактилоскопии были начаты в 1987

году в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта АН СССР, в лаборатории академика Г.П. Георгиева. Здесь, в группе, руководимой доктором биологических наук А.П. Рысковым, был получен целый ряд приоритетных результатов и разработан первый отечественный метод типирования ДНК. В декабре 1988 году на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Бюро Главной судебно-медицинской экспертизы Минздрава России была проведена первая в нашей стране молекулярно-генетическая идентификационная экспертиза, позволившая изобличить особо опасного убийцу-маньяка. Эта экспертиза и положила начало внедрению методов геномной дактилоскопии в практику работы правоохранительных органов России.

Метод идентификации личности на основании данных ДНК-анализа начал свое победное шествие в криминалистике, выполняя при этом два типа основных задач: задачи на совпадение биологических образцов, найденных на месте преступления, и полученных от подозреваемого в совершении этого преступления; задачи на установление родства по характеристикам ДНК. Сбор биологических образцов происходит во время следствия или по постановлению суда. В качестве исходного материала для выделения ДНК могут быть использованы кровь, сперма, слюна, пот, волосы, костные ткани – любые следы, содержащие хотя бы несколько клеток человека, из которых можно выделить ДНК. В последнее время разработан и активно внедряется в экспертную практику метод, позволяющий проводить исследование очень малых количеств разрушенных молекул ДНК – полиморфизм длины фрагментов рестрикции (*RFLP*, Restriction Fragment Length Polymorphism ПЦР представляет собой процесс контролируемого "молекулярного копирования" ДНК, позволяющий нарабатывать (амплифицировать) экспоненциально возрастающее со временем число интересующих последовательностей ДНК. Процесс амплификации напоминает процесс воспроизведения ДНК, который происходит в клетке перед ее делением, с тем лишь отличием, что копируется не вся хромосома, а лишь маленький ее фрагмент. Благодаря ПЦР имеется

возможность работать с единичными молекулами ДНК, увеличивая их количество в миллионы раз.

С выделения ДНК начинается первый этап ДНК-экспертизы – молекулярно-биологический анализ. Он заключается в определении размера специфических для каждого человека фрагментов ДНК, образующихся при ее обработке по определенным методикам.

Существуют несколько причин, по которым молекула ДНК так привлекательна для использования в судебной идентификации:

1. Уникальность индивидуальной ДНК. Каждый человек в мире генетически индивидуален (кроме однояйцевых близнецов, которые, по сути, являются клонами).

2. Генетическое постоянство организма. Генетическая информация не изменяется с течением жизни, а также в зависимости от типа клеток, из которых была выделена ДНК.

3. Чувствительность метода. Для современных методов ДНК-анализа достаточно нескольких капель крови, образца слюны (например, при наклеивании почтовой марки на конверт), пятна спермы, по площади в 10 раз меньше булавочной головки, следа ДНК, оставшейся на выкуренной сигарете.

4. Относительная стабильность молекул ДНК. В отличие от белков, являющихся нестабильными структурами, молекула ДНК обладает повышенной устойчивостью к воздействиям окружающей среды. Это свойство ДНК является для криминалистов ценным, поскольку позволяет проводить идентификацию по прошествии даже очень большого срока давности, или в случае если останки человека не могут быть опознаны никакими другими методами (например, при авиакатастрофе).

Идентификационные признаки связаны с двумя видами полиморфизма ДНК – полиморфизма **длины** последовательностей и полиморфизма **самих** последовательностей.

Носителями **полиморфизма длины последовательностей** являются тандемные повторы ДНК. Это последовательности ДНК, состоящие из

одинаковых субъединиц, повторяющихся многократно. Структура таких субъединиц в одном и том же локусе у разных людей одинакова или очень близка, но число их различно.

Полиморфизм последовательностей ДНК обусловлен различным порядком в них нуклеотидов при одинаковой длине последовательностей. Отличие даже по одному нуклеотиду может служить основой существования в популяции генетических вариантов.

Одними из таких гипервариабельных участков ДНК являются структуры, известные как **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats, вариабельное число тандемных повторов), которые характеризуются следующими особенностями:

1. В каждый VNTR-локус входит от 500 до 10 000 пар нуклеотидов.
2. Особенность VNTR заключается в том, что они целиком состоят из одной-двух ключевых последовательностей нуклеотидов, длиной обычно в 15-35 пар оснований.
3. Насчитывают сто и более известных разновидностей (аллелей) по длине для каждого VNTR, равномерно распространенных в человеческой популяции.
4. Данная конкретная последовательность VNTR может быть уникальной в геноме (т.е. находиться только в одном локусе) либо «разбросанной» по нескольким участкам ДНК.
5. Использование анализа VNTR очень удобно для целей установления отцовства.

В некоторых случаях использование VNTR оказывается невозможным.

Фрагменты другого типа – **STR** (Short Tandem Repeats, короткие тандемные повторы). Благодаря небольшим размерам удобно их исследование посредством ПЦР. Особенности STR:

1. STR состоят из тандемных повторов длиной в несколько нуклеотидов (обычно от 3 до 5 пар оснований), число таких повторов меньше, чем у VNTR.

2. ПЦР очень удобна в тех случаях, когда имеется ничтожно малое количество образца.
3. Чувствительность ПЦР – это также и слабая ее сторона.
4. STR-фрагменты имеют меньше аллелей, чем VNTR (от 7 до 15 на локус), и распределение частот аллелей в популяции не такое равномерное.

Достоинством метода является значительное сокращение времени исследований (результаты – в течение 24 часов). Однако лаборатория, использующая STR-анализ, вынуждена исследовать больше локусов для получения того же количества информации.

Аmplицированные STR-фрагменты, аналогично VNTR-фрагментам, фракционируют в геле и визуализируют их, используя различные методы детекции. В последнее время для этих целей принято использовать флуоресцентные метки, возбуждаемые лазерным излучением, поскольку такой метод, хотя и требует специального оборудования и значительных материальных затрат, является наиболее чувствительным и позволяет проводить исследование в режиме реального времени. Более того, благодаря разноцветным флуоресцентным меткам, можно анализировать несколько локусов одновременно.

Следующий этап – популяционно-генетический анализ. Когда генотипы образцов с места преступления и подозреваемого не совпадают, ответ ясен – следы оставлены не этим человеком. А вот в случае совпадения генотипов требуется проверка – идентичны эти образцы или это случайное совпадение. Для окончательного результата необходим статистический анализ полученных данных, особенно важный при совпадении генотипов преступника и подозреваемого: ведь в этом случае речь порой идет о человеческой жизни. Вероятность идентификации определяется на основе популяционно-генетических данных, т.е. данных о том, насколько часто в той или иной конкретной популяции может встречаться именно это сочетание генетических признаков.

Независимо от того, какой тип ДНК-тестирования был использован, интерпретация результатов должна ответить на два вопроса. Во-первых, необходимо определить, соответствует ли профиль ДНК, взятый на месте преступления, образцам, полученным от подозреваемого. Во-вторых, в случае соответствия, следует определить его достоверность. Другими словами, нужно выяснить, насколько распространен данный ДНК-"отпечаток" в популяции, т.е. насколько вероятна уникальность полученного ДНК-фингерпринта. Вероятность точности идентификации - это и есть та самая цифра, которая представляется в суде. Ее величина, удовлетворяющая суд, зависит от обстоятельств дела и обычно тем выше, чем более суровое наказание грозит обвиняемому.

Для вынесения обвинения нужно убедиться в том, что фрагменты, полученные непосредственно от подозреваемого и с места преступления, мигрируют в геле на одинаковое расстояние. Последующая компьютерная обработка данных должна подтвердить, что различия в уровне миграции статистически недостоверны (это этап определения соответствия). Далее следует оценка достоверности соответствия, основанная на принципах популяционной генетики. Очевидное соответствие ДНК подозреваемого и ДНК, полученной на месте преступления, еще не позволяет предъявить ему обвинение: ведь это совпадение может быть случайным и аналогичный ДНК-профиль может быть присущ другому человеку. С какой вероятностью возможно такое совпадение? Для ответа на этот вопрос исследователь должен знать относительную частоту, с которой исследуемые варианты (аллели) гипервариабельных участков присутствуют в определенной популяции (к которой относится подозреваемый). Однако это не всегда возможно, поэтому во многих случаях приходится опираться на косвенные данные. Общеизвестно, что формирование популяции не случайно и люди склонны выбирать себе партнера из той же географической области, этнической группы или имеющего такие же религиозные взгляды, а также в зависимости от его физических и поведенческих особенностей. Все это накладывает свой отпечаток на частоту

возникновения аллелей в популяции. Учет этих данных требует сложного статистического анализа, и до сих пор ведутся дебаты о том, какой из методов наиболее полно учитывает все разнообразие популяционно-генетических данных.

В случае отсутствия генетических данных о популяции, к которой относится подозреваемый, используются данные по другим популяциям, которые обрабатываются с помощью специальных коэффициентов пересчета, что, конечно, снижает степень надежности идентификации. Кроме того, итоговая вероятность зависит от множества других обстоятельств: вовлечение нескольких подозреваемых или содержание в образцах смеси биологического материала от разных лиц значительно усложняет статистический анализ и интерпретацию результатов теста.

В мире существует несколько систем с установленным стандартным набором локусов, по которым проводится ДНК-идентификация. В США, например, принята система CODIS, в которую входят 14 STR-локусов. Они находятся на разных хромосомах, и их независимое распределение делает статистический анализ более достоверным. В европейских странах более распространен набор ENFSI, по которому исследуются 9 локусов. В России часто используют набор фирмы Promega. Наборы локусов в разных системах частично перекрываются. Также существуют другие локусы, анализ которых проводится по мере необходимости.

На сегодняшний день с помощью генного метода идентификации личности практически решаются правоохранные задачи, которые ранее были неразрешимыми. Но очень важно при применении данного метода не переоценить его возможности. Так, исключается использование данного метода, если во время производства определенных следственных действий были допущены грубые нарушения, послужившие, к примеру, причиной порчи собранных объектов исследования. Действительно, несмотря на относительную универсальность данного метода, его применение требует от следователей и экспертов высокого уровня профессионализма. Для эксперта важно исключить

возможность случайного совпадения. Вероятность идентификации – ключевое значение криминалистического ДНК-исследования. Чтобы вычислять вероятность идентификации, необходимо в первую очередь иметь данные о частоте встречаемости генетических характеристик, используемых для анализа, именно в этой популяции. Для выявления этих частот у населения различных регионов в настоящее время существуют базы популяционно-генетических данных. Методы анализа, в том числе и для расчета вероятности идентификации по данным о генотипах лиц, вовлеченных в дело, и о популяционных частотах исследуемых аллелей, разрабатывают во всем мире, в том числе в России такие работы ведутся в Институте общей генетики РАН. Геномные экспертизы особенно эффективны при расследовании половых преступлений, убийств с расчленением трупа, катастроф, сопряженных с отделением частей тела, а также при необходимости сужения круга поиска лиц для установления их групповой принадлежности. В гражданских исках ДНК-экспертиза чаще всего применяется в делах по установлению отцовства.

В России с 1 января 2009 года вступил в силу Федеральный закон «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации» от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ. В РФ государственная геномная регистрация проводится в целях идентификации личности человека, она подразделяется на добровольную и обязательную государственную геномную регистрацию. Обязательной государственной геномной регистрации подлежат: лица, осужденные и отбывающие наказание в виде лишения свободы за совершение тяжких или особо тяжких преступлений, а также всех категорий преступлений против половой неприкосновенности и половой свободы личности; неустановленные лица, биологический материал которых изъят в ходе производства следственных действий; неопознанные трупы. Геномная информация, полученная в результате проведения государственной геномной регистрации, используется в следующих целях: предупреждение, раскрытие и расследование преступлений, а также выявление и установление лиц, их совершивших; розыск пропавших без вести граждан РФ, а также иностранных граждан и лиц без

гражданства, проживающих или временно пребывающих на территории РФ; установление личности человека, чей труп не опознан иными способами; установление родственных отношений разыскиваемых (устанавливаемых) лиц.

Итак, генотипоскопия – один из самых продвинутых и точных методов идентификации человека, однако при оценке результатов данных исследований необходимо исходить из того, что даже они не исключают вероятность ошибки, которая может очень дорого обойтись человеку.

3.4. Экологическая генетика

3.4.1. Предмет экологической генетики

Экологическая генетика – это синтетическая наука, наука на стыке генетики и экологии, использующая методы обеих наук. Первое определение экологической генетики было дано Ф.М. Шеппардом в 1958 году (Шеппард, 1970), обозначившее ее как науку, изучающую генетические основы гомеостаза и адаптации к абиотическим и биотическим факторам среды на популяционном уровне. Е.Б. Форд (1964) определил экологическую генетику как генетику популяций в природных условиях. Последнее определение до сих пор наиболее часто используется за рубежом. Ф.Фогель в 1958 году предложил концепцию новой науки фармакогенетики с областью исследования – роль генетических факторов в индивидуальной реакции организма человека на лекарственные препараты и неблагоприятные экологические воздействия (Фогель, Мотульски, 1990). Дальнейшее развитие фармакогенетики привело к возникновению экогенетики науки, предложенной Дж. Брюэром (1971), изучающей реакцию организма на различные агенты среды, исследующую различную чувствительность отдельных индивидуумов к действию потенциально опасных внешних агентов и индивидуальные особенности адаптации к окружающей среде (Фогель, Мотульски, 1990).

Данные концепции были обобщены С.Г. Инге-Вечтомовым (1998), который определил экологическую генетику как «область знания,

исследующую взаимовлияние генетических процессов и экологических отношений». При этом исследования в области экологической генетики ведутся как на уровне организмов (аутэкологии), так и на уровнях популяций и сообществ (синэкологии). Изучение генетических процессов основано на методах генетического анализа наследственности и изменчивости организмов. Сочетание составляющих экологии (аутэкологии и синэкологии) и генетики (наследственности и изменчивости) определяет структуру экологической генетики (табл. 3). Взаимодействие этих составляющих позволяет выделить четыре раздела экологической генетики: разработка элементарных эколого-генетических моделей; исследование биологических факторов изменчивости; изучение генетической основы устойчивости организмов к абиотическим факторам окружающей среды; генетическая токсикология.

Таблица 3

Общая структура экологической генетики (Инге-Вечтомов, 1998)

Генетические подходы	Типы экологических отношений	
	синэкология	аутэкология
Генетический контроль признаков (наследственность)	Эколого-генетические модели	Генетика устойчивости к факторам среды
Генетический контроль признаков (наследственность)	Биологические факторы изменчивости (мутагенеза)	Генетическая токсикология

3.4.2. Эколого-генетические модели

Разработка элементарных эколого-генетических моделей основана на применении двух методологических подходов. Первый подход заключается в анализе пищевых (трофических) цепей, которые в некоторых случаях могут

быть упрощены до схемы передачи конкретных химических соединений от продуцентов к потребителям, либо в определении конкретных веществ-регуляторов симбиотических отношений между организмами. Второй подход состоит в анализе генов детерминирующих продукцию вышеуказанных веществ, для чего получают мутантов с дефектными генами у каждого из взаимодействующих видов с последующей расшифровкой блокируемых процессов и оценкой влияния блокировки на их взаимоотношения.

Классическим примером разработки эколого-генетической модели является работа, проведенная под руководством профессора Л.А. Лутовой на кафедре генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета, по получению растений устойчивых к насекомым-фитофагам и некоторым фитопатогенным грибам (Инге-Вечтомов, 1997). Ряд организмов не способны к выработке стероидов и зависимы от их поступления от экзогенного источника, это насекомые, нематоды, а также некоторые паразитические грибы, например фитофтора (*Phytophthora infestans*). Так, многие гормоны насекомых имеют стероидную структуру и недостаток поступающих с пищей стероидов вызывает нарушение их развития, снижение плодовитости вплоть до стерильности. Таким образом, растения с пониженным содержанием данных соединений будут иметь повышенную устойчивость к поражению организмами фитофагами или паразитами, у которых отсутствует способность к синтезу собственных стероидов.

Для получения мутантных растений с пониженным содержанием стероидов культуры растительных клеток были облучены ультрафиолетовым светом. Затем клетки растений переносились на среду, содержащую полиеновый антибиотик (нистатин, филипин и др). Полиеновые антибиотики, связываясь с стероидами клеточных мембран, вызывают их повреждения. Поэтому на средах с данными антибиотиками выживали мутантные растительные клетки с пониженным содержанием стероидов в мембранах.

Полученные мутантные клеточные культуры испытывались в биотестах на пищевую ценность для дрозофилы. Перспективными считались те формы,

которые обеспечивали пониженную плодовитость мухи и задержку ее развития по сравнению с вариантом опыта, в котором дрозфила питалась клетками исходного, чувствительного растения. Как выяснила Л.В. Бондаренко, снижение плодовитости обычно сопровождалось нарушениями в развитии яичников у самок, выращенных на клетках табака, устойчивых к нистатину. Этот критерий доказывает, что отобранные мутанты обладают потенциальной устойчивостью к насекомым. Кроме того, исследовали содержание стероидов в мутантных клетках растений с использованием методов газожидкостной хроматографии. В некоторых случаях было показано изменение качественного состава и количества стероидов в клетках, Это доказывало, что именно данный путь биосинтеза изменен в результате мутации. На заключительном этапе, исследовали возможность получения целого растения в результате регенерации мутантных клеток. Это происходило далеко не всегда, поскольку заранее нельзя знать все побочные эффекты индуцируемых мутаций, а непосредственный интерес представляют только те мутанты, из которых можно получить целые растения.

По данной схеме с использованием полиенового антибиотика филипина в качестве селективного агента были получены аспиранткой профессора Л.А. Лутовой Л.Т. Ходжайовой были получены мутанты картофеля с измененным метаболизмом стероидов, была выявлена повышенная устойчивость (в 2-4 раза) у полученных растений к фитофторе по сравнению с исходными формами.

3.4.3. Биологические факторы мутагенеза

Биологические факторы мутагенеза – факторы биологического происхождения способные вызывать генетические мутации или влиять на активность мутагенов. Они представляют особый интерес, поскольку их существование указывает на генетическую активность синэкологических отношений. К биологическим факторам мутагенеза в настоящее время относят старение, иммунные и нейрогуморальные конфликты в организме, ДНК и

вирусы, токсины микроорганизмов, растений, животных.

Влияние старения на мутационный процесс впервые установлено в 1935 году М.С. Навашиным и Е.Н. Герасимовой. Они показали, что в проростках старых семян наблюдается резко увеличенное число клеток с разнообразными цитогенетическими изменениями, сформулировано положение о мутационном процессе как физиологическом явлении и о необходимости поиска основных факторов мутационного процесса внутри организма. К старости изменяется мутагенная чувствительность лимфоидных клеток организма. Облучение этих клеток рентгеновскими лучами приводит к более выраженным поражениям в хромосомном аппарате клеток, полученных из крови людей старшей возрастной группы. Н.Н. Ильинских с соавторами (1982) было показано, что частота лимфоцитов с цитогенетическими нарушениями при заболевании гриппом различна у детей (2-5 лет), лиц среднего возраста (17-35 лет) и в старшей возрастной группе (65-80 лет). Особенно высокий уровень цитогенетически измененных клеток наблюдается у лиц старшей возрастной группы.

Ю.Я. Керкисом (1940) и М.Е. Лобашевым (1946) выдвинута и развита так называемая физиологическая гипотеза мутагенеза, согласно которой существует организменный контроль спонтанного (самопроизвольного) мутагенеза (Ильинских и др., 1984). В экспериментах, проведенных под руководством профессора Ю.Я. Керкиса, его сотрудниками в Новосибирском академгородке было установлено, что у крыс, стрессированных резким звуковым сигналом, повышается чувствительность к мутагенному воздействию ионизирующей радиации. Животные, склонные к эпилептическим припадкам, более чувствительны к мутагенному действию как радиации, так и некоторых химических веществ. При этом денервация (перерезка нервов) печени и селезенки у животных индуцирует увеличение числа полиплоидных клеток. Денервация костного мозга вызывает у кошек увеличение количества клеток со структурными нарушениями хромосом и нарушения митоза. При денервации семенника наблюдалось увеличение числа сперматогониев с полиплоидным

набором хромосом, а также с дегенеративными формами сперматозоидов. Нервная и гормональная системы тесно связаны друг с другом и очень часто говорят о нейроэндокринных воздействиях на организм, при этом очень трудно отделить действие одной системы от другой. Например, в экспериментах со стрессированными крысами было установлено, что на резкий звуковой сигнал выделяется большое количество адреналина, при этом установлено, что введение крысам адреналина повышает способность различных мутагенных факторов индуцировать цитогенетические нарушения. Адреналэктомия (оперативное удаление надпочечников - органа, где образуется адреналин) у крыс снижает последствия радиационного мутагенеза.

Под руководством М.Е. Лобашева в 60-е годы на кафедре генетики и селекции Ленинградского университета были начаты эксперименты, доказавшие роль нервной системы в контроле частоты хромосомных aberrаций в соматических клетках (роговице глаза) у мышей (Ильинских и др., 1984). Развивая это направление, ученики М.Е. Лобашева (Р.И. Цапыгина, С.Н. Новоков, Е.В. Даев) показали мутагенный эффект феромонального стресса у мышей. Феромоны, летучие вещества, содержащиеся в моче этих животных, играют роль сигналов, вызывающих реакцию подчинения, агрессии и т.д. Пользуясь этими сигналами, старые самцы держат в подчинении самок и молодых самцов. Оказалось, что запах взрослого самца при однократном воздействии повышает частоту цитологических нарушений в сперматогенезе у молодых самцов, увеличивает частоту аномальных сперматозоидов и доминантных летальных мутаций, выявляемых после их спаривания с самками, не подвергавшимися воздействию.

Ю.Я. Керкисом также было выявлено влияние иммунологических реакций на мутагенез (Ильинских и др., 1984). При аллогенной трансплантации кожных лоскутов у мышей, различающихся гистологической совместимостью тканей, частота клеток костного мозга с хроматическими aberrациями повышается с 4-5% в контроле до 12-15% у опытных животных. После отторжения чужеродной ткани частота хроматических aberrаций снижается и к

двадцатому дню достигает контрольного уровня.

Мутагенная активность ДНК была установлена С.М. Гершензоном в конце 30-х годов. В его исследованиях ДНК из зубной железы теленка была добавлена в питательную среду с дрозofiлами дрозofiлу.

Особенности мутагенного действия ДНК:

1. Продленный мутагенный эффект (растянутость во времени) – многие мутанты появлялись в виде мозаичных особей, мутации возникали не только в первом, но и последующих поколениях. Эффект охватывает десятки клеточных поколений. Такого длительного действия не описано ни для одного другого мутагена.

2. Высоко избирательный характер действия ДНК – некоторые гены и участки хромосом мутировали особенно часто: частота мутаций некоторых генов возрастала на 2-3 порядка, а частота других генов не превышала спонтанный уровень или возрастала незначительно. Спектр мутаций, индуцированных ДНК у дрозofiлы, сильно отличается от спектра спонтанных мутаций или мутаций, вызываемых другими мутагенами.

3. ДНК индуцирует видимые и летальные мутации, однако они представлены только генными мутациями и микроделециями. Крупные перестройки хромосом полностью отсутствуют.

Возможным механизмом мутагенного действия препаратов ДНК является включение фрагментов молекул чужеродной ДНК в хромосомы по типу транспозиций.

В 1958 году С.И. Алиханьяном и Т.С. Ильиной выявлено мутагенное действие вирусов (Ильинских и др., 1982). Мутагенность выявлена для многих инфекционных для человека вирусов (кори, аденовируса, гриппа, скарлатины, оспы, ветряной оспы, эпидемического паротита и др.), вирусных вакцин, аттенуированных (ослабленных) вирусов. Мутагенное действие вирусов имеет те же особенности, что и ДНК.

Мутагенную активность имеют также некоторые токсины микроорганизмов, растений, животных. Мутагенное действие выявлено для

стрептолизина-О, продуцируемого гемолитическим стрептококком, афлатоксинов, который синтезируют некоторые плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*. Ряд токсинов содержащихся в растениях ингибируют деление клеточного ядра на стадии метафазы при митозе, в результате возникает полиплоидность клеток. Наиболее известным веществом, обладающим данным действием, является колхицин (содержится в растениях рода безвременник (*Colchicum*). Кроме того, токсины, блокирующие деление клеток, содержат также растения видов катарантус розовый (*Catharanthus roseus*), чистотел большой (*Chelidonium majus*), виды рода тисс (*Taxus*) и др. В растениях видов рода саговник (*Cycas*) обнаружен гликозид циказин, который гидролизует в кишечнике животных и человека с образованием глюкозы и N-метил-N' нитро-N-нитрозогуанидина – соединения с высокой мутагенной активностью. Камптотецины, содержащиеся в некоторых тропических растениях, впервые выделенные из растений вида *Camptotheca acuminata*, ингибируют фермент топоизомеразу I. В результате ингибирования данного фермента происходит перекручивание и повреждение клеточной ДНК.

Мутагенная активность обнаружена у токсинов, выделяемых печеночными трематодами, вызывающими заболевание человека и животных – описторхоз. Основная часть данных токсинов являются необычными азотистыми основаниями, например 6,7-димеркаптопурин, которые встраиваются в клеточную ДНК вместо обычных нуклеотидов, вызывая ее повреждение. Возникающие мутации в клетках лимфоцитов приводят к снижению иммунного ответа организмов человека и животных на заражение гельминтами.

3.4.5. Генетика устойчивости/чувствительности к факторам среды (экогенетика)

В данном разделе экологической генетики изучаются наследуемые особенности различий индивидов в реакции на воздействия факторов внешней

среды. Исследования в области экогенетики, в частности генетического контроля устойчивости сельскохозяйственных растений, животных и человека к неблагоприятным внешним факторам, имеют большое значение для медицины, сельского хозяйства и поддержания оптимальной среды обитания человека.

По экологическому значению существуют две группы адаптаций организмов к факторам окружающей среды (Шилов, 2000).

1. Адаптации, обеспечивающие поддержание гомеостаза организма в условиях устойчивых параметров окружающей среды.

2. Лабильные реакции организма, поддерживающие гомеостаз при отклонении условий среды от средних характеристик.

Эти два уровня адаптаций действуют совместно, и их взаимодействие обеспечивает существование организмов в окружающей среде.

В настоящее время наиболее полно изучена генетика адаптаций человека, принадлежащих ко второй группе, обеспечивающих функционирование организма при изменении условий среды, в связи с их высокой значимостью.

Главный подход экогенетики в изучении дифференциальной чувствительности организмов к действию факторов заключается в изучении биохимических особенностей организмов и, соответственно, генов, определяющих данные особенности; при этом считается, что биохимические особенности полностью определяют характер реакции организма на внешние воздействия.

Особенности активности метаболизирующих ферментов имеют большое значение в реакции организма на вещества-загрязнители, лекарства, органические соединения, поступающие с пищей (Бочков и др., 2011). Так, в последнее время обнаружена взаимосвязь заболеваемости с производственными факторами у лиц с мутациями в группе генов глутатион-S-трансфераз и N-ацетилтрансферазы. Первый фермент играет ключевую роль в обезвреживании продуктов перекисного окисления липидов и пероксидов ДНК, восстанавливает органические гидроперекиси в спирты и

изомеризует некоторые стероиды и простагландины. Центральное место в семействе генов глутатион-S-трансфераз занимают гены *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1*, функционально ослабленные аллели которых ассоциированы с развитием злокачественных новообразований, хронического бронхита, эмфиземы легких. Так как глутатион-S-трансфераза обеспечивает выведение из организма ароматических соединений и бензпирена, людям с пониженной активностью данных ферментов особенно опасен контакт с этими загрязнителями. Второй фермент участвует в детоксикации ксенобиотиков, содержащих ароматические амины или гидразиновые группы, путем их ацетилирования. Выделяют четыре полиморфных варианта: три «медленных» и один «быстрый». Доказана связь между «медленным» ацетилятором и развитием раковых заболеваний. Риск особенно повышается при воздействии соответствующих факторов среды (курение, контакт с фенолом, асбестом и другими вредными веществами). Данный фермент влияет на метаболизм некоторых лекарственных препаратов. Например, изониазида при лечении туберкулеза в стандартной дозе выводится из организма в норме в течение двух часов. Мутация в гене *NAT2* приводит к медленному ацетилированию, в результате наблюдается токсический эффект, как при передозировке, за счет медленного выведения из организма в течение 3-10 часов.

Люди с повышенной активностью арилгидрокарбонгидроксилазы чаще заболевают раком легких при контакте с полициклическими углеводородами, которые под действием этого фермента превращаются в эпоксиды, обладающие высоким уровнем канцерогенности.

У людей с низкой активностью глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы происходит гемолиз при действии сульфаниламидов, химических окислителей, также гемолиз вызывают у них конские бобы, принятые с пищей. Если своевременно не приняты меры, за гемолизом следует поражение почек. С другой стороны, носители дефектного гена глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы не болеют малярией, поэтому они часто встречаются в районах где была распространена данная болезнь. Недостаточность данного фермента

наследуется как сцепленная с X-хромосомой.

При отсутствии выработки фермента лактазы у людей отмечается непереносимость лактозы, приводящая к дискомфорту в кишечнике и диспепсическим явлениям после употребления молока, так как лактоза не расщепляется и служит субстратом для размножения бактерий. Мутантные аллели гена лактазы широко распространены у восточных народов (до 95-100%), среди американских индейцев и афроамериканцев (70-75%). У европейцев частота гомозигот по этим мутациям невелика (5-10%).

Один из вариантов синдрома нарушенного всасывания у детей связан с непереносимостью глютена (белок пшеницы и других злаков). Это заболевание называется целиакией. Дети тяжело болевают, как только начинают получать прикорм пищей, содержащей злаки. При исключении злаковых продуктов (хлеба, манной каши) такие дети развиваются нормально. Близнецовым и генеалогическим методами показано значение наследственности в этих реакциях. Предрасположенность к целиакии определяется взаимодействием двух генов главного комплекса гистосовместимости II класса (α -1 и β -1). При этом некоторые сорта пшеницы не вызывают патологических реакций. Они отличаются от других сортов заменой одной или нескольких аминокислотных остатков в молекуле глютена.

Примером влияния репарационной способности ДНК на реакцию человеческого организма на действие экологических факторов является пигментная ксеродерма: под воздействием солнечного света возникают ожоги, затем язвенные поражения кожи и, наконец, злокачественные новообразования. При пигментной ксеродерме поражается репарирующая система, восстанавливающая нормальное строение ДНК после повреждения ультрафиолетовыми лучами из-за мутаций в нескольких локусах, обуславливающих процессы репарации ДНК и детерминирующих синтез ферментов экзо- и эндонуклеазы, полимеразы, лигазы.

3.4.6. Генетическая токсикология

Данный раздел экологической генетики изучает способность факторов вызывать генетические изменения и разрабатывает методы оценки их генетической активности. Генетическая токсикология возникла в середине 70-х годов XX века. К этому времени было накоплено большое количество данных о мутагенном действии радиации и многих химических веществ, а также о потенциальной опасности вызванных ими генетических изменений для человека и других организмов.

Оценка генетических последствий воздействия факторов на человека является основной задачей генетической токсикологии. Однако из-за невозможности тестировать вещества и физические факторы непосредственно на человеке биотесты проводятся на микроорганизмах, растениях, животных и культуре клеток. Критериями генетической активности фактора являются генетические изменения, которые могут выявляться на генном, хромосомном и геномном уровнях, также косвенным доказательством повреждения ДНК может служить ее репарационная активность (SOS-биотест, внеплановый синтез ДНК). Тесты на мутагенную активность с использованием микроорганизмов применяются наиболее часто (Гераськин и др., 2010). При этом наиболее обычным является тест Эймса. В данном тесте используются мутантные штаммы бактерии *Salmonella typhimurium*, неспособные к синтезу гистидина с заменой, вставкой или выпадением пар оснований в гене. При действии мутагена возможно появление обратной мутации данного гена, в результате которой штамм приобретает способность расти на среде, не содержащей гистидин. Из-за отличий между метаболизмом бактерий и млекопитающих в тесте обычно используется микросомальная фракция печени мыши, можно также крысы или курицы, которая вместе с бактериальными клетками и исследуемым веществом наносится на поверхность среды без добавления гистидина в чашке Петри. Микросомальная фракция печени необходима для имитации эффекта обмена веществ, так как некоторые соединения, например

бенз[а]пирены, не обладают мутагенной активностью, являясь промутагенами, но при их окислении образуются производные обладающие генотоксичностью. Мутагенный потенциал исследуемого вещества оценивается пропорционально числу выросших на среде колоний.

Большое распространение приобрел также SOS-биотест, основанный на измерении SOS-репарации у индикаторного штамма *Escherichia coli* PQ 37. SOS-репарация индуцируется появлением в клетке повреждений ДНК в одноцепочечных участках, которые другие репарационные системы не смогли устранить, при этом повреждение в ДНК, как правило, остается. Система SOS-репарации включает в себя ряд ферментов, достраивающих одоцепочечную ДНК до двухцепочечной в «обход повреждений». В индикаторном штамме *E. coli* PQ 37 ген β -галактозидазы (лактазы) находится под контролем промотора одного из генов – SOS-регулона. Экспрессия этого гена индуцируется при повреждении ДНК и может быть оценена калориметрическим измерением активности β -галактозидазы. Для этого в среду с бактериями может быть добавлен орто-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, β -галактозидаза расщепляет это соединение на лактозу и нитрофенол, окрашивающий среду в желтый цвет. Интенсивность желтой окраски соответствует генотоксичности испытываемого соединения.

Биотесты с использованием высших растений являются наиболее простыми, экономичными и быстрыми. Наиболее широко применяется *Allium*-тест, в котором оценивается частота хромосомных aberrаций в клетках корневых меристем на кончике корня лука репчатого (*Allium cepa* L.).

Также достаточно широко используется тест с применением растений традесканции (клон 02). Данный клон является межвидовым гибридом между *Tradescantia occidentalis* и *T. ohiensis*. При оценке мутагенного воздействия факторов применяют методику учета соматических мутаций в клетках волосков тычинок. Клон имеет голубую окраску цветков и клеток волосков, формирующихся на тычинках. Изменение цвета клеток волосков с голубой на розовую считается фенотипическим проявлением мутации. В результате

деления мутантных клеток в волоске формируется сектор, содержащий одну или более клеток с розовой окраской. По количеству секторов розового цвета рассчитывают частоту соматических мутаций, которая зависит от мутагенной активности фактора. Из животных *Drosophila melanogaster* – наиболее обычный объект в тестах на генетическую активность факторов. Примером учитываемых эффектов при этом являются рецессивные, сцепленные с полом летальные мутации (метод Меллер-5 и др.), соматические мутации, доминантные летали.

Возникновение соматических мутаций учитывают по мозаичности глаз или крыльев как результату появления мутантных клонов клеток после воздействия фактора на личинок. В методе доминантных летальных мутаций воздействию фактора подвергаются самцы. Для расчета мутагенности фактора под микроскопом учитывают пустые оболочки яиц, из которых вылупились личинки, и не развившиеся яйца, отложенные самками мух после спаривания данными самцами. Неразвившиеся яйца считают проявлением летальных мутаций, доля которых от общего количества яиц зависит от мутагенности фактора. Результаты о мутагенности фактора, полученные в биотестах с использованием млекопитающих, крыс, мышей, хомяков и др., считаются наиболее близкими с действием данного фактора на человека из-за схожести метаболизма. При этом обычно используются методы учета доминантных леталей и хромосомные аберрации.

В настоящее время в биотестах на мутагенную активность активно используются культуры клеток животных и человека. Основными методами при этом являются микроядерный тест (учет клеток имеющих микроядра), определение хромосомных аберраций, одноцепочечные разрывы ДНК (метод ДНК-комет), внеплановый синтез ДНК, обмены сестринских хроматид.

Хромосомные аберрации учитываются ана-телофазным и метафазным анализами. Ана-телофазный анализ хромосом проводится у клеток, находящихся на стадии анафазы и телофазы, позволяет регистрировать хромосомные мутации типа делеций и транслокаций, следствием которых является наличие фрагментов, отставания хромосом, присутствие

многополюсных и асимметричных митозов. При метафазном анализе хромосом определяется наличие хромосомных aberrаций в клетках, на стадии метафазы. Данный метод является более точным в сравнении с ана-телофазным методом, однако он более сложный, требует высокой квалификации исследователя и знание морфологии всех хромосом организма, используемого в биотесте.

В методе ДНК-комет учитывается количество одноцепочечной ДНК в клетке, которая образуется как результат повреждения ДНК. Для этого проводится иммобилизация, подвергнутых воздействию изучаемого фактора клеток в агарозе, нанесенной на предметное стекло для микроскопии. Обработка образцов в буфере с высоким содержанием соли приводит к лизису клеточных мембран и экстракции белков. Молекулы ДНК разделяют электрофорезом, треки ДНК визуализируют посредством окрашивания флуоресцентным красителем, после чего образцы изучают микроскопически. При наличии разрывов ДНК нарушается структурная организация хроматина и утрачивается сверхспирализация ДНК, происходит ее денатурация, формируются фрагменты ДНК, не связанные с клеткой. В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, что и придает наблюдаемым объектам вид «комет» (отсюда и произошло название). Количество ДНК, мигрировавшей по направлению к аноду и определяемое микрофотометром, может использоваться в качестве показателя, характеризующего уровень повреждений ДНК в изучаемых клетках. «Кометы» анализируют либо путем визуального наблюдения и дифференциации «комет» по степени поврежденности ДНК, либо с использованием компьютерных программных средств обработки изображений.

Для определения внепланового синтеза ДНК клетки, подвергшиеся воздействию фактора, обрабатывают тимидином меченым тритием (радиоактивный изотоп). Клетки при этом находятся на стадиях, на которых нормального синтеза ДНК нет или он подавлен. Количество меченого тимидина в ДНК является показателем ее репарационного синтеза и отражает степень повреждения ДНК.

Кроме того, мутагенный эффект фактора можно оценить методом учета хромосомных aberrаций и микроядерным тестом клеток периферической крови людей, подвергшихся его воздействию. В настоящее время базовая схема тестирования ксенобиотиков на генотоксичность включает три этапа (Абилев, Глазер, 2013):

1. Использование наиболее простых и экономичных биотестов определения мутагенной активности (тест Эймса *Salmonella*/микросомальная фракция печени, методы учета хромосомных aberrаций и генных мутаций в клеточных культурах млекопитающих).

2. Биотестирование на мышах или крысах с учетом способности фактора индуцировать мутации в соматических клетках (методы учета хромосомных aberrаций).

3. Оценка потенциальной мутагенной активности в половых клетках животных (метод учета доминантных летальных мутаций у мышей).

Несмотря на то, что основной задачей генетической токсикологии является оценка генетических последствий воздействия факторов на человека, в настоящее время ее методы имеют также большое значение для экологического мониторинга, проводимого с целью изучения мутагенного воздействия антропогенных факторов на природные популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лавинообразное накопление генетической информации требует выделения ключевых направлений для подготовки молодых исследователей. Большой интерес вызывают современные разработки технологий секвенирования нуклеотидных последовательностей, особенно секвенирование нового поколения. Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени в настоящее время является надежным и широко используется в научных исследованиях, в медицине и внедрен в производство. Геномные и постгеномные технологии развиваются от структурно-функционального анализа геномов к изучению регуляции экспрессии генов и межмолекулярных взаимодействий. Путь от гена к признаку длителен и включает множество этапов и взаимодействий на молекулярном уровне. На каждом из них различные многочисленные факторы оказывают влияние на реализацию генетической информации. Многоступенчатые и многофакторные генные сети демонстрируют связи, необходимые для формирования фенотипа. Следующим этапом после определения нуклеотидных последовательностей является биоинформационный анализ. Для изучения механизмов генетических процессов важно знать и понимать генетический контроль клеточных механизмов, среди которых одним из основных является мейоз.

Генетика в настоящее время находит реальное практическое применение, прежде всего в молекулярной медицине. Знание основ и подходов этого направления представляет большой интерес, так же как и основы близкого к нему направления фармакогенетика. Изучение генетических процессов основано на методах генетического анализа наследственности и изменчивости организмов. Структуру одного из самых востребованных направлений экологической генетики определяет сочетание составляющих экологии (аутэкологии и синэкологии) и генетики (наследственности и изменчивости).

Изучение представленных в пособии материалов и закрепление их при проведении ПЦР и секвенирования ДНК позволит начинающим генетикам стать настоящими специалистами.

Список литературы

1. *Абилев С.К., Глазер В.М.* Генетическая токсикология: итоги и проблемы // Генетика. 2013.Т.49, № 1. С. 81-93.
2. *Артамонов В.В., Любченко Л.Н., Немцова М.В., Залетаев Д.В.* Неблагоприятная экология и молекулярные системы перспективной диагностики высокого риска развития онкозаболеваний (на примере рака молочной железы) // Вестник НИИ молекуляр. медицины «Молекулярная медицина и биобезопасность». 2004. Вып.4. С.37 – 54.
3. *Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены «предрасположенности»: введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. 263 с.
4. *Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л.* Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2007. 358 с.
5. *Бочков Н.П., Пузырев В.П., Смирнихина С.А.* Клиническая генетика: учебник для студ. высш. учеб. заведений. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 592 с.
6. *Браун Т.А.* Геномы / пер. с англ. М.;-Ижевск: Ин-т компьютер. исслед., 2011. 944 с.
7. *Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины/* под ред. Баранов В.С. СПб.: Изд-во Н-Л,2009.528 с.
8. *Гвоздев В.А.* Подвижная ДНК эукариот. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома // Сорос. образоват. журн. 1998. №8. С. 15-21.
9. *Глазко В.И., Глазко Г.И.* Введение в генетику. Биоинформатика. ДНК-технология. Генная терапия. ДНК-экология. Протеомика. Метаболика. Киев: КВІЦ, 2003. 640 с.
10. *Гераськин С.А., Сарапульцева Е.И., Цаценко Л.В. и др.* Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг: учеб. пособие для студ. вузов. М.: Академия ИЦ, 2010. 207 с.
11. *Голубовская И.Н.* Мейоз и гены. URL: www.inventors.ru/meioz_i_geny.html (дата обращения: 11.10.2013).

12. *Гришаева Т.М., Богданов Ю.Ф.* Генетический контроль мейоза у дрозофилы // Генетика. 2000. Т.36, № 10. С. 1301-1321.
13. *Животовский Л.А.* ДНК в суде // Химия и жизнь. 2001. № 12. С. 23-27.
14. *Зубов В.В.* Секвенирование по Ротбергу. (Потенциал полупроводникового секвенирования)/ Биомика. 2013. Т.5. №1. С. 48-61. URL: <http://biomics.ru/> (дата обращения: 02.09.2013).
15. *Кукес В.Г., Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В.* Клиническая фармакогенетика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 248 с.
16. *Иванов П.Л.* Индивидуализация человека и идентификация личности: молекулярная биология в судебной экспертизе // Вестник РАН. 2003. Т. 73, № 12. С. 1085-1097.
17. *Ильинских Н.Н., Бочаров Е.Ф., Ильинских И.Н.* Инфекционный мутагенез. Новосибирск: Наука, 1982. 168 с.
18. *Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.Ф.* Цитогенетический гомеостаз и иммунитет. Новосибирск: Наука, 1984. 256 с.
19. *Инге-Вечтомов С.Г.* Метаболизм стероидов и защита растений // Сорос. образоват. журн. 1997. № 11(24). С. 16-21.
20. *Инге-Вечтомов С.Г.* Экологическая генетика. Что это такое? // Сорос. образоват. журн. 1998. № 2(27). С. 59-65.
21. *Инге-Вечтомов С.Г.* Генетика с основами селекции: учебник для студентов высших учебных заведений. 2-е изд., перераб. и доп. СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. 720 с.
22. *Евгеньев М.Б.* Мобильные элементы и эволюция генома // Молекулярная биология. 2007. Т. 41, №2. С. 234-245.
23. *Кайданов Л.З.* Генетика популяций: учебник для биол., мед. и с.-х. спец. вузов/ под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. М.: Высш. шк., 1996. 320 с.
24. *Корженевская М.А., Степанов Н.Н.* Клеточный цикл. Митоз. Мейоз. Гаметогенез, курс лекций для студ.-медиков. 3-е изд. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2008. 48 с.

25. *Леск А.* Введение в биоинформатику / пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 318 с.
26. *Любомирская Н.В., Ильин Ю.В.* Мобильные генетические элементы эукариот: прошлое, настоящее, будущее // Молекулярная биология. 1999. Т.33, №6. С. 958-968.
27. *Натальин П.* «454-секвенирование (высокопроизводительное пиросеквенирование ДНК)»/ URL: <http://biomolecula.ru>, (дата обращения: 05.11.2013)
28. Национальный центр биотехнологической информации США. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 04.11.2013).
29. *Федеральный закон* о государственной геномной регистрации в Российской Федерации: от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ.
30. *Попов В.В.* Геномика с молекулярно-генетическими основами. М.: Кн. дом «ЛИБРОКОМ», 2009. 304 с.
31. *Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю.* ПЦР «в реальном времени»: подходы к анализу данных (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т.42, №5. С.520-528.
32. *Рябинина Н.Л., Банникова А.А., Шереметьева В.А. и др.* Анализ ДНК высших приматов с помощью интер-SINE-ПЦР // Генетика. 2008. Т. 44, №3. С. 315–322.
33. *Скрябин К.Г., Прохорчук Е.Б., Мазур А.М. и др.* Комбинирование двух технологических платформ для полногеномного секвенирование человека // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2009. Т.1, №3. С. 113-119.
34. *Трофимов Д.Ю., Бурменская О.В., Донецкова А.Д. и др.* Разработка тест-системы для определения уровня экспрессии мРНК FoxP3 на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени // Иммунология. 2008. № 3. С.182-187.
35. *Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека. М.: Мир, 1990. Т. 2. 378 с.
36. *Шенпард Ф.М.* Естественный отбор и наследственность. М.: Просвещение, 1970. 216 с.
37. *Шилов И.А.* Экология. М.: Высшая школа, 2000. 512 с.

38. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J. et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis* // Science. 2005. V. 307. P. 223–227.
39. Angly F.E., Felts B., Breitbart M. et al. The marine viromes of four oceanic regions // PLoS Biol. 2006. V. 4. P. 368.
40. Arkhipova I.R., Lyubomirskaya N.V., Ilyin Y.V. *Drosophila* retrotransposons. Austin. TX Molecular Biology Intelligen. Unit: KR.G Landes Company, 1995. 130p.
41. Arkhipova I.R., Pyatkov K.I., Meselson M. et al. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa // Nature Genet. 2003. V. 33. P. 123–124.
42. Bernard P.S., Pritham G.H., Witter C.T. Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping // Analytical Biochemistry. 1999. V.273. P.221-228.
43. Boguski M.S., Arnaout R., Hill C. Customized care 2020: how medical sequencing and network biology will enable personalized medicine // F1000 Biol Rep. 2009. V. 1. P. 73.
44. Cheung F., Haas B.J., Goldberg S.M. et al. Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology // BMC Genomics. 2006. V. 7. P. 272.
45. Cheung M.-K., Li L., Nong W., Kwan H.-S. 2011 German *Escherichia coli* O104:H4 outbreak: whole-genome phylogeny without alignment // BMC Research Notes. 2011. V. 4. P. 533.
46. Dhanasekaran S., Doherty T.M., Kenneth J., TB Trials Study Group. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification // J. Immunol. Methods. 2010. V.354, №1-2. P.34-39.
47. Diamandis M., White N.M., Yousef G.M. Personalized medicine: marking a new epoch in cancer patient management // Mol Cancer Res. 2010. V. 9. P. 1175–1187.
48. Flavell A.J., Knox M.R., Peace S.R., Ellis T.H.N. Retrotransposon–based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis // Plant J. 1998. V. 16. P. 643-650.
49. Edwards R.A., Rodriguez-Brito B., Wegley L. et al. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology // BMC Genomics. 2006. V. 7. P. 57.

50. *Ford E.B.* Ecological Genetics. London: Methuen, 1964. 368 p.
51. *Gerasimova T.I., Matjunina L.V., Mizrokhi L.J. et al.* Successive transposition explosions in *Drosophila melanogaster* and reverse transpositions of mobile dispersed genetic elements // EMBO J. 1985. V. 4. P. 3773–3779
52. *Gachon C., Mingam A., Charrier B.* Real-time PCR: what relevance to plant studies? // J Exp Bot. 2004. V.55. P.1445-1454.
53. *Gilbert M.T., Tomsho L.P., Rendulic S. et al.* Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts // Science. 2007. V. 317. P. 1927–1930.
54. *Goldberg S.M., Johnson J., Busam D. et al.* A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. V. 103. P. 11240–11245.
55. *Ilyin Y.V., Tchurikov N.A., Ananiev E.V. et al.* Studies on the DNA fragments and adjacent sequences // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1978. V. 42. P. 959-969.
56. *Giulietti A., Overbergh L., Valckx D. et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression // Methods. 2001. V.25. P.386-401.
57. *Heid C.A.* Real-Time quantitative PCR // Genome Res. 1996. V.6. P.986-994.
58. *Higuchi R.* Kinetic PCR Analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. V.11. P.1026-1030.
59. *Jeffreyes A.J., Wilson V., Thein S.L.* Individual specific «fingerprints» of human DNA // Ibit. 1985. V. 316. P. 76–79.
60. *Kahvejian A., Quackenbush J., Thompson J.F.* What would you do if you could sequence everything? // Nat Biotechnol. 2008. V. 10. P. 1125–1133.
61. *Kalendar R., Grob T., Regina M. et al.* IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // Theor. and Applied Genetics. 1999. V. 98. P. 704–711.
62. *Kalendar R., Schulman A.X.* IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // Nature Protocols. 2006. V. 1, №5. P. 2478–2484.

63. Kalendar R., Tanskanen J., Chang W. et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // PNAS. 2008. V. 105, №15. P. 5833–5838.
64. Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S. et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97, №12. P. 6603-6607.
65. Kim M., Lee K.-H., Yoon S.-W. et al. Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era // Genomics Inform. 2013. V. 11(3). P. 102-113.
66. Koeth R.A., Wang Z., Levison B.S. et al. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis // Nat Med. 2013. V. 5. P. 576-585.
67. Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet. 1999. V. 33. P. 479–532.
68. Kunin V., Copeland A., Lapidus A., Mavromatis K. et al. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008. 72(4). P. 557-578.
69. McClintok B. Controlling elements and the gene // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1956. V. 21. P. 197-216.
70. Leong D.T., Gupta A., Bai H.F. et al. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR // Biomaterials. 2007. V.28. P.203-210.
71. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method // Methods. 2001. V.25. P.402-408.
72. Margulies M., Egholm M., Altman W.E. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // Nature. 2005. V. 437. P. 376–380.
73. Maxam A.M., Gilbert W. A new method of sequencing DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. 1977. V. 74. P. 560-564.
74. Nebert D.W., Carvan M.J. Ecogenetics: from biology to health// Toxicol. Indust. Hlth. 1997. V.13. P.163 – 192.

75. Ohtsu K., Smith M.B., Emrich S.J. et al. Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.) // Plant J. 2007. V. 52. P. 391–404.
76. Panelli M.C., Wang E., Monsurro V. et al. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research // Trends Mol. Med. 2002. V.9. P.189-195.
77. Sandberg M., Lundberg L., Ferm M. et al. Real-time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods // European Food Research and Technology. 2003. V.217. P.344-349.
78. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase // J. Mol. Biol. 1975. V. 94. P. 444-448.
79. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. 1977. V. 74. P. 5463-5467.
80. Shirasu K., Schulman A.X., Lahaye T. et al. A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion // Genom. Res. 2000. V. 10. P. 908-915.
81. Service R.F. Gene sequencing. The race for the \$1000 genome // Science. 2006. V. 311. P. 1544–1546.
82. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere” // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. V. 103. P. 12115–12120.
83. Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A., Mills A.G. et al. Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods // Anal Biochem. 2000. V.285, №.2. P.194-204.
84. Thomas R.K., Baker A.C., Debiasi R.M. et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer // Nat Genet. 2007. V. 39. P. 347–351.
85. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization // Nat. Biotechnol. 1996. V.14. P.303-308.
86. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control gene // Genome Biology. 2002. V.3, №.7. P.0034.1-0034.11.

87. *Velicer G.J., Raddatz G., Keller H. et al.* Comprehensive mutation identification in an evolved bacterial cooperator and its cheating ancestor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 8107–8112.
88. *Vicient C.M., Kalendar R., Schulman A.X.* Envelope-class retroviruslike elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants // *Genom. Res.* 2001. V. 11. P. 2041- 2049.
89. *Vitte C., Panaud O.* LTR-retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 110. P. 91–107.
90. *Waugh R., McLean K., Flavell F.J., Pearce S.R. et al.* Powell Genetic distribution of BARE-1 retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 253. P. 687–683.
91. *Wicker T., Sabot F., Hua-Van A. et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements // *Nature Rev. Genet.* 2007. №8. P. 973–982.
92. *Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C. et al.* Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V.66. P.2853-2858.

Список использованных сокращений

АПФ	Ангиотензинпревращающий фермент
ДКП	длинные концевые повторы
ДНК-ШК	ДНК-штрихкодирование
dФ/dT	Электродвижущая сила
кДНК	комплементарная ДНК
КГО	коэффициент генетической оригинальности
МБС	микроскоп биологический световой
МДГ	мобильные диспергированные гены
ПААГ	полиакриламидный гель
ПГНИУ	Пермский государственный национальный исследовательский университет
ПДРФ	полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в реальном времени
T _m	температура плавления
эПЦР	эмульсионная полимеразная цепная реакция
СТАВ	Cetyltrimethylammonium bromide
ADA	Adenosine deaminase
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BAC	Bacterial artificial chromosome
dbEST-	Database for "expressed sequence tags"
ETS	Expressed Sequence Tags
HIV	Human immunodeficiency virus, ВИЧ
HSV	Herpes simplex virus
IRAP –	Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR –	Inter Simple Sequence Repeats
LTR –	Long Terminal Repeats
LINE	Long Interspersed Elements
MAC	Mammalian artificial chromosomes
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
ORF	Open Reading Frame
RAPD	Random Amplified Polymorphic
RBIP	<u>R</u> etrotransposon- <u>B</u> ased <u>I</u> nsertion <u>P</u> olymorphisms
REMAP	Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
SFHR	Small fragment homologous replacement
Rn	Значение флуоресценции нормализованного репортера.
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSAP	Sequence Specific Amplification Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
SINE	Short Interspersed Elements

STR	Short Tandem Repeats
UPGMA –	unweighed pair-grup method using arithmetic average
UCLA	University of California, Los Angeles
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
YAC	Yeast artificial chromosomes
ΔR_n	“R_n^+”(значение нормализованного репортерного сигнала экспоненциальной фазы амплификации), “R_n^-” (значение нормализованного сигнала флуоресценции базовой линии) или интенсивность флуоресцентного сигнала в любой из моментов реакции при данных условиях.

Приложения

Приложение 1

Определение количества кольцевых ДНК Т-клеточного рецептора человека методом ПЦР в реальном времени

Метод позволяет количественно определить кольцевые ДНК α -цепи Т-клеточного рецептора (α TREC). Эти молекулы являются маркерами тимических мигрантов – наивных Т-клеток, прошедших реаранжировку в вилочковой железе, но не подвергавшихся пролиферации на периферии. Определение количества клеток, несущих α TREC, позволяет проанализировать число тимических мигрантов в крови и оценить продуктивную функцию вилочковой железы.

При каждом запуске количественной ПЦР-РВ в качестве образцов также используют набор стандартов с известным числом копий молекулы α TREC для последующего построения калибровочной кривой. Условия для проведения реакции представлены ниже.

Праймеры для α TREC:

Прямой праймер: CACATCCCTTTCAACCATGCT;

Обратный праймер: GCCAGCTGCAGGGTTTAGG;

TaqMan-зонд: FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCACT-BHQ1;

длина ампликона – 108 пар нуклеотидов.

Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	5,00
Taq-полимераза (Platinum Taq)	0,125
Platinum Buffer без $MgCl_2$	2,5
$MgCl_2$ (50 ммоль/л)	1,75
Праймеры (12,5мкМоль)	1,00 каждого
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10 ммоль/л каждого)	0,5
Зонд (5 мкМоль)	1,00
Деионизированная вода	Довести до 25,00 мкл

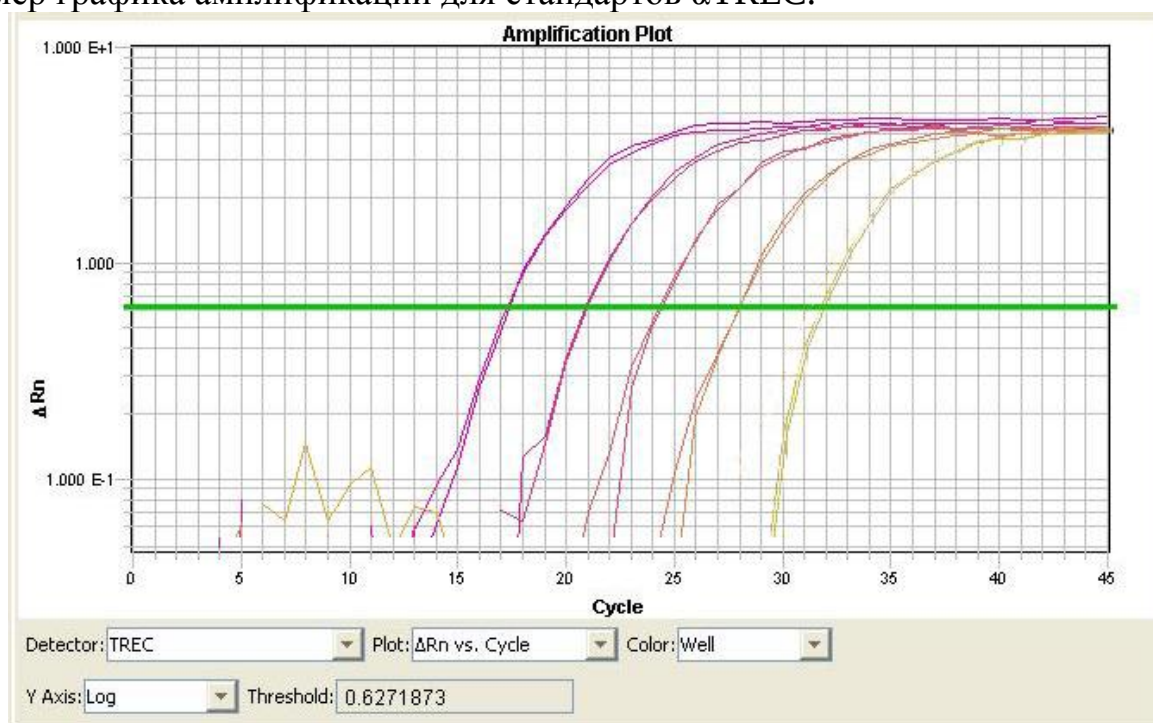
В случае необходимости использовать внутренний референсный краситель.

Условия амплификации

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	5 мин/95°C – 1 цикл для активации полимеразы
Амплификация	30 сек/95°C 60 сек/60°C – измерение
Количество циклов	40

Результаты исследования

Пример графика амплификации для стандартов α TREC.



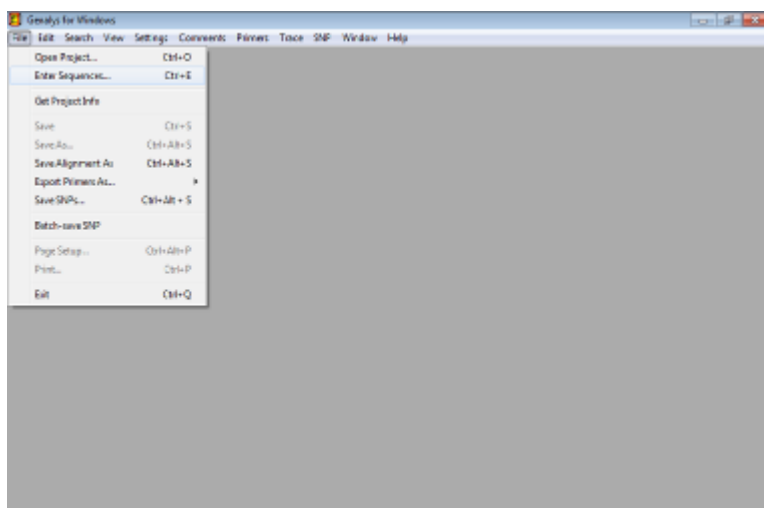
Данные, представленные на рисунке, подвергаются математическому анализу. Пороговые циклы амплификации каждого образца сопоставляются с концентрацией молекул α TREC. Строится калибровочная кривая в координатах «пороговый цикл – концентрация образца». Данные о пороговом цикле амплификации неизвестной пробы экстраполируются на полученную кривую. Рассчитанная концентрация молекул α TREC позволяет определить количество тимических мигрантов в крови пациентов, оценить эффективность работы вилочковой железы людей и проанализировать восстановительный потенциал пула наивных Т-лимфоцитов.

Выравнивание секвенированных последовательностей.

Определение однонуклеотидных замен, делеций и вставок

Для выполнения вышеописанных задач предлагаем программное обеспечение GenalysWin, ранние версии которого распространяются свободно. Genalys - программа, которая позволяет выравнивать длинные нуклеотидные последовательности (до 1000) и обнаруживать одиночные нуклеотидные замены (SNPs). Результаты работы можно сохранять в Excel (®Microsoft). В Genalys включен Primer 3, программный продукт, который позволяет осуществлять дизайн праймеров. Важная дополнительная особенность Genalys в том, что он существует и в Макинтоше и в версиях PC. Программа **GenalysWin** работает с файлами с расширением *.abl. Файлы с таким расширением мы можем получить после секвенирования.

Перед вами стартовое окно программы Genalys for Windows Version 2.8. Под заголовком окна вы видите строку основного меню (File, Edit, Search...). Если вы начинаете работу заново и у вас еще нет сохраненного проекта, то выберите в пункте основного меню **File** пункт **Enter Sequences** (ввести последовательности). Можно выбрать (выделением) сразу все интересующие последовательности и нажать **Открыть**.



Рекомендуется называть файлы по схеме: *вид, номер популяции_номер особи_праймер*. Например: t2_28_SP6

Pt2 – означает *Populus tremula* (тополь дрожащий, осина) популяция №2, 28 – номер особи, SP6 – название праймера

После введения последовательностей окно редактирования (Sequences edit) будет разделено на 3 части. Самая верхняя последовательность используется как справочная. Сверху – линейка нумерации. Начало нумерации можно поставить самим, начиная с места, где последовательности расшифрованы достаточно хорошо. Это можно сделать двойным кликом мыши в нужном месте линейки нумерации. В качестве справочной последовательности можно использовать любую последовательность популяции. Слева – название последовательности, длина последовательности и соответствие в процентах относительно справочной последовательности. В центре – последовательность ДНК. Вы можете перемещать последовательности вверх и вниз, удерживая их за название левой кнопкой мыши. Вы можете удалять последовательности (пункт Delete в контекстном меню). Если последовательность введена в проект верно, но неудовлетворительного качества, вы можете выбрать в меню **Edit** пункт “**zero sequence**” – это означает, что последовательность удалится, но название останется.



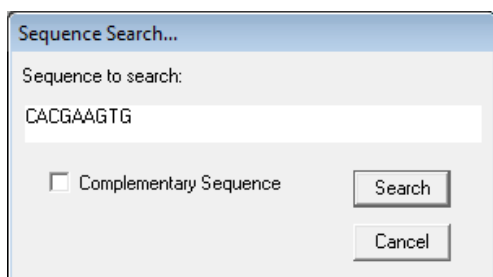
Справа – окно хроматограмм (Sequences traces). Это те же последовательности (название слева), но сопровождающиеся хроматограммой. Для удобства работы предлагаем расположить окна горизонтально.



Для того чтобы не «потерять» данные и результаты, рекомендуем сразу сохранить проект. Выбираем в меню **File** пункт **Save as...** Проект сохранится с расширением *.gpr. В процессе дальнейшей работы рекомендуем как можно чаще сохранять изменения.

Выравнивание последовательностей

Начнем работу по выравниванию последовательностей. Если вы визуально видите сдвиг последовательностей на несколько шагов, то можете выравнивать последовательности вручную. Наведясь на последовательность и удерживая клавишу Shift, вы можете передвигать последовательности вправо и влево относительно других последовательностей. Если визуально сдвиг последовательностей не определяется, то выделяем некую последовательность из примерно 10 нуклеотидов, копируем ее. Выбираем в пункте основного меню **Search** (поиск), **Search sequences** (поиск последовательностей), вставляем искомую последовательность и нажимаем кнопку **Search** (поиск)/



В окне редактирования мы видим буквы, соответствующие названиям нуклеотидов.

Если затруднено автоматическое определение нуклеотида, компьютер подставляет буквы, обозначение которых представлено в таблице.

Смесь нуклеотидов	Обозначение
A/C	M
A/G	R
A/T	W
C/G	S
C/T	Y
G/T	K
A/C/T	H
G/T/C	B
G/C/A	V
G/A/T	D
G/A/T/C	N

Новые технологии секвенирования ДНК (оборудование и этапы секвенирования в схемах)

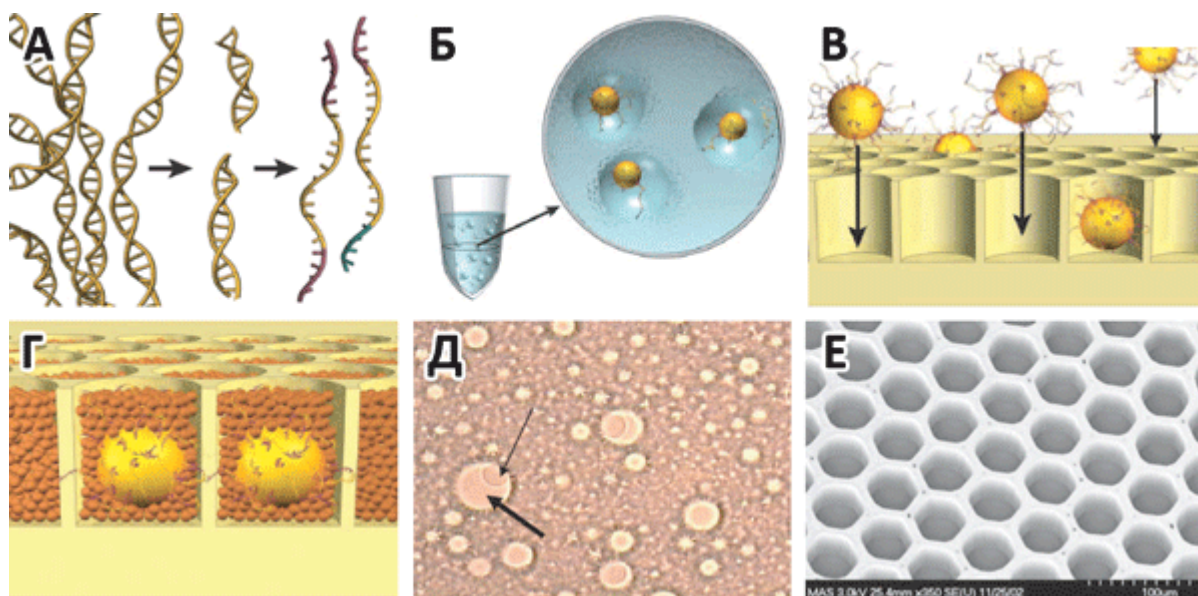


Рис. 1. Схема пиросеквенирования: *А* — ДНК фрагментируется, к фрагментам пришиваются олигонуклеотиды-«адаптеры». Полученные двуцепочечные молекулы ДНК разделяются на две комплементарные цепи; *Б* — Одноцепочечные молекулы ДНК прикрепляются к бусинкам в условиях, стимулирующих попадание лишь одной молекулы на бусинку. Отдельные бусинки заключаются в капли реакционной смеси, окруженные маслом. Количество молекул на бусинке увеличивается в миллионы раз в результате эмульсионной полимеразной цепной реакции (эПЦР); *В* — Эмульсия разбивается, и цепи ДНК-фрагментов, образовавшиеся в результате эПЦР, разделяются. Бусинки, несущие на своей поверхности миллионы одноцепочечных копий первоначального фрагмента ДНК, помещаются в лунки оптико-волоконного слайда, по одной в каждую лунку; *Г* — в каждую лунку добавляются бусинки поменьше, несущие на своей поверхности ферменты, необходимые для пиросеквенирования; *Д* — микрофотография эмульсии, изображающая «пустые» капли и капли, содержащие бусинки с ДНК-матрицей. Толстая стрелка указывает на 100-мкм каплю, тонкая — на 28-мкм бусинку; *Е* — микрофотография фрагмента оптико-волоконного слайда, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. Видна плакировка оптических волокон и пустые лунки

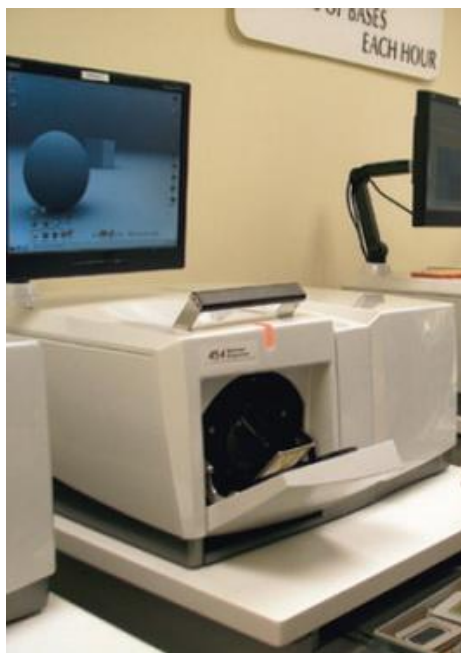


Рис. 2. Система для высокопроизводительного пиросеквенирования ДНК секвенатор Roche (454) Genome Sequencer FLX (2007).
(Изображение с сайта 454 Life Sciences)

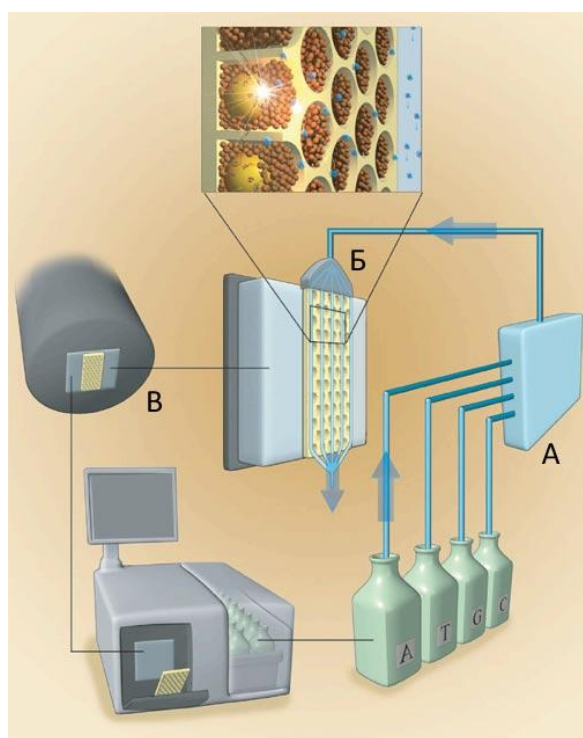
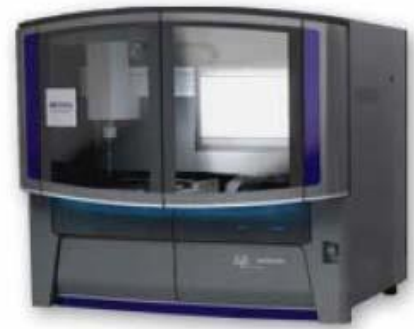


Рис. 3. Схема секвенатора. Инструмент состоит из трех основных блоков: *А* — система микронасосов для подачи реактивов; *Б* — проточная камера, содержащая оптоволоконный слайд с лунками-реакторами; *В* — оптоволоконная система с CCD-сенсорами для регистрации сигналов. Прибор также включает в себя встроенный компьютер с необходимым программным обеспечением для управления всем процессом



a



б

Рис. 4. Секвенаторы последнего поколения: **a** – HiSeq 1000 и HiSeq 2000 (Illumina); **б** – 5500 и 5500xl (Life Technologies).



Рис. 5. Personal Genome Machine (PGM) компании Ion Torrent

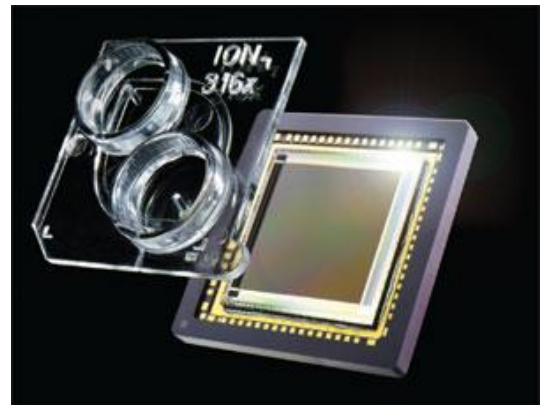


Рис. 6. Полупроводниковый микрочип для секвенирования ДНК Ion 316

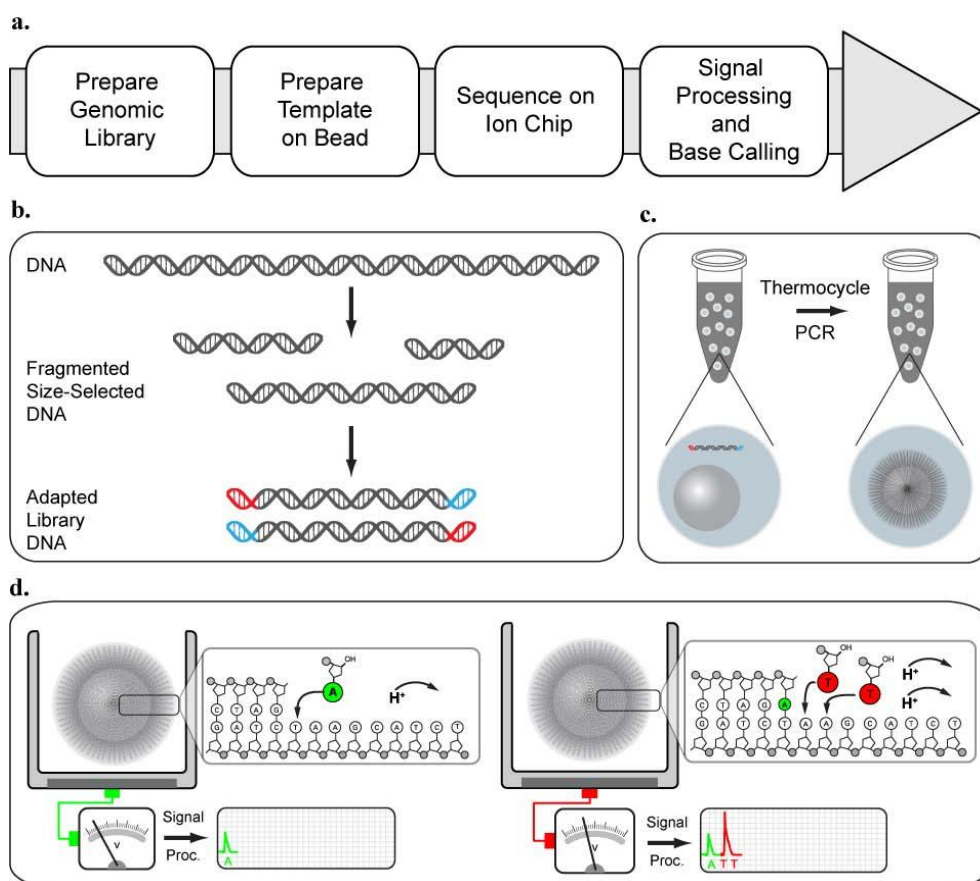
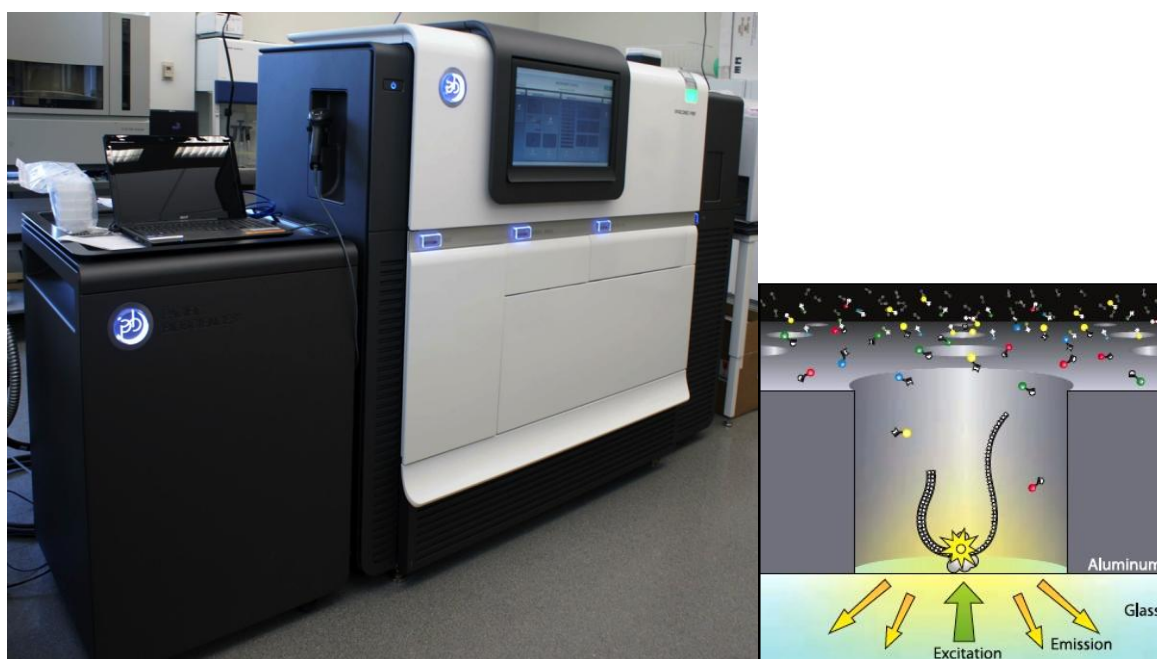


Рис. 7. Стадии полупроводникового секвенирования

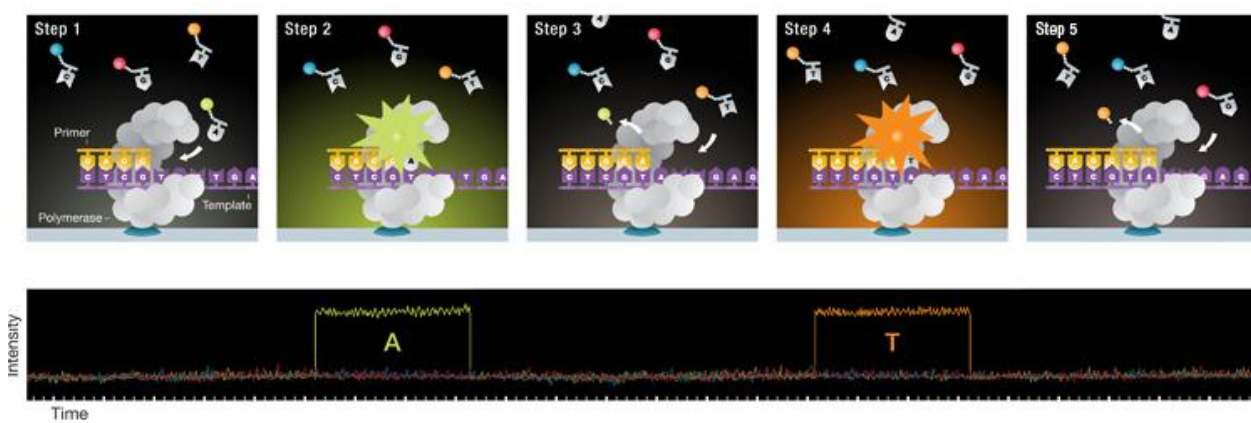
(http://www.genomics.cn/en/navigation/show_navigation?nid=4147)

Стадии подготовки ДНК к секвенированию (b -Prepare Genomic Library; c Prepare Template on Bead) по продолжительности превосходят само секвенирование (d – Sequence on Ion Chip, ~ 2 часа) в 2...3 раза, но самой продолжительной может оказаться обработка получаемой информации (Signal Processing and Base Calling). Что касается трудоемкости, то по этому показателю пробоподготовка (b+c) занимает первое место



a

б



c

Рис. 8. Секвенатор: **a.** – Секвенатор PacBio (Pacific Biosciences); **b, c** – принцип работы секвенатора (Изображение с сайта – http://en.wikipedia.org/wiki/Pacific_Biosciences)

Сведения об авторах

Боронникова Светлана Витальевна	зав. кафедрой ботаники и генетики растений ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), руководитель сектора «Геномных и постгеномных технологий» ведущей лаборатории «Микробных и клеточных биотехнологий» ПГНИУ, и.о. зав. НИЛ «Молекулярной биологии и генетики» ЕНИ ПГНИУ; доктор биологических наук по специальности «Генетика»
Плотникова Елена Генриховна	профессор кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН), доктор биологических наук по специальности «Микробиология»
Назаров Алексей Владимирович	доцент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН, кандидат биологических наук по специальности «Микробиология»
Шибанова Наталья Леонидовна	доцент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, кандидат биологических наук по специальности «Ботаника»
Данилова Мария Александровна	доцент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, кандидат биологических наук по специальности «Ботаника»
Бельтюкова Надежда Николаевна	доцент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, кандидат биологических наук по специальностям «Ботаника» и «Генетика»
Лисина Татьяна Николаевна	доцент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, кандидат биологических наук по специальности «Генетика»
Бобошина Ирина Викторовна	аспирант биологического факультета, кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, в 2013 году защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Генетика»
Сайдакова Евгения Владимировна	аспирант лаборатории экологической иммунологии ИЭГМ УрО РАН, в 2013 году защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Иммунология»
Нечаева Юлия Сергеевна	аспирант биологического факультета, ассистент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, готовит диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Генетика»

Учебное издание

Коллектив авторов:

**Боронникова Светлана Витальевна, Плотникова Елена Генриховна,
Назаров Алексей Владимирович, Шибанова Наталья Леонидовна,
Данилова Мария Александровна, Бельтюкова Надежда Николаевна,
Лисина Татьяна Николаевна, Бобошина Ирина Викторовна,
Сайдакова Евгения Владимировна, Нечаева Юлия Сергеевна**

Под общей редакцией С. В. Боронниковой

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ

Учебное пособие

Редактор *Л.В. Хлебникова*

Корректор *М.Н. Демидова*

Компьютерная верстка *С.В. Боронниковой*

Дизайн обложки *К.А. Нигирняк*

Подписано в печать 19.12.2013. Формат 60х84 1/16.

Усл. печ. л. 7,38. Тираж 100 экз. Заказ

Редакционно-издательский отдел
Пермского государственного национального
исследовательского университета
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Типография
Пермского государственного национального
исследовательского университета
614990, Пермь, ул. Букирева, 15