

MICHAŁ REICHERT, JADWIGA GRUNDBOECK

## artykuł przeglądowy

## Hybrydyzacja kwasów nukleinowych – zastosowanie w inżynierii genetycznej i diagnostyce

Zakład Biochemii, Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych, czyli zdolność do łączenia się w odpowiednich warunkach pojedynczych, odpowiadających sobie (komplementarnych) nici kwasów nukleinowych w strukturę dwuniciową, jest podstawą szeregu technik obecnie szeroko stosowanych w biologii i naukach pokrewnych. Zastosowania tych metod sięgają od badań podstawowych z zakresu biologii molekularnej aż do diagnostyki chorób mających swe źródło w anomaliach genetycznych.

Dwie charakterystyczne cechy tego procesu opisanego po raz pierwszy przez Marmura i Doty w 1961 r. (26), tj. że dwie sekwencje formujące dupleks muszą się cechować komplementarnością oraz że stabilność dupleksu zależy od stopnia komplementarności zostały szybko zauważone i wykorzystane do analizy zależności pomiędzy sekwencjami kwasów nukleinowych. Proces hybrydyzacji był następnie wykorzystany do badania struktury DNA i RNA. Jako przykład można podać obserwacje poczynione przez Brittena i Kohne (6), którzy zauważyli, że reasocjacja zdenaturowanego wcześniej DNA eukariontów następuje znacznie szybciej, niż by to wynikało z jego złożonej struktury i co doprowadziło wspomnianych autorów do odkrycia występowania w DNA tej grupy organizmów znacznego odsetka sekwencji powtarzających się. W badaniach ewolucyjnych badanie stabilności termicznej dupleksów okazało się cenną metodą w określaniu pokrewieństwa pomiędzy genami różnych gatunków roślin i zwierząt. Dalszym znaczącym momentem w rozwoju technik bazujących na hybrydyzacji kwasów nukleinowych były odkrycia dokonane w latach 60-tych przez Gall i Pardue (9). Badacze ci wprowadzili po raz pierwszy metodę lokalizowania pozycji specyficznych sekwencji nukleotydomów w jądrze lub chromosomach poprzez hybrydyzację sondy do materiału komórkowego utrwalonego na szkiełku mikroskopowym.

Znacznym impulsem do pełniejszego wykorzystania tych technik był rozwój technik rekombinacji DNA i potrzeba posiadania metody wykrywania interesujących badacza sekwencji w zrekombinowanych klonach. Grunstein i Hogness (13) zastosowali po raz pierwszy hybrydyzację do kolonii bakteryjnych, a Benton i Davies (3) do analizowania lysinek fagowych. Te metody miały olbrzymie znaczenie dla rozwoju technik analizowania sekwencji i budowy DNA. Zastosowanie techniki elektroforezy do rozdzielania fragmentów kwasów nukleinowych trawionych enzymami restrykcyjnymi w połączeniu z wprowadzeniem metody transferu rozdzielonych frakcji na filtr nitrocelulozowy z następującą hybrydyzacją umożliwiło identyfikowanie specyficznych sekwencji wśród innych prążków (metoda Southerna, ang. Southern blotting) (39) i dało początek dalszym modyfikacjom znanym (z ang.) jak Northern (1) i Dot blotting (21).

Reasumując obecne zastosowania metody hybrydyzacji

nukleinowych należałoby je wymienić w następującym porządku:

- analiza hybrydyzacji w roztworze w badaniach nad budową i strukturą genomu,
- hybrydyzacja na nośniku stałym (hybrydyzacja z replikami kolonii bakteryjnych i fagowych, met. Southern, Northern i Dot-blotting oraz DNA finger printing),
- hybrydyzacja „in situ”,
- elektronomikroskopowe badania hybrydów kwasów nukleinowych.

Powyższa terminologia wymaga wyjaśnienia; metoda Southerna lub z ang. „Southern blotting” dotyczy badania techniką hybrydyzacji kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). Dla odróżnienia badanie tą techniką RNA określa się mianem „Northern blotting”. W obu tych technikach hybrydyzacja jest poprzedzona trawieniem enzymami restrykcyjnymi i rozdziałem elektroforetycznym, a następnie transferem badanego kwasu nukleinowego na filtr nitrocelulozowy. W odróżnieniu — metodą „Dot blotting” przyjęto nazywać hybrydyzację do sondy molekularnej zarówno DNA, jak i RNA znajdującego się na filtrze nitrocelulozowym bez uprzedniego trawienia enzymami restrykcyjnymi i rozdziału elektroforetycznego.

Ze względu na ograniczone ramy niniejszego artykułu zostanie przedstawiona jedynie krótka charakterystyka wybranych technik, mogących mieć znaczenie w diagnostyce chorób wirusowych zwierząt. Jedną z najczęściej stosowanych jest metoda Southerna. Metoda ta ma na celu identyfikację poszukiwanych przez badacza sekwencji DNA z reguły pośród olbrzymiej masy innych sekwencji w danym momencie nieistotnych. W tym celu badany DNA jest cięty wybranym enzymem restrykcyjnym na fragmenty rozdzielane następnie elektroforetycznie w żelu agarozowym. Uwidocznienie produktów trawienia następuje po zanurzeniu żelu w roztworze bromku etydyny w postaci efektu fluorescencji. Rozdział elektroforetyczny nie daje, zwłaszcza w przypadku trawienia genomowego DNA, praktycznie żadnych informacji ze względu na ogromną ilość prążków uszeregowanych od najkrótszych do najdłuższych, wśród których trudno jest zidentyfikować ten, który zawiera poszukiwane sekwencje. Dopiero hybrydyzacja w roztworze sondy molekularnej pozwala na jego zlokalizowanie. W tym miejscu wyjaśnienie: sonda molekularna jest to wyznakowany pierwiastkiem radioaktywnym lub innym markerem i zdenaturowany do struktury jednoniciowej fragment genu o sekwencji odpowiadającej (homologicznej) poszukiwanemu fragmentowi kwasu nukleinowego (szersza charakterystyka w podrozdziale: sondy molekularne).

DNA po rozdzieleniu w elektroforezie jest denaturowane, czyli przekształcane ze struktury dwuniciowej w jednoniciową i przenieszone metodą sączenia kapilarnego na filtr nitrocelulozowy. DNA przyklejony na

filtrze jest następnie zapiekany w temp. 80°C celem związania jego pojedynczych nici ze strukturą filtra. Z kolei filtr jest zanurzany w roztworze sondy molekularnej, w którym pozostaje od kilku do kilkunastu godzin przy zachowaniu ściśle określonych warunków temperaturowych i stężenia soli (ma to pierwszorzędne znaczenie dla szybkości hybrydyzacji). W trakcie tej procedury ma miejsce łączenie sondy molekularnej z tymi fragmentami DNA, które są w stosunku do niej homologiczne. Po zakończeniu hybrydyzacji filtr płucze się celem usunięcia niezwiązanej puli sondy i w przypadku, gdy była ona wyznakowana materiałem radioaktywnym eksponuje filtr wobec kliszy rentgenowskiej. Na kliszy w miejscach odpowiadających wiązaniu się DNA z sondą wystąpią w związku z tym zaczerwienienia. Powyższa metoda informuje nas, czy dana sekwencja występuje w badanym materiale, a ponadto pozwala na określenie wielkości poszukiwanego fragmentu i jego koncentracji przez porównanie ze wzorcowym DNA znajdującym się na filtrze i poddawanym podobnej obróbce. Informacje te uzyskuje się na podstawie lokalizacji prążka i stopnia zaczerwienienia kliszy proporcjonalnego do czasu ekspozycji i ilości związanego materiału radioaktywnego.

Z innych metod wykorzystujących technikę hybrydyzacji na filtrach, a mogących mieć zastosowanie w diagnostyce wirusologicznej należałoby wymienić hybrydyzację „in situ” i „DNA finger printing”

### Hybrydyzacja „in situ”

Ta metoda jest szeroko stosowana do wykrywania specyficznych sekwencji w preparatach histologicznych, chromosomach, pojedynczych komórkach lub skrawkach tkanek (2, 4, 5, 17, 24). Od metody Southern różni się tym, że można ją stosować bezpośrednio na szkiełku mikroskopowym bez uprzedniego transferu na filtr nitrocelulozowy. Metoda ta umożliwia nie tylko wykrycie obecności poszukiwanych sekwencji, lecz także ich precyzyjną przestrzenną lokalizację w komórce. Znajduje to zastosowanie np. do wykrywania RNA, które jest obecne w niewielkiej subpopulacji badanych komórek i które nie mogłoby być wykryte po jego ekstrakcji z całej tkanki ze względu na olbrzymie „zanieczyszczenie” pozostałymi rodzajami RNA. W takich przypadkach metoda hybrydyzacji „in situ” gwarantuje większą czułość, niż stosowana do wykrywania sekwencji RNA metoda Northern blotting. Jeśli chodzi o sondę, to znakuje się ją zarówno pierwiastkami radioaktywnymi, jak i biotyną. Ze względu na konieczność precyzyjnej lokalizacji poszukiwanych sekwencji stosuje się jedynie niskocenergetyczne izotopy np. tryt.

### DNA finger printing

Hybrydyzacja na nośniku stałym w metodzie określanej z ang. jako „DNA finger printing” wydaje się mieć ogromne perspektywy diagnostyczne (18). Wykorzystuje się tutaj obecność w DNA eukariontów znacznego odsetka tzw. sekwencji powtarzających się oraz cechujących się dużą zmiennością i w związku z tym nadających DNA poszczególnych osobników niepowtarzalny charakter i indywidualność, podobnie jak to jest z układem linii papilarnych, będących indywidualną, różniącą cechą każdego człowieka. Ta zmienność ma swoje źródło prawdopodobnie w mechanizmie rekombinacji genetycznej w trakcie mejozy lub mitozy, polegającej na nierównym rozdziale sekwencji repetytywnych, a co za tym

idzie powstawaniu polimorficznych alleli (12, 37). Powyższe zjawiska są przyczyną różnic w autoradiogramach otrzymanych po hybrydyzacji rozdzielonych elektroforetycznie i trawionych próbek DNA wyrażających się obecnością lub brakiem poszczególnych prążków.

Metoda DNA finger printing może być z tych względów pomocna w badaniu pokrewieństwa między osobnikami m.in. w medycynie sądowej (12, 16, 18, 32). W odróżnieniu od tradycyjnych metod wykorzystujących badanie grup krwi, przy pomocy których można jedynie wykluczyć pokrewieństwo, DNA finger printing oferuje dodatkowo możliwość wskazania takowego pokrewieństwa w oparciu o próbki DNA pochodzące od konkretnych osobników. DNA finger printing jest wygodnym narzędziem w szybkim badaniu zmian genetycznych, będących następstwem rozwoju tkanki nowotworowej. Porównanie autoradiogramów próbek DNA pochodzących od zdrowych i chorych osobników uwidacznia pojawienie się nowych lub wypadnięcie niektórych prążków związane z utratą alleli. Metoda ta może również znaleźć zastosowanie w weryfikacji rodowodu w hodowli zarodkowej.

### Sondy molekularne

Sonda molekularna jest to specjalnie oznakowany fragment kwasu nukleinowego (DNA lub RNA), przy pomocy którego można wykrywać specyficzne sekwencje nukleotydowe w materiale biologicznym. Zastosowanie sond molekularnych w badaniach naukowych, w tym również w diagnostyce chorób zwierząt, jest efektem dynamicznie rozwijającej się w ostatnich dziesięcioleciach dyscypliny określanej mianem biologii molekularnej. Za przełomowy moment w rozwoju tej techniki badawczej można uznać doświadczenia wykonane w 1965 r. przez Gillespie i Spiegelmana (10), a dotyczące hybrydyzacji kwasów nukleinowych na filtrach nitrocelulozowych. Od tego momentu dokonano szeregu modyfikacji tej metody, zwiększających jej czułość, specyficzność, a także zwiększył się zakres zastosowań od badań podstawowych (analiza genów, określanie poziomu ekspresji, badanie struktury DNA i RNA) aż do diagnostyki konkretnych czynników chorobotwórczych włącznie.

Stosowanie sondy molekularnej np. w diagnostyce wirusologicznej musi być poprzedzone uzyskaniem materiału genetycznego potrzebnego do jej konstrukcji tzn. fragmentu kwasu nukleinowego o interesującej badacza sekwencji nukleotydów, który będzie hybrydyzował tzn. łączył się chemicznie z odpowiadającym mu homologicznym DNA lub RNA obecnym w badanym materiale biologicznym. Aby uzyskać materiał na sondę molekularną trzeba znać przynajmniej fragment sekwencji nukleotydowej, z którą ma ona hybrydyzować. Na tej podstawie istnieje możliwość jej syntezy chemicznej w programowanym automatycznym urządzeniu do syntezy oligonukleotydów. Zwykle syntetyzuje się je w formie krótkich fragmentów o długości od dwudziestu do dwudziestukilku par nukleotydów, które wystarczają już jako materiał na sondę po oznakowaniu radioizotopem. Sonda skonstruowana w oparciu o taki fragment syntetyczny jest jednak gorsza od sondy otrzymanej z naturalnego materiału w tym sensie, że daje częściej odczyny nieswoiste, słabszy sygnał w autoradiografii i wymaga stosowania tzw. łagodnych warunków w trakcie hybrydyzacji i płukania, co często jest powodem znacznego tła i mało czytelnych wyników. Pewnym ograni-

zeniem w konstrukcji takiej sondy jest również znaczny koszt syntezy chemicznej oligonukleotydów. W związku z powyższym często stosuje się następujący schemat postępowania. Przy pomocy syntetycznego oligonukleotydu oznakowanego radioizotopem identyfikuje się poszukiwaną sekwencję w materiale biologicznym, a następnie klonuje się taki gen przy pomocy odpowiedniego wektora do bakterii, które można następnie łatwo i szybko namnożyć i uzyskiwać po oczyszczeniu dowolną ilość żądanego materiału genetycznego (szerzej o klonowaniu w dalszej części artykułu). Jedną z nowszych technik (28, 34) umożliwiających otrzymanie sondy jest zastosowanie metody PCR — polymerase chain reaction (dokładne omówienie w oddzielnym artykule). W tym celu syntetyzuje się parę oligonukleotydów komplementarnych do obydwu nici poszukiwanego fragmentu DNA na jego przeciwnych końcach. Sekwencje zawarte pomiędzy tymi oligonukleotydami (zwanymi również z ang. primerami) są następnie w reakcji polimeryzacji wielokrotnie powielane. W wyniku tej reakcji uzyskuje się miliony kopii wybranego fragmentu DNA, który następnie będąc już w znacznych (mikrogramowych) ilościach do dyspozycji może służyć jako materiał na sondę. Technika PCR może być również wykorzystana do bardzo wydajnego znakowania kwasów nukleinowych (36), umożliwiającego uzyskanie wysokiej aktywności specyficznej (szerzej o znakowaniu w dalszej części artykułu).

Znane są dwa zasadnicze rodzaje sond: gorące i zimne. Pierwsze z nich — są to fragmenty kwasów nukleinowych wyznakowane pierwiastkiem radioaktywnym np. izotopem fosforu, siarki lub trytem. Natomiast drugi rodzaj — to sondy wyznakowane substancjami nieradioaktywnymi np. biotyną. Taka biotynylowana sonda jest następnie po związaniu z poszukiwaną sekwencją wykrywana w reakcji kolorymetrycznej przy pomocy kompleksu avidyna-enzym lub streptawidyna-enzym. Tymi metodami można wykrywać nawet do 1 pg. poszukiwanych sekwencji. Uważa się, że sondy gorące cechują się większą czułością w porównaniu do zimnych, niemniej jednak te ostatnie posiadają cały szereg zalet takich, jak: brak niebezpieczeństw związanych z operowaniem izotopami, ich stabilność i związany z tym brak ograniczeń czasowych w stosowaniu, możliwość stosowania wyższych koncentracji sondy zwiększających czułość sondy bez jednoczesnego wzrostu tła, znacznie krótszy czas testu, co jest związane z brakiem autoradiografii, ponadto stosowanie sondy zimnej jest tańsze zwłaszcza przy niezbyt częstych badaniach.

Znakowanie DNA celem otrzymania sondy molekularnej wykonuje się podobnymi metodami niezależnie od tego, czy substratem jest nukleotyd znakowany np. fosforem radioaktywnym, czy też nukleotyd biotynylowany. Najkrócej rzecz ujmując polega ono na wymianie lub uzupełnieniu części nukleotydów tworzących DNA przez nukleotydy znakowane. Znakowanie może być prowadzone na DNA jednoniciowym po uprzednim zdenaturowaniu cieplnym DNA dwuniciowego, (DNA jednoniciowy służy wówczas jako matryca dla enzymu polimerazy), bądź też możliwe jest znakowanie DNA dwuniciowego. Polega ono na wymienieniu części nukleotydów (metoda nick-translacji lub przy użyciu polimerazy T4) lub dodaniu ich na końcach DNA mającego służyć jako sonda (metoda z wykorzystaniem kinazy polinukleotydowej).

Najczęściej stosowanymi metodami są: Nick-translacja i znakowanie przy użyciu wielu primerów. W pierw-

szej metodzie wykorzystuje się aktywność enzymatyczną dezoksyrybonukleazy I, który to enzym wykonuje nacięcia (po angielsku „nick”) w dwuniciowym DNA mające postać ubytków części nukleotydów w jedncj nici. Te ubytki są następnie uzupełniane enzymatycznie znakowanymi nukleotydami. W drugiej metodzie wykorzystuje się mieszaninę syntetycznych heksanukleotydów jako primerów, które po dodaniu do zdenaturowanego (jednoniciowego) DNA poddawanego znakowaniu wiążą się z nim i dają początek enzymatycznej reakcji polimeryzacji na matrycy tegoż DNA. Ponieważ w środowisku te same reakcje enzymatycznej znajdują się znakowane nukleotydy, są one wbudowywane do nowo syntetyzowanej nici.

Stosunkowo nową techniką otrzymywania sond molekularnych o dużej aktywności specyficznej jest wspomniana już metoda PCR. Metoda ta, podobnie jak poprzednia, wykorzystuje reakcję polimeryzacji do wbudowywania (najczęściej radioaktywnych) nukleotydów do syntetyzowanej nici, ale ponieważ jest to połączone z równoległą amplifikacją DNA matrycowego, otrzymany produkt cechuje się wyjątkowo dużą aktywnością specyficzną. Metoda ta posiada cały szereg innych jeszcze zalet; szczegółów można znaleźć w pracy (36).

### Klonowanie molekularne

Stosowanie sond molekularnych bezpośrednio w diagnostyce czynników etiologicznych chorób zakaźnych zwierząt oraz anomalii w aparacie genetycznym to tylko jedno z możliwych zastosowań tego narzędzia badawczego. Równie ważne, a może nawet bardziej fundamentalne zastosowanie mają sondy w inżynierii genetycznej, a także w badaniach nad strukturą i funkcjonowaniem genów. Jednym z podstawowych problemów przy prowadzeniu tego rodzaju badań jest posiadanie dostatecznej ilości materiału genetycznego, który ma być obiektem manipulacji. Technika, która umożliwia osiągnięcie tego celu, jest tzw. klonowanie molekularne.

Pod pojęciem klonowanie molekularne należy rozumieć szereg technik z zakresu inżynierii genetycznej, mających na celu identyfikację określonych, interesujących badacza sekwencji DNA, a następnie ich przeniesienie w zdolny do replikacji układ biologiczny np. bakterie celem umożliwienia biologicznej syntezy wklonowanego materiału. Posiadanie takiego klonu umożliwia badania nad strukturą i sekwencją kwasów nukleinowych, mechanizmami transkrypcji i translacji, a także uzyskanie zrekombinowanych białek do produkcji immunologicznie czynnych preparatów, szczepionek i zestawów diagnostycznych typu ELISA.

Ostateczny cel, jaki przyświeca badaczowi rzutuje na wybór metody postępowania przy klonowaniu. Uzyskanie możliwości replikacji materiału genetycznego możliwe już jest przy zastosowaniu wektora prokariotycznego np. powszechnie stosowanej bakterii *E. coli*. Natomiast jeśli celem jest uzyskanie pełnowartościowych preparatów białkowych możliwych do stosowania np. w profilaktyce chorób zakaźnych, wówczas wskazane jest użycie wektora eukariotycznego np. komórek ssaków. Przewaga tych ostatnich nad wektorami prokariotycznymi tkwi w bardziej wyspecjalizowanym aparacie enzymatycznym, który umożliwia uzyskanie pełnowartościowych białek odpowiadających budową i składem białkom natywnym, występującym w organizmach ssaków. Komórki bakterii lub grzybów stosowane do ekspresji nie mają w pełni takich możliwości.

Pierwszy etap klonowania zwykle wymaga identyfikacji i wyodrębnienia pojedynczego, interesującego badacza genu spośród innych genów. Przy czym skala trudności zwiększa się w miarę przechodzenia od filogenetycznie niższych do wyższych organizmów, o ile to ich komórki są obiektem badań. Aby to zilustrować można np. porównać haploidalny genom bakterii *E. coli* o zawartości  $4,2 \times 10^6$  par zasad z również haploidalnym genomem człowieka  $3,3 \times 10^9$  par zasad. O ile w przypadku bakterii klonując w bakteriofagu  $\lambda$ , pojedynczą sekwencję DNA o dł. 20 tys. par zasad należy wyodrębnić spośród ok. 1000 innych, to w przypadku genomu ssaka ilość koniecznych do sprawdzenia klonów równa się ok. 0,5 miliona. Badanie genomu organizmów wyższych, w tym genomu ssaków wymaga zatem stosowania coraz doskonalszych metod selekcji genów, jak również wyboru odpowiednich wektorów zdolnych pomieścić coraz liczniejsze tzw. biblioteki genów. Pod pojęciem biblioteki genów rozumie się reprezentację badanego genomu w formie krótszych lub dłuższych jego fragmentów, sklonowaną w wybranym wektorze. Obecnie, chcąc klonować w *E. coli*, mamy do dyspozycji zasadniczo cztery rodzaje wektorów: plazmidy, pochodne bakteriofaga  $\lambda$ , kosmidy i bakteriofagi jednoniciowe z grupy M13. Niezależnie od różnic pomiędzy nimi obowiązują pewne wspólne schematy postępowania (25).

DNA, w których znajduje się poszukiwana sekwencja, po oczyszczeniu z białek jest cięty na mniejsze fragmenty o dł. od kilku do kilkudziesięciu tys. par zasad przy pomocy wybranego enzymu restrykcyjnego. Następnie tym samym enzymem przecina się cząsteczkę wektora. Kolejnym etapem jest ligacja, czyli enzymatyczne połączenie donorowego DNA z DNA wektora, którą przeprowadza się w obecności enzymu ligazy. Po zakończeniu ligacji mamy dużą ilość cząsteczek wektora zawierających różnej długości fragmenty obcego DNA. Tak zrekombinowane cząsteczki wektora należy następnie wprowadzić do komórki bakteryjnej, co określa się mianem transformacji bakterii (25). Kolejnym etapem jest izolacja tych komórek bakteryjnych, które zawierają interesujący nas gen. Dokonuje się jej przy użyciu metody hybrydyzacji DNA komórkowego z sondą molekularną homologiczną do poszukiwanego genu.

### Zastosowanie sklonowanych genów

Posiadanie sklonowanego genu umożliwia wykorzystanie go w celach badawczych oraz najogólniej mówiąc — biotechnologicznych. W nauce sklonowane geny są wykorzystywane m.in. jako sondy molekularne w diagnostyce chorób wirusowych, w badaniu poziomu ekspresji w danej tkance, w badaniach nad strukturą i funkcją genomu.

Wykorzystanie biotechnologiczne polega na wprowadzeniu określonego genu przy pomocy wektora do komórek bakterii, drożdży lub eukariontów i ich hodowli na skalę laboratoryjną lub przemysłową w celu uzyskania produktu ekspresji tego genu. W przemyśle farmaceutycznym sklonowane geny są stosowane do produkcji preparatów białkowych używanych w terapii niektórych chorób na skalę, której osiągnięcie metodami klasycznymi, tj. poprzez preparatykę z tkanek zwierzęcych byłoby niemożliwe. Dotyczy to szczególnie hormonów, tj.: insuliny (27), somatostatyny (40), interferonów (14, 15, 38), czynników białkowych krwi stosowanych w leczeniu hemofilii (11), hormonów płciowych (20), nowotworowego czynnika nekrotycznego (30) i innych.

Coraz konkretniej rysują się możliwości leczenia wielu chorób genetycznych poprzez wymianę genów defektywnych na prawidłowe. Dotyczy to np. anemii sierpowatej, gdzie przyczyną choroby jest defekt genu kodującego hemoglobinę lub ciężkiego złożonego niedoboru odporności (ang. SCID) związanego z defektem enzymu dezaminazy adenozykowej w limfocytach T (41). Metoda leczenia polega na pobraniu od chorego komórek szpikowych, wprowadzeniu do nich *in vitro* genu prawidłowego i ponownym wszczepieniu ich choremu pacjentowi po zniszczeniu komórek defektywnych.

Bardzo zaawansowane są prace nad otrzymywaniem zrekombinowanych szczepionek i zestawów diagnostycznych w wirusologii np. szczepionki przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby (35), pryszczycy (22), malarii (42), chorobie Newcastle (29), wścieklicznie (8) itp.

Sklonowane geny stosuje się również w rolnictwie do „ulepszania” właściwości genetycznych roślin, np. wprowadzenie genu białka fasoli kodującego aminokwasy egzogenne do genomu słonecznika, a także do zwiększania mrozoodporności roślin po ich zakażeniu zrekombinowanym szczepem bakterii *Pseudomonas syringae* (cyt. za 31).

Olbrzymie perspektywy ma stosowanie genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów w ochronie środowiska naturalnego przed skutkami działalności człowieka m.in. w neutralizacji wycieków ropy naftowej oraz utylizacji ścieków przemysłowych i komunalnych. (cyt. 31).

### Uwagi końcowe

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych i stosowanie sond molekularnych — to tylko fragment z całego szeregu metod stosowanych w diagnostyce chorób zakaźnych zwierząt. Czas pokaże, czy te metody będą w stanie zdominować w przyszłości klasyczne metody wirusologiczne. Ich znaczenie jednak stale rośnie głównie ze względu na ogromną czułość i specyficzność. Kwas nukleinowy wirusa był do niedawna postrzegany jedynie jako nośnik informacji genetycznej, kluczowy w procesie replikacji. Obecnie daje się zauważyć wzrastająca tendencja aplikacyjnego wykorzystania kwasów nukleinowych jako nośnika olbrzymiej ilości informacji i w związku z tym kryjących wielkie możliwości identyfikowania poszczególnych, serologicznie identycznych czynników zakaźnych. Przykładem może być zastosowanie metody „DNA finger printing” przez badaczy analizujących wybuch epidemii pryszczycy w 1981 r. w Anglii (7). Badacze ci wykazali, że wariant genetyczny odpowiedzialny za ten wybuch był blisko spokrewniony z tym, który wywołał podobną epidemię we Francji i z wariantem używanym do produkcji szczepionki. W konsekwencji ustalono, że przyczyną epidemii była szczepionka zanieczyszczona wirusem lub źle inaktywowana.

Zastosowanie metod biologii molekularnej do analizowania nierozróżnialnych serologicznie szczepów wirusowych nie wyczerpuje możliwości tych metod. Mogą one być bardzo przydatne także w diagnostyce stanów latencji, przebiegających wraz z tolerancją immunologiczną i związanym z tym stanem brakiem przeciwciał.

Piśmiennictwo dostarcza na bieżąco dużej ilości informacji, z których wynika, że sondy molekularne są stosowane z powodzeniem w diagnostyce większości wirusów, a także innych czynników zakaźnych będących przyczyną chorób zwierząt. W Polsce sondy molekular-

ne były stosowane w diagnostyce zakażeń wirusem biaczki bydłej (33) i wirusem choroby Aujeszkyego (23).

#### Piśmiennictwo

- Alvine J. C., Kemp D. J., Stark G. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350, 1977.
- Angerer L. M., Angerer R. C.: Nucleic Acids Res. 9, 2819, 1981.
- Benton W. D., Davis R. W.: Science 196, 180, 1977.
- Brahic M., Haase A. T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 6125, 1978.
- Brigati D. J., Myerson D., Leary J. J., Spalholz B., Travis S. Z., Fong C. K. Y., Hsiung G. D., Ward D. C.: Virology, 126, 32, 1983.
- Britten R. J., Kohne D. E.: Science, 161, E29, 1968.
- Donaldson A. I., Gloster J., Harvey L. D. J., Deans D. H.: Vet. Rec. 10, 53, 1982.
- For J. L.: AM. Soc. Microbiol. News, 56 (11), 179, 1990.
- Gall J. G., Pardue M. L.: Methods Enzymol. 21, 470, 1971.
- Gillespie D., Spiegelman S.: J. Mol. Biol., 12, 829, 1965.
- Gitshier J., Wood W. I., Goralka T. M., Wion K. L., Chen E. Y., Eaton D. H., Vehar E. G. A., Capon D. J., Lawn R. M.: Nature 312, 326, 1984.
- Goodbourn S. E. Y., Higgs D. R., Clegg J. B., Weatherall D. J.: J. Mol. Biol. Med., 2, 23, 1984.
- Grunstein M., Hogness D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961, 1975.
- Haynes J., Weissmann C.: Nucl. Acids Res., 11, 687, 1983.
- Hitzeman R. A., Leung D. W., Perry L. J., Kohr W. J., Levine H. L., Goettel D. R.: Science, 219, C20, 1983.
- Hodgkinson S., Sherrington R., Gurling H., Marchbanks R., Reeders S., Mallet J., McInnis M., Petursson H., Brynjolfsson J.: Nature, 325, 805, 1987.
- Hutchinson N. J., Langer-Safer P. R., Ward D. C., Hamkalo B. A.: J. Cell Biol. 95, 609, 1982.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.: Nature, 314, 87, 1985.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Weatherall D. J., Ponder B. A. J.: Am. J. Hum. Genet.: 39, 11, 1986.
- Kaetzel D. M., Browne J. K., Wondisford F., Nett T. M., Thomason A. R., Nilson J. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7280, 1985.
- Katafos F. C., Jones C. W., Efstratiadis A.: Nucl. Acids Res. 7, 1541, 1979.
- Kleid D. G., Yansura D., Small B., Dowbenko D., Moore D. M., B. H., Bachrach H. L.: Science, 214, 1125, 1981.
- Kochan G., Lipowski A., Pejsak Z., Szewczyk B.: Materiały IX Kongresu PTNW, Olsztyn 1992.
- Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4381, 1982.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- Marmur J., Doty P.: J. Mol. Biol., 1, 169, 1962.
- Moore H-P. H., Walker M. D., Lee F., Kelly R. B.: Cell 35, 531, 1983.
- Mullis K. B., Faloona F. A.: Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 155, 335, 1987.
- Ogawa R., Yanagida N., Saeki S., Satto S., Ohkawa S., Gotoh H., Kodama K., Kamogawa K., Sawaguchi K., Iritani Y.: Vaccine, 3 (5), C85, 1990.
- Old L. J.: Science, 230, 630, 1985.
- Ostrowski W. S.: Problemy Biotechnologii, Wszechnica Polskiej Akademii Nauk, Wrocław 1988.
- Reeders S. T., Breuning M. H., Davies K. E., Nicholls R. D., Jarman A. P., Higgs D. R., Pearson P. R., Weatherall D. J.: Nature, 317, 542, 1985.
- Reichert M., Grundboeck-Juško J.: Acta Biochim. Polon., 38 (1), 111, 1991.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N.: Science, 230, 1350, 1985.
- Scolnick E. M., McLean A. A., West D. J., McAleer W. J., Miller W. J., Buynak E. B.: J. Am. Med. Assoc. 251, 2812, 1984.
- Showalter D. B., Sommer S. S.: Anal. Biochem., 177, 90, 1989.
- Smith G. P.: Science, 191, 528, 1976.
- Smith G. E., Summers M. D., Fraser M. J.: Molec. Cell. Biol. 3, 2156, 1983.
- Southern E.: J. Mol. Biol.: 98, 193, 1975.
- Warren T. G., Shields D.: Cell, 39, 547, 1984.
- Williams D. A., Orkin S. A., Mulligan R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2566, 1985.
- Young J. F., Hockmeyer W. T., Gross M., Ballou W. R., Wirtz R. A., Trosper J. H., Beaudoin R. L., Hollingdale M. R., Miller L. H., Diggs C. L., Rosenberg M.: Science, 228, 958, 1985.

Adres autora: prof. dr hab. Jadwiga Grundboeck, ul. Kościuszki 19/3, 24-100 Puławy

STANISŁAW WINIARCZYK

### artykuł przeglądowy

## Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce weterynaryjnej

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Wykrycie enzymów restrykcyjnych i technik pozwalających na rekombinację, a także na łączenie cząsteczek DNA pochodzących z różnych organizmów z DNA plazmidów, bądź wirusów stanowiących wektory do wprowadzenia obcego DNA do komórek biorców, można uznać za początek powstania tzw. inżynierii genetycznej. Jest ona jednak konsekwencją epokowego odkrycia roli DNA jako substancji dziedzicznej i faktu posługiwania się przez wszystkie organizmy jednym i tym samym kodem genetycznym przy biosyntezie białek. Dzięki swym właściwościom restryktazy stały się narzędziami inżynierii genetycznej, umożliwiając dokonywanie rekombinacji (łączenia) cząsteczek DNA różnego pochodzenia w układach pozakomórkowych — *in vitro*. Restryktazy (enzymy przecinające cząsteczkę kwasu nukleinowego w obrębie rozpoznawanej sekwencji) rozpoznają z reguły jedną, ściśle określoną sekwencję nukleotydów i trawią wiązanie fosfodwuestrów w każdej z nici DNA. Duża liczba enzymów restrykcyjnych przecina dwa komplementarne łańcuchy podwójnej spirali DNA z pozostawieniem krótkich odcinków pojedynczych nici (tzw. lepkie końce). Fragmenty DNA, nawet różnego pochodzenia, lecz strawione tym samym enzymem lub różnymi enzymami rozpoznającymi tę samą sekwencję cięcia kwasu nukleinowego, mogą ponownie łączyć się ze sobą w dowolnej kombinacji na zasadzie komplementarności owych końców. Możliwość włączenia frag-

mentów DNA do wektora — cząsteczek DNA posiadających zdolność autonomicznego powielania się — stworzyło szansę klonowania molekularnego. Plazmidy, czy bakteriofagi (wektory) mają na ogół tylko jedno miejsce podatne na trawienie danym enzymem restrykcyjnym, co umożliwia podstawienie w to miejsce obcego fragmentu DNA pociętego najczęściej tą samą restryktazą. W wyniku wprowadzenia takich zrekombinowanych cząsteczek kwasu nukleinowego do odpowiednich bakterii i ich namnożenia dochodzi do amplifikacji (wielokrotnego powielania się) poszczególnych sekwencji wraz z całym wektorem, do których zostały wbudowane. Zbiór klonów (grupa komórek bakteryjnych pochodząca od jednej komórki bakteryjnej) zawierających plazmidy lub fagi zrekombinowane losowo z fragmentami badanego DNA, które łącznie reprezentują całkowity genom, określamy mianem biblioteki lub banku genów. Sklonowane rekombinanty można następnie izolować z komórek bakteryjnych oraz „wycinać” z nich wcześniej użytą restryktazą badane fragmenty. W ten sposób otrzymujemy geny, ich fragmenty lub sekwencje o nieznanym dotychczas właściwościach, w ilościach umożliwiających dokonywanie z nimi wszelkich manipulacji biochemicznych i genetycznych.

Wraz z opracowaniem technik rekombinacji i klonowania DNA pojawiła się sprawa praktycznego zastosowania inżynierii genetycznej w różnych dziedzinach