

А.А. ЧИРКИН

**ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ:
МЕТОДЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК**



А.А. Чиркин

**ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ:
МЕТОДЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК**

**Учебно-методический комплекс для студентов
биологического факультета
(Издание второе исправленное и дополненное)**

УДК 575 (075.8)
ББК 28.04я73
Ч 65

Автор: заведующий кафедрой химии УО «ВГУ им. П.М. Машерова», доктор биологических наук, профессор **А.А. Чиркин**

Рецензенты: доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экспериментальной гепатологии Института биохимии НАН Беларуси **В.У.Буко** и доктор медицинских наук, профессор кафедры патфизиологии Витебского государственного медицинского университета, профессор **Ю.Я.Родионов**

Учебно-методический комплекс по генной инженерии для студентов биологического факультета включает программу по генной инженерии, рабочий план, тематику лекций и лабораторных занятий, теоретические основы предмета, лабораторный практикум, вопросы для итогового контроля (зачет). Комплекс призван оказать помощь студентам биологических специальностей в изучении технологии рекомбинантных ДНК (генной инженерии).

УДК 575 (075.8)
ББК 28.04я73

© Чиркин А.А., 2005
© УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2005

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Программа курса «Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК»	6
Литература	10
Теоретическое содержание курса	11
Молекулярная биотехнология	11
Функции, нуклеотидный состав и структура ДНК	14
Функции, нуклеотидный состав и структура РНК	16
Денатурация и ренатурация ДНК	17
Белки, связанные с ДНК, упаковка ДНК	18
Методы изучения ДНК	20
Матричные синтезы	21
Основной постулат молекулярной биологии. Обратная транскрипция	24
Рибосомы	25
Генетический код	26
Этапы синтеза белка и необходимые факторы	26
Регуляция биосинтеза белков	29
Технология рекомбинантных ДНК	30
Перенос генов у прокариот	31
Условия существования микроорганизмов при недостатке субстратов	31
Трансформация	32
Конъюгация. Конъюгационный перенос	33
Трансдукция	35
Перенос генов у эукариот	36
Плазмиды дрожжей	36
Трансформация на уровне организма	36
Рекомбинация	37
Рестриктазы	38
Плазмидные векторы	40
Трансформация и отбор	42
Геномная библиотека	43
Секвенирование ДНК	44
Химический синтез ДНК	46
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	46
Структура и функция белков	48
Направленный мутагенез	51
Генная инженерия белка	53
Экспрессия генов, клонированных в прокариотических и эукариотических клетках	55

Основные этапы синтеза экспортируемого из клетки белка	56
Повышение эффективности технологии рекомбинантных ДНК	57
Экспрессия генов при участии сильных регулируемых промото- ров	58
Повышение стабильности белков, кодируемых клонированными генами	59
Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем	61
Молекулярная биотехнология микробиологических систем и пи- тание	62
Белок одноклеточных организмов.....	62
Утилизация крахмала и сахаров.....	64
Изменение пищевой ценности растений.....	66
Генетически модифицированные животные и питание.....	66
Генетическая инженерия микробиологических систем и произ- водство коммерческих продуктов	67
.....	
Иммунологические и ДНК-диагностические тесты в диагностике заболеваний.....	67
ELISA.....	68
Системы ДНК-диагностики.....	69
Микробиологическое производство лекарственных средств.....	71
Вакцины.....	72
Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения низкомолекулярных биорегуляторов.....	72
Биодеградация токсических соединений.....	73
Бактерии, стимулирующие рост растений.....	74
Микробные инсектициды.....	74
Генетическая инженерия растений (трансгенные растения)	75
Трансгенные животные	86
Молекулярная генетика человека	91
Контроль применения генно-инженерных методов	97
Производство и использование объектов генной инженерии	99
Лабораторный практикум	104
Краткий словарь используемых понятий	126
Вопросы итогового контроля (зачет)	132

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методический комплекс «Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК» составлен с ориентацией на конечный результат обучения студентов на биологическом факультете с целью формирования знаний о современных биотехнологических процессах, основанных на методах рекомбинантных ДНК. В основе программы лежат представления о молекулярном переносе единиц наследственности (генов) из одного организма в другой с целью создания нового продукта или получения уже известного продукта в промышленных масштабах. Рассмотрены вопросы практического применения методов рекомбинантных ДНК на примерах трансгенных растений и животных, производства фармацевтических субстанций, биологической очистки объектов окружающей среды, совершенствования лабораторных методов обследования биологических объектов. Программа основана на учебно-исследовательском принципе изучения предмета.

Весь материал разбит на 4 раздела. В первом разделе излагаются современные представления о матричных синтезах, дается понятие о химическом синтезе и секвенировании ДНК (генов), во втором – основной упор сделан на механизмы экспрессии генов и получение рекомбинантных белков, в третьем – рассмотрены вопросы генной инженерии растений и животных, в четвертом разделе приведены положительные и возможные отрицательные аспекты использования генно-инженерных продуктов в пищевой и фармацевтической промышленности, применения рекомбинантных организмов в сельском хозяйстве, рассмотрены требования производства генно-инженерных продуктов и их добротного испытания.

При изложении теоретических основ спецкурса автор широко использовал три уникальных учебных пособия: Б. Глика, Дж. Пастернака «Молекулярная биотехнология. Принципы и применение», Т.А. Егоровой, С.М. Клуновой, Е.А. Живухиной «Основы биотехнологии», А.В. Кузнецова, И.В. Кузнецова «Подвижный вектор», Щелкунова С.Н. «Генетическая инженерия».

Все замечания и предложения будут с благодарностью приняты и учтены в дальнейшей работе по совершенствованию спецкурса.

Программа курса «Генная инженерия»

(спецкурс для студентов, обучающихся на биологическом факультете)

Программа «Генная инженерия» для студентов биологического факультета университета разработана заведующим кафедрой химии Витебского государственного университета им. П.М. Машерова, доктором биологических наук, профессором А.А.Чиркиным. Учебно-методический комплекс «Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК» прорецензирован доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией экспериментальной гепатологии Института биохимии НАН Беларуси *В.У.Буко* и доктором медицинских наук, профессором кафедры патфизиологии Витебского государственного медицинского университета, профессором *Ю.Я.Родионовым*

ЗАДАЧИ ПРЕПОДАВАНИЯ КУРСА

В результате изучения основ генной инженерии студент должен:

знать

– биологические агенты, используемые в методах рекомбинантных ДНК;

– принципы культивирования клеток и переноса генов;

– сущность методов молекулярной генетики;

– трансгенные растения и животные;

– принципы работы с рекомбинантными белками;

уметь

– пользоваться языком генной инженерии и справочными руководствами;

– выбрать биологический объект, составить алгоритм генно-инженерных работ, обосновать метод наиболее эффективной очистки целевого продукта;

– применить методы спектрофотометрии, тонкослойной и колоночной хроматографии, определения активности и количества ферментов, выделения и очистки целевого продукта.

СОДЕРЖАНИЕ КУРСА

История генной инженерии. Методы рекомбинантных ДНК как разделы молекулярной биологии, молекулярной генетики бактерий, энзимологии нуклеиновых кислот, с одной стороны, промышленной и химической инженерии, с другой. Цели генной инженерии: диагностика, профи-

лактика и лечение инфекционных и генетических заболеваний, повышение урожайности сельскохозяйственных культур, создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения, создание пород сельскохозяйственных и других животных с улучшенными наследуемыми признаками. Возможные негативные эффекты развития методов рекомбинантных ДНК.

1. Матричные синтезы: репликация, транскрипция, трансляция. Особенности регуляции матричных синтезов у бактерий и эукариот.

Естественные механизмы переноса генетической информации у прокариот и эукариот.

Технология рекомбинантных ДНК как совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. Рестрицирующие эндонуклеазы (рестриктазы). Плазмиды и плазмидные векторы. Введение рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина (трансформация) и отбор. Создание геномной библиотеки и поиск клона (клонов) несущего искомую последовательность ДНК: гибридизация с меченым ДНК-зондом, иммунологический скрининг, скрининг по активности белка, кодируемого геном-мишенью. Особенности клонирования структурных генов эукариот. Генетическая трансформация прокариот: перенос ДНК в *E. coli*, электропорация, конъюгация.

2. Понятие о химическом синтезе ДНК (генов). Методы секвенирования ДНК – определения нуклеотидной последовательности. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) как способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей. Синтез генов с помощью ПЦР.

Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотические клетки (сильный промотор, проблема получения большого количества белка, устойчивого к протеиназам клетки-хозяина, метаболическая перегрузка и недостаток кислорода). Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем. Дрожжевые системы экспрессии (синтез поверхностного антигена вируса гепатита В, синтез бычьего лизоцима С₂). Системы экспрессии с использованием культур клеток насекомых (рекомбинантные бакуловирусы). Системы экспрессии для работы с клетками млекопитающих (челночные векторы, экспрессия двух клонированных генов с получением белка, состоящего из двух субъединиц).

Направленный мутагенез (получение нового белка с заранее заданными свойствами): олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК, то же с использованием ПЦР-амплификации, случайный мутагенез. Генная инженерия белков для повышения термостабильности: введение дополнительных дисульфидных связей, замена аспарагина на другие аминокислоты, уменьшение числа свободных сульфгидрильных групп. Повышение ферментативной активности и стабильности ферментов, изменение потребности металлоферментов в кофакторах, из-

менение специфичности фермента.

Системы ДНК-диагностики (гибридизационные зонды, геномная дактилоскопия, полиморфные ДНК-маркеры). Молекулярная диагностика генетических заболеваний. Биodeградация токсичных соединений и утилизация биомассы. Метаболические пути биodeградации ксенобиотиков, созданные методами геной инженерии. Мультиплазмидные организмы, способные утилизировать несколько соединений. Бактерии, стимулирующие рост растений: непосредственно путем поставки фиксированного азота, хелатированного железа, фитогормонов, фосфатов (штаммы *Rhizobium*, симбиоз с растениями, клубеньки на корнях) и опосредованно через подавление роста фитопатогенных микроорганизмов.

3. Промышленный синтез белков при участии рекомбинантных микроорганизмов. Генная инженерия растений и животных. Фертильные растения, все клетки которых несут чужеродный(-е) ген(-ы) (трансгенные растения). Трансформация растений Ti-плазмидой из *Agrobacterium tumefaciens*. Векторные системы на основе Ti-плазмид. Физические методы переноса генов в растительные клетки, бомбардировка микрочастицами, использование векторов на основе вирусов, прямое введение генов в протопласты растений. Получение трансгенных растений, не содержащих маркерных генов.

Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям, вирусам и гербицидам. Получение растений, противостоящих неблагоприятным воздействиям и старению. Изменение свойств растений: окраски цветков, пищевой ценности, вкуса, внешнего вида плодов. Трансгенные растения, способные синтезировать ценные для промышленности и сельского хозяйства белки и химикаты.

Трансгенные животные: теория (генетическая трансформация эмбрионов, введение рекомбинантного гена в яйцеклетки); моделирование (болезнь Альцгеймера, муковисцидоз; экспрессия генов, кодирующих трансгенные продукты, секретлируемые с молоком); практика – трансгенный крупный рогатый скот (молочная железа – «биореактор», наследуемая устойчивость к бактериальным, вирусным инфекциям и паразитарным инвазиям); трансгенные овцы, козы и свиньи (синтез человеческого гемоглобина); трансгенные птицы, рыбы. ПЦР как метод обнаружения трансгена, перспективы и потенциальные опасности.

Общие положения молекулярной генетики человека. Исследовательская программа «Геном человека». Клонирование генов заболеваний человека. Генная терапия (*in vitro*, *in vivo*); вирусные и невирусные системы доставки генов. Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов и коррекция ими генетических дефектов.

4. Контроль применения экспериментов с рекомбинантными ДНК, производства и потребления пищевых продуктов и пищевых добавок, освобождения генетически модифицированных организмов в окружающую

среду. Общее представление о правилах добротного и безопасного производства (GMP – Good Manufacturing Practice), доклинического испытания (GLP – Good Laboratory Practice) и клинического испытания (GCP – Good Clinical Practice) продуктов генно-инженерных продуктов.

В соответствии с утвержденным учебным планом для биологического факультета по специальности «Биология и химия», «Биоэкология» и «География и биология» на преподавание спецкурса «Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК» предусматривается следующее количество часов:

Название факультета	Семестр	Всего часов	Из них аудиторные	Лекции	Лабораторные занятия	Экзамен, зачет
Биологический	План	36	30	20	10	Зачет

ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ЛЕКЦИЙ СПЕЦКУРСА «ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ: МЕТОДЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК» ДЛЯ СТУДЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ

№	СОДЕРЖАНИЕ	Часы
1.	Введение в генную инженерию	1
2.	Матричные синтезы	1
3.	Технология рекомбинантных ДНК	2
4.	Химический синтез и секвенирование ДНК	2
5.	Направленный мутагенез и генная инженерия белков	2
6.	Экспрессия генов, клонированных в прокариотических и эукариотических клетках	2
7.	Молекулярная биотехнология микробиологических систем и питание	1
8.	Генная инженерия микробиологических систем и производство коммерческих продуктов	1
9.	Генная инженерия растений (трансгенные растения)	2
10.	Трансгенные животные	2
11.	Молекулярная генетика человека	2
12.	Контроль применения генно-инженерных методов	2

ИТОГО: 20 часов.

**ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН ЛАБОРАТОРНЫХ
ЗАНЯТИЙ СПЕЦКУРСА «ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ: МЕТОДЫ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК»**

№	Наименование раздела, темы, элемента	Количество часов	Примечание
1.	Количественный и качественный анализ нуклеиновых кислот	4	
2.	Белки. Качественные и количественные методы определения аминокислот и белков. Методы изучения физико-химических свойств белков.	4	
3.	Ферменты. Определение специфичности ферментов. Иммунизация ферментов. Методы качественного выявления и количественного определения активности ферментов. Методы изучения кинетических свойств ферментов.	2	

ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

Бейли Д., Оллис Д. Основы биохимической инженерии: в 2-х частях. – М.: «Мир», 1989.

Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райнулис Е.П. Биотехнология. – М.: «Агропромиздат», 1990.

Биотехнология: в 8-ми томах. Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. – М.: «Высшая школа», 1987–1988.

Блинов Н.П. Основы биотехнологии. – СПб: «Наука», 1995.

Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов. – М.: «Высшая школа», 1990.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: «Мир», 2002.

Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: АСADEMIA, 2003. – 208 с.

Кислухина О., Кюдулас И. Биотехнологические основы переработки растительного сырья. – Каунас: «Технология», 1997.

Кузнецов А.В., Кузнецова И.В. Подвижный вектор. – М., 1998. – 189 с.

Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. – М.: «Медицинское информационное агентство», 2003.

Чиркин А.А. Основы генной инженерии: методы рекомбинантных ДНК. Витебск: УО ВГУ им. П.М.Машерова, 2004. – 123 с.

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск: Сибирское

университетское издательство, 2004. – 496 с.

Harvey W. Blanch, Douglas S. Clark. Biochemical Engineering. – N. Y.: Marcel Dekker, 1997.

Wong C.H., White G.M. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. – Trowbridge: Pergamon, 1995.

Primrose S.B., Twyman R.M. Principles of Genome Analysis and Genomics. – Blackwell Publishing, 2003.

Дополнительная литература

Голубев В.Н., Жиганов И.Н. Пищевая биотехнология. – М.: ДеЛи принт, 2001.

Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. – М.: «Агропромиздат», 1987.

Гриневич А.Г., Босенко А.М. Техническая микробиология. – Мн.: «Вышэйшая школа», 1986.

Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. М.: МИА, 2004. – 207 с.

Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: «Просвещение», 1987.

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Минздрав РФ, ЗАО «ИИА Ремедиум», 2000.

Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Дьюри Г. И др. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. – М.: «Мир», 1991. – 408 с.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ СОДЕРЖАНИЕ КУРСА

Молекулярная биотехнология

Молекулярная биотехнология сформировалась в последней трети XX века на основе технологии рекомбинантных ДНК и традиционной промышленной микробиологии. Учитывая, что эта перспективная область знаний может дать как положительные, так и отрицательные результаты для человечества, быть полезной для развития народного хозяйства, а также из-за наличия большого числа околонуточных и фантастических домыслов, принято решение о введении спецкурса «Генная инженерия» для студентов биологических, медицинских, инженерных и других специальностей.

Молекулярная биотехнология основана на переносе единиц наследственности (генов) из одного организма в другой с помощью методов генной инженерии (технология рекомбинантных ДНК). Целью такого переноса является создание нового продукта или получение уже известного продукта в промышленных масштабах. Первая рекомбинантная ДНК была получена в 1972 г. П. Бергом и сотрудниками. Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гене) из одного организма в другой была разработана американскими учеными Стэнли Коэном и Гербертом Бойером в 1973 г.

В 1976 г. ученые небольшой американской фирмы Genentech начали

исследования по проблеме получения рекомбинантных ДНК. Спустя 2 года были осуществлены следующие мероприятия:

- 1) выделены фрагменты гена (последовательности ДНК) человеческого инсулина;
- 2) эти фрагменты перенесены в генетические элементы (клонировующие векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*Escherichia coli*);
- 3) клетки кишечной палочки синтезировали человеческий инсулин по программе введенных фрагментов гена инсулина;
- 4) полученный инсулин подвергался очистке и использовался как лекарственный препарат для больных диабетом, имеющих аллергическую реакцию на свиной инсулин.

К середине 90-х годов прошлого века на рынке появилось более десятка новых биотехнологических лекарственных препаратов, более 100 препаратов проходят клинические испытания и свыше 500 находятся на стадии разработки. Ежегодный оборот молекулярно-биотехнологической индустрии увеличился с 6 млн. долларов в 1986 году до 60 млрд. долларов в 2000 году.

Итак, **генная инженерия** является частью молекулярной биотехнологии и служит для получения конечных биотехнологических продуктов (биополимеры, метаболиты, лекарственные препараты, вакцины, диагностические методы, высокопродуктивные и устойчивые сельскохозяйственные растения и животные). Молекулярная биотехнология базируется на теории и методах молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, генетики, химической инженерии и клеточной биологии.

Роль генной инженерии в становлении молекулярной биотехнологии видна из анализа истории развития этой науки (табл. 1).

Таблица 1

Историческая справка о становлении молекулярной биотехнологии

Дата	Событие
1869	Ф. Мишер выделил ДНК из ядер клеток гноя
1917	Карл Эреки ввел термин «биотехнология» на основе промышленного выращивания свиней с использованием сахарной свеклы
1943	Промышленное производство пенициллина
1944	Генетический материал – ДНК (Эвери, МакЛеод, МакКарти)
1953	Двойная спираль ДНК (Уотсон и Крик)
1961	А. Мармур и П. Доти открыли явление ренатурации ДНК и установили точность и специфичность гибридизации полинуклеотидных цепей
1962	В. Арбер опубликовал сведения о ферментах рестрикции ДНК
1966	Описан генетический код (М. Ниренберг, С. Очоа, Г. Корана)
1970	Выделена первая рестриктаза (эндонуклеаза)
1972	Синтез полноразмерного гена тРНК (Корана)
1973	Создание технологии рекомбинантных ДНК (Бойер и Коэн)

1975	Описание технологии получения моноклональных антител (Колер, Мильштейн)
1976	Первые руководства для работы с рекомбинантными ДНК
1976	Методы определения нуклеотидной последовательности ДНК
1978	Произведен человеческий инсулин, полученный с помощью <i>E. coli</i>
1981– 1982	Получена трансгенная мышь. Получены трансгенные мушки дрозофилы (Р. Пальмитер, Р. Бринстер, А. Спрэдлинг, Г. Рубин)
1983	Описано применение Ti-плазмиды для трансформации растений
1988	Генно-инженерным путем получена высокоопухолевая линия мышей
1988	Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)
1990	Программа испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека (США)
1990	Начало проекта «Геном человека»
1993	Получены трансгенные овцы с геном химозина (Л.К. Эрнст, Г. Брем, И.В. Прокофьев)
1996	Определение нуклеотидной последовательности всех хромосом эукариотического микроорганизма (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
1997	Клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки

Цели использования генной инженерии в рамках молекулярной биотехнологии:

1. Создание методов точной диагностики, а также технологий профилактики и лечения инфекционных и генетических (наследственных) заболеваний.

2. Создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения, антибиотики, полимеры, аминокислоты, ферменты.

3. Значительное повышение урожайности сельскохозяйственных культур путем создания растений, устойчивых к вредителям, грибковым и вирусным инфекциям и вредным воздействиям окружающей среды.

4. Создание пород сельскохозяйственных и других животных с улучшенными наследуемыми признаками.

5. Переработка отходов, загрязняющих окружающую среду.

К наиболее важным методам технологии рекомбинантных ДНК относят (по Т.А. Егоровой и соавт., 2003):

1. Специфическое расщепление ДНК рестриктазами, что ускоряет выделение различных генов и манипуляции с ними.

2. Быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющее определить точные границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность полипептида.

3. Гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая с большой точностью выявить специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания.

4. Клонирование ДНК, суть которого сводится к введению ДНК-фрагмента в самореплицирующийся генетический аппарат (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации способна воспроизводить этот фрагмент во многих миллионах идентичных копиях.

5. Генная инженерия, позволяющая получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.

Широкое внедрение метода технологии рекомбинантных ДНК требует ответа на ряд вопросов, в том числе:

1. Могут ли организмы, полученные генно-инженерным путем, оказывать вредное воздействие на другие живые организмы или окружающую среду?

2. Не приведет ли создание и распространение генетически модифицированных организмов к уменьшению природного генетического разнообразия?

3. Имеем ли мы право изменять генетическую природу человека, используя генно-инженерные методы?

4. Не нанесет ли молекулярная биотехнология ущерб традиционному сельскому хозяйству?

5. Каковы отдаленные эффекты использования генетически модифицированной пищи?

Эти и многие другие вопросы требуют государственной регламентации научных и производственных работ с использованием технологий рекомбинантных ДНК.

Учитывая, что в генной инженерии объектом исследования являются нуклеиновые кислоты, необходимо вспомнить их функции и строение.

Функции, нуклеотидный состав и структура ДНК

Основные функции ДНК по А. Ленинджеру: 1) хранение запаса генетической информации, необходимой для кодирования структуры всех белков и всех РНК каждого вида организма; 2) регуляция во времени и пространстве биосинтеза компонентов клеток и тканей; 3) определение деятельности организма в течение его жизненного цикла; 4) обеспечение индивидуальности данного организма.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные полимеры нитевидной формы, состоящие из полинуклеотидных цепей. Отличия ДНК от РНК: 1) по углеводному компоненту (в ДНК – дезоксирибоза, в РНК – рибоза); 2) по пиримидиновому основанию (в ДНК – тимин, а в РНК – урацил). Полимерная молекула ДНК (первичная структура) построена из 4-х типов нуклеотидов, связанных 3',5'-фосфодиэфирными связями. При линейной записи слева 5'-конец, справа 3'-конец. При иных ситуациях пишут 3'→5' или 5'→3'.

Все нуклеозиды (азотистое основание-углевод) не заряжены при нейтральном значении рН. Все нуклеотиды (азотистое основание-углевод-фосфорная кислота) имеют отрицательный заряд, в связи с чем полинук-

леотидная цепь (первичная структура ДНК) является полианионом.

Для ДНК установлены закономерности соотношения нуклеотидов, названные правилами Чаргаффа: 1) сумма пуриновых нуклеотидов равна сумме пиримидиновых нуклеотидов ($A+G/C+T=1$); 2) содержание аденина равно содержанию тимина и содержание гуанина равно содержанию цитозина ($A=T, G=C$).

На основании рентгеноструктурного анализа и правил Чаргаффа в 1953 г. Уотсон и Крик предложили модель строения ДНК – *двойную спираль* (вторичная структура): 1) молекула ДНК построена из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, образующих правую спираль (описано пять вариантов А-Е и Z-форма – левая спираль); 2) обе цепи удерживаются между собой водородными связями между комплементарными парами оснований (А-Т две водородных связи, Г-Ц три водородных связи); 3) углеводно-фосфорные остовы обеих цепей обращены наружу, а основания – внутрь спирали; плоскости оснований параллельны и между ними имеется гидрофобное взаимодействие (стэкинг-взаимодействие). Вдоль оси отдельной цепи на каждые 0,34 нм приходится 1 моонуклеотид, шаг спирали 3,4 нм, в один виток укладывается 10 нуклеотидных остатков, диаметр спирали 2 нм. Отрицательно заряженные фосфатные группы образуют два спиральных желобка – малый и большой. Отрицательно заряженные фосфатные группы отталкиваются и стремятся вытянуть цепь ДНК. Поэтому в реальной клетке ДНК связана с положительно заряженными белками (протамины и гистоны) и с полиаминами (спермин, спермидин). Структура ДНК может изменяться в зависимости от ионного микроокружения в клетке.

В связи с комплементарностью нуклеотидов в составе двойной спирали длину молекулы ДНК принято выражать в *парах оснований* (п.о.), а также тысячах пар оснований (килобазы, кб) и миллионах пар оснований (мегабазы, Мб). В состав ДНК человека как биологического вида входит около трех миллиардов п.о.

В природной ДНК хромосом строгая двуспиральность нарушается в участках, называемых палиндромами: порядок чередования нуклеотидов вдоль цепи одинаков справа налево и слева направо (как последовательность букв в словах **шалаш**, **кок**, **«я иду с мечем судия»**). Комплементарные основания, входящие в состав палиндромов, спариваются и образуют структуры в форме крестов или шпилек. Такие структуры помогают регуляторным белкам узнавать место списывания генетического текста ДНК хромосом. Палиндромные последовательности ДНК – места целенаправленного расщепления молекулы специальными ферментами-эндонуклеазами (рестриктазы). Кроме того важную роль играют минорные метилированные основания 5-метилцитозин и 6-метиладенин, которые участвуют в природном мутагенезе (дезаминирование 5-метилцитозина приводит к образованию тимина, в результате чего

пара Г-Ц заменяется на пару А-Т) и эволюции. С возрастом метилирование ДНК уменьшается. Некоторые исследователи склонны считать, что степень метилирования ДНК может служить биологическими часами, по которым можно судить о возрасте и прогнозировать продолжительность жизни.

Третичная структура ДНК образуется в результате дополнительного скручивания в пространстве двуспиральной молекулы (суперспираль или изогнутая в пространстве двойная спираль).

*Дискретной единицей наследственности у высших организмов является ген. Совокупность всех генов определенного биологического вида определяется термином **геном** (иногда данный термин относится к полной генетической системе отдельной клетки или конкретного организма). Ген в своем наиболее практическом понимании представляет собой строго определенный участок молекулы ДНК, последовательность нуклеотидов которого заключает в себе всю информацию, необходимую для синтеза молекулы белка или РНК. Генетическая информация зашифрована посредством универсального для всех живых организмов **генетического кода**, представляющего собой набор нуклеотидных триплетов – **кодонов**.*

*По ориентировочным оценкам, собственно кодирующие последовательности ДНК составляют не более 3-10% всего генома человека. Под **экспрессией гена** понимают реализацию записанной в нем генетической информации, приводящую к синтезу первичных молекулярных продуктов гена – РНК и белка.*

*При обозначении гена и его белкового продукта с целью дифференцирования этих понятий в литературе принято обозначать **символ гена курсивом**, а символ соответствующего белка – **обычным шрифтом**. Например, символ «CFTR» обозначает ген муковисцидоза, а символ «CFTR» - соответствующий данному гену белок (нарушение структуры его в результате мутаций вызывает развитие заболевания – муковисцидоз).*

Функции, нуклеотидный состав и структура РНК

Все типы РНК предназначены для снятия информации о структуре белка с ДНК и обеспечения биосинтеза белка в соответствии с этой информацией. РНК является одиночной полинуклеотидной цепью, построенной из четырех основных типов рибонуклеотидов – АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ. Для РНК характерны минорные нуклеотиды с необычными азотистыми основаниями – дигидроурацил, 3-метилурацил, 1-метилгуанин и др. (до 50 типов). Особенно их много в аминоксил-т-РНК (до 10% от всех нуклеотидов). В РНК содержание аденина и гуанина не соответствует содержанию урацила и цитозина.

Различают следующие типы РНК:

– информационная РНК (m-RNA, или иРНК), м.м. 25000–1000000 Da, состоит из 75–300 нуклеотидов, синтезируется в ядре из пре-иРНК. Кодо-

вым элементом является триплет нуклеотидов (кодон), кодирующий аминокислоту. Во вторичной структуре – изогнутая цепь, в третичной – полинуклеотидная цепь связана (намотана) с транспортным белком информофером.

– Растворимые, транспортные РНК (тРНК). Выделяют около 60 вариантов (по несколько на каждую аминокислоту). М.м. 23000–30000 Да включает 70–95 оснований и находится в цитозоле. В молекуле тРНК выделяют функционально важные участки: 1) акцепторный конец, состоящий из последовательности ЦЦА на 3'-конце. Гидроксильная группа 3'-ОН аденозина свободна. К ней присоединяется карбоксильной группой аминокислота и образуется аминоацил-т-РНК. 2) Антикодоновая петля содержит специфический для каждой тРНК триплет нуклеотидов (антикодон), служит для спаривания с соответствующим кодоном иРНК. 3) Псевдоуридиловая петля состоит из 7 нуклеотидов и содержит остаток псевдоуридина; служит для связывания тРНК с рибосомой. 4) Дигидроуридиновая (D-петля) состоит из 8–12 нуклеотидных остатков. Необходима для связывания с аминоацил-тРНК-синтетазой, которая участвует в узнавании аминокислотой своей тРНК. 5) Добавочная петля представляет собой наиболее вариабельную структуру и служит основой классификации тРНК – тРНК класса 1 (75% от их общего числа), которые обладают дополнительной петлей в 3–5 пар оснований, тРНК класса 2 в этой петле содержат 13–21 пару оснований и часто включают неспаренную петлю. Во вторичной структуре эти участки организованы в форме листа клевера. Третичная структура представлена пространственной структурой в виде локтевого сгиба (L-форма).

– Рибосомная РНК (рРНК) находится в комплексе с белками в рибосомах. На ее долю приходится до 65% от всей РНК. М.м. 35000–1000000 Да, что соответствует 100–3100 нуклеотидам; у эукариот по скорости седиментации выделяют 5 S, 5,8 S, 18 S, 28 S тРНК. Вторичная структура представлена спиральными участками, соединенными изогнутой одиночной цепью. Третичная структура рРНК – скелет рибосомы, имеет форму палочки или клубка; снаружи находятся рибосомальные белки.

– Гетерогенные гигантские ядерные РНК (гяРНК) являются предшественниками иРНК.

– Малые (низкомолекулярные) ядерные РНК (мяРНК) участвуют в процессинге РНК.

Денатурация и ренативация ДНК

Гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК. Двухцепочечные структуры ДНК при нагревании, при экстремальных значениях рН, обработке мочевиной и др. разделяются на отдельные цепи и могут переходить в форму неупорядоченных клубков – денатурация ДНК. Молекулы нуклеиновых кислот максимально поглощают ультрафиолет при 260 нм за счет поглощения азотистых оснований. Раствор нативной ДНК имеет при 260 нм оп-

тическую плотность на 40% ниже оптической плотности смеси нуклеотидов – гиперхромный эффект. Поэтому о денатурации судят по увеличению E_{260} . При нагревании поглощение при 260 нм возрастает в узком диапазоне температур – точка плавления (80–85 градусов Цельсия): E_{260} ДНК < E_{260} смеси нуклеотидов на 40%. Денатурация обратима, если остались спирализованные участки ДНК. Восстановление структуры ДНК после удаления денатурирующего фактора (за счет комплементарного спаривания оснований нуклеотидов) называется ренативацией ДНК (восстановление структуры ДНК при охлаждении ниже точки плавления – отжиг). На явлении денатурации-ренативации основан метод гибридизации.

Известны гибридные двухцепочечные молекулы:

- ДНК-РНК образуются как промежуточные формы при действии обратной транскриптазы;
- ДНК-РНК – на короткое время в процессе транскрипции ДНК.

Белки, связанные с ДНК, упаковка ДНК

Все связывающиеся с ДНК эукариот белки делят на две группы: гистоны и негистоновые белки. Гистоны – это белки с молекулярной массой около 20000 Да и очень высоким содержанием положительно заряженных аминокислот (лизина и аргинина). Гистоны участвуют в упаковке ДНК в составе хромосомы. Негистоновые белки – это разные типы регуляторных белков, связывающихся со специфическими последовательностями ДНК, а также ферменты, участвующие в матричных биосинтезах.

У высших организмов ДНК находится в хромосомах. Хромосомы имеют разную форму, которая зависит от центрической перетяжки. В каждой хромосоме содержится гигантская молекула ДНК (М.м. 10^{11} , линейная длина несколько см), которая составляет основу хроматина.

Общая длина молекул ДНК в каждой клетке человека составляет около 2-х м. Поскольку тело человека состоит примерно из 10^{13} клеток, оно содержит в совокупности не менее 2×10^{13} м ДНК; чтобы наглядно представить себе эту цифру, достаточно сказать, что такая гигантская длина человеческой ДНК позволяет более 10 раз покрыть расстояние от земли до солнца и обратно.

Хроматин – комплекс ДНК с РНК и белками (в процентном выражении ДНК – 30–45%, гистоны – 30–50%, негистоновые белки – 4–30%, РНК – до 10%). Структурная организация хроматина такова, что позволяет использовать одну и ту же генетическую информацию ДНК, присущую данному виду организма, по-разному в специализированных клетках. При этом основная часть хроматина не активна. Она содержит плотно упакованную ДНК. Активный хроматин составляет в разных клетках от 2 до 11%. Упаковка (компактизация) ДНК следующая: 1) нуклеосома содержит отрезок двуспиральной ДНК, равный по протяженности 140 парам оснований, обернутый в 1,5 оборота вокруг ядра, состоящего из гистонов (2 Н1, 2 Н2а, 2 Н2в и 2 Н3). Степень компактизации 5 раз. Примерно 90% ДНК входит в состав нуклеосом, 10% содержится в перемычках между нуклеосомами

(30–60 пар, связанных с гистоном H1). Считают, что нуклеосомы содержат фрагменты «молчащего» хроматина, а перемычки – активного. При развертывании нуклеосомы весь хроматин активный. Дискоидные нуклеосомы имеют диаметр 10 нм и высоту 5 нм. Из них образуются фибриллы. Межнуклеосомный разрыв ДНК лежит в основе механизма запрограммированной гибели клеток – *апоптоза*. 2) Фибриллы толщиной 10 нм состоят из ряда нуклеосом, касающихся друг друга своими краями и ориентированных плоскими поверхностями вдоль оси фибриллы. 3) Фибриллы скручиваются в спираль, на виток которой приходится 6–7 нуклеосом. В результате образуется хроматиновое волокно диаметром 30 нм. Для того, чтобы образовалась митотическая хромосома нормального размера, волокно диаметром 30 нм должно подвергнуться дополнительной компактизации с уменьшением результирующей длины в 100 раз.

В интерфазных хромосомах хроматиновые волокна организованы в домены или петли, состоящие из 30000–100000 пар оснований и «заякоренные» на внутриядерном поддерживающем матриксе. Распределение участков генома в такой структуре не случайно. Можно предположить, что каждый петлеобразующий домен хроматина содержит как кодирующие, так и не кодирующие области генов, соответствующих определенной генетической функции.

В клетке имеется около 5% ДНК, не входящей в состав хромосом ядра и локализованной в митохондриях. По С.Н.Иллариошкину (2004), митохондриальная (внеядерная, цитоплазматическая) ДНК представляет собой автономную по отношению к ядру генетическую систему, организованную в виде двухцепочечной кольцевой молекулы. Митохондриальную ДНК (мтДНК) иногда условно называют М-хромосомой. Структура мтДНК полностью расшифрована: молекула мтДНК состоит всего из 16569 п.о. и содержит 37 генов. Эти гены кодируют синтез двух видов рибосомальной РНК, 22-х видов транспортной РНК (необходимых для синтеза белка в митохондриях), а также 13-ти белков, входящих в состав I, III, IV и V комплексов цепи переноса электронов митохондрий. Значительная часть белков этих комплексов, а также все белки II комплекса цепи переноса электронов, кодируются ядерной ДНК. В митохондриях локализовано около 1000 различных полипептидов, что составляет почти 10% всего белкового фонда типичной эукариотической клетки.

Особенностями мтДНК являются:

- весьма компактное расположение генов и отсутствие некодирующих областей – интронов;
- небольшие отличия генетического кода по сравнению с ядерной ДНК;
- отсутствие связи с белками-гистонами;
- несовершенство системы репарации (восстановление повреждений) ДНК.

Два последних фактора и высокая подверженность воздействию свободных радикалов, образуемых при аэробном окислении, способствуют весьма высокой скорости накопления мутаций в мтДНК в онто- и филогенезе (другими словами, темп мутирования мтДНК на порядок выше, чем ядерной ДНК). Набор митохондрий в зиготе и, следовательно, во всех клетках организма имеет исключительно материнское происхождение – из цитоплазмы яйцеклетки, поэтому мтДНК всегда наследуется *по материнской линии*. Это следует учитывать при создании трансгенных животных путем пересадки ядра соматической клетки в лишенную ядра яйцеклетку.

Число митохондрий в клетках различных тканей может составлять от сотен до нескольких тысяч, каждая митохондрия содержит 2-10 копий мтДНК (в среднем около 5). Каждая молекула мтДНК (как и каждая митохондрия) реплицируется самостоятельно, и в результате деления клетки различные молекулы мтДНК в составе митохондрий в случайном порядке переходят в цитоплазму дочерних клеток.

Методы изучения ДНК

Для выделения ДНК ткань гомогенизируют (переводят в гомогенное состояние), удаляют фрагменты мембран (центрифугирование, фильтрование). Белки, разрушенные протеиназами (чаще всего применяют протеиназу К), экстрагируют из раствора. Затем ДНК осаждают, например, этанолом и после удаления надосадочной жидкости ДНК растворяют в буферном растворе. Молекула ДНК среднего размера содержит 150000000 нуклеотидных пар. В процессе выделения возможны разрывы с образованием крупных фрагментов ДНК. Оптимальными для изучения нуклеотидной последовательности являются фрагменты размером 250–350 нуклеотидных пар. Следовательно, выделенную гигантскую молекулу ДНК следует разделить на 500000 фрагментов. Для фрагментирования используют рестриктазы – ферменты, выделяемые из бактерий. У бактерий эти ферменты участвуют в уничтожении чужеродных для них ДНК. Рестриктазы «узнают» специфические последовательности из 4–6 нуклеотидов (сайты рестрикции), которые встречаются в ДНК человека. Затем с помощью автоматического секвенатора исследуют нуклеотидную последовательность выделенных фрагментов ДНК. Этот гигантский и кропотливый труд завершается созданием с помощью ЭВМ наиболее вероятной последовательности нуклеотидов в исследуемой ДНК.

Синтез гена или его фрагмента требует использования:

- методов химического синтеза, позволяющих в автоматизированном синтезаторе получать олигонуклеотиды с заданной последовательностью нуклеотидов и длиной до 100 мономеров;
- обратных транскриптаз – ферментов, катализирующих синтез ДНК на матрице мРНК;
- рестриктаз – ферментов группы эндонуклеаз, позволяющих расщеплять обе полинуклеотидные цепи ДНК в строго определенных местах.
- полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей за короткий период по минимальному количеству создать достаточное для исследования количество точных копий ДНК.

Наименование направлений исследований, связанных с молекулярной генетикой:

1. Геномика – исследование структуры и функции генов.
2. Функциональная геномика – исследование экспрессии генов и продуктов деятельности генов.
3. Структурная геномика – исследование структуры продуктов экспрессии генов (белков) в связи с функцией.

4. Сравнительная геномика – структура и функционирование генов в филогенезе.
5. Протеомика – исследование всех белков клетки (фенотип) в связи с белок-белковыми и белок-лигандными взаимодействиями.
6. Транскриптомика – исследование всех РНК в клетках, тканях или организме.
7. Метаболомика – через секвенирование генов (определение нуклеотидной последовательности ДНК) изучение способности клеток, тканей и организма к синтезу малых молекул.
8. Биоинформатика – ветвь биологии, изучающая информацию о строении и функционировании ДНК, РНК и белков.

Итак, для понимания технологии рекомбинантных ДНК требуется знать:

- принцип комплементарности – А соответствует Т (А соответствует У в случае РНК), Г соответствует Ц;
- при повышении температуры до 70–80°C полинуклеотидные цепи ДНК расходятся (денатурация ДНК, плавление ДНК), при постепенном охлаждении возможно восстановление двуспиральной структуры в случае наличия комплементарных полинуклеотидных цепей – ренатурация ДНК (отжиг ДНК);
- на принципе комплементарности основана гибридизация – гибриды ДНК-ДНК и ДНК-РНК;
- палиндромные участки ДНК – место атаки рестриктаз.

Матричные синтезы

Матричные синтезы включают репликацию, транскрипцию и трансляцию.

Биосинтез ДНК (репликация). Репликация ДНК начинается одновременно во многих точках ДНК (число таких точек может превысить тысячу). Из каждой такой точки одновременно в противоположных направлениях движутся две репликационные вилки. Репликация продолжается до полного завершения синтеза дочерних цепей и разделения новых дуплексов. Для биосинтеза ДНК необходимы следующие условия:

1) необходима неспаренная цепь ДНК, которая служит матрицей и необходима цепь-затравка, к которой присоединяются новые нуклеотиды.

2) Полный набор нуклеозидтрифосфатов. Удлинение ДНК идет по общему уравнению $d(\text{НМФ})_n + d\text{НТФ} = d(\text{НМФ})_{n+1} + \text{PP}_n$, где $d(\text{НМФ})_n$ – ДНК до удлинения, $d(\text{НМФ})_{n+1}$ – ДНК после удлинения, $d\text{НТФ}$ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, PP_n – пирофосфат. При отсутствии хотя бы одного $d\text{НТФ}$ синтез ДНК не идет. Цепь удлиняется от затравки в соответствии с матрицей в направлении 5'→3', т.е. каждый следующий нуклеотид присоединяется к 3'-ОН группе предшествующего. Энергия, затрачиваемая на образование каждой новой фосфодиэфирной связи в остоле ДНК, обеспечивается расщеплением пирофосфатной связи между α - и β -фосфатными группами присоединяемого нуклеозидтрифосфата. Образующийся при этом пирофосфат расщепляется до неорганического фосфата, сдвигая реакцию в сторону удлинения цепи.

3) Ферменты и белки, участвующие в синтезе ДНК: ДНК-полимераза I, II, III. Из-

вестна роль ДНК-полимераз I и III; они обладают тремя типами ферментативной активности – полимеразная (образование 3', 5'-фосфодиэфирных связей); 5'→3' и 3'→5' экзонуклеазные активности (способны отщеплять концевые нуклеотиды с любого конца цепи ДНК); белок гер (хеликаза) расплетает двойную спираль ДНК; ДНК-связывающий белок стабилизирует расплетенные одноцепочечные участки ДНК; ДНК-гираза вводит отрицательные супервитки в ДНК, выполняя функцию шарнира при продвижении репликационных вилок; праймаза (РНК-полимераза) синтезирует РНК-затравку (праймер); dnaB – белок, определяющий возможность праймазе инициировать синтез фрагмента РНК-праймера; ДНК-лигаза соединяет концы фрагментов ДНК. Весь комплекс, состоящий более чем из 20 репликативных ферментов и факторов, называют ДНК-репликационной системой или реплисомой.

Репликация ДНК идет в три стадии: инициация, элонгация и тер-минация.

1) Инициация.

– Белки гер, или ферменты хеликазы (helix – спираль), расплетают короткие участки ДНК. На разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза двух молекул АТФ до АДФ и неорганического фосфата. К каждой из разделившихся цепей прочно присоединяются несколько молекул ДНК-связывающего белка, которые препятствуют образованию комплементарных пар и обратному воссоединению цепей. Благодаря этому нуклеотидные последовательности цепей ДНК оказываются доступными для репликативной системы. Быстрое раскручивание цепей родительской ДНК в процессе репликации (4500 об/мин) компенсируется биологическим шарниром – ферментом гиразы (семейство топоизомераз), который обеспечивает кратковременный разрыв одной из цепей ДНК, быстро восстанавливаемый с высокой точностью после одного или нескольких оборотов (гираза от англ. gyration – вращение). Этот фермент не только позволяет ДНК вращаться, но и активно закручивает ее в направлении, благоприятствующем расплетению цепей матрицы в районе репликативной вилки. Таким образом, гираза помогает хеликазе раскручивать ДНК для ее репликации.

– В месте инициации образуется предзаправочный промежуточный комплекс, состоящий, как минимум из пяти белков. Один из них – белок dnaB может передвигаться вдоль ДНК, используя энергию гидролиза АТФ. Белок dnaB может служить сигналом для активации праймазы.

– Особая РНК-полимераза (праймаза) синтезирует короткую цепь РНК (примерно 10 рибонуклеотидов – праймер), комплементарную одной из цепей ДНК-матрицы. Этот фермент не нуждается в затравке для синтеза полирибонуклеотида.

– 3'-ОН группа концевого рибонуклеотида этой короткой цепи РНК служит затравкой для синтеза ДНК под действием ДНК-полимеразы III. По матрице материнской ДНК точно синтезируется комплементарная цепь дочерней ДНК в направлении 5'→3' (у прокариот 1000–2000 нуклеотидов, в животных клетках 150–200 нуклеотидов). Точность синтеза определяется тем, что фермент редактирует синтезированную цепь: если ДНК-полимераза встраивает неправильный нуклеотид, то фермент сам может распознать неспособность этого нуклеотида образовать правильную пару с соответствующим нуклеотидом матричной цепи. В этом случае фермент возвращается назад и отщепляет неправильный нуклеотид с 3'-конца цепи за счет экзонуклеазной активности, после чего ДНК-полимераза продолжает присоединять правильные нуклеотиды в направлении 5'→3'. В результате достигается высокая точность матричного синтеза (не более одной ошибки на 1–10 миллиардов нуклеотидных остатков). Аналогичный процесс происходит и на второй расплетенной цепи ДНК – синтез праймера и затем дочерней цепи ДНК в направлении 5'→3'. Поскольку цепи антипараллельны, то на первой рост цепи совпадает с направлением дви-

жения репликативной вилки, а на второй рост цепи идет в противоположном направлении.

2) Элонгация.

– Хеликаза расплетает следующий участок ДНК. ДНК-полимераза III продолжает синтез непрерывной цепи дочерней ДНК в направлении движения репликативной вилки (5'→3') – лидирующая цепь. На другой материнской цепи ДНК вновь синтезируется праймер, к которому присоединяется ДНК-полимераза III, синтезирующая фрагмент дочерней ДНК в направлении 5'→3' (1000–2000 нуклеотидов у прокариот и 100–200 нуклеотидов у эукариот) против движения репликативной вилки – запаздывающая цепь. Фрагменты, синтезированные в запаздывающей цепи, называются фрагментами Рейджи Оказаки.

– После завершения синтеза фрагмента Оказаки РНК-затравка (праймер) удаляется нуклеотид за нуклеотидом с помощью 5'→3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I. По мере отщепления рибонуклеотидных мономеров каждый из них замещается на соответствующий дезоксирибонуклеотид в ходе полимеразной реакции, осуществляемой ДНК-полимеразой I (при этом в качестве затравки используется 3'-конец предыдущего фрагмента Оказаки). Новый фрагмент Оказаки присоединяется к отстающей цепи ДНК с помощью фермента ДНК-лигазы. Источником энергии для этой реакции у эукариот служит АТФ. ДНК-лигаза не может соединить две молекулы одноцепочечной ДНК. Цепи ДНК, соединяемые ДНК-лигазой, должны быть частью двухцепочечной молекулы ДНК.

3) Терминация синтеза ДНК наступает вследствие исчерпания матрицы. Репликационные пузыри сливаются, и на каждой матрице образуется дочерняя цепь ДНК.

Биосинтез РНК (транскрипция). Биосинтез РНК на матрице ДНК называется транскрипцией. Это важный элемент экспрессии генов. Для биосинтеза РНК необходимы следующие факторы: матрица – двухцепочечная или одноцепочечная ДНК; четыре типа рибонуклеозидтрифосфатов – АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ; ДНК-зависимая РНК-полимераза, катализирующая синтез РНК по уравнению $(\text{НМФ})_n + \text{НТФ} = (\text{НМФ})_{n+1} + \text{РР}_n$; двухвалентные ионы магния, марганца; регуляторные белки.

1) Характеристика матрицы. Отрезок ДНК, подвергающийся транскрипции, называют транскриптоном (у прокариот – опероном). В составе транскриптона по функциональному признаку выделяют четыре области: промотор – место инициации транскрипции; акцепторная зона, или оператор у прокариот – место связывания регуляторных факторов, например, белка-репрессора у прокариот; структурные гены, включающие информативные участки – экзоны и неинформативные – интроны; терминатор – область для завершения транскрипции. Следовательно, при транскрипции на матрице отмечены начало и конец синтеза РНК. У прокариот – гены непрерывные, у эукариот – прерывистые (экзоны и интроны).

В области промотора у прокариот находятся богатые АТ-парами последовательности (ТАТА-блок Прибнова). По всей видимости в таких участках ДНК процесс расплетения двойной спирали полинуклеотидных цепей облегчен (в паре АТ две водородные связи, а в паре ГЦ – три). У эукариот функциональная организация промотора намного сложнее за счет добавления регуляторных блоков: блок регуляции скорости транскрипции – энхансерные участки (enhance – усиливать), сайленсерные участки (silence – заставить молчать, заглушать), а также другие регуляторные элементы (определенные полинуклеотидные последовательности и белки). Если положение блока начала транскрипции относительно постоянно по отношению к точке инициации, то положение регуляторных блоков не закреплено. Они могут быть перед транскрибируемым геном, за ним, внутри него или даже в другой хромосоме. Обычно в данном участке генома транскрибируется только одна цепь ДНК в направлении 3' → 5'.

Возможно, промотор фиксирован в одной из двух цепей ДНК и определяет направление транскрипции. Терминацию синтеза РНК вызывают длинные блоки АТ-последовательностей нуклеотидов в ДНК – терминатор (стоп-сигнал); у ряда прокариот обнаружен белок, называемый ρ (ро)-фактором, который в участке терминации освобождает цепь РНК от матрицы ДНК.

2) ДНК-зависимая РНК-полимераза. РНК-полимераза *E. coli* является мультимерным белком, состоящим из 5 субъединиц: α_1 , α_2 , β , β' , σ . Установлено, что β -субъединица участвует в связывании с ДНК-матрицей, β' -субъединица – в связывании рибонуклеозидтрифосфатов, α -субъединица участвует в выборе участка инициации транскрипции. Весь комплекс субъединиц – холофермент; РНК-полимераза без σ -субъединицы – кор-фермент. Каталитический участок фермента находится в кор-ферменте. В эукариотических клетках существует четыре типа РНК-полимераз: в ядре РНК-полимераза I (транскрипция рРНК), РНК-полимераза II (транскрипция иРНК), РНК-полимераза III (транскрипция тРНК), а также еще один тип в митохондриях (хлоропластах).

3) Транскрипция РНК протекает в три стадии: инициация, элонгация и терминация.

На стадии инициации РНК-полимераза через серию случайных актов ассоциации-диссоциации с ДНК находит промотор. Эту функцию выполняет σ -субъединица. Она же обеспечивает расплетение примерно 17 пар оснований ДНК. Синтезируемая цепь РНК на 5'-конце начинается либо с рррА либо с рррГ. Цепь-затравка в этом случае не нужна. Следовательно, новообразованная цепь РНК имеет трифосфатную группу на 5'-конце и свободную ОН-группу на 3'-конце (место присоединения следующего рибонуклеотида). После того как начинается синтез новой цепи РНК, δ -субъединица отделяется от холофермента.

На стадии элонгации кор-фермент РНК-полимеразы скользит по матричной цепи ДНК и катализирует удлинение цепи РНК в направлении 5'→3';

Терминация синтеза РНК наступает при достижении РНК-полимеразой терминатора. При этом отделяется вновь синтезированная цепь РНК и с помощью специальных белковых факторов – кор-фермент. Кор-фермент соединяется с σ -субъединицей и цикл транскрипции повторяется. Таким образом на матрице ДНК синтезируется много молекул идентичных РНК.

В результате транскрипции образуются три типа предшественников РНК: предшественник иРНК, или гетерогенная ядерная РНК (пре-иРНК, или гяРНК); предшественники рРНК (пре-рРНК), содержащие 18S РНК и 28S РНК у эукариот и, соответственно, 16S РНК и 23S РНК у прокариот; предшественники тРНК (пре-тРНК).

4) Посттранскрипционный процессинг РНК (созревание) включает три операции: вырезание неинформативных участков из пре-иРНК; сращивание информативных участков (экзонов) – сплайсинг; модификация 5'- и 3'-концевых участков РНК.

Основной постулат молекулярной биологии.

Обратная транскрипция

Согласно современной трактовке основного постулата молекулярной биологии (ДНК → РНК → БЕЛОК) потоки информации могут обеспечить синтез ДНК на матрице ДНК (репликация), синтез РНК на матрице ДНК (транскрипция), синтез белка на матрице РНК (трансляция), синтез РНК на

матрице РНК у некоторых вирусов (репликация РНК) и синтез ДНК на матрице РНК – обратная транскрипция.

Обратная транскрипция была предсказана и открыта Говардом Теминым (1962) и Дэвидом Балтимором (1970). Обратная транскриптаза содержится в РНК-ретровирусах. С ней связывают три вида ферментативной активности: РНК-зависимая ДНК-полимераза строит по матрице РНК дочернюю цепь ДНК; рибонуклеазная активность обеспечивает удаление цепи РНК; ДНК-зависимая ДНК-полимераза строит на матрице кДНК вторую цепь кДНК. Затем фрагмент двойной спирали кДНК встраивается в геном клетки-хозяина. Предполагают, что гены РНК-содержащих вирусов когда-то транскрибировались, после чего встроились в хромосомы предков (протоонкогены). Они передаются, не транскрибируясь, из поколения в поколение. Их активация (происходит при действии канцерогенов, излучения и др.) приводит к экспрессии этих генов (превращение в онкогены) с образованием белков, вызывающих трансформацию нормальных клеток человека в злокачественные. Полагают, что через онкогены реализуется действие многих ростовых факторов. Активация протоонкогенов требует создания промоторного участка ДНК или распространения действия существующего промотора на данный участок ДНК – протоонкоген.

*В соответствии с основным постулатом молекулярной биологии синтез белков включает три процесса. **Транскрипция** – синтез информационной (матричной) РНК на ДНК-матрице на основе комплементарности. Это процесс переписывания генетической информации с ДНК на РНК. В молекуле иРНК записана информация о последовательности аминокислот в первичной структуре белка с помощью триплетного нуклеотидного кода. У эукариот процесс идет в ядре. **Трансляция** – перевод генетической информации иРНК, записанной с помощью четырех нуклеотидов, в первичную структуру белка (полипептид), записанную с помощью 20 аминокислот. Процесс идет в рибосомах. Для осуществления перевода нуклеотидного кода в аминокислотную последовательность существуют специальные молекулы-адаптеры. Роль адаптеров выполняют тРНК: с одного конца молекулы – аминокислота (3'-конец тРНК), а в другой части молекулы – антикодон, т.е. триплет нуклеотидов, комплементарный кодону иРНК. В результате транскрипции и трансляции генетическая информация ДНК реализуется в виде первичной структуры белка. **Пост-трансляционная модификация** белков осуществляется в цитозоле, аппарате Гольджи и других местах клетки за счет специфического взаимодействия радикалов аминокислот первичной структуры и других молекул. При этом формируется нативная структура белка.*

Рибосомы

Внутриклеточный компонент, в котором осуществляется процесс трансляции, называется рибосомой. Множество рибосом могут одновременно транслировать одну и ту же цепь иРНК, образуя так называемые полирибосомы (полисомы). Шероховатый эндоплазматический ретикулум – это компартмент клетки, в котором мембраносвязанные полисомы продуцируют как мембранные белки, так и белки, подлежащие экскреции и транспорту. Полирибосомные структуры присутствуют и в свободной форме – в цитозоле, где они синтезируют внутриклеточные белки. Рибосомы – это субклеточные частицы, состоящие из рРНК и белков. По константе седиментации различают 70S рибосомы прокариот и 80S рибосомы эукариот. Соотношение рРНК и белков у 70S рибосом 2:1, а у 80S рибосом 1:1. Рибосомные РНК синтезируются в ядрышке в виде предшественника 45S рРНК, который расщепляется затем эндонуклеазами на рРНК нужной длины. Рибосомные белки образуются в цитоплазме и переносятся в ядрышко. Здесь спонтанно образуются рибосомные субчастицы путем объединения белков с соответствующими рРНК. Возникшие большая (50S у прокариот и 60S у эукариот) и малая (30S у прокариот и 40S у эукариот) субъединицы рибосом через поры ядерной оболочки переносятся в цитозоль. Большая субъединица рибосом эукариотической клетки содержит 41 белок, 5S, 5,8S и 28S рРНК; малая субъединица – 30 белков и 18S рРНК. В микробной клетке количество рибосом равно 10000, а в эукариотической клетке достигает 100000. Согласно представлениям Дж. Уотсона существует «рибосомный цикл»: в начале синтеза полипептидной цепи субъединицы рибосомы объединяются в функционирующую рибосому на иРНК для осуществления трансляции, а в конце синтеза диссоциируют.

Генетический код

Информация о последовательности аминокислот в полипептидной цепи записана на иРНК в виде трехбуквенного нуклеотидного кода. Основные свойства кода: 1) триплетность – каждая аминокислота кодируется тройкой нуклеотидов, называемой кодоном; 2) вырожденность – одну и ту же аминокислоту может кодировать несколько кодонов, причем важнейшую роль играют два первых нуклеотида триплета; 3) однозначность – каждому триплету соответствует только одна аминокислота; 4) неперекрываемость – кодоны считываются один за другим, не перекрываясь;

5) универсальность – соответствие аминокислот триплетному коду у всех живых организмов (в последние годы показано, что в митохондриях различных клеток 4 кодона считываются иначе, чем постулировано принципом универсальности). Среди 64 триплетов иРНК выделяют три типа: 1) иницирующий – АУГ (кодирует включение формилметионина у прокариот или метионина у эукариот) определяют стадию начала (инициации) синтеза белковой молекулы; 2) смысловые кодоны – кодируют вклю-

чение аминокислот в синтезируемую полипептидную цепь; 3) терминирующие кодоны (УАА, УАГ и УГА) не кодируют включение аминокислот, это нонсенс-кодона, которые определяют завершение (терминацию) синтеза полипептидной цепи.

Этапы синтеза белка и необходимые факторы

По А. Ленинджеру выделяют 5 этапов синтеза белковой молекулы: 1) активация аминокислот с образованием аминоацил-тРНК; 2) инициация полипептидной цепи; 3) элонгация полипептидной цепи; 4) терминация полипептидной цепи и освобождение; 5) сворачивание полипептидной цепи и процессинг (созревание).

Белоксинтезирующая система клетки должна иметь: 1) матрицу – иРНК, на которой записана информация о последовательности аминокислотных остатков в синтезируемой полипептидной цепи; 2) рибосомы – субклеточные частицы, осуществляющие ферментативный синтез полипептидной цепи по матрице иРНК (точнее – полирибосома, являющаяся комплексом иРНК и рибосом); 3) набор всех типов аминоацил-тРНК (набор молекул-адаптеров); различные регуляторные и вспомогательные факторы белковой природы; 4) АТФ, ГТФ, ионы магния и др.

Трансляция молекул иРНК начинается с 5'-конца с образованием N-конца растущей полипептидной цепи. Информация считывается в направлении 5'→3' и заканчивается образованием C-конца белковой молекулы. Транскрипция гена в соответствующую иРНК начинается с образования 5'-конца молекулы иРНК. У прокариот это позволяет начать трансляцию иРНК еще до завершения транскрипции. У эукариот процесс транскрипции происходит в ядре, а трансляции иРНК – в цитоплазме. Такая компартиментализация процессов исключает одновременное протекание транскрипции и трансляции и делает неизбежным процессинг предшественников иРНК – гяРНК.

1) **Активация аминокислот.** В цитоплазме клеток 20 различных аминокислот присоединяются эфирной связью к соответствующей тРНК с образованием аминоацил-тРНК. Этот процесс катализируется высокоспецифичными аминоацил-тРНК-синтетазами: аминокислота + тРНК + АТФ → аминоацил-тРНК + АМФ + РР_н. Многие аминоацил-тРНК-синтетазы способны исправлять ошибки при присоединении близких по структуре аминокислот. Например, при включении валина вместо изолейцина (различие на одну метиленовую группу) фермент способен распознать ошибку, когда аминокислота поступает в активный центр, и гидролитически отщепить «неправильную» аминокислоту. Поэтому в этих ферментах выделяют 4 важных для катализа места связывания: 1) для аминокислоты; 2) для тРНК; 3) для АТФ; 4) для воды (гидролиз «неправильных» аминоацил-тРНК).

2) **Инициация полипептидной цепи.** Факторы, необходимые для этой стадии: иРНК, иницирующая аминоацил-тРНК, малая и большая субъединицы рибосом. Эти факторы собираются в работающий ансамбль с помощью белков (факторы инициации) IF-1, IF-2, IF-3, ионов магния и ГТФ. Иницирующая аминоацил-тРНК у прокариот представлена формил-метионин-тРНК, а у эукариот – метионин-тРНК. Стадия инициа-

ции начинается с присоединения IF-3 к малой субъединице рибосомы. Этот фактор обеспечивает узнавание на иРНК участка для присоединения иницирующей тРНК, т.е. иницирующего кодона (АУГ). В это же время иницирующая формилметионин-тРНК связывается с IF-2 и ГТФ. Затем оба комплекса взаимодействуют и образуется инициаторный комплекс, который связывается с иРНК. Это связывание происходит с помощью фактора IF-1, который способствует соединению иРНК с инициаторным комп-лексом, состоящим из малой субъединицы, формилметионин-тРНК, IF-2, IF-3, ГТФ. Белковый фактор IF-2 способствует соединению большой и малой субъединиц рибосомы. После присоединения большой субъединицы высвобождаются все иницирующие факторы, ГДФ и неорганический фосфат (т.е. процесс идет с затратой энергии). Смысл всех этих операций заключается в том, что иРНК соединяется с иницирующей (формил)метионин-тРНК в рибосоме единственно возможным способом, определяющим точное положение рамки считывания кодонов иРНК на иницирующем кодоне. В работающей рибосоме имеются два участка связывания транспортных РНК (тРНК): 1) А-участок (аминоацильный), имеющий сродство к аминоксил-тРНК; 2) Р-участок (пептидилный), имеющий сродство к пептидил-тРНК. В конце стадии инициации иницирующая (формил) метионин-тРНК находится в Р-участке собранной рибосомы и соединена водородными связями с иницирующим кодоном иРНК. В А-участке находится следующий кодон иРНК.

3) **Стадия элонгации.** Необходимые факторы: набор аминоксил-тРНК, ГТФ, ионы магния, факторы элонгации EF-T и EF-g. Элонгация начинается с присоединения аминоксил-тРНК к следующему за иницирующим кодоном иРНК в А-участке рибосомы. Каждое присоединение аминоксил-тРНК требует затраты молекулы ГТФ и происходит при участии EF-T. Между кодоном иРНК и антикодоном аминоксил-тРНК замыкаются водородные связи. Когда два аминокислотных остатка оказываются рядом, между ними образуется водородная связь. Процесс катализируется рибосомным ферментом пептидилтрансферазой и использует энергию макроэргической связи аминоксил-тРНК. Образовавшийся дипептид силами гидрофобного взаимодействия радикалом связан с Р-участком. В то же время он связан с тРНК, находящейся в А-участке и связанной с кодоном иРНК. Сродства к А-участку эта пептидил-тРНК не имеет. При участии EF-g и за счет энергии ГТФ происходит перемещение пептидил-тРНК в Р-участок, а вместе с ней в этот участок перемещается и кодон иРНК, т.к. они связаны водородными связями. Фактор EF-g считают ГТФазой. Такое перемещение называют транслокацией. (Формил)метиониновая тРНК при этом высвобождается из рибосомы. В результате транслокации в А-участок рибосомы приходит следующий новый кодон иРНК. К нему методом случайного подбора присоединяется комплементарным антикодоном новая аминоксил-тРНК. Между дипептидом Р-участка и аминокислотным остатком в А-участке замыкается пептидная связь. Возникший трипептид транслоцируется в Р-участок, а в А-участок приходит следующий новый кодон иРНК и т.д. Таким образом происходит многократное повторение этапов элонгации, пока в А-участок не придет один из терминирующих кодонов.

4) **Стадия терминации.** Необходимые факторы: FR-1 воспринимает УАА и УАГ; FR-2 воспринимает УАА и УГА; ГТФ. Терминирующие (бессмысленные, нон-сенс-кодоны не имеют для себя аминоксил-тРНК). Кодоны, поступив в А-участок, воспринимаются факторами FR-1 или FR-2. Эти факторы индуцируют пептидилэстеразную активность, вследствие чего отщепляется синтезированный полипептид. Весь комплекс трансляции диссоциирует на составные части. В цитоплазме клеток прокариот с помощью фермента деформилаза происходит отщепление формильной группы от N-концевого формилметионина синтезированного полипептида; часто после завершения синтеза в цитоплазме клеток отщепляется N-концевой метио-

нин от синтезированного полипептида (у прокариот и у эукариот). На основе взаимодействия радикалов аминокислотных остатков полипептидной цепи спонтанно формируется вторичная, третичная и у олигомерных белков четвертичная структура. В настоящее время считают, что правильное сворачивание полипептидной цепи (фолдинг) обеспечивается специальными белками шаперонами.

5) Посттрансляционная модификация белка включает следующие процессы: химическую модификацию белка (часто отсутствует) – метилирование по аминогруппе лизина и аргинина; фосфорилирование по ОН-группе серина; окисление лизина, пролина и др.; связывание простетической группы; связывание между собой субъединиц олигомерного белка; частичный протеолиз.

Например, посттрансляционная модификация при биосинтезе гликопротеинов происходит следующим образом. Полисомы связаны с внешней поверхностью мембраны эндоплазматического ретикулама клеток через большую субъединицу рибосомы. Синтезированные полипептидные цепи проходят через мембрану шероховатого эндоплазматического ретикулама в цистерны и переносятся в гладкий эндоплазматический ретикулум и в комплекс Гольджи. Здесь с помощью гликозилтрансфераз происходит присоединение моносахаридных молекул к полипептидным цепям с образованием гликопротеинов.

Регуляция биосинтеза белков

В настоящее время считают, что регуляции подвержены все или почти все этапы биосинтеза белков. Например, метаболиты и гормоны могут изменять сродство белков-репрессоров к регуляторным отделам ДНК; гормоны способны модифицировать активность метилаз, участвующих в биосинтезе рРНК; новообразованные белки способны активировать рибонуклеазы и тем самым ускоряют распад своих иРНК и т.п. Согласно теории Жакоба и Моно в биосинтезе белков у бактерий участвуют три типа генов: структурные гены, ген-оператор и ген-регулятор. Структурные гены определяют первичную структуру белков. Функционирование структурных генов контролируется геном-оператором. Оператор локализован между промотором и структурными генами. Формирование мРНК начинается с промотора и далее распространяется вдоль оператора и контролируемых им структурных генов. Оператор и структурные гены называют опероном. Деятельность оперона контролируется геном-регулятором. Оперон и ген-регулятор находятся в разных участках цепи ДНК, поэтому связь между ними осуществляется с помощью белка-посредника репрессора, синтезируемого по информации гена-регулятора. Если репрессор связан с геном-оператором, то РНК-полимераза не может синтезировать иРНК и, следовательно, не синтезируются белки. Если ген-оператор свободен, процесс транскрипции возможен и информация структурных генов используется для синтеза белков.

Рассмотрим превращения:

$$A \xrightarrow{E^{-1}} B \xrightarrow{E^{-2}} C \xrightarrow{E^{-3}} D.$$

Чтобы исходное вещество А превратилось в конечный продукт Д, необходимы ферменты $E^{-1,2,3}$. Если это неразветвленный процесс, то синтез этих ферментов кодируется одним опероном.

Установлено, что при отсутствии вещества А репрессор связан с геном-оператором и синтез белков-ферментов $E^{-1,2,3}$ не идет. При появлении метаболитов возможны 2 варианта:

– индукция синтеза ферментов – исходное вещество А, подлежащее превращению, понижает сродство репрессора к гену-оператору. В результате РНК-полимераза осуществляет синтез мРНК и затем синтезируются белки-ферменты $E^{-1,2,3}$. Эти ферменты обеспечивают

превращения вещества А в Д.

– Репрессия синтеза ферментов. Конечные продукты реакции (их называют корепрессоры) повышают сродство репрессора к гену-оператору. Это приводит к блокировке гена-оператора и матричный синтез мРНК прекращается, что сопровождается подавлением синтеза белков $E^{-1,2,3}$.

Регуляция синтеза белков в клетках эукариот намного сложнее: не характерна прямая субстратная регуляция, т.к. опероны (транскриптоны) у эукариот имеют обширные регуляторные зоны; у эукариот структурные гены разбросаны по геному; в ядрах дифференцированных клеток эукариот большинство генов находится в репрессированном состоянии; все структурные гены делят у эукариот на 3 группы – гены, функционирующие во всех клетках организма, в тканях одного типа, в специализированных клетках одного типа; пространственное разделение процессов – транскрипция в ядре, трансляция в рибосомах.

Заключение. Для молекулярной биотехнологии и, в частности, технологии рекомбинантных ДНК, ключевое значение имеют следующие механизмы:

1. Из репликации – а) построение дочерней цепи ДНК на материнской цепи ДНК происходит по принципу **комплементарности А-Т, Г-Ц**; б) синтез дочерней цепи ведет фермент **ДНК-полимераза III**; известны термостабильные варианты фермента, которые используются в полимеразной цепной реакции; в) для функционирования ДНК-полимеразы III необходим 3'-ОН группа предшествующего нуклеотида, поэтому в начале репликации по матрице материнской цепи строится праймер (короткий отрезок РНК, фиксированный на материнской цепи ДНК (А-У, Г-Ц); **праймеры** синтезируются в лабораторных условиях и служат для технологии рекомбинантных ДНК (синтез гена) и полимеразной цепной реакции.

2. Из транскрипции – а) экспрессия гена, т.е. синтез белка по его программе, возможна, если имеются компоненты оперона (транскриптона) – **промотор**, акцепторная зона, структурные гены, терминатор; без промотора, к которому присоединяется РНК-полимераза не возможно считывание информации ДНК и синтез РНК; б) **обратная транскриптаза** позволяет синтезировать ДНК по матрице РНК, это используется в синтезе генов: определяют последовательность аминокислот в белке → используя генетический код, синтезируют иРНК для данного белка → используя обратную транскриптазу, синтезируют отрезок ДНК-ген данного белка.

3. Из трансляции – экспрессия гена, т.е. синтез белка по его программе регулируется на уровне акцепторной зоны (гена-оператора) оперона (транскриптона) с помощью белков и низкомолекулярных биорегуляторов. В клетках прокариот могут синтезироваться только простые белки, т.к. в них отсутствуют компартменты пострибосомальной модификации белков. Для синтеза сложных белков следует использовать клетки эукариот.

Технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК (молекулярное клонирование или генная инженерия) – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой.

Важнейшей проблемой генной инженерии является анализ естественных путей передачи генов между живыми организмами. Согласно прекрасному обзору А.В. Кузнецова и И.В. Кузнецовой (1998) к настоящему времени известно:

1. Обмен генами между клетками реализуется у прокариот.
2. Существует возможность переноса генов между симбиотическими организмами. Наиболее вероятен обмен генов между длительно контактирующими симбионтами или паразитами и хозяевами.
3. Перенос генов от бактерий к эукариотам постоянно происходит при передаче Ti-плазмиды от *Agrobacterium tumefaciens* в клетки растений-хозяев. Сегмент ДНК из Ti-плазмиды включается в геном растения, что вызывает изменение роста и дифференцировки клеток последнего.
4. У эукариот латеральный (горизонтальный) перенос генов, насколько сейчас известно, не происходит, хотя нельзя утверждать, что это правило абсолютно. Например, онкогенные вирусы, интегрированные в хромосому эукариотической клетки и оказавшиеся рядом с онкогеном, при выходе из этой клетки и повторном инфицировании способны захватить данный онкоген с собой и перенести в другой организм.

Считается, что в естественных условиях между видами животных (и растений) не происходит передачи генов, которые они приобрели в ходе эволюции, так как необходимые рекомбинации и мутации в обычных условиях происходят с низкой частотой. С развитием генной инженерии возможность включения чужеродной ДНК в геном реципиентных клеток доказана в многочисленных опытах по их трансформации (трансфекции, трансгенезу). Тот факт, что интродуцированная в клетку молекула ДНК может эффективно включаться в работу генома, по всей видимости, является общебиологическим феноменом (Kumar, 1996), на основе которого строится здание современной биотехнологии.

Перенос генов у прокариот

Сведения о латеральном переносе генов в природных сообществах прокариот немногочисленны. *Гены могут переноситься в виде свободной ДНК, нехромосомных структур ДНК – плазмид и с помощью вирусов.*

Условия существования микроорганизмов при недостатке субстратов

Основная проблема, с которой сталкиваются микроорганизмы в окружающей среде, – это лимит субстратов. Доступных для микробов субстратов в почвенных и водных экосистемах настолько мало, что за год типичные почвенные бактерии совершают в среднем от одной до 36 генераций. В водных экосистемах концентрации от-

дельных углеводов, доступных для водных микроорганизмов, составляют 6–10 мкг/л, однако и эти количества могут быть малодоступны из-за того, что углеводы связаны водным гумусом.

В состоянии глубокого голодания у микробов происходит адаптационное переключение многих групп генов, в результате чего:

- 1) белки энергогенерирующих систем остаются интактными;
- 2) метаболическая активность голодающих клеток снижается почти до нуля, например, в голодающих бактериях не обнаруживаются ферменты путей биосинтеза;
- 3) индуцируется синтез специфических протеинов, функция которых – обеспечить переживание неблагоприятных условий (синтезируются протеазы, расщепляющие белки, ставшие уже ненужными);
- 4) аминокислоты, образующиеся при протеолизе, используются при синтезе шаперонов, основная задача которых – предотвратить необратимую денатурацию жизненно важных протеинов;
- 5) при голодании микроба нуклеоид, содержащий бактериальную ДНК, сильно компактизуется и становится наиболее законсервированным и неактивным компонентом клетки;
- 6) в глубоко лимитированном состоянии микробы приобретают общую устойчивость к стрессам;
- 7) микробы становятся некультивируемыми, т.е. не растут при высеве на чашки с питательными средами.

В естественных условиях достаточно большая доля природных микроорганизмов находится именно в некультивируемом состоянии, в частности, 90% от общего количества почвенных микробов и 99% – водных. Плазмиды способны сохраняться в некультивируемых бактериальных клетках.

Трансформация

Передачу генов при помощи *свободной растворимой ДНК*, выделенной из клеток-доноров, называют трансформацией. При этом гены могут передаваться из клетки в клетку без всякого межклеточного контакта и без каких-либо переносчиков. В почве обнаруживают внеклеточную ДНК, высвободившуюся из генетически модифицированных микроорганизмов или из природных организмов. Такая ДНК быстро адсорбируется на поверхности твердых частиц, становится устойчивой к нуклеазам и сохраняет способность к трансформации.

Трансформация не происходит:

- 1) если чужеродная ДНК не имеет гомологии с геномом реципиентных клеток, поскольку для успешной трансформации необходима гомологичная рекомбинация между трансформирующей ДНК и хромосомой;
- 2) если в природных штаммах микроорганизмов присутствуют системы рестрикции-модификации; в лабораторных условиях в этом случае эффективность трансформации снижается в 10^4 раз.

У бактерий такой способ передачи признаков стал известен раньше других (первый случай наследственного изменения, возникшего в результате приобретения чужеродного генетического материала, был обнаружен у бактерий рода *Pneumococcus* Griffith в 1928 году). Следует отличать генетическую (биохимическую) трансформацию от онкогенной трансформации клеток животных. Эффективность трансформации обычно выражают количеством клонов трансформантов, приходящихся на единицу массы донорной ДНК. Для трансформации требуются чрезвычайно малые concentra-

ции ДНК (0,1 мкг ДНК на 1 мл суспензии клеток-реципиентов). Трансформировать удается только те бактерии, в которые может проникать интактная ДНК.

Способность клеток поглощать ДНК из окружающей среды называют *компетентностью*. Доля компетентных клеток в популяции составляет максимально 15%. Компетентность зависит от физиологического состояния клетки. Она наиболее высока в середине фазы экспоненциального роста, а затем быстро снижается до минимума. Полагают, что поверхность клетки изменяется на протяжении роста, и ДНК может поглощаться только в определенную, относительно короткую фазу. Многие бактерии, а также дрожжи и культивируемые клетки животных физиологической компетентностью не обладают. Бактерии, раньше считавшиеся некомпетентными (такие, как *E. coli*), удается сделать компетентными путем модификации клеточной поверхности. Каким же образом молекула ДНК может проникнуть внутрь бактериальной клетки? На первом этапе трансформации экзогенная ДНК независимо от ее природы связывается с компетентными клетками, по-видимому, на определенных рецепторных участках поверхности бактерии. Затем происходит нарезание молекулы ДНК на фрагменты. После этого одна цепь молекулы ДНК разрушается, а другая проникает в клетку, гидролизуясь с концов. Вошедший в клетку одноцепочечный фрагмент ДНК при участии определенных белков может интегрировать в гомологичную область реципиентной хромосомы за счет комплементарного спаривания между донорной и реципиентной ДНК.

Конъюгация. Конъюгационный перенос

На основании морфологических данных давно предполагали, что у бактерий может происходить своего рода спаривание, однако только эксперименты с множественными мутантами доказали, что у *микроорганизмов возможна передача генетического материала при прямом межклеточном контакте*.

1. В 1946 г. Lederberg и Tatum провели эксперимент с двумя мутантами *E. coli* K12, каждый из которых был ауксотрофным по двум различным аминокислотам. Эти мутанты не росли на минимальной питательной среде и не образовывали колоний. Если на ту же минимальную среду высевали смесь суспензий обоих мутантов ($\text{Bio}^- \text{Met}^- \beta \text{Thr}^- \text{Leu}^-$), то появлялись колонии. Клетки этих колоний обладали наследственной способностью синтезировать все аминокислоты.

2. Дальнейшие опыты по скрещиванию, в которых один из родительских штаммов был стрептомицинустойчивым, позволили сделать вывод, что генетический материал передается лишь в одном направлении.

3. Способность бактерии быть донором (F^+) связана с наличием фактора F , который при конъюгации передается из одной клетки в другую. Фактор F представляет собой *плазмиду* размером ~ 60 т.п.н. Эта молекула содержит гены, ответственные за процесс конъюгации клеток при контакте. Донорами хромосомной ДНК могут быть бактерии, у которых фактор F интегрировал в хромосому (Hfr). Если смешать популяцию клеток Hfr с избытком клеток F , то почти каждая бактерия Hfr найдет себе партнера F и будет с ним конъюгировать. Обмен генами путем конъюгации и мобилизация генов с помощью плазмид, вероятно, очень распространены в мире прокариот.

В настоящее время считают, что *реальный, экологически значимый поток генов в микробных сообществах осуществляется с помощью конъюгации. Для этого бактерии самых различных родов могут содержать внехромосомные элементы ДНК – плазмиды, способные к автономной репликации.*

Размеры встречающихся в природе бактериальных плазмид варьируют очень широко: от 2 до 300 т.п.н. и более. Число копий плазмид на клетку строго определено и характерно для данной группы совместимости плазмид. Часто плазмиды несут гены, которые обуславливают фенотипическое отличие содержащих их клеток от бесплазмидных вариантов. Некоторые плазмиды делают клетку способной конъюгировать с другими бактериями. Это обеспечивает дальнейшее распространение таких плазмид путем прямого межклеточного контакта. Они способны также мобилизовать хромосомные гены и осуществить их перенос в другую клетку. Плазмиды могут содержать гены, которые в определенных условиях создают селективное преимущество хозяину. Вероятно, происходит обмен генами между хромосомой и плазмидами. Считают, что плазмиды играли важную роль в эволюции прокариот.

Выявлено, что многие бактерии содержат несколько плазмид различной величины. Однако две родственные плазмиды не могут поддерживаться в одной клетке с сохранением нормального числа копий. Явление несовместимости плазмид связано с нарушением репликации одной из плазмид. По определению *несовместимость* – это неспособность двух плазмид стабильно сохраняться в одном и том же штамме клеток. Предполагается, что несовместимость свойственна таким плазмидам, поддержание которых регулируется одними и теми же механизмами. Поэтому явление несовместимости объясняли подавлением репликации ДНК или нарушением распределения реплицированных плазмид между дочерними клетками. Изучение плазмид позволило разделить их примерно на 30 групп на основании их взаимной несовместимости. Плазмиды, принадлежащие к пяти группам – IncC, IncN, IncP-1, IncQ и IncW, способны размножаться в широком круге хозяев. Существовало мнение, что несовместимость отражает филогенетическое родство между плазмидами. Однако исследования, проведенные в последнее время, свидетельствуют, что несовместимость может быть обусловлена целым рядом факторов. Конъюгативные плазмиды широкого спектра хозяев, в частности плазмиды группы несовместимости IncP1, способны осуществлять перенос генов через эволюционные барьеры, например, из *Pseudomonas* и *Escherichia* в *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Mycoboccus*, *Desulfovibrio*, в цианобактерии *Synecoccus*, в флавобактерии *Bacteroides*; Ti-плазмиды из *Agrobacterium* способны к внесению бактериальных генов в клетки растений.

1. Конъюгационный перенос между почвенными микроорганизмами.

– В искусственных экосистемах (микросомах), состоящих из стерильной и нестерильной почв, показано, что присутствие в почве природных микроорганизмов подавляет перенос ДНК между интродуцированными штаммами в 2–7 раз.

– В ризосфере, богатой питательными веществами, происходит эффективный перенос генов между штаммами *Agrobacterium*, *Pseudomonas* и *Rhizobium*.

– В почвах, загрязненных тяжелыми металлами и органическими ксенобиотиками, стимулировано распространение генов путем конъюгации.

– Глубоко лимитированное состояние природных почвенных микроорганизмов препятствует конъюгационному переносу генов.

– Добавление к микробным сообществам почвы субстратов (глюкозы и/или триптона) является фактором, стимулирующим конъюгационный перенос плазмид.

2. Конъюгационный перенос между водными микроорганизмами. В водных микробных экосистемах обнаружено много плазмидных штаммов микроорганизмов. В частности, в озерной воде содержат плазмиды до 46% гетеротрофов, в речной воде – 10–15%; большинство плазмид конъюгативны. Указанные плазмиды свойственны таким родам бактерий, как *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Moraxella*. В загрязненной нефтепродуктами морской воде и активном иле, так же как и в загрязненной почве, содержится повышенное количество плазмидных штаммов микроорганизмов и усилен перенос соответствующих плазмид.

Трансдукция

Известно, что трансдукция осуществляется *бактериофагами*, содержащими двунитевую ДНК и способными включать в капсид фрагменты бактериальной ДНК. В результате заражения других клеток фаговые частицы вносят в них захваченную ДНК. Трансдуцируемая ДНК может интегрировать в клеточный геном только при существовании гомологии. Кроме того, способные к трансдукции фаги имеют весьма узкий спектр хозяев, так как способны адсорбироваться только на строго специфических участках поверхности клеток. Поэтому возможная трансдукция чужеродных генов в природе может происходить только между микроорганизмами одного и того же вида или, по крайней мере, между очень близкими видами.

Различают два вида трансдукции:

1) неспецифическую (общую), при которой может быть перенесен любой фрагмент ДНК хозяина (ДНК клетки-хозяина включается в частицу фага либо дополнительно к его собственному геному, либо вместо него);

2) специфическую, затрагивающую лишь строго определенные фрагменты ДНК (некоторые гены фага замещаются генами хозяина).

В обоих случаях трансдуцирующие фаги, как правило, дефектны: например, они часто теряют способность лизировать клетку-хозяина. Передача признаков путем трансдукции была обнаружена у многих бактерий, в том числе у видов *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio* и *Rhizobium*.

Инфекционность фаговых ДНК для бактерий, соответствующую генетической трансформации, называют *трансфекцией*. Обнаружено, что существенное влияние на инфекционность оказывает форма молекул ДНК, которую они принимают *in vivo*. Фаги с кольцевой или линейной ДНК, быстро замыкающейся в кольцо (лямбдоидные фаги), характеризуются большей эффективностью трансфекции. Доказано, что молекулы ДНК проникают в сферопласты в нативной двухцепочечной форме.

Перенос ДНК в клетки требует изменения свойств мембраны, например, обработка CaCl_2 на холоде с последующим тепловым шоком (быстрое нагревание от 0 до 42°C). Если после нагревания смесь клеток и ДНК снова охладить до 0°C, то в процессе индуцируемого фазового перехода липидов молекулы ДНК смогут опять проникать в клетки. При этом время проникновения ДНК продолжительнее. Выявленные фазовые переходы липидов приводят к нарушению структуры внешней мембраны, но практиче-

ски не затрагивают цитоплазматическую мембрану. Механизм проникновения фаговых и плазмидных ДНК в клетки *E. coli*, по-видимому, одинаков.

Все вышеизложенное позволяет сделать следующие заключения:

1. *Экологически значимый перенос генетической информации, существующий в природных почвенных и водных микробных сообществах, осуществляется преимущественно за счет конъюгативных плазмид широкого спектра хозяев. Этот перенос стимулируется субстратами, а также селективным давлением, существующим в загрязненной почве или воде.*

2. *Перенос хромосомных генов крайне редок и возможен только между одними и теми же или близкородственными видами, имеющими высокую степень гомологии ДНК.*

3. *Большая степень полиморфизма говорит об интенсивном генетическом обмене, малая – о небольшом. Генетический полиморфизм природных микробных популяций весьма низок; в природе бактериальные виды существуют в виде малого количества больших по численности, но однородных популяций. Данный факт может свидетельствовать о незначительной интенсивности латерального переноса генов в современных микробных сообществах.*

Перенос генов у эукариот

Прокариоты не способны осуществлять посттрансляционные модификации белка, свойственные эукариотам. Дрожжи являются наиболее примитивными одноклеточными эукариотами, которые могут использоваться для направленного переноса генов.

Плазмиды дрожжей

При электронно-микроскопическом исследовании препарата общей дрожжевой ДНК была обнаружена кольцевая ДНК длиной около 2 мкм, которая получила название 2μ -ДНК или *Scp1*. Дальнейшие исследования показали, что большинство лабораторных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* содержат такие плазмиды в количестве 1–5% от суммарной ДНК клетки. Эти плазмиды не кодируют жизненно важных функций клетки и локализованы в ядре дрожжей, но не обнаруживаются в хромосомной ДНК в интегрированном виде. Репликация плазмид происходит в S-фазе клеточного цикла. Обнаружено, что в ядре клеток дрожжей *S. cerevisiae* находится также небольшое количество кольцевой ДНК с контурной длиной около 3 мкм, которая автономно реплицируется (гены рРНК). Описан метод трансформации дрожжевых клеток, позволяющий вводить дрожжевую или чужеродную ДНК в сферопласты дрожжей, обработанных CaCl_2 и полиэтиленгликолем (ПЭГ). Перенесенные гены могут встраиваться в гомологичные сайты хромосом (если это дрожжевые гены) или же в негомологичные сайты, а также способны существовать как автономно реплицирующиеся единицы (это зависит от вида использованного вектора). Перенесенные гены в случае их автономной репликации могут входить в состав

гибридных плазмид, содержащих компоненты бактериальной плазмиды (например, pBR322) и дрожжевой плазмиды (например, 2 μ -ДНК).

Трансформация на уровне организма

Одно из первых исследований трансформации у высших животных касалось явления мозаицизма тела у *Drosophila melanogaster*. Яйца *D. melanogaster* дикого типа на ранних стадиях развития обрабатывали раствором, содержащим ДНК мух с мутантными признаками. В качестве генетических маркеров использовали мутации, изменяющие пигментацию тела, форму щетинок и окраску глаз. Из обработанных таким образом зародышей развивались взрослые мухи, обладавшие тем же фенотипическим признаком, что и мутантный штамм, служивший донором трансформирующей ДНК. Более того, трансформированные признаки передавались по наследству. Однако трансформированные особи были мозаичными. Косвенные данные позволяли считать, что трансформирующая ДНК не включалась в хромосомы мух-реципиентов.

В 70–80-х годах прошлого века стало известно, что чужеродные гены могут стабильно интегрировать в геном оплодотворенных яйцеклеток и во многих случаях после этого активно функционируют, заменяя или дополняя собственные гены реципиентного ядра. Для описания животных, которые содержат новые последовательности ДНК в своем геноме, был введен термин «трансгенное животное» (Gordon, Ruddle, 1982). Теперь этот термин применяется для характеристики особей, чей геном изменен в результате переноса генов, т.е. претерпел генетическую трансформацию.

В 1971 г. Brackett и соавт. показали, что после инкубации спермиев кролика с меченой тритием ДНК SV40 радиоактивный материал обнаруживается в головках сперматозоидов. Этот результат свидетельствовал, что гетерологичная ДНК может инкорпорировать в зрелые мужские гаметы млекопитающих. Кроме того после искусственного осеменения крольчих спермиями, обработанными ДНК SV40, 2-клеточные оплодотворенные яйцеклетки были способны заражать компетентные клетки почки зеленой мартышки – CV1. Следовательно, в процессе оплодотворения инфекционная ДНК была передана в ооцит. Таким образом, был поставлен вопрос о возможном участии сперматозоидов в латеральном переносе генов. Начиная с 1989 г., это открытие было повторено для других видов.

Теоретически существуют три возможных варианта судьбы экзогенной ДНК, перенесенной в яйцеклетку спермием (А.В. Кузнецов, И.В. Кузнецова, 1998):

- элиминация в ряду клеточных делений,
- автономная репликация в экстрахромосомном состоянии,
- стабильное встраивание в геном зародыша.

Эксперименты показали, что экзогенная ДНК остается в эмбрионах, по крайней мере, до наступления стадии вылупившейся бластоцисты. Однако, привнесенная в яйца ДНК распадается в процессе эмбрионального развития.

Существует несколько сообщений об интеграции перенесенной сперматозоидом экзогенной ДНК в геном и получении в результате этого трансгенных животных. Показано, что сперматозоиды мыши способны переносить чужеродную ДНК в яйцеклетки при оплодотворении. Помимо этого, процедура вызывает наследуемую генетическую трансформацию получающихся особей, в результате чего может быть получена трансгенная линия. Таким образом, показана возможность запланированного переноса ДНК у эукариот.

Рекомбинация

Одним из важных вопросов трансформации клеток является дальнейшая судьба поглощенной ДНК. В компетентные клетки может проникать любая ДНК, но рекомбинация происходит лишь тогда, если это ДНК близкородственного вида. В этом случае возможен обмен гомологичными участками между собственной и проникшей извне ДНК.

Рассмотрим типичную процедуру технологии рекомбинантной ДНК (рис. 1).

1. Из организма – донора нужных генов – экстрагируют нативную ДНК (донорская ДНК, клонируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК). Эту ДНК подвергают ферментативному гидролизу и соединяют с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы. Образуется новая рекомбинантная молекула: конструкция «клонированный вектор – встраиваемая ДНК».

2. Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается по наследству при каждом делении. Этот процесс называется трансформацией.

3. Отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).

4. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

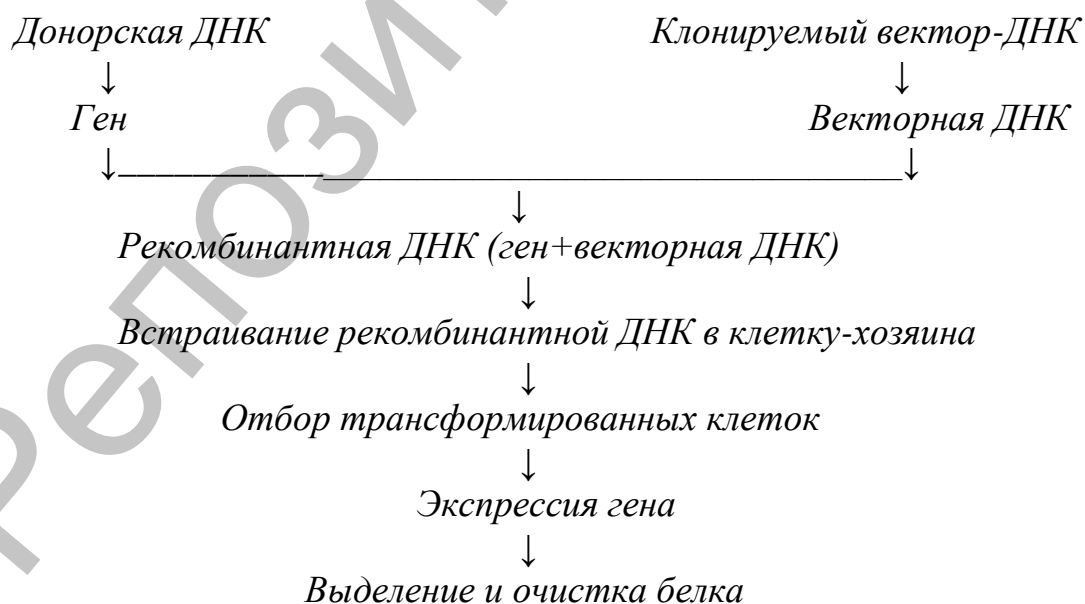


Рис. 1. Схема технологии рекомбинантных ДНК

Успех молекулярного клонирования зависит 1) от возможности вос-

производимо разрезать молекулу ДНК на фрагменты определенного размера и 2) способа их целенаправленного транспорта.

Рестриктазы

Для точного расщепления ДНК используют бактериальные рестрицирующие эндонуклеазы типа II. Например, одна из первых рестрицирующих эндонуклеаз II типа была выделена из бактерии *E. coli* и получила название *EcoRI*. Этот фермент узнает участок ДНК, содержащий специфическую палиндромную последовательность (перевертыш типа «кок», «шалаш») G-A-A-T-T-C, и катализирует разрыв между остатками гуанина (G) и аденина (A) в каждой цепи. Происходит расщепление связи между атомом кислорода при 3'-атоме углерода дезоксирибозного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5'-углеродному атому дезоксирибозы соседнего нуклеотида. Разрывы в цепи ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом (липкие концы). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена. К настоящему времени получены сотни рестриктаз; их номенклатура: род микроорганизма обозначается прописной буквой, а вид – двумя строчными, штамм обычно не указывается; римские цифры – порядковый номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма (см. выше *EcoRI*). Палиндромные последовательности, которые атакуют рестриктазы называют сайтами узнавания. Рестриктазы существуют двух типов: 1) катализируют косое расщепление двойной спирали ДНК с образованием «липких концов» и 2) катализируют перпендикулярный разрыв с образованием «тупых концов».

Рестриктазы используют для 1) изучения последовательности нуклеотидов в ДНК и 2) в генетической инженерии. В последнем случае рекомбинантные ДНК получают, когда два разных образца ДНК обрабатывают *одной и той же рестриктазой* с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы. Благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов ДНК могут образовываться новые комбинации генов. Этот ключевой механизм молекулярного клонирования поддерживается тремя способами:

1. Фрагменты ДНК, образующие комплементарные дуплексы в области липких концов удерживаются водородными связями недостаточно прочно, чтобы молекулы в растворе оставались стабильными длительное время. Для стабилизации используют фермент ДНК-лигаза бактериофага T4, который катализирует образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей, которые уже удерживаются вместе благодаря спариванию липких концов. Этот же фермент способен «сши-

вать» тупые концы, которые сближаются друг с другом после связывания с ферментом.

2. Объединение разных молекул ДНК (образование рекомбинантных ДНК) требует их реплицирования в клетке-хозяине. Следовательно, одна часть рекомбинантной молекулы ДНК должна нести нужный ген, который предполагается клонировать, а другая – должна содержать информацию, необходимую для репликации в клетке рекомбинантной ДНК (клонирование векторы).

3. При рестрикции ДНК образуется смесь разнообразных фрагментов, а затем после их лигирования с векторной ДНК образуется множество различных комбинаций. Поэтому существуют специальные системы скрининга для распознавания реципиентных клеток, содержащих ДНК с нужной для клонирования нуклеотидной последовательностью.

Плазмидные векторы

Плазмиды – это внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, содержащие от 1 до 500 т.п.н. Плазмиды встречаются практически у всех бактерий. Их делят на высококопийные (в клетке 10–100 копий) и низкокопийные (в клетке 1–4 копии). На долю плазмидной ДНК приходится 0,1–5,0% суммарной клеточной ДНК. Классификация плазмид по типу содержащейся информации:

- F-плазмиды содержат информацию для собственного переноса из одной клетки в другую;
- R-плазмиды несут гены устойчивости к антибиотикам;
- плазмиды деградации содержат гены, ответственные за утилизацию необычных метаболитов;
- криптоические плазмиды несут гены, выполняющие скрытые (латентные) функции;
- плазмиды с узким спектром хозяев несут специфический сайт начала (инициации) репликации и могут реплицироваться только в клетках одного вида;
- плазмиды с широким спектром хозяев – содержат неспецифичный сайт инициации репликации, что позволяет им реплицироваться в разных бактериальных клетках.

Для целей генетической инженерии требуются плазмиды, обладающие тремя важными свойствами:

- небольшой размер (менее 15 т.п.н.), необходимый для эффективного переноса;
- наличие уникального сайта рестрикции, в который может быть осуществлена вставка;
- наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

Природные (не модифицированные) плазмиды обычно лишены од-

ного или нескольких свойств, необходимых для эффективного переноса, поэтому качественные плазмидные векторы приходится также создавать методами генетической инженерии.

В технологии рекомбинантных ДНК классическим является плазмидный вектор pBR322. Номенклатура: p – от английского plasmid, следующие буквы имеют отношение к описанию вектора или истории его создания (для данного вектора буквы BR указывают на авторство Ф. Боливара и Р. Родригеса); цифра 322 – номер из исследовательского протокола. Размер плазмиды pBR322 – 4361 п.н. Плазмидный вектор несет два гена устойчивости к антибиотикам – ампициллину и тетрациклину, а также уникальные сайты узнавания ферментами рестрикции для *Bam*HI, *Hind*III, *Sal*I в гене Tet', один *Pst*I-сайт в гене Amp', один сайт для *Eco*RI, находящийся за пределами кодирующих последовательностей, и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в бактериальных клетках кишечной палочки.

Пример создания плазмидного вектора приведен на рисунке (рис. 2, заимствованный из монографии А.В. Кузнецова и И.В. Кузнецовой, 1998), на котором изображены различные стадии конструирования плазмиды pBR322 и ее производных. Основные этапы процесса конструирования состоят в ослаблении контроля репликации, а также во встраивании генов устойчивости к ампициллину и тетрациклину, которые используются в качестве генетических маркеров селекции, инактивируемых при встраивании чужеродной ДНК. Первоначально из клинического изолята, несущего плазмиду pMB1, которая синтезирует колицин, был выделен сайт инициации репликации ДНК с ослабленным контролем в форме плазмиды pMB13. В плазмиду pBR312 были включены ген устойчивости к тетрациклину (Tet') из плазмиды pSC101 и ген устойчивости к ампициллину (Amp') из транспозона Tn3, содержащегося в плазмиде pRSF2124. Таким образом, гены Tc^R и Ap^R помещены в репликон с ослабленным контролем репликации, который амплифицируется в присутствии ингибиторов синтеза белка. Все последующие манипуляции были направлены на увеличение числа уникальных сайтов рестрикции и уменьшение размера плазмиды. Широкое использование pBR322 в качестве клонирующего вектора связано с тем, что полностью известна ее нуклеотидная последовательность. Плазмиды pBR322 и ее производные использовались в качестве модельных систем для изучения различных свойств молекул ДНК как *in vivo*, так и *in vitro*. Эти данные имеют большую практическую ценность для исследователей, желающих создавать более эффективные или специализированные плазмидные векторы.

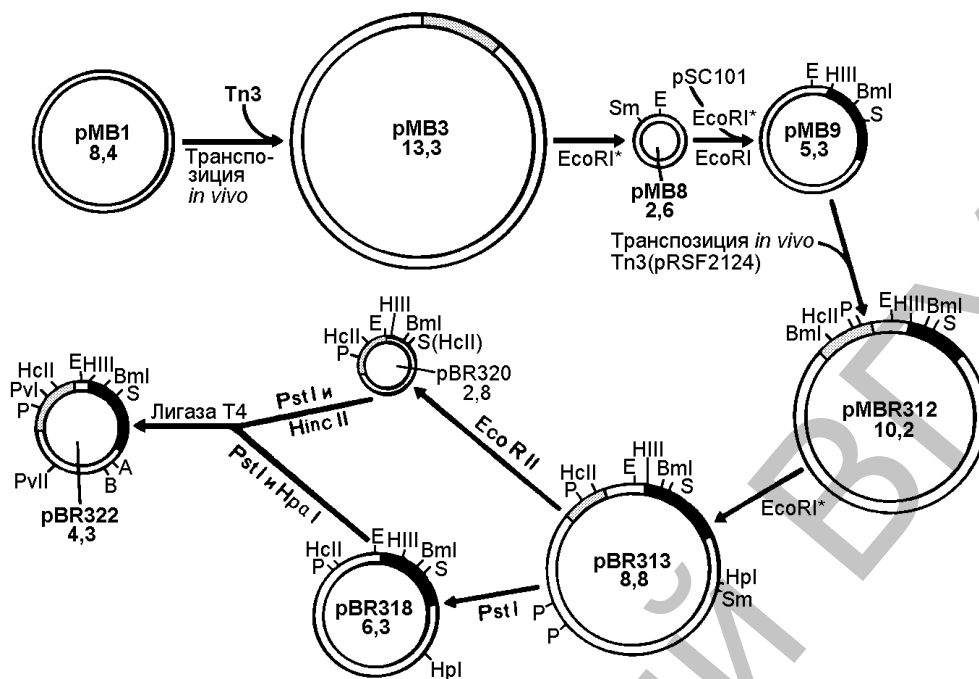


Рис. 2. Схема стадий конструирования плазмиды pBR322 из pMB1, pSC101 и pRSF2124 (Балбас, 1991). Сайты рестрикции обозначены: А – AvaI, В – BamI, BmI – BamHI, Е – EcoRI, HIII – HindIII, HcII – HincII, HpI – HpaI, P – PstI, PvI – PvuI, PvII – PvuII, S – SalI, Sm – SmaI. Черные участки – Tc^R, серые участки – Ap^R

Принцип работы плазмидного вектора pBR322:

1. Плазмиду pBR322 обрабатывают рестриктазой, которая катализирует ее разрыв в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к тому или иному антибиотику. Образуется линейная молекула с липкими концами.
2. Донорную ДНК, содержащую нужный ген, обрабатывают той же рестриктазой, что приводит к образованию фрагментов ДНК с липкими концами.
3. Линейные молекулы плазмиды pBR322 смешивают с обработанной донорной ДНК. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул.
4. Для стабилизации гибридных молекул ДНК производят обработку ДНК-лигазой фага Т4 в присутствии АТФ, в результате чего образуется множество разных комбинаций фрагментов. Кроме того, образуются нежелательные продукты, объединяющие между собой фрагменты донорной ДНК и исходные плазмидные ДНК. Для их уменьшения обрабатывают рестрицированную плазмидную ДНК щелочной фосфатазой, отщепляющей от линейной молекулы 5'-фосфатные группы. В результате ДНК-лигаза не сможет сшить концы дефосфорилированной линейной плазмидной ДНК. Что касается собственно рекомбинантных молекул ДНК, то два из четырех одноцепочечных разрывов при действии ДНК-лигазы устраняются, и конструкция оказывается стабильной благодаря образовавшимся фосфодиэфирным связям.
5. После введения гибридной ДНК в клетку хозяина происходит ее репликация и образуются новые кольцевые молекулы уже без разрывов.

Трансформация и отбор

Введение рекомбинантной ДНК в клетку-хозяина называется трансформацией. Положительный результат получается примерно в одной клетке

из тысячи (введение в клетку плазмиды со встроенным фрагментом чужеродной ДНК – гибридная плазида). Однако, проникновение в клетку экзогенной ДНК еще не означает, что она будет поддерживаться в клетке-хозяине. Для сохранения рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине в первоначальном виде необходимо отсутствие генов, кодирующих синтез рестриктаз, разрушающих ДНК. Необходимо также, чтобы клетка имела фенотип ResA⁻ (такие клетки неспособны к общей рекомбинации).

Следующий этап – это идентификация клеток, содержащих рекомбинантную ДНК. При использовании плазмиды pBR322, в которой чужеродная ДНК встраивается в сайт *Bam*HI, специфическая идентификация состоит из двух этапов:

1. Клетки после трансформации высевают на питательную среду, содержащую ампициллин. Вырастают только клетки с наличием интактного гена *Amp*^r (или в составе интактной плазмиды pBR322, или в составе гибридной плазмиды). *Нетрансформированные клетки чувствительны к ампициллину. Сайт BamHI расположен в гене Tet^r плазмиды pBR322; встраивание в этот ген фрагмента ДНК прерывает кодирующую последовательность, в результате чего устойчивость к тетрациклину утрачивается. Следовательно, клетки, которые несут гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину и чувствительны к тетрациклину, а клетки, получившие интактную плазмиду pBR322, несут ген Tet^r и устойчивы как к ампициллину, так и к тетрациклину.*

2. Клетки, выросшие на среде с ампициллином, переносят на среду с тетрациклином. Клетки, образующие колонии на чашках с тетрациклином, содержат интактную плазмиду pBR322 (они устойчивы к обоим антибиотикам). Клетки, не выросшие на среде с тетрациклином, чувствительны к этому антибиотику, а значит они содержат гибридную плазмиду pBR322. Среди колоний, выросших на среде с ампициллином, выделяют те, которые оказались чувствительны к тетрациклину, и из каждой колонии получают индивидуальные клеточные клоны. Чаще объединяют все колонии, устойчивые к ампициллину и чувствительные к тетрациклину, культивируют их вместе. Далее проводят дополнительный скрининг и идентифицируют те клетки, которые несут гибридную плазмиду pBR322 со специфической вставкой.

В настоящее время известно много плазмидных векторов. Например, на основе плазмиды pUC создан вектор, содержащий ген, который кодирует убивающий клетку белок. Этот остроумный подход позволяет облегчить сортировку и выделение трансформированных клеток.

Геномная библиотека

Процесс разделения геномной ДНК на клонируемые элементы и введение этих элементов в клетки-хозяева называется созданием геномной библиотеки (банка клонов, банка генов).

Для молекулярной биотехнологии важна идентификация структурных генов, кодирующих определенные белки. Ранее говорилось, что у прокариот структурные гены непрерывны, а у эукариот кодирующие участки генов – экзоны – разделены некодирующими – интронами. Поэтому технологии клонирования генов у прокариот и эукариот имеют различия.

У прокариот нужная последовательность для клонирования (ДНК-мишень) часто не превышает 0,02% от суммарной хромосомной ДНК. Технология клонирования и отбора ДНК-мишени включает: 1) гидролиз суммарной ДНК рестриктазой; 2) каждый из получившихся фрагментов встраивают в вектор; 3) обнаружение специфической клеточной линии (клон), которая несет нужную последовательность; 4) выделение и характеристика этой клеточной линии. У эукариот (прерывистые гены) вначале выделяют иРНК, затем с помощью обратной транскриптазы синтезируют кДНК (ДНК, комплементарная иРНК) и уже ее используют для молекулярного клонирования и создания геномной библиотеки.

Следующий после создания геномной библиотеки этап – это поиск клона (клонов), несущего искомую последовательность ДНК. Для этого используют три метода:

1. Гибридизация с меченым ДНК-зондом с последующим радиоавтографическим анализом. После трансформации высевают клетки на чашки с питательной средой и переносят выросшие колонии на твердую подложку (нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр). Лизируют клетки. Производят депротеинизацию и денатурацию ДНК. Фиксируют ДНК на подложке. Наносят на фильтр меченый зонд и производят отжиг, а затем радиоавтографию. Колонии на исходной чашке, которые содержат гибридизовавшуюся ДНК, выделяют и культивируют.

2. Иммунологический скрининг. В результате экспрессии клонированного гена образуется белок, который можно обнаружить иммунологическими методами. Для этого все клеточные линии (клоны) библиотеки высевают на чашки с питательной средой. Выросшие колонии переносят на фильтр, клетки лизируют, а высвободившиеся белки фиксируют на фильтре. Затем на фильтр наносят первые антитела, которые специфически связываются с данным белком (антигеном). Все несвязавшиеся антитела удаляют, а фильтр помещают в раствор вторых антител, специфичных в отношении первых антител. Во многих тест-системах используют конъюгаты вторых антител с ферментом (например, щелочной фосфатазой). После отмывания фильтра добавляют бесцветный субстрат. Если вторые антитела связываются с первыми, то под действием фермента происходит гидролиз субстрата с образованием окрашенного вещества в том месте, где идет реакция.

3. Скрининг по активности белка. Если искомый ген кодирует фермент, не синтезируемый клеткой-хозяином, то для обнаружения клонов используют цветную реакцию, катализируемую данным ферментом.

Клонирование крупных фрагментов ДНК. Чтобы иметь возможность

клонировать целый ген, донорную ДНК расщепляют лишь частично. При этом получают фрагменты разной длины, из которых затем создают геномную библиотеку. Для клонирования крупных фрагментов ДНК были сконструированы векторы на основе бактериофагов лямбда и P1, а также плазмиды F.

В заключение следует отметить, что конечный результат молекулярного клонирования ДНК лишь тогда положителен, если будет доказано получение нативного структурного гена.

Для обеспечения переноса генетического материала между организмами необходимо осуществлять анализ химического состава и синтез ДНК.

Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК – это определение нуклеотидной последовательности полинуклеотидных цепей. Без знания нуклеотидной последовательности генов невозможно осуществлять молекулярное клонирование. Для секвенирования используют несколько методов.

1. Дидезоксинуклеотидный метод. Дидезоксинуклеотид – это полученный искусственным путем нуклеотид, лишенный 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах сахара. У дезоксирибонуклеотидов, входящих в ДНК, отсутствует только 2'-гидроксильная группа. Как указано выше, удлинение цепи во время репликации ДНК происходит в результате присоединения очередного нуклеозидтрифосфата к 3'-гидроксильной группе последнего нуклеотида растущей цепи. Если же присоединяемым нуклеотидом является дидезоксинуклеотид, то синтез ДНК останавливается, поскольку следующий нуклеотид не может образовать фосфодиэфирную связь. Остановка синтеза ДНК – ключевой этап дидезоксиметода. Для секвенирования в разных пробирках одновременно проводят четыре реакции синтеза ДНК, каждая – в присутствии одного из четырех дидезоксинуклеотидов (ддАТФ, ддГТФ, ддЦТФ и ддТТФ). Продукты реакций разделяют с помощью гель-электрофореза, проводят радиоавтографию и «считывают» с радиоавтографа нуклеотидную последовательность синтезированного фрагмента ДНК.

2. Для секвенирования более длинных генов используют систему на основе фага M13. В ДНК фага встраивают фрагмент ДНК длиной до 500 нуклеотидов, который хотят секвенировать. Эту рекомбинантную ДНК легко получить в одноцепочечной форме и использовать ее в качестве матрицы для секвенирования вставки. Можно использовать также двухцепочечные плазмиды, содержащие клонированную ДНК.

3. Для определения нуклеотидной последовательности протяженных клонированных сегментов сначала подбирают синтетический олигонуклеотидный праймер, комплементарный участку, соседствующему со вставкой. Затем с помощью дидезоксиметода секвенируют первые 250–300 нуклеотидов. Затем по результатам секвенирования синтезируют второй праймер и определяют последовательность следующих 250–350 нуклеотидов клонированного участка и т.д. Этот метод, называемый «праймеропосредованной прогулкой» (или «блуждающей затравкой»), позволяет секвенировать протяженные фрагменты ДНК без их субклонирования, как в случае системы на основе фага M13.

В табл. 2 представлен прогресс в секвенировании генов.

Таблица 2

Историческая справка о секвенировании ДНК генов (S.B. Primrose, R.M. Twyman, 2003)

Секвенированный ген	Год	Размер гена	Комментарий
---------------------	-----	-------------	-------------

Бактериофаг фх174	1977	5,38 kb	Первый ген
Плазмида <i>pBR322</i>	1979	4,30 kb	Первая плазмида
Бактериофаг А	1982	48,5 kb	
Вирус Эпштейн-Барра	1984	172 kb	
Дрожжевая хромосома III	1992	315 kb	Первая хромосома
<i>Haemophilus influenzae</i>	1995	1,8 Mb	Первый геном организма-клетки
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1996	12 Mb	Первый геном клетки-эукариота
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1998	97 Mb	Первый геном мультиклеточного организма
<i>Drosophila melanogaster</i>	2000	165 Mb	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2000	125 Mb	Первый геном растения
<i>Homo sapiens</i>	2001	3000 Mb	Первый геном млекопитающего
Pufferfish (<i>Fugu rubripes</i>)	2002	400 Mb	Наименьший геном позвоночных
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	2002/3	2700 Mb	Генетическая модель человека

Химический синтез ДНК

Химический синтез ДНК используют для получения 1) одноцепочечных цепей дезоксирибонуклеотидов (олигонуклеотиды) и 2) двухцепочечных цепей ДНК (синтез генов).

Синтез олигонуклеотидов длиной около 50 нуклеотидов осуществляется с помощью ДНК-синтезаторов с использованием фосфорамидитного метода. В отличие от биологического синтеза ДНК (присоединение каждого последующего нуклеотида по 3'-ОН группе дезоксирибозы, в химическом синтезе каждый новый нуклеотид присоединяется к 5'-ОН группе, т.е. 5'-концу олигонуклеотида). Синтезированные олигонуклеотиды используются:

- для конструирования фрагментов или целых генов;
- для амплификации (усиление синтеза) специфических фрагментов ДНК;
- для направленных мутаций изолированных ДНК;
- в качестве зондов при гибридизации (нуклеотидную последовательность зондов длиной 20–40 звеньев находят из данных об аминокислотной последовательности соответствующих белков);
- в качестве линкеров, облегчающих клонирование (линкер – синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции; используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры);
- олигонуклеотиды длиной 17–24 звеньев служат праймерами при секвенировании ДНК и проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Синтез генов из химически синтезированных отдельных комплементарных цепей олигонуклеотидов: как правило, синтетические двухцепочечные

чечные гены собирают из модулей – одноцепочечных фрагментов длиной от 20 до 60 нуклеотидов с перекрывающимися концами. Нуклеотидные последовательности цепей задают так, чтобы после отжига (образование комплементарных двухцепочечных фрагментов) концевые сегменты гена имели тупые концы. Каждый внутренний сегмент имеет выступающие 3'- и 5'-концы, комплементарные таковым соседнего сегмента. После сборки гена остается сшить одноцепочечные разрывы с помощью ДНК-лигазы T4. Синтетические гены могут быть сконструированы так, чтобы помимо белок-кодирующих последовательностей они содержали концевые участки, обеспечивающие:

- встраивание в клонирующий вектор (сайты для рестриктаз);
- сигнальные последовательности для правильной инициации и терминации транскрипции и трансляции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей (Kary Mullis; США, патент 4,683,202). Их амплификация (иногда в миллионы раз) осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы:

- два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим последовательность-мишень; 3'-гидроксильные группы праймеров после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу (таким образом, отмечаются начальный и конечный участки нужного фрагмента на ДНК-матрице);

- ДНК-мишень длиной от 100 до 35000 п.н.;
- термостабильная ДНК-полимераза *Taq*, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, которая не теряет своей активности при температуре 95°C и выше;

- четыре дезоксирибонуклеотида;

- буфер, содержащий ионы магния.

Этапы ПЦР:

1. Денатурация (плавление). Для денатурации ДНК (расхождение цепей) ее выдерживают до 1 мин. при 95°C. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза и четыре дезоксирибонуклеотида.

2. Ренатурация (отжиг). Температуру смеси медленно понижают до 55°C, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3. Синтез (элонгация). Температуру повышают до 75°C, т.е. температурного оптимума для ДНК-полимеразы *Taq*. Начинается синтез компле-

ментарной цепи ДНК, иницируемой 3'-гидроксильной группой праймера. Все реакции проводятся в регулируемом термостате с повторением циклов, продолжительностью 3–5 мин. Эти циклы повторяют до 30 раз.

Применение метода ПЦР:

– идентификация патогенных микроорганизмов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений. Для синтеза праймеров, специфичных в отношении исключительно ДНК-мишени, необходимо знать нуклеотидную последовательность ДНК предполагаемого патогенного микроорганизма. В этом случае в ходе ПЦР будет амплифицироваться только фрагмент ДНК, длина которого равна суммарной длине двух праймеров и фрагмента ДНК между ними.

– Получение кДНК (ДНК, комплементарные информационной РНК, мРНК). Метод называют RACE (rapid amplification of cDNA ends). Обычно получают кДНК, комплементарные 3'- и 5'- концам мРНК (3'RACE и 5'RACE). В случае 3'RACE праймером для синтеза первой цепи кДНК является олиго(дТ) с присоединенным к нему вторым праймером (Р). Олиго(дТ) спаривается с поли(А)-хвостом мРНК (3'-конец молекулы). С помощью обратной транскриптазы на матрице мРНК синтезируется цепь кДНК. На матрице синтезированной цепи кДНК синтезируется вторая цепь и затем в последовательных циклах ПЦР с введением «внутренних праймеров» накапливаются значимые количества кДНК, комплементарной 3'концу мРНК.

– Синтез генов с помощью ПЦР.

– Выделение делеций или вставок в генах, ответственных за то или иное наследственное заболевание. Например, определение мутаций с помощью аллельспецифических проб производится следующим образом. Синтезируются 2 коротких ³²P-олигодезоксирибонуклеотида, один из которых содержит ДНК-последовательность, включающую мутацию, а другой не изменен. С помощью этих аллельспецифических проб ДНК пациентов проверяют на носительство исследуемой мутации. Для этого область гена, содержащую интересующий участок, амплифицируют с помощью ПЦР. Образцы наносят на узкие полоски нитрата целлюлозы и обрабатывают мечеными олигонуклеотидами, содержащими нормальную или мутантную последовательность. Радиоавтографически оценивают, с какой из проб преимущественно связывается ДНК пациента.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет выделять гены любых белков, существующих в природе, экспрессировать их в организме хозяина и получать чистые белковые продукты. Так, получение термостабильных белков с помощью бактерий, обитающих в горячих источниках при 90°C и выше, позволило создать метод полимеразной цепной реакции или получить термостабильную амилазу, которая работает при высокой температуре промышленного получения спирта.

Структура и функция белков

Для понимания сущности метода получения белков с заданными свойствами следует вспомнить особенности структурной организации белков (табл. 3).

Таблица 3

Уровни структурной организации белковых молекул

Структура	Характеристика	Связи, стабилизирующие структуру
Первичная	Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Определяет все последующие структуры	Ковалентная пептидная связь
Вторичная	Регулярная организация полипептидной цепи в пространстве. Соотношение альфа-спиралей и бета-структур определяют динамические или структурные свойства белков	Водородные связи между NH и CO компонентами пептидных связей
Третичная	Конформация полипептидной цепи в трехмерном пространстве. Нативная структура – единственная трехмерная организация белковой молекулы, при которой реализуется полная функция белка. Денатурация – утрата третичной структуры и функции белка	Ковалентная – дисульфидная и слабые водородные, ионные связи и гидрофобные взаимодействия между радикалами аминокислот полипептидной цепи
Четвертичная	Полная функция белка, состоящего из двух и более полипептидных цепей, каждая из которых обладает первичной, вторичной и третичной структурой	Водородные, ионные связи и гидрофобные взаимодействия между радикалами аминокислот полипептидной цепи

Итак, функционирующие уровни структурной организации белковой молекулы (третичная и четвертичная структуры) зависят от взаимодействия радикалов аминокислотных остатков полипептидных цепей. Следовательно, для направленного изменения функционирования белка необходимо знать последовательность аминокислот и уметь осуществлять замены аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Среди различных функций белков в биотехнологии используется чаще всего каталитическая. Характеристика свойств ферментов, которые используются в технологических процессах, представлена в табл. 4.

Таблица 4

Основные свойства ферментов

Свойство	Характеристика
Активный центр	Область белковой молекулы фермента, где протекает катализируемая химическая реакция
K_m	Концентрация субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости катализируемой ферментом реакции. Определяет сродство фермента к субстрату. Чем меньше K_m , тем эффективнее ферментативная реакция
V_{max}	Максимальная скорость катализируемой ферментом реакции
Аллостерический центр	Область белковой молекулы фермента вне активного центра, взаимодействие с которой молекул-эффекторов через изменение нативной структуры может изменять скорость ферментативной реакции.
Специфичность	Абсолютная – фермент катализирует превращения одного субстрата; относительная – фермент катализирует превращения определенного типа связей; относительная групповая – катализ превращения определенного типа связей, но образованных определенными молекулярными группировками; стереохимическая – фермент катализирует превращения только вещества D или L ряда
Взаимодействие фермента с субстратом	В третичной структуре по гиперболической зависимости (имеются насыщающие концентрации с реакцией 0-порядка); в четвертичной структуре по S-образной зависимости (кооперативный эффект)
Влияние концентрации субстрата	Описывается уравнением Михаэлиса-Ментен; характеризуется величинами K_m и V_{max}
Влияние концентрации фермента	При избытке субстрата – линейная зависимость.
Влияние температуры	Сложная зависимость, состоящая из взаимодействия двух процессов: 1) увеличения скорости реакции в 2–4 раза при повышении температуры на каждые 10°C и 2) уменьшения скорости реакции при тепловой денатурации белка. Для каждой ферментативной реакции имеется температурный оптимум
Влияние pH	Колоколообразная зависимость с оптимумом pH – величина pH, при которой фермент проявляет максимальную активность. Сдвиг pH в кислую или щелочную сторону изменяет ионизацию функциональных

	групп аминокислотных радикалов, что меняет конформацию молекулы. Если такие изменения затрагивают область активного центра, то будет изменяться и скорость ферментативной реакции (K_m и V_{max})
Активаторы	Вещества оптимизирующие образование фермент-субстратного комплекса и подавляющие его распад, что обеспечивает оптимизацию протекания ферментативной реакции
Ингибиторы	Вещества, препятствующие образованию фермент-субстратного комплекса, снижающие скорость или прекращающие ферментативную реакцию

Практически все свойства ферментов зависят от состояния молекулы белка в трехмерном пространстве. Следовательно, вводя направленные аминокислотные замены можно изменять свойства ферментов.

Промышленные технологии требуют определенных свойств белков, которыми природные белки не обладают. Например:

- изменив сродство субстрата к ферменту (уменьшив K_m) и увеличив количество субстрата, превращаемого в продукт (V_{max}), можно существенно повысить общую каталитическую активность реакции (V_{max}/K_m);

- изменив характер взаимодействия фермента с аллостерическими регуляторами, можно управлять ходом катализируемой реакции;

- изменив стабильность белка к температуре и pH, возможно его использование в технологических процессах, требующих жестких условий протекания;

- создав белки, способные функционировать в гидрофобных растворителях (обращенные мицеллы), можно осуществлять ферментативные реакции в нефизиологических условиях;

- повысив устойчивость белка к лизосомальным ферментам, можно упростить процедуру получения и очистки белка;

- изменив белок-лигандные взаимоотношения возможно создание управляемого технологического процесса с участием белков.

Для создания подобных белков используют технологии направленного мутагенеза, включающие внесение изменений клонированными генами в кодирующие белки.

Направленный мутагенез

Направленный мутагенез – это внесение специфических изменений в кодирующие последовательности ДНК, приводящих к определенным изменениям в аминокислотных последовательностях. Методики направленного мутагенеза служат для получения белков с заранее заданными свойствами. Это сложная задача, поскольку она требует знания нативной структуры (третичной, четвертичной) белка. Метод направленного мутагенеза клонированных генов имеет существенные преимущества перед мето-

диками химического мутагенеза из-за высокой специфичности. Известно, что свойства любого белка зависят от его конформации, которая, в свою очередь, определяется аминокислотной последовательностью. Некоторые аминокислоты в полипептидной цепи играют ключевую роль в определении специфичности, термостабильности и других свойств белка. Замена единственного нуклеотида в гене, кодирующем белок, может привести к включению в него аминокислоты, что может изменить свойства кодируемого белка.

Методы направленного мутагенеза:

– олигонуклеотид-направленный (сайт-специфичный) мутагенез с использованием ДНК фага М13. Это один из наиболее простых, но многостадийных и длительных методов внесения точечных мутаций в клонированный ген. Для его осуществления необходимо знать: 1) точную нуклеотидную последовательность той области ДНК, которая соответствует иРНК-кодону, подлежащему изменению, и 2) характер аминокислотных замен. Интересующий ген клонируют в ДНК фага М13. Одноцепочечную форму ДНК этого фага копируют с использованием олигонуклеотидного праймера, синтезированного таким образом, чтобы в ген-мишень был встроен определенный нуклеотид. Затем трансформируют двухцепочечными ДНК М13 клетки *E. coli*. Часть образующихся в клетках фаговых частиц несет ген, содержащий нужную мутацию. Такие частицы идентифицируют, встраивают мутантный ген в экспрессирующий вектор, синтезируют белок и определяют его активность.

– Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК создан для сокращения количества процедур получения мутантного гена. ДНК встраивают в плазмидный вектор, который несет функциональный ген устойчивости к тетрациклину и неактивный ген устойчивости к ампициллину. В середине последнего заменен один нуклеотид. Клетки *E. coli* трансформируют вектором, несущим ДНК-мишень. Двухцепочечную плазмидную ДНК денатурируют щелочью для получения одноцепочечных кольцевых молекул. Денатурированную ДНК отжигают с тремя разными олигонуклеотидами. Один из них предназначен для внесения изменений в клонированную ДНК-мишень, второй – для устранения мутаций в гене устойчивости к ампициллину, третий – для замены одного нуклеотида в гене устойчивости к тетрациклину с целью его инактивации. В реакционную смесь добавляют четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата и ДНК-полимеразу Т4 (фермент функционирует подобно фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*). Гибридовавшиеся олигонуклеотиды служат затравками для синтеза ДНК, а интактная кольцевая молекула ДНК – матрицей. Одноцепочечные разрывы в новосинтезированной цепи зашиваются с помощью ДНК-лигазы Т4. По окончании синтеза трансформируют клетки *E. coli*. Трансформантов отбирают по признаку устойчивости к ампициллину и чувствительности к тетрациклину. Примерно 90% из них

содержат специфическую мутацию в клонированном гене. Клетки, несущие мутантный клонированный ген, идентифицируют с помощью гибридизации.

– Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации является более простым и быстрым методом получения больших количеств мутантных генов.

– Случайный мутагенез с использованием «вырожденных» (содержащих разные нуклеотиды в одном из сайтов) олигонуклеотидных праймеров используют, когда неизвестно, какую нуклеотидную замену в клонированном гене необходимо произвести, чтобы получить белок с заданными свойствами.

– Случайный мутагенез с использованием аналогов нуклеотидов, которые встраивают в плазмиду и ими трансформируют клетки *E. coli*. Плазмиды реплицируются, и в клонированный ген включается нуклеотид, отличный от такового в исходном гене. Случайный мутагенез является предпочтительным по сравнению с олигонуклеотид-направленным, поскольку обычно заранее не известно, какую именно аминокислоту (или аминокислоты) следует заменить для получения белка с заданными свойствами.

Генная инженерия белка

В различных технологических процессах широкое распространение получили ферменты. Приведем некоторые из них (табл. 5).

Таблица 5

Технологические процессы, в которых используются ферменты (Б. Глик, Дж. Пастернак, 2002)

Фермент	Применение
А-Амилаза	Пивоварение, производство этанола
Аминоацилаза	Получение L-аминокислот
Бромелаин	Размягчение мяса, осветление соков
Каталаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Целлюлаза	Получение спирта и глюкозы
Фицин	Размягчение мяса, осветление соков
Глюкоамилаза	Пивоварение, производство этанола
Глюкозоизомераза	Производство сиропов с высоким содержанием фруктозы
Глюкозооксидаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Инвертаза	Инверсия сахарозы
Лактаза	Утилизация сыворотки, гидролиз лактозы
Липаза	Сыроварение, получение ароматизаторов
Папаин	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производство спирта
Протеиназы	Производство спирта

Производственные технологические процессы предъявляют к ферментам особые требования, отличные от организма. Поэтому производство технологичных белков-ферментов с заданными свойствами перспективно с помощью направленного мутагенеза и клонирования генов-мишеней.

Рассмотрим некоторые подходы к управляемой модификации свойств белков:

– повышение термостабильности белковой молекулы за счет введения дополнительных дисульфидных связей делает ее более технологичной (длительность использования, устойчивость к действию органических растворителей, экстремальных значений pH и др.). Рассмотрим эффективность получения термостабильной мутантной ксиланазы *Bacillus circulans* – фермента, который можно использовать при производстве бумаги. Одним из этапов этого процесса является удаление гемицеллюлозы из пульпы с целью ее отбеливания, при этом образуются большие количества токсических отходов. Обработка древесной массы ксиланазой позволяет использовать меньше отбеливающих химикатов. К сожалению, перед добавлением фермента пульпу обрабатывают горячей щелочью. Поэтому ксиланаза должна оставаться активной при относительно высоких температурах. Для модификации белка-фермента был вначале использован метод компьютерного моделирования пространственной структуры ксиланазы. В результате были получены восемь производных ксиланазы. Все они обладали более высокой термостабильностью, чем нативный фермент; три сохраняли активность при 60°C. Одно из производных ксиланазы, содержащее дисульфидную связь между концевыми аминокислотами, оказалось в два раза более активным и сохраняло свыше 85% активности после 120-минутного прогревания при 60°C.

– Замена аспарагина на другие аминокислоты. Известно, что при высоких температурах остатки аспарагина и глутамина могут дезамидироваться, в результате чего конформация полипептидной цепи изменяется. Это является причиной изменения функциональной активности белка. Рассмотрим роль этих остатков на примере триозофосфатизомеразы *Saccharomyces cerevisiae*. Этот фермент состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит два остатка аспарагина. При помощи олигонуклеотид-направленного мутагенеза были заменены остатки аспарагина в положениях 14 и 78. Замена одного из них на остаток треонина или изолейцина приводила к повышению термостабильности фермента, на аспарагиновую кислоту – к понижению. Фермент, получающийся при замене обоих остатков оказался нестабильным при нормальной температуре. Кроме того, была выявлена положительная корреляционная зависимость между термостабильностью полученных форм фермента и его устойчивостью к протеолизу. Следовательно, одним из путей к повышению термостабильности ферментов, используемых в промышленных технологиях, является замена

некоторых остатков аспарагина на другие остатки аминокислот.

– Уменьшение числа свободных сульфгидрильных групп. При синтезе в клетках *E. coli* человеческого β -интерферона установлено, что белковый продукт обладал в 10 раз более низкой противовирусной активностью из-за возможности образования димеров. Оказалось, что остатки цистеина в 17 положении молекулы участвуют в образовании дисульфидных связей, что ведет к образованию олигомерных форм с низкой противовирусной активностью. После замены цистеина в 17 положении на серин был получен рекомбинантный интерферон сер-17-интерферон- β , не отличимый по активности от естественного. Этот интерферон был более стабильным при хранении, чем природный. Таким образом, с помощью направленного мутагенеза можно повышать стабильность ферментов.

– Повышение ферментативной активности возможно осуществлять также с помощью направленного мутагенеза. Для этого необходимо иметь представление о третичной структуре области активного центра фермента. С помощью компьютерного моделирования подбирается вариант замен аминокислотных остатков, который может дать повышение активности фермента. Затем вносятся изменения в клонированный ген и получают фермент – продукт его функционирования с заданным повышением активности. Реальные исследования были проведены с использованием тирозил-тРНК-синтетазой.

– Изменение потребности ферментов в кофакторах-металлах. Промышленное использование металлозависимых ферментов ограничено применением различных, необходимых по технологии, хелатирующих агентов (агентов, связывающих металлы). Так, сериновые протеиназы субтилизины требуют присутствия кальция и служат как биodeградируемые детергенты. Однако, используемые в технологическом процессе хелатирующие вещества быстро инактивируют субтилизины. Для решения этой проблемы методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза был создан мутантный ген, в котором отсутствовал участок, кодирующий кальцийсвязывающий домен белка-субтилизина. Мутантный субтилизин обладал той же ферментативной активностью и не боялся хелатирующих агентов, т.е. оказался более устойчивым, чем естественный фермент.

– Изменение специфичности фермента с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Это направление генной инженерии нашло наиболее эффективное применение в создании ферментов, обладающих специфичной рестриктазной активностью.

– Повышение стабильности и специфичности фермента. Фермент активатор тканевого плазминогена (tPA) используется в клинике для растворения тромбов. Однако он быстро выводится из кровеносного русла. Для клиники необходимо создать фермент, обладающий тремя эффектами: 1) долговременное пребывание в кровеносном русле; 2) высокое сродство к фибрину в тромбах; 3) не вызывать кровотечения. Белок с такими свой-

ствами был создан путем внесения специфических мутаций в ген естественного tPA. При экспрессии этого мутантного гена был получен фермент, сохраняющийся в крови в 10 раз дольше, с повышенным сродством к фибрину и сохраненной фибринолитической активностью.

Таким образом, *технологии генной инженерии позволяют придавать новые свойства существующим белкам и создавать новые белки-ферменты с уникальными свойствами.* Многие из таких разработок еще не вышли из стадии экспериментальных разработок, дороги и требуют специального оборудования и высоко профессионального персонала. Однако, бурное развитие молекулярной биотехнологии делает эти подходы реальными для воплощения в практическую деятельность промышленности, медицины, ветеринарии и фармации в ближайшие годы.

Экспрессия генов, клонированных в прокариотических и эукариотических клетках

Под экспрессией гена подразумевают синтез полипептидной цепи по его программе. В связи с этим следует вспомнить основные этапы синтеза белка и выделить механизмы, необходимые для реализации технологии рекомбинантных ДНК.

Основные этапы синтеза экспортируемого из клетки белка

1. В ядре по программе расплетенной цепи ДНК синтезируется пре-иРНК, которая после сплайсинга превращается в иРНК (транскрипция).

2. Информационная, или иРНК выходит в цитозоль, на ней собираются рибосомы (полисома), которые синтезируют полипептидную цепь (трансляция).

3. Синтез полипептидной цепи начинается с сигнальной последовательности аминокислот (содержит много гидрофобных аминокислот), с помощью которой полипептидная цепь проникает в просвет шероховатого эндоплазматического ретикулума.

4. В просвете эндоплазматического ретикулума от полипептидной цепи отщепляется сигнальная последовательность, образуются дисульфидные связи, осуществляется N-гликозилирование, формируется нативная третичная структура с помощью шаперонов.

5. В аппарате Гольджи осуществляется фосфорилирование белка, образуются специальные олигосахаридные структуры в гликопротеинах и происходят другие химические модификации белковой молекулы.

6. Секретируемые белки перемещаются в секреторных пузырьках (везикулах) и посредством экзоцитоза выделяются из клетки в окружающую среду. В процессе такого везикулярного транспорта часто отделяется пептид, например, из проинсулина отщепляется С-пептид и формируется молекула активного инсулина.

Для технологий рекомбинантных ДНК важно, что клетки прокариот могут синтезировать только простые белки и секретировать их в культу-

ральную среду. Для синтеза сложных модифицированных белков требуется аппарат Гольджи, который присутствует в клетках эукариот.

Теперь рассмотрим особенности стадий синтеза белка, важные для технологий рекомбинантных ДНК:

1. Считывание информации с расплетенной цепи ДНК, содержащей только ген, невозможно. Для считывания требуется участок ДНК, называемый транскриптоном и содержащий промотор, ген-оператор (акцепторная зона), структурные гены, терминатор. Промотор – участок ДНК, к которому избирательно присоединяется ДНК-зависимая РНК-полимераза. В области гена-оператора фиксируется репрессор белковой природы, который регулирует ход транскрипции. В эукариотических клетках в подобной зоне находят энхансерные (усилительные) и сайленсерные (ослабляющие) зоны регуляции транскрипции. Структурные гены содержат не только информацию о последовательности аминокислот в синтезируемом полипептиде, но и о сигнальной последовательности, теряемой при созревании белка. В области терминатора находятся последовательности нуклеотидов, прекращающие работу РНК-полимеразы.

Следовательно, к клонируемому гену необходимо добавить нуклеотидные последовательности ДНК, несущие функции промотора, гена-оператора, структуру сигнальной последовательности аминокислот, терминатор. Иными словами, клонируемый вектор должен обеспечить все вышеперечисленные функции.

2. Этап трансляции должен быть обеспечен достаточным количеством аминоацил-тРНК и энергией (ГТФ, АТФ). Это требует *особого кислородного режима культивирования клеток-продуцентов рекомбинантных белков*. На этом этапе важно строить рибосому точно на иницирующем кодоне мРНК.

3. Этап посттрансляционной модификации белка связан с функционированием сигналов для сортировки белков. Сигнальные пептиды – это короткие участки, расположенные на N- и C-концах, реже – в центральной части полипептидной цепи. Эти фрагменты имеют характерные физико-химические свойства (гидрофобность, положительный или отрицательный заряд). Они нужны для транспорта белка в место функционирования. Для осуществления функции белка необходимо удалить сигнальные последовательности. Поэтому *в структуру клонируемого гена необходимо вводить информацию о синтезе специальных протеиназ.*

Повышение эффективности технологии рекомбинантных ДНК

Повышение эффективности технологии рекомбинантных ДНК является актуальной проблемой, поскольку конечные целевые продукты должны иметь стоимость, адекватную возможностям потребителя. По Т.А. Егоровой и соавт. (2003), эффективность функционирования бактериальных генов неодинакова, что обуславливает вариабельность concentra-

ции отдельных белков в зависимости от их функций. Такие вариации белков, например у *E. coli*, определяются системой контроля генной экспрессии, осуществляемой в основном на уровне транскрипции ДНК, и зависят от количества синтезируемой на данном гене иРНК и активности фермента РНК-полимеразы. Порядок в чередовании нуклеотидных последовательностей в промоторном участке структурного гена определяет степень активности РНК-полимеразы и инициацию процесса транскрипции. Бактериальные гены, включенные в геном, как правило, экспрессируются достаточно легко, давая иРНК и белок в силу того, что в сигнальных последовательностях, управляющих процессами транскрипции и трансляции у различных прокариотических организмов, много общих черт. Что касается экспрессии генов эукариот в бактериях, то она происходит крайне редко, если не создавать специальные условия, поскольку регуляторные участки эукариот отличны от бактериальных. Регуляторные (сигнальные) участки не узнаются бактериальными РНК-полимеразами, что приводит к замедлению транскрипции. При клонировании геномной ДНК эукариотической клетки экспрессия генов не происходит из-за отсутствия у бактерий системы сплайсинга. Следовательно, для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот необходимо, чтобы данные гены находились под контролем прокариотических регуляторных элементов. В связи с этим для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК (или синтетическая ДНК), содержащая кодирующую последовательность, в составе векторной молекулы (например, плазмиды) присоединяется к регуляторным элементам бактерии-промотора, оператору и рибосом-связывающему участку. Таким образом, в сконструированных промежуточных рекомбинантных ДНК эукариотический ген будет находиться под контролем бактериальных регуляторных элементов.

Оптимизируются следующие свойства систем экспрессии генов:

- тип промотора и терминатора транскрипции;
- прочность связывания иРНК с рибосомой;
- число копий клонированного гена и его локализация (в плазмиде или в хромосоме клетки-хозяина);
- конечная локализация синтезируемого продукта;
- эффективность трансляции в организме хозяина;
- стабильность продукта в клетке-хозяина.

Чтобы получить целевой белковый продукт, необходимо обеспечить правильную транскрипцию кодирующего его гена и трансляцию соответствующей иРНК. Для инициации транскрипции в нужном сайте необходим промотор, а для ее остановки – терминирующий кодон.

Экспрессия генов при участии сильных регулируемых промоторов

Для экспрессии структурного гена необходимо наличие перед ним промотора. Это одноцепочечный участок ДНК, имеющий высокое сред-

ство к ДНК-зависимой РНК-полимеразе. Через промоторную зону полинуклеотидной цепи ДНК осуществляется контроль транскрипции. Для экспрессии клонированных генов широко используется промотор хорошо изученного *lac* (лактозного)-оперона *E. coli*. Теоретически промотор и клонируемый ген лучше всего встроить в плазмиду, а последнюю ввести в клетку-хозяина. Практически оказалось, что достигнутая в таком случае постоянная экспрессия гена ведет к скорой гибели клетки-хозяина из-за истощения энергетических и пластических ресурсов. Поэтому экспрессию клонированного гена следует контролировать и осуществлять в определенную фазу клеточного цикла. Плазмиды, сконструированные для этих целей, называются экспрессирующими векторами. Регуляция промотора достигается дополнительным введением гена-регулятора или белков-репрессоров. Вся схема регуляции основана на схеме Жакоба и Ману регуляции *lac* (лактозного)-оперона *E. coli*.

Эффективность синтеза белка зависит от наличия в его иРНК специфических нуклеотидных последовательностей. Чтобы предотвратить разрушение белкового продукта или обеспечить его секрецию, клонированные гены, которые кодируют этот белок, подвергают направленным изменениям:

- это может быть присоединение сайта связывания рибосомы перед сайтом инициации транскрипции;
- присоединение сайта инициации транскрипции;
- присоединение к концу клонированного гена терминирующего кодона, что обеспечивает окончание трансляции (биосинтеза белка);
- обеспечение достаточного для экспрессии клонированного гена количества тРНК (исключение из клонированного гена редко встречающихся в клетке-хозяине триплетов нуклеотидов – кодонов);
- если необходимо, чтобы белок секретировался, то перед клонированным геном необходимо встроить сигнальную последовательность, рамка считывания которой согласуется с таковой гена-мишени.

Повышение стабильности белков, кодируемых клонированными генами

Продукты экспрессии генов – белки часто характеризуются невысокой стабильностью. Для решения этой проблемы существует несколько подходов:

1. Ковалентное присоединение белка-продукта клонированного гена к какому-нибудь стабильному белку клетки-хозяина с образованием «химерного белка». В этом случае синтезированный чужеродный белок окажется защищенным от действия протеиназ клетки-хозяина. Но для практического (например, клинического) применения белка-продукта клонированного гена) необходимо его отделить от химерного белка, т.е. необходима специфичная протеиназа для его отщепления. Все эти три процесса программируются на уровне ДНК: введение клонированного гена, структурного гена белка клетки-хозяина и специфичной протеиназы. Химерные белки нашли свое место в биотехнологических процессах: очистка пепти-

дов (антител), рекомбинантных белков.

2. Обычно время полужизни белков составляет от нескольких минут до нескольких часов. Такая вариабельность обусловлена различиями в количестве дисульфидных связей в белковых молекулах, а также наличием или отсутствием некоторых концевых аминокислот. Например, если к N-концу β -галактозидазы присоединять разные аминокислоты, то время модифицированного *in vitro* белка может варьировать от двух минут до 20 часов. Аминокислоты, увеличивающие время жизни белков, можно включать в белки методами генетической инженерии. Стабильность клонированных белков можно понизить введением пролина (P), глутаминовой кислоты (E), серина (S) и треонина (T). По символам однобуквенного обозначения аминокислот такие последовательности называют PEST-последовательностями. Возможно они и служат маркерами для действия протеиназ.

3. Большинство микроорганизмов, с помощью которых получают белковые продукты, растет только в присутствии кислорода. При уменьшении концентрации кислорода в культуральной среде экспоненциальный рост микроорганизмов замедляется и культура клеток переходит в стационарную фазу, характеризующуюся образованием в клетках протеиназ. Это может привести к разрушению белка-продукта клонируемого гена. Для предупреждения эффектов истощения кислородных запасов используют два подхода:

- применяют штаммы, неспособные синтезировать некоторые протеолитические ферменты (протеиназы);

- включают в геном клеток-хозяев гены, кодирующие гемоглобин *Vitreoscilla sp.*, который связывает кислород окружающей среды и повышает его концентрацию в клетке.

4. С увеличением числа копий клонированного гена увеличивается количество синтезируемого белка-продукта. Однако при переходе к крупномасштабному производству конструкция «плазмида/клонированная ДНК» очень часто утрачивается. Чтобы избежать этого, разработали способы интеграции клонированного гена в хромосому организма-хозяина. В этом случае ген остается в клетке как часть хозяйской ДНК. Последовательность типичных генно-инженерных операций может быть следующей:

- Идентификация подходящего сайта интеграции, т.е. сегмента хозяйской ДНК, последовательность которого может быть прервана без ущерба для функционирования клетки.

- Выделение и клонирование всего хромосомного сайта интеграции или его части.

- Встраивание нужного гена вместе с регулируемым промотором в клонированный сайт интеграции или вблизи него.

- Перенос полученной генетической конструкции «хромосомный сайт интеграции/клонированный ген» в хозяйскую клетку в составе плазмиды, не способной к автономной репликации в клетках этого хозяина.

– Отбор и сохранение тех хозяйских клеток, которые экспрессируют клонированный ген. Наследование клонированного гена возможно только в случае его интеграции в хромосому клеток хозяина.

5. Стабильность белков, кодируемых клонированными генами, зависит от их клеточной локализации. Например, рекомбинантный проинсулин оказывается примерно в 10 раз более стабильным, если он секретируется в периплазму (пространство между плазматической и наружной мембранами), а не остается в цитоплазме. К тому же секретируемые белки легче подвергаются очистке и выделению. Транспорт белков через мембраны обеспечивают «сигнальные последовательности» (чаще гидрофобные олигопептиды на N-конце синтезируемой белковой молекулы). С помощью методов генетической инженерии синтезируемый белок можно сделать секретируемым, если к клонируемому гену присоединить нуклеотидную последовательность, которая кодирует «сигнальную последовательность» аминокислотных остатков.

6. Введение в клетку чужеродной ДНК и ее экспрессия часто приводят к нарушениям клеточного метаболизма по следующим основным причинам:

– Увеличение числа копий и/или размера плазмид и связанное с этим увеличение количества энергии, необходимого для их репликации и сохранения.

– Недостаток растворенного кислорода в среде и невозможность обеспечения им и всех метаболических реакций, и процесса экспрессии плазмидных генов.

– Гиперпродукция чужеродных белков, приводящая к истощению фонда аминокислот-тРНК и/или доноров энергии (АТФ, ГТФ).

– Перегрузка системы экспорта и нарушение правильной локализации жизненно важных белков хозяйской клетки вследствие «перепроизводства» чужеродного белка, экспортируемого из цитоплазмы к клеточной мембране или в периплазматическое пространство.

– Наличие у организма-хозяина необычных метаболических свойств (высокое потребление кислорода), что делает его более чувствительным к различным воздействиям, чем обычные клетки.

– Непосредственное влияние чужеродных белков на функционирование хозяйской клетки, например, путем связывания незаменимых компонентов жизнедеятельности или каталитического образования токсических молекул.

Общим проявлением метаболической перегрузки является снижение скорости роста клеток после введения чужеродной ДНК, активация синтеза внутриклеточных протеиназ, способных расщеплять белковый продукт клонированного гена.

Наиболее важным способом увеличения количества белка, синтезируемого по программе клонированного гена, является поддержание экспрессии этого гена на среднем уровне (доля рекомбинантного белка не должна

превышать 5% от суммарного клеточного белка) и максимальное увеличение плотности культуры (до 40 г/л в пересчете на массу сухого вещества).

Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем

Системы экспрессии клонированных генов у прокариот широко используются для получения многих белков. Однако с их помощью невозможно достичь механизмов посттрансляционной модификации синтезированных белков (гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование). Для этих целей используют эукариотические экспрессирующие векторы. Для синтеза клонированных белков широко применяются дрожжи *S. cerevisiae*. Однако, при их использовании достигается невысокий уровень экспрессии клонированных генов. Существенный интерес представляют экспрессирующие векторы на основе бакуловирусов, в частности бакуловируса AcMNPV, инфицирующего клетки многих насекомых. Исходная стратегия предполагала трансфекцию клеток насекомого, зараженных бакуловирусом, транспортным вектором, который содержал клонированный ген. В результате клетки насекомого, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом, синтезировали рекомбинантный белок. Примерно 95% рекомбинантных белков, синтезированных в системах экспрессии клонированных генов на основе бакуловирусов, имели соответствующие посттрансляционные модификации. Разработаны системы экспрессии млекопитающих, позволяющие получать белки, состоящие из двух разных субъединиц. Для этого хозяйские клетки трансфицировали сразу двумя векторами, каждый из которых нес ген одной из субъединиц. Возможно использование одного вектора, который несет эти два гена в виде отдельных единиц транскрипции или в виде одного транскриптона, содержащего оба этих гена.

Таким образом, методами генной инженерии возможно получение рекомбинантных белков без модификации с помощью систем экспрессии генов прокариот. Получение модифицированных белков (с проявлением благодаря этому физиологических функций), а также синтез олигомерных белков (белки с четвертичной структурой) требует систем экспрессии генов эукариот.

Молекулярная биотехнология микробиологических систем и питание

За последние десятилетия постоянно увеличивается удельный вес пищевых продуктов и пищевых добавок, полученных методами молекулярной биотехнологии. Для производства таких продуктов питания используют микробиологические системы, трансгенные растения и животные.

Белок одноклеточных организмов (БОО) – это белковые продукты, синтезированные монокультурой микробных клеток и используемые в качестве пищевых добавок или корма для скота. Это направление молеку-

лярной биотехнологии развивается в связи:

- с истощением традиционных источников белка по мере развития общества;

- высоким относительным содержанием белка в микроорганизмах (60–80% от сухой массы микроорганизмов);

- наличием высокой биологической ценности пищевых добавок из бактериальных клеток (незаменимые аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, витамины, микроэлементы).

Широкое использование БОО сдерживается рядом причин:

- более высокой стоимостью пищевого продукта по сравнению с белками *soy* или другими традиционными белковыми добавками;

- высоким содержанием нуклеиновых кислот в полученном пищевом продукте, что может представлять потенциальную опасность при некоторых патологических состояниях;

- возможным присутствием в полученном пищевом продукте загрязнений, связанных с особенностями роста микроорганизма (соли тяжелых металлов) или токсичных продуктов жизнедеятельности клеток-продуцентов белка (микотоксины);

- особенностями расщепления микробных клеток в пищеварительном тракте, вызывающими нарушения пищеварения или аллергические реакции.

Для получения БОО используют многие микроорганизмы (бактерии, дрожжи, грибы, водоросли, актиномицеты) и различные субстраты. Например, сине-зеленая водоросль спирулина (*Spirulina platensis* и *Spirulina maxima*), растущая в Африке (озеро Чад) и в Мексике (озеро Тескоко), культивируется в лабораторных и промышленных условиях и служит для получения пищевого белка, который приравнивается к лучшим стандартам. При культивировании получают до 20 г биомассы с 1 м³ в сутки; эта биомасса содержит, помимо биологически ценного белка, комплекс витаминов А, С, D и достаточно полный набор витаминов группы В. Некоторые исследователи находят субстанцию, аналогичную витамину В₁₂. В настоящее время освоены и внедрены технологии выращивания богатой белками биомассы хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на простых синтетических средах (например, на этиловом спирте микробного или химического происхождения; разработаны способы выделения из дрожжевой биомассы очищенных белковых концентратов. При выращивании хлебопекарных дрожжей на синтетической этанольной среде в лабораторном ферментере при непрерывном режиме с добавкой 0,5% дрожжевого экстракта достигнута концентрация биомассы 8–9 г/л при выходе 70–75% от использованного субстрата.

В последнее время интерес к БОО обострился в связи с утилизацией различных отходов, например, целлюлозы, продуктов перегонки нефти или сыворотки. Предполагается использовать как природные микроорганизмы, так и созданные методами генной инженерии микроорганизмы.

Разработан новый подход, с помощью которого можно будет обеспечивать крупный рогатый скот белком, обогащенным незаменимыми аминокислотами. Простое добавление белков в корм – дорогостоящий и неэффективный способ, поскольку белки и аминокислоты разрушаются бактериями рубца еще до того, как животное успеет его использовать. Кроме того, основное количество белка они получают не с кормом; его поставляют присутствующие в рубце микроорганизмы. Эти микроорганизмы были модифицированы:

1) был синтезирован белок из 100 аминокислотных остатков, обогащенный незаменимыми аминокислотами (57%) – метионином, треонином, лизином и лейцином;

2) синтезировали ген этого белка и сшили его с геном белка, связывающего мальтозу;

3) синтезированный ген экспрессировали в *E. coli*, на долю гибридного белка приходилось до 12% от суммарного клеточного белка;

4) синтезированный ген следует экспрессировать в бактериях рубца, что позволит организм животного обеспечить белком с незаменимыми аминокислотами.

Вследствие дороговизны получаемых продуктов, их плохих вкусовых качеств и токсичности производство БОО оказалось экономически нецелесообразным. Ожидаемый прогресс в этой области пищевой промышленности связывают с методами генной инженерии.

Утилизация крахмала и сахаров. Крахмал, основной резервный полисахарид растений, представляет собой смесь гомополимеров D-глюкозы – как линейных (амилоза), так и разветвленных (амилопектин). Крахмал широко используется в пищевой промышленности и пивоварении. Его сначала гидролизуют до низкомолекулярных компонентов, а затем превращают во фруктозу или этанол. Для ферментативного гидролиза крахмала необходимы α -амилаза, глюкоамилаза и глюкоизомераза (это наиболее часто употребляемые в пищевой промышленности ферменты, на их долю приходится до 30% стоимости от всех используемых ферментов).

Основные этапы производства фруктозы и этанола из крахмала:

– желирование молотого зерна путем его обработки паром под давлением (разрушение крахмальных зерен и доступность крахмала для гидролизующего фермента); продукт имеет желеобразную консистенцию.

– Ожижение путем охлаждения желированного крахмала до 50–60°C и добавления α -амилазы. При такой температуре усиливается проникновение фермента в желированный крахмал и увеличивается скорость гидролиза до низкомолекулярных полисахаридов.

– Осахаривание (полный гидролиз) низкомолекулярных полисахаридов до глюкозы (фермент глюкоамилаза).

– Получение фруктозы с помощью глюкоизомеразы.

- Получение этанола с помощью дрожжевой ферментации.
- Развитие этих технологий требует:
 - использования для получения необходимых ферментов быстрорастущих рекомбинантных микроорганизмов.
 - Получения методами генной инженерии более термостабильного и активного фермента α -амилазы, что необходимо для ускорения гидролиза желированного крахмала.
 - Модификации генов α -амилазы и глюкоамилазы для получения ферментов с одинаковыми оптимумами pH и температуры.
 - Создания гена для синтеза фермента, способного гидролизовать необработанный крахмал, исключив этап желирования.
 - Создания такого микроорганизма для ферментации, который будет синтезировать глюкоамилазу в процессе гидролиза крахмала.

К настоящему времени получены следующие обнадеживающие результаты по изменению свойств ферментов методами генной инженерии с целью их приспособления для технологических промышленных установок получения фруктозы и этанола:

- получены гены α -амилазы из различных источников, в том числе из термофильной бактерии *B. Stearotherophilus*, что позволило получать рекомбинантные образцы фермента с заданными свойствами, необходимыми для определенного технологического процесса (например, повышение оптимума температуры);
- для получения глюкоамилазы использован штамм пивных дрожжей *S. cerevisiae* с встроенным в хромосому геном глюкоамилазы и устойчивый к высокой концентрации этанола;
- фермент глюкоизомеразы (ксилозо/глюкоизомеразы) получен путем экспрессии этого гена из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* в *E. coli* и *B. brevis*, в результате чего в 1000 раз повышается производство ферментативного белка, а сам фермент сохраняет свою стабильность при 95°C;
- с помощью сайт-специфического мутагенеза осуществлена замена двух аминокислот в активном центре глюкоизомеразы из термофильной бактерии *Clostridium thermosulfurogenes*, что повысило специфичность и каталитическую эффективность фермента (до 17 раз).

Для сбраживания крахмала при промышленном производстве этанола используют дрожжи *S. cerevisiae*. В тропических странах для тех же целей применяют бактерию *Zygomonas mobilis* (табл. 6).

Таблица 6

Сравнение продуцентов этанола (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002)

Показатель	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Превращение сахара в этанол, %	96	96
Максимальная концентрация этанола, %	12	12

Скорость продукции этанола, $\text{г} \times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$	5,67	0,67
Объемная скорость продукции этанола, $\text{г} \times \text{л}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$	200	29
Допустимая концентрация сахара, %	> 40	> 40
Диапазон pH	3,5–7,5	2–6,5
Оптимальная температура, °C	25–30	30–38

Как видно из таблицы, *Zyomonas mobilis* обеспечивает более высокую скорость образования этанола, но число углеродных субстратов ограничено. В связи с этим в *Zyomonas mobilis* были введены гены ферментов, способных гидролизовать лактозу, крахмал, целлюлозу, ксилозу и целлобиозу. Перспективными для промышленного производства этанола оказались бактерии, в которые ввели гены глюкозо/ксилозоизомеразы и ксилулокиназы, а затем гены транскетотазы и трансальдозазы. В итоге трансформированные клетки утилизировали ксилозу и преобразовывали пентозы до фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата, которые затем превращаются в этанол. Таким образом, с помощью методов генной инженерии создан микроорганизм – продуцент этанола, который может использовать в качестве источника углерода ксилозу, побочный продукт деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

Изменение пищевой ценности растений. Селекционная работа по улучшению свойств сельскохозяйственных растений является трудоемким и продолжительным процессом. Генно-инженерные методы позволяют намного быстрее получить растения с заданными свойствами (за 2–3 года), а также создать растения со свойствами, не встречающимися в естественных условиях. В последние годы получены кукуруза и горох с улучшенными пищевыми качествами за счет изменения аминокислотного состава запасных белков семян. Когда кукуруза используется в качестве корма для скота, к ней добавляют соевую муку и аминокислоту лизин. В настоящее время дорогостоящий лизин может быть заменен на дешевую соевую муку, полученную из генетически модифицированных растений сои, которые синтезируют в больших количествах лизин. Созданы сорта масляничных культур с желательным жирно-кислотным составом плодов (изменение длины цепи и количества двойных связей). Широкое распространение получили продукты из генетически модифицированной сои.

Изменение цвета овощей и фруктов начинается с окисления монофенолов и о-дифенолов до о-хинонов. Катализатором процесса служат ферменты полифенолоксидазы, которые локализуются в мембранах хлоропластов и митохондрий. Использование сульфитов для сохранения внешнего вида растений не является безопасной технологией. Недавно были созданы генетически модифицированные растения, устойчивые к черной пятнистости за счет изменения гена полифенолоксидазы.

Улучшение вкусовых качеств фруктов и овощей достигается на этапе приготовления пищи. Придание исходным продуктам необходимого

вкуса является актуальной проблемой для молекулярной биотехнологии пищи. Известно, что в плоде африканского растения *Dioscorephyllum cumminsii* Diels содержится белок монеллин, примерно в 100000 раз более сладкий, чем сахароза в эквимолярных количествах. Этот белок не оказывает вредного воздействия на метаболизм. Монеллин – это двухцепочечный димер, а цепи А (45 аминокислотных остатков) и В (50 аминокислотных остатков) связаны слабыми нековалентными связями. Поэтому этот белок не может быть подсластителем, так как в процессе приготовления пищи (температура, кислоты) димер распадается с утратой вкусовых качеств. В настоящее время синтезирован ген монеллина и получены растения (томаты, салат, цветная капуста и др.), в которые введен данный ген и осуществлена его экспрессия, т.е. синтез монеллина.

Генетически модифицированные животные и питание. Существенные результаты были получены путем изменения содержания в молоке различных компонентов. Так, количество сыра, получаемого из молока, тесно коррелирует с содержанием в нем капа-казеина. Увеличение биосинтеза этого белка молока достигается с помощью гиперэкспрессии его гена. Если обеспечить экспрессию гена лактазы в клетках молочной железы, то можно получить молоко, не содержащее лактозы. Такое молоко незаменимо в питании людей с дефицитом лактазы (непереносимость молока). Молочные железы животных могут использоваться как биореакторы для получения продуктов клонированных генов и секретируемых в молоко. Возможно повышение яйценоскости кур с измененной прочностью скорлупы путем генетической трансформации. Разведение рыб в искусственных условиях потребовало их генетической трансформации. Рекомбинантные рыбы приспособлены к условиям искусственного содержания и быстрее (до 10 раз) растут.

Таким образом, технологии рекомбинантных ДНК позволят изменить качество продуктов питания, полученных с помощью генетически модифицированных одноклеточных организмов, а также растений и животных.

Генетическая инженерия микробиологических систем и производство коммерческих продуктов

Технологии рекомбинантных ДНК наиболее успешно используются для направленной модификации микробиологических систем, используемых для получения «коммерческих» продуктов. Такие микробиологические системы производят белковые препараты, различные низкомолекулярные биорегуляторы и биополимеры.

Иммунологические и ДНК-диагностические тесты в диагностике заболеваний. Для своевременной диагностики и эффективной профилактики заболеваний человека и животных необходимо определить этиологический фактор (причину) – вирусы, бактерии, грибы, паразитические мик-

роорганизмы, белки и низкомолекулярные соединения.

Для этого используют различные типы исследования (табл. 7).

Таблица 7

Характеристика различных методов диагностики инфекционных заболеваний (по Б. Глику, Дж. Пастернаку, 2002)

Метод	Преимущества	Недостатки
Микроскопическое исследование	Простота, прямое определение патологических микроорганизмов, возможность разграничения микроорганизмов по морфологическим признакам	Трудоемкость, длительность, низкая чувствительность, трудность разграничения близких микроорганизмов
Культивирование <i>in vitro</i> и иммунизация мышей	Обнаружение жизнеспособных и вирулентных микроорганизмов	Длительность, высокая стоимость анализа, разные ответы у разных пород животных, утрата жизнеспособности в организме животного
Определение антигена в сыворотке	Простота, непродолжительность анализа, возможность автоматизации, тестирование большого количества образцов	Не всегда специфичен, трудность в разграничении острой и латентной фаз заболевания
Гибридизация и ПЦР	Быстрота, высокая чувствительность и специфичность, прямое определение патологических микроорганизмов, возможность разграничения разных видов, независимость результатов от предыдущих инфекций, не требуют жизнеспособности паразитов, возможность автоматизации	Высокая стоимость и многоэтапность анализа, невозможность различить живые и мертвые микроорганизмы, возможность ложноположительных и ложноотрицательных результатов

Эффективный диагностический тест должен быть:

- высокоспецифичным в отношении молекулы-мишени;
- чувствительным для выявления небольших количеств мишени;
- простым, но обеспечивающим получение однозначных и воспроизводимых результатов.

В настоящее время выделяют две основные группы методов молекулярной диагностики:

- 1) основана на сродстве антитела к конкретному антигену (ELISA);
- 2) основана на идентификации специфических нуклеотидных последовательностей с помощью гибридизации или ПЦР.

ELISA включает следующие основные этапы:

1. Образец, в котором хотят обнаружить специфическую молекулу или микроорганизм, фиксируют на твердой подложке, чаще используют пластиковые 96-луночные плашки.

2. К фиксированному образцу добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело), затем промывают лунку, чтобы

удалить несвязавшиеся молекулы первого антитела.

3. В лунку добавляют второе антитело, которое специфически связывается с первым антителом и не взаимодействует с маркерной молекулой. К этому антителу присоединен фермент, катализирующий превращение неокрашенного субстрата в окрашенный продукт (чаще, щелочная фосфатаза, пероксидаза или уреазы). Промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы конъюгата второе антитело-фермент.

4. Добавляют в лунку неокрашенный субстрат.

5. Проводят количественное (качественное) определение окрашенного продукта.

Основной принцип ELISA – специфическое связывание первого антитела с мишенью (белок, клетка). Применение моноклональных антител позволило существенно повысить специфичность метода ELISA, поскольку они связываются с одним, строго определенным антигенным сайтом. Напомним, что антитела продуцируют В-клетки (В-лимфоциты). Каждая клетка системы иммунитета вырабатывает одно антитело, которое распознает отдельный участок (эпитоп, антигенную детерминанту) молекулы антигена. Поскольку в молекуле антигена присутствует несколько разных эпитопов, антитела против каждого из них вырабатываются отдельными клетками системы иммунитета. Такие антитела, каждое из которых взаимодействует с данным антигеном, называют поликлональными. Они вариabельны по количеству, в связи с чем не нашли применения в методе ELISA. Известно, что В-клетки не воспроизводятся в культуре. Но после слияния с миеломными клетками удалось получить гибридомы и выделить растущие и делящиеся в культуре клоны клеток, которые продуцируют высокоспецифичные моноклональные антитела. Их и используют в методе ELISA.

Если первое антитело не связывается с мишенью, то оно удаляется при первом промывании. Поскольку при этом конъюгату второе антитело-фермент не с чем связываться, он удаляется при втором промывании, и образец остается неокрашенным. Если связывание с мишенью происходит, то второе антитело присоединяется к первому, и конъюгированный фермент катализирует образование легко регистрируемого окрашенного продукта.

Моноклональные антитела широко применяются в настоящее время при определении полипептидных гормонов, маркеров опухолей, цитокинов, лекарственных препаратов, различных низкомолекулярных биорегуляторов, возбудителей инфекционных заболеваний.

Системы ДНК-диагностики основаны на гибридизации нуклеиновых кислот – спаривание двух комплементарных сегментов разных молекул ДНК. Известно, что информация о фенотипе организма заключена в его генетическом материале. Так, патогенность бактерий определяется на-

личием у них специфического гена или набора генов, а наследственное генетическое заболевание возникает в результате повреждения определенного гена. Сегмент ДНК, детерминирующий данный биологический признак, имеет строго определенную нуклеотидную последовательность и может служить диагностическим маркером.

Ход анализа:

1. Фиксация одноцепочечной ДНК-мишени на мембранном фильтре.
2. Нанесение меченой одноцепочечной ДНК-зонда, которая при определенных условиях (температуре и ионной силе) спаривается с ДНК-мишенью.
3. Промывание фильтра для удаления избытка несвязавшейся меченой ДНК-зонда (РНК-зонда). Специфичность реакции зависит от качества зонда.
4. Детекция гибридных молекул зонд/мишень. ДНК-диагностика основывается на обнаружении известных нуклеотидных последовательностей; для этого синтезируют специфические праймеры и амплифицируют последовательность-мишень. Это позволяет использовать нерадиоактивные системы детекции (например, хемилюминесцентный метод) или регистрировать ПЦР-продукты методом гель-электрофореза. ПЦР-продукты помечают также флюоресцентным красителем.

Методы гибридизации нуклеиновых кислот используются при анализе исходного материала (например, выявление определенного микроорганизма) без специального выделения их: проводят гибридизацию с ДНК-мишенями, присутствующими в образцах кала, мочи, крови, смывах из зева, в тканях и объектах окружающей среды. Если концентрация последовательности мишени в исследуемом образце слишком мала, ее можно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Метод геномной дактилоскопии (ДНК-типирование) часто используется в судебной медицине для идентификации биологических образцов (кровь, сперма, кусочек кожи, волосы). В образцах оценивают содержание ДНК и подвергают ее расщеплению с помощью эндонуклеаз, полученные фрагменты ДНК разделяют методом агарозного электрофореза и выделенные фрагменты переносят на нейлоновые фильтры. Проводят последовательную гибридизацию с четырьмя или пятью радиоактивно мечеными зондами, каждый из которых распознает определенную последовательность ДНК (как правило, минисателлитные ДНК, не кодирующие белки, многократно встречающиеся в геноме человека и состоящие из tandemно повторяющихся участков). Ребенок наследует одну минисателлитную последовательность от одного родителя, а другую – от второго. Гибридованные фрагменты визуализируют радиоавтографически. «ДНК-отпечаток» данного индивида представляет собой набор различающихся по длине фрагмен-

тов, соответствующих минисателлитным последовательностям его генома. Такой отпечаток характерен для каждого человека, как, например, отпечаток пальцев. Метод применяют для установления отцовства. Если в образце мало ДНК и она не очень сильно разрушена, можно амплифицировать небольшие участки минисателлитной ДНК с помощью ПЦР и провести анализ. Метод геномной дактилоскопии длительный – недели, месяцы.

Диагностика специфических наследственных заболеваний человека на генетическом уровне дает ответ на вопрос, входят ли обследуемые индивидуумы или их потомки в группу повышенного генетического риска. ДНК-анализ можно использовать для выявления носителей генов наследственных заболеваний, а также для пренатальной (дородовой) и пресимптоматической (на этапе, когда нет проявлений) диагностики серьезных генетических нарушений, выявлять специфические мутации. ДНК-тесты не требуют экспрессии мутантного гена (т.е. биохимического анализа его продукта-белка) для его выявления. Поэтому интенсивно разрабатываются системы скрининга для всех моногенных заболеваний с использованием ДНК-тестов.

Метод «ДНК-отпечатков» используется для установления различий между растительными культурами. Для характеристики ДНК растений используют набор произвольных олигонуклеотидных праймеров, проводят ПЦР-амплификацию случайных фрагментов ДНК, осуществляют электрофорез и получают специфичный для каждого растения набор полос ДНК (метод RAPD – random amplified polymorphic DNA).

Перечисленные выше и другие методы молекулярной диагностики постоянно развиваются. В 1994 году объем мирового рынка ДНК-диагностических тестов был равен 80 млн. долларов США, а спустя десять лет составит 2 млрд. долларов США.

Микробиологическое производство лекарственных средств. Белковые лекарственные препараты ранее получались в небольших количествах из крови и тканей человека или животных. В настоящее время клонировано более 400 генов различных белков человека (внедренных и потенциальных лекарственных средств). Эти гены вводят в бактерии и экспрессируют. Белковые продукты экспрессии выделяют, очищают и переводят в маркетинговый вид (табл. 8).

Таблица 8

Некоторые белки, полученные технологией рекомбинантных ДНК и используемые в медицине и фармации (по Б. Глику, Дж. Пастернаку, 2002)

Рекомбинантный белок	Применение
Кортикотропин (АКТГ)	Ревматизм (лечение)
Альфа-1-антитрипсин	Эмфизема легких (диагностика)
Бактерицидный/повышающий проницаемость белок	Инфекции (патогенез)
Гемоглобин	Анемия (диагностика, лечение)

Соматотропин (СТГ)	Задержка роста, работоспособность
Инсулин	Сахарный диабет (лечение)
Инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I, IGF-II)	Диабет, почечная недостаточность, нарушения роста скелета
Интерлейкины	Злокачественные опухоли, иммунные заболевания
Интерфероны	Вирусные заболевания, злокачественные опухоли, рассеянный склероз
Кальцитонин	Остеомаляция (размягчение костей)
Лимфотоксин	Злокачественные опухоли
Релаксин	Роды
Рецептор интерлейкина-I	Астма, ревматоидный артрит
Соматолиберин	Характер роста
Сывороточный альбумин	Отеки при дефиците (лечение)
Тиротропин (ТТГ)	Рак щитовидной железы
Тканевой активатор плазминогена	Тромбообразование
Тромбоцитарный фактор роста	Атеросклероз (патогенез)
Урогастрон	Язвы желудка и кишечника
Урокиназа	Тромбообразование
Фактор некроза опухолей	Злокачественные образования
Фактор роста нервов	Поражения нервной ткани
Фактор роста эпидермиса	Регенерация (заживление тканей)
Фактор VIII, IX	Гемофилия (патогенез)
Факторы роста В-лимфоцитов	Иммунные заболевания
Хорионический гонадотропин	Женское бесплодие
Эндорфины, энкефалины	Боль, эмоции

Развитие технологии рекомбинантных ДНК даст в качестве лекарственных средств:

- ферменты; антитела (иммуноглобулины);
- лекарства, «пришитые» к вариабельному фрагменту моноклональных антител (направленный транспорт в клетку, имеющую иммунную детерминанту, комплементарную антителу);
- токсические вещества, избирательно связывающиеся с ВИЧ-инфицированными клетками и убивающими их и др.

Объем мирового рынка лекарственных средств на основе рекомбинантных белков увеличивается на 12–18% в год и в 2000 году составил около 20 млрд. долларов США.

Вакцины. В настоящее время в мире страдают 2 млрд. людей заболеваниями, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации. В последнее время делаются попытки создать вакцину против белка, переносящего эфиры холестерина в кровеносном русле и играющего важную роль в патогенезе атеросклероза, клинические проявления которого уносят каждую вторую жизнь. Традиционные вакцины содержат инактивированные патогенные микроорганизмы (бактерии или вирусы). Их получение является трудоемким процессом и они не всегда специфичны. Некоторые вакцины дают побочные эффекты. Вакцины, полученные техноло-

гией рекомбинантных ДНК, лишены ряда недостатков, присущих натуральным вакцинам:

- удаляя гены, ответственные за вирулентность (вызывание заболевания), получают эффективные живые вакцины, лишенные осложнений;
- клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного (болезнетворного) микроорганизма, встраивают в непатогенный носитель (чаще вирус) и получают безопасную вакцину;
- гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенных микроорганизмов, встраивают в экспрессирующие векторы, получают нужный продукт в большом количестве и используют как вакцину;
- пептидные вакцины получают с помощью методик химического синтеза пептидов.

Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения низкомолекулярных биорегуляторов. С помощью технологии рекомбинантных ДНК можно получить не только белки, но и низкомолекулярные метаболиты. Для этого следует изменить метаболизм клетки либо путем регуляции активности ключевых ферментов определенного метаболического пути, либо вводя гены/модифицируя существующие гены, продуктами экспрессии которых являются ферменты нового метаболического пути. В настоящее время созданы рекомбинантные микроорганизмы, способные синтезировать L-аскорбиновую кислоту (одно из первых исследований 1985 года), краситель индиго, аминокислоты, антибиотики, мономерные единицы различных биополимеров. Этот подход может превратить бактерии не только в «фабрики» по производству белков с заданными свойствами, но и низкомолекулярных веществ с необычными (не токсичными для данного микроорганизма-производителя) свойствами. Например, весьма востребован *каучук*, получаемый из особых растений. Его биосинтез начинается с превращения простых сахаров и включает 17 ферментативных реакций. В ходе последней из них происходит полимеризация аллилпирофосфатных остатков с образованием цис-1,4-полиизопрена. Для получения рекомбинантных микроорганизмов, производящих каучук, было проведено:

- с помощью иРНК из растения *Hevea brasiliensis*, синтезирующего каучук, была создана библиотека кДНК;
- произведена гибридизация ДНК-зондом, соответствующим по нуклеотидной последовательности гену полимеразы каучука;
- полученный клон кДНК (или несколько клонов, кодирующих несколько ферментов пути синтеза каучука) можно ввести в бактериальные клетки;
- продуктом экспрессии таких рекомбинантных клеток будет биополимер – каучук.

Вариантом использования кДНК, кодирующей ферменты синтеза каучука, может быть ферментативная биосинтетическая технология *in vitro*.

Биодеградация токсических соединений. Примерно 40 лет назад были открыты почвенные микроорганизмы, способные разрушать чужеродные вещества (ксенобиотики). Оказалось, что разные штаммы *Pseudomonas* способны расщеплять более 100 органических соединений. В 1981 году А.М. Чакрабартти получил патент на получение мультиплазмидных микроорганизмов, способных утилизировать несколько соединений. Он взял четыре разные бактерии, каждая из которых имела плазмиду (ДНК), кодирующие определенные ферменты деградации одного вещества, и создал микроорганизм («супербацилла»), содержащий плазмиды, которые обуславливали деградацию четырех веществ: камфары, октана, салицилата и нафталина. Объединяя плазмиды разных штаммов *Pseudomonas* в одном хозяине, можно создать организм, способный деградировать заданный комплекс загрязняющих веществ. С помощью генетических манипуляций можно расширить спектр субстратов, разрушаемых с помощью определенного метаболического пути (модифицируя специфичность ферментов) и подобрать условия ферментативной деградации ксенобиотиков (например, обезвреживание в воде при температуре, близкой к точке замерзания, и др.). Использование технологии рекомбинантных ДНК может сделать процесс обезвреживания токсических веществ во внешней среде более безопасным и дешевым по сравнению с существующими заводами по утилизации отходов.

Бактерии, стимулирующие рост растений. Скорость роста и урожайность растений в естественных условиях зависят от их генотипа, доступности питательных веществ, наличия в почве полезных микроорганизмов и отсутствия патогенных. Создание штаммов микроорганизмов, усиливающих рост растений, включает четыре основных направления:

- оптимизация молекулярных механизмов фиксации азота, чтобы уменьшить количество вносимых удобрений;
- усиление образования корневых клубеньков симбиотическими бактериями;
- обеспечение микробиологического синтеза веществ, хелатирующих железо (siderофоров) с целью подавления роста фитопатогенов;
- микробиологический синтез фитогормонов для усиления роста растений.

В настоящее время в сельском хозяйстве используют бактерии семейств *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*, которые вступают в симбиотические отношения со строго определенными растениями. Молекулярно-генетические исследования показали, что фиксация азота бактериями – это сложный процесс, в котором участвует семь координированно регулируемых оперонов, кодирующих в общей сложности 20 разных белков. Такая сложная система пока не может быть введена в растение, чтобы оно само без помощи азотфиксирующих бактерий утилизировало азот. Вступая в симбиотические отношения с растениями, штаммы *Rhizobium* стимулируют образование на их корнях клубеньков, где и происходит размножение

этих бактерий и фиксация азота. Процесс образования клубеньков требует функционирования продуктов экспрессии множества генов, а также пока не имеет реальных генно-инженерных подходов для оптимизации (конкуренции с менее эффективными дикими штаммами).

Опосредованная стимуляция роста растений с помощью бактерий состоит в защите растений от их повреждения фитопатогенными грибами и бактериями. Такие защитные бактерии синтезируют специфические вещества, стимулирующие рост растений: сидерофоры, антибиотики, ферменты, фитогормоны.

Микробные инсектициды. Известно, что число описанных видов насекомых приближается к 1 млн. Некоторые насекомые являются переносчиками заболеваний человека и животных, а также могут наносить ущерб урожаю сельскохозяйственных культур. Химические инсектициды (хлорорганические – дихлордифенилтрихлорэтан, ДДТ и фосфорорганические – малатион, паратион, диазинон) оказывают вредное влияние на человека, а ДДТ может накапливаться и сохраняться до 20 лет, нанося ущерб живым организмам окружающей среды. Под «микробным инсектицидом» понимают микроорганизм синтезирующий токсическое вещество для подавления жизнедеятельности определенных насекомых или инфицирующий насекомое-мишень и приводящий к его гибели. Микробные инсектициды не оказывают вредного влияния на окружающую среду, но помогают регулировать численность насекомых. Рассмотрим некоторые примеры микробных инсектицидов:

- некоторые подвиды бактерии *Bacillus thuringiensis* образуют протоксин, который в условиях щелочной среды кишечника насекомых и под действием пищеварительных протеиназ превращается в убивающий насекомое активный токсин;

- для расширения видов насекомых-мишеней были созданы рекомбинантные бактерии, несущие гены нескольких токсинов *Bacillus thuringiensis*;

- гены токсинов *Bacillus thuringiensis* вводили в микроорганизмы, обитающие в поверхностном слое воды и служащие пищей для личинок комаров; аналогичный подход был использован для борьбы с насекомыми, повреждающими корни растений;

- бакуловирусы, патогенные для небольшого числа насекомых, были трансформированы путем введения генов, обеспечивающих синтез инсектицида в течение всего жизненного цикла вируса или синтеза смертельных для насекомых нейротоксинов.

Таким образом, технология рекомбинантных ДНК позволяет получить новые продукты, имеющие прямую коммерческую ценность (тесты, лекарства, вакцины, низкомолекулярные биорегуляторы, белки), и опосредованную путем совершенствования технологических процессов очищения внешней среды и повышения эффективности сельского хозяйства.

Генетическая инженерия растений (трансгенные растения)

Основной задачей селекционеров остается получение высокоурожайных сортов растений с повышенной пищевой ценностью. В качестве важного инструмента прямого генетического воздействия на растения применяется технология рекомбинантных ДНК, широко используемая в микробиологических системах. Разработаны специальные эффективные системы переноса ДНК и экспрессирующих векторов для растительных клеток. Одним из достоинств последних является возможность создания из одной клетки, сконструированной генно-инженерными методами, целого растения, все клетки которого несут чужеродный(-е) ген(-ы) – **трансгенные растения**. Если такое растение цветет и дает жизнеспособные семена, то желаемый признак передается последующим поколениям. Трансгенные растения имеют следующие преимущества:

- введение гена(-ов) обеспечивает повышение сельскохозяйственной ценности и декоративных качеств культурных растений;
- трансгенные растения могут служить биореакторами для малозатратного производства экономически и биологически важных белков и низкомолекулярных биорегуляторов;
- генетическая трансформация растений (трансгеноз) позволяет изучать действие генов в ходе развития растений, т.е. получать фундаментальные знания, необходимые для обоснования практических мероприятий по оптимизации сельского хозяйства.

Трансгенные растения получают новые свойства в следующих направлениях:

- изменение инсектицидной активности;
- повышение устойчивости к вирусным заболеваниям;
- изменение устойчивости к гербицидам;
- замедление старения;
- повышение устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды;
- изменение окраски цветков;
- повышение пищевой ценности семян.

Рассмотрим некоторые методологические подходы генной инженерии растений.

Трансформация растений Ti-плазмидой из *Agrobacterium tumefaciens*. Грамотрицательная почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens* – фитопатоген. В процессе своего жизненного цикла она трансформирует клетки растений: образование корончатого галла, т.е. опухоли у корневой шейки, нарушающей нормальный рост растений. При инфицировании этой болезнью подвержены двудольные растения (виноград, косточковые фруктовые деревья, розы). Образование корончатого галла начинается с проникновения, интеграции в геном растительных клеток и экспрессии специфического сегмента бактериальной плазмидной ДНК, так называемой

Т-ДНК (от англ. transferred DNA). Т-ДНК – это часть плазмиды, индуцирующей развитие опухоли (tumor-inducing plasmid, Ti-плазмиды).

Большинство генов Т-ДНК активируются только после ее встраивания в геном растений. Их продукты и вызывают образование корончатого галла. Продуктами экспрессии генов Т-ДНК являются белки-ферменты, которые принимают участие:

- в синтезе растительного гормона *ауксина* (индолилуксусной кислоты);
- в образовании *цитокининов* изопентениладенина и изопентениладенозинмонофосфата (присоединение к 5'-АМФ изопреноидной боковой цепи), при гидроксировании этих цитокининов растительными ферментами образуются трансзеатин и транскрибозилзеатин;
- синтез *опинов* (продукты конденсации amino- и кетокислот или аминокислот и сахаров), например, октопин – аргинин+пируват, нопалин – аргинин+ α -кетоглутаральдегид, агропин – бициклическое производное глутамата и сахара.

*Ауксин и цитокинины регулируют рост и развитие растительной клетки. В избытке они ведут к образованию опухолей растений (например, корончатый галл). В корончатом галле опины синтезируются и секретируются. Они служат источниками углерода и азота для *Agrobacterium tumefaciens*, несущей Т-ДНК (Ti-плазмиду). Следовательно, бактерии трансформируют растительные клетки в биореакторы по производству соединений углерода исключительно для собственной жизнедеятельности.*

Чтобы использовать природную способность *Agrobacterium tumefaciens* проникать в растительные клетки для доставки в них необходимых клонированных генов, были созданы модифицированные Ti-плазмиды. Из Т-ДНК удаляли гены ауксина и опинов (ауксин подавляет образование из клеток зрелого растения, а ферменты синтеза опинов уменьшают выход биомассы, поскольку часть ресурсов расходуется на синтез опинов). Встраивали такую измененную Т-ДНК в плазмиду, способную стабильно существовать в *E. coli*. Встроенный в Т-ДНК ген-мишень попадал вместе с ней в ядро растительной клетки-реципиента. К настоящему времени разработаны методы трансформации, позволяющие вводить клонированный ген в небольшое число клеток растительной ткани, из которой можно регенерировать целое растение.

Бомбардировка микрочастицами – биолистика является перспективным методом введения ДНК в растительные клетки. Золотые или вольфрамовые сферические частицы диаметром 0,4–1,2 мкм покрывают ДНК (плазмидной ДНК), осажденной CaCl_2 , спермидином или полиэтиленгликолем и обстреливают ими клетки с помощью специальной пушки. Частицы разгоняются до скорости 300–600 м/с и пробивают прочную стенку растительной клетки. Попав в клетку, ДНК, покрывающая частицы, встраивается в растительную ДНК. Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения самых разных видов, в том числе

однодольные и хвойные, в которые не удается ввести ДНК с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Бомбардировку микрочастицами используют для введения чужеродной ДНК:

- в суспензию растительных клеток;
- культуры клеток;
- меристематические ткани;
- незрелые зародыши;
- протокормы, колеоптили и пыльцу.

Основные методы введения ДНК в клетки растений приведены в табл. 9.

Таблица 9

Методы введения ДНК в клетки растений (по Б. Глику, Дж. Пастернаку, 2002).

Метод	Комментарий
Использование Ti-плазмид	Эффективная система, но не применимая для всех видов растений
Бомбардировка микро-частицами	Используется для широкого круга растений, простота и дешевизна
Использование вирусных векторов	Низкая эффективность доставки ДНК в растительные клетки
Прямое введение генов в протопласты растений	Введение генов только в протопласты растительных клеток, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения
Микроинъекции	Ограниченное применение
Электропорация	Введение генов только в протопласты растительных клеток, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения
Слияние липосом	Введение генов только в протопласты растительных клеток, из которых могут быть регенерированы жизнеспособные растения

Применение репортерных генов при трансформации клеток растений. Для идентификации трансформированных клеток необходимо уметь обнаруживать чужеродную ДНК, интегрировавшую в геномную ДНК растения, а также оценить уровень экспрессии генов. Для этого используют репортерные гены. Эти гены, как правило, микробного происхождения и их вводят поэтому в растительные клетки вместе с сильным растительным промотором. Имеется опыт введения репортерных генов, продукты экспрессии которых видны в целом растении (например, введение гена люциферазы светляков). В системах трансформации чаще всего используется ген β -D-глюкуронидазы *E. coli* (GUS-ген). Он кодирует стабильный фермент, обычно отсутствующий в растениях, который катализирует расщепление β -D-глюкуронидов. Его активность в трансформированных растительных тка-

нях можно обнаружить по появлению синей окраски в результате гидролиза неокрашенного субстрата (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкуроновой кислоты). Экспрессия репортерных генов показывает эффективность растительных различных промоторов, функционирующих в определенных растительных клетках или на определенных стадиях развития растения.

В настоящее время разработаны методы встраивания чужеродных генов непосредственно в хлоропластную или митохондриальную ДНК так, чтобы кодируемый белок синтезировался прямо в этих органеллах.

Получение высокоурожайных растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды остается актуальной научно-практической задачей. Эта задача решается с помощью традиционных селекционных подходов (длительный процесс, 10–15 лет) и новых технологий генной инженерии (результат за 3–5 лет). В настоящее время разработано несколько эффективных систем переноса ДНК и экспрессирующих векторов, которые работают в растительных клетках. Одним из достоинств растительных клеток является их *тотипотентность*: из одной клетки может быть регенерировано целое растение. Из клеток, сконструированных генно-инженерными методами, можно получить фертильные растения, все клетки которых несут чужеродный(-е) ген(-ы) – *трансгенные растения*. Если такое растение цветет и дает семена, то введенная генетическая информация будет передаваться по наследству, т.е. следующим поколениям растения.

Трансгенные растения, не содержащие маркерные гены. Обычно при введении чужеродного гена, кодирующего желаемый признак, в растение одновременно вводится и селективный маркерный ген. Продукты экспрессии маркерных генов служат для отбора клеток с желаемыми свойствами, например, по их чувствительности к антибиотикам. Выполнив свою вспомогательную роль по трансформации растительной клетки, селективные маркерные гены способны вызывать негативные эффекты:

- белки-продукты их экспрессии могут оказаться аллергенами или токсинами;
- гены устойчивости к антибиотикам могут попасть в патогенные почвенные микроорганизмы;
- один селективный маркерный ген не используется дважды, поэтому его присутствие может затруднить трансформацию трансгенных растений дополнительными генами.

В связи с этим были предложены методы удаления маркерных генов из трансгенных растений. Например, получение безмаркерных трансгенных растений включает котрансформацию растений двумя разными ДНК, одна из которых несет маркерный ген, а другая – вводимый ген желаемого признака. В этом случае 30–80% растений содержат оба гена, которые введены в разные участки хромосомной ДНК. После отбора трансформированных растений с помощью продуктов экспрессии маркерного гена, его

удаляют из трансгенного растения путем обычного скрещивания.

Устойчивость к насекомым-вредителям. В конце прошлого века в мире было израсходовано более 4 млрд. долларов на использование химических инсектицидов. Их многократное применение (опрыскивание) в течение вегетационного периода требует технических устройств и отвлечения людей. Поэтому целесообразно создание растений (например, злаковых), способных продуцировать функциональные инсектициды. Для создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям, с помощью генно-инженерных методов были разработаны различные технологии.

Один из популярных подходов базируется на использовании гена инсектицидного протоксина, продуцируемого *Bacillus thuringiensis* (микробный инсектицид). Инсектицид (токсин белковой природы) находится в клетке в виде так называемого параспорального кристалла – структуры, которая образуется во время споруляции бактерий. На его долю приходится 20–30% сухой массы спорулирующей культуры (95% – белок, 5% – углеводы). Кристалл – это четвертичная структура белка, диссоциирующая на субъединицы при щелочном значении pH. Выделяют 4 основных класса токсина: CryI – токсичен для чешуекрылых, CryII – для чешуекрылых и двукрылых, CryIII – для жесткокрылых, CryIV – для двукрылых, которые разделяются на подклассы и подгруппы. В параспоральном кристалле инсектицид неактивен; при солюбилизации кристалла белок высвобождается в форме протоксина, предшественника активного токсина. Молекулярная масса протоксина CryI около 130 кДа. После заглатывания насекомым параспорального кристалла протоксин активируется в кишечнике в условиях щелочного pH (7,5–8,0) и под действием пищеварительных протеиназ превращается в активный токсин с молекулярной массой 68 кДа. Этот токсин встраивается в мембрану эпителиальных клеток кишечника и образует канал, через который утрачивается часть АТФ и других компонентов клетки. Насекомое перестает питаться, обезвоживается и погибает. Для создания трансгенных растений, которым был введен ген токсина *Bacillus thuringiensis*, использовали несколько приемов.

1. Был введен ген N-концевой части молекулы токсина (отвечает за токсичность) и вместе с сильным растительным промотором (для повышения экспрессии гена); количество синтезированного растением токсина увеличилось и была достигнута некоторая защита от насекомых (трансгенный томат). Эффективность такого подхода была недостаточной из-за того, что в переносимом гене присутствовали нуклеотидные последовательности, характерные для бактерий и замедляющие экспрессию гена в растительных клетках.

2. С помощью сайт-специфического мутагенеза, а также химического мутагенеза были получены измененные гены токсина, клонирование которых в растительных клетках увеличило продукцию токсина в 100 раз. В США проведены успешные испытания и дано разрешение на использова-

ние инсектицидного токсина *Bacillus thuringiensis* для повышения устойчивости картофеля к колорадскому жуку. Следует помнить, однако, о необходимости постоянного контроля популяции насекомых-вредителей, с тем чтобы вовремя обнаружить устойчивые организмы. В настоящее время ведутся работы по введению бактериального гена холестеролоксидазы в хлопчатник для борьбы с личинками хлопкового долгоносика (фермент разрушает эпителиальные клетки средней кишки насекомого).

3. Были проведены эксперименты, которые показали возможность индукции синтеза протоксина путем обработки трансгенного растения недорогим и безопасным химическим веществом (например, салициловой или полиакриловой кислотой) в определенный момент вегетационного периода. Такая периодичность синтеза позволяет замедлить развитие устойчивости у насекомых к микробному инсектициду, продуцируемому растением. Аналогичные системы могут оказаться полезными для регуляции синтеза самых разных чужеродных белков в трансгенных растениях.

Другой подход базируется на том, что некоторые растения синтезируют ингибиторы протеиназ, которые, попадая в кишечник насекомого, блокируют гидролиз растительных белков. Возникло предположение о введении растительного гена ингибитора протеиназ с сильным растительным промотором в растительные клетки. Например, был клонирован ген, кодирующий ингибитор трипсина вигны китайской в табак. Оказалось, что ущерб, наносимый личинками совки (*Heliothis virescens*) трансгенным растениям, синтезирующим более 2 мкг ингибитора трипсина на 1 мг растительного белка, был значительно меньше, чем в случае с обычными растениями. Введение гена ингибитора II протеиназы картофеля в растения риса защищает их от розового стеблевого точильщика (*Sesamia inferens*), основного насекомого-вредителя для этой культуры; заражение приводит к образованию полых стеблей и мертвых метелок без семян. Поскольку растительные ингибиторы протеиназ являются обычными компонентами рациона человека и животных и в процессе приготовления пищи быстро инактивируются, их введение в новые зерновые культуры можно считать безопасным.

Третий подход сформировался на основе двух предыдущих: использование токсина *Bacillus thuringiensis* и ингибитора протеиназ сериновой природы. Оказалось, что смесь очищенного токсина *Bacillus thuringiensis* в количестве, обеспечивающем минимальную смертность насекомых, и ингибитора протеиназ в низких концентрациях обладает в 20 раз большей инсектицидной активностью, чем один протоксин *Bacillus thuringiensis*.

Четвертый подход предполагает введение в растительные клетки гена, кодирующего ингибитор альфа-амилазы. Большой ущерб зерновым наносят зерновка (*Callosobruchus maculatus*) и долгоносик лучистой фасоли (*C. Chinen-sis*). Если питать этих насекомых обычной фасолью (*Phaseolus vulgaris*), то они погибают из-за присутствия в ней ингибитора альфа-амилазы, а следовательно, подавления гидролиза крахмала – основного продукта питания насекомых.

Был выделен ген этого ингибитора и клонирован в растение, весьма чувствительное к насекомым, – горох (*Pisum sativum*). В результате были получены растения трансгенного гороха, устойчивые к обоим насекомым.

Устойчивость к вирусам. Вирусы растений существенно снижают урожай. Чтобы не прибегать к обработке культур химическими препаратами, селекционеры попытались перенести природные гены устойчивости к вирусам от одной линии растений к другой. Однако устойчивость растений быстро утрачивалась. Природный иммунитет к вирусным инфекциям обуславливается разными причинами:

- блокированием проникновения вируса в растение;
- предотвращением распространения вируса в здоровые клетки;
- подавлением симптомов вирусной инфекции.

Чтобы получить растения, устойчивые к вирусам, проводили их «иммунизацию» вирусными генами, кодирующими белки оболочки, другими вирусными генами или бессмысленными последовательностями вирусного генома. Обнадёживающие результаты были получены, если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок оболочки вируса: создано множество трансгенных зерновых и других растений. Механизм подавления пролиферации вирусных частиц в присутствии произведенного растением белка оболочки вируса пока неясен. Ценность подхода увеличивается в связи с тем, что ген белка оболочки одного вируса иногда обеспечивает устойчивость к широкому кругу неродственных вирусов.

Защита растений от патогенных вирусов может осуществляться естественными противовирусными белками, синтезируемыми самими растениями. Например, в клеточной стенке фитолакки американской (*Phytolacca americana*) присутствуют три разных противовирусных белка: РАР, синтезируемый в листьях весной, РАРП, обнаруживаемый в листьях летом, и РАР-S, содержащийся в семенах. Эти белки легко выделить из водных экстрактов измельченных тканей растения. Если небольшое количество РАР нанести на листья других растений, то последние также окажутся устойчивыми к нескольким вирусам. Ген РАР был использован для получения трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусов растений.

Устойчивость к гербицидам. Известно, что почти 10% урожая теряется из-за сорняков. Для борьбы с сорняками используется около 100 химических гербицидов, на производство которых в мире тратится 10 млрд. долларов США. В присутствии гербицидов сельскохозяйственные растения не должны терять продуктивность. Для этого их необходимо генетически трансформировать, чтобы:

- уменьшить поглощение гербицида культурным растением;
- уменьшить способность белка, чувствительного к гербициду, к связыванию с ним;
- обеспечить синтез белка, чувствительного к гербициду, в таком количестве, чтобы его хватало на выполнение присущих ему функций в при-

сутствии гербицида;

– обеспечить инактивацию гербицида в ходе метаболизма культурного растения.

Были получены растения, устойчивые к глифосфату – гербициду, быстро разлагающемуся в почве на нетоксические составляющие и потому безопасному для окружающей среды. Глифосфат является ингибитором 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS) – фермента, играющего важную роль в синтезе ароматических аминокислот и у бактерий, и у растений. Из глифосфатустойчивого штамма *E. coli* был выделен ген, кодирующий EPSPS, помещен под контроль растительного промотора и введен в растительные клетки. Трансгенные растения табака, петунии, томата, картофеля и хлопка, синтезировавшие EPSPS в количестве, достаточном для замены ингибированного гербицидом растительного фермента, были устойчивы к глифосфату и при обработке, в отличие от сорняков, не погибали.

Устойчивость к грибам и бактериям. Фитопатогенные грибы наносят ощутимый ущерб сельскохозяйственной продукции. Например, в странах, где выращивается рис, ущерб от гриба, вызывающего пирикулярриоз риса, оценивается в 5 млрд. долларов. Выведены растения, устойчивые к болезнетворным грибам, за счет переноса и экспрессии генов PR-белков (pathogenesis-related proteins) – β -1,3-глюканаза, хитиназа, тауматинподобные белки, ингибиторы протеиназ. Все эти белки подавляют жизнедеятельность патогенных грибов.

Ущерб, наносимый урожаю картофеля почвенной бактерией *Erwinia carotovora*, составляет до 100 млн. долларов в год. Химических способов защиты от этого патогена не существует. Поэтому было создано трансгенное растение картофеля, способное экспрессировать ген лизоцима бактериофага T4. Лизоцим секретировался в апопласт (межклеточное пространство, т.е. в компартмент, куда проникают болезнетворные бактерии) и лизировал их. Поскольку лизоцим лизирует различные грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, этот подход перспективен для защиты растений от других патогенных бактерий.

Устойчивость к неблагоприятным воздействиям и старению. Растение не способно активно избегать неблагоприятных факторов внешней среды: высокой освещенности, ультрафиолетового облучения, высоких температур, концентраций солей и др. Для защиты срабатывают эволюционно отобранные механизмы «физиологического стресса». В составе этих реакций присутствуют свободнорадикальные, вызывающие образование радикальных форм кислорода – «окислительный стресс»: супероксидный, гидроксидный, пероксидный радикалы. Для обезвреживания супероксидного радикала служит фермент супероксиддисмутаза. Известно, что Cu/Zn-супероксиддисмутаза содержится в хлоропластах, Mn-супероксиддисмутаза – в митохондриях; некоторые растения синтезируют Fe-супероксиддисмутазу. Созданы трансгенные растения, устойчивые к

очень яркому свету, путем переноса и экспрессии гена Cu/Zn-супероксиддисмутазы: у контрольных растений фотосинтетическая активность утрачивалась, а у трансгенных сохранялась на уровне 94%.

Растения, произрастающие на засоленных почвах, синтезируют нетоксичные вещества – осмопротекторы. Они способствуют поглощению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение макромолекул, присутствующих в клетках растений, под действием высоких концентраций солей. Осмопротекторами являются сахара, спирты, пролин и четвертичные соединения аммиака. Одним из высокоактивных осмолитиков является бетаин, который накапливается в некоторых растениях во время засухи или при высокой засоленности почв. Были созданы устойчивые растения путем переноса гена кишечной палочки, кодирующего синтез ферментов бетаинообразования.

Контроль времени созревания плодов. Преждевременное созревание и размягчение плодов затрудняет их транспортировку. Известно, что при созревании плодов в растениях активируются специфические гены, кодирующие ферменты целлюлазы и полигалактуроназу. Если подавить их экспрессию, созревание будет замедляться. Созданы трансгенные растения томата, в которых нарушен синтез полигалактуроназы, плоды которых удобны для транспортировки и с 1994 года разрешены к реализации Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США как безопасные. Другим фактором, ускоряющим созревание плодов, является этилен. Он синтезируется из S-аденозилметионина с образованием промежуточного продукта 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АСС). Созданы трансгенные растения томата, в которых подавлен синтез ААС, а следовательно, и этилена. Из некоторых почвенных растений был выделен ген ААС-дезаминазы и введен в геном томата. Полученные растения синтезировали меньше этилена, чем нормальные, а их плоды тоже имели гораздо более длительный срок хранения.

Изменение декоративных свойств растений. Примерно 70% объема индустрии цветоводства приходится на долю четырех растений: роз, гвоздик, тюльпанов и хризантем. В окраске цветов важную роль играют флавоноиды – антоцианины. Они синтезируются из фенилаланина. Окраска цветка определяется химическими свойствами флавоноидов, например, цианидина (красный цвет) и дельфинидина (синий цвет). Созданы трансгенные цветковые растения, у которых подавлена или введена новая ферментативная реакция в метаболических цепях превращений антоцианинов, что обеспечило новые коммерчески выгодные варианты формы и окраски цветов.

Трансгенные растения, синтезирующие Mn-супероксиддисмутазу, в 3–4 раза менее чувствительны к действию озона. В перспективе – создание трансгенных цветковых растений, содержащих супероксиддисмутазу, препятствующую увяданию.

Изменение пищевой ценности растений реализуется методами

генной инженерии по следующим направлениям:

- изменение аминокислотного состава запасных белков семян;
- изменение жирно-кислотного состава плодов;
- улучшение вкуса фруктов путем введения в растения гена монеллина (растительного белка, имеющего сладкий вкус).

Известно, что запасные белки, которые служат источниками углерода и азота прорастающих семян, состоят из ограниченного повторяющегося набора аминокислот, среди которых отсутствуют некоторые незаменимые аминокислоты. Для повышения биологической ценности запасных белков, например, путем обогащения лизином, был апробирован метод отмены ингибирующего действия лизином своего собственного синтеза. Для этого в растительные клетки были введены регуляторные гены биосинтеза лизина микробного происхождения, которые отличались от растительных тем, что они не чувствительны к ингибирующему действию лизина. В семенах полученных трансгенных растений содержалось в 100 раз больше свободного лизина.

Считают, что спустя 5–7 лет в мире будет выработано растительного масла на сумму 70 млрд. долларов. Около 75% всех масличных культур приходится на долю сои, пальмы, рапса (канолы) и подсолнечника. В получаемых маслах содержатся пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая жирные кислоты. С помощью генной инженерии созданы десятки сортов рапса, которые синтезировали масла с измененным жирно-кислотным составом. Каждый трансгенный сорт содержал один дополнительный ген, который кодировал белки-ферменты, обеспечивающие накопление одной жирной кислоты.

Изменения внешнего вида и вкуса. Изменение цвета овощей и фруктов начинается с окисления монофенолов и о-дифенолов до о-хинонов. Этот процесс катализируют полифенолоксидазы, локализующиеся в мембранах хлоропластов и митохондрий. Начаты исследования по созданию трансгенных растений, окраску которых можно будет контролировать через введение и экспрессию генов полифенолоксидазы.

В плоде африканского растения *Dioscorephyllum cumminsii* Diels содержится белок монеллин, примерно в 100000 раз более сладкий, чем сахароза в эквимолярных количествах. Ген монеллина был химически синтезирован и введен в растительные клетки инфицированием их *A. tumefaciens*, используя Ti-плазмиды. Монеллин был обнаружен в зрелых помидорах и листьях салата.

Растения как биореакторы. Для использования рекомбинантных бактерий, производящих белки или низкомолекулярные биорегуляторы, требуются биореакторы и квалифицированный персонал. Создание трансгенных растений для тех же целей менее затратно. В настоящее время имеются экспериментальные установки по получению с помощью растений моноклональных антител, функциональных фрагментов антител и подверженного

биодegradации биополимера поли-β-гидроксибутирата. Рассмотрим этапы создания трансгенного растения, производящего данный биополимер.

1. В бактериях *Alcaligenes eutrophus* поли-β-гидроксибутират синтезируется из ацетил-КоА тремя ферментами, гены которых входят в один оперон. Растения могут экспрессировать только один ген.

2. Каждый из генов был клонирован по отдельности и встроен в хлоропластную ДНК растения *Arabidopsis thaliana*.

3. Два трансгенных растения, каждое со своим чужеродным геном, скрещивали, чтобы получить растения с двумя чужеродными генами, включенными в хлоропластную ДНК.

4. Полученное трансгенное растение с двумя чужеродными генами скрещивали с растением, несущим третий чужеродный ген, и отбирали растения, несущие все три бактериальных гена поли-β-гидроксибутирата. В листьях такого трансгенного растения, экспрессирующего все три бактериальных гена, синтезировалось более 1 мг поли-β-гидроксибутирата на 1 г сырой ткани листа.

К настоящему времени на рынок поступило лишь небольшое число генетически модифицированных растений, в основном сои, однако можно ожидать их стремительного производства в обозримом будущем.

Человечество находится на развилке исторического пути. Путь по одной дороге ведет к исчезновению многообразия живых организмов. Только 20 видов растений (из 220 000) составляют более 90% пищевого рациона человечества. А за последние 80 лет в США, например, исчезло 97% всего разнообразия овощей. Из 7000 сортов яблок осталось 900. Теперь существует 330 разновидностей груш, тогда как было 2600. Даже в Индии, где полвека назад были тысячи сортов риса, в настоящее время 75% культуры представлено 10 сортами. Сейчас представляется новый путь создания новых или модернизация существующих растений методами геной инженерии. Однако все ли можно учесть на пути серьезного изменения биогеоценозов?

Трансгенные животные

Стратегия скрещивания и отбора, хотя и требует много времени, остается основой выведения новых пород сельскохозяйственных животных, птиц и рыб. Однако после выведения эффективной генетической линии добавление новых признаков без риска утраты создаваемых свойств потребовало новых методических и биотехнологических подходов, в частности, путем переноса ядра из эмбриональной клетки в яйцеклетку с удаленным ядром (перенос ядра, клонирование):

- клонированный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки;
- инокулированные оплодотворенные яйцеклетки имплантируют в матку самки;
- отбирают потомков, развившихся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках;

– скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Эта идея реализована на практике в 1980 гг. Были введены новые термины: трансгенное животное (генотип изменен введением чужеродной ДНК), трансген – вводимая ДНК, трансгеноз – процесс создания трансгенного животного.

Трансгенные животные: методология. Введение чужеродной ДНК животным осуществляют несколькими способами:

1. С помощью ретровирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента. Эмбрион, обычно находящийся на стадии 8 клеток, инфицируют рекомбинантным ретровирусом, несущим трансген. Самки, которым был имплантирован эмбрион («суррогатные» матери), производят на свет трансгенное потомство.

2. Микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки. У млекопитающих после проникновения сперматозоида в яйцеклетку ядро спермия (мужской пронуклеус) и ядро яйцеклетки существуют отдельно. Мужской пронуклеус обычно гораздо больше женского, его легко локализовать с помощью секционного микроскопа и ввести в него чужеродную ДНК. Это лежит в основе метода получения линий трансгенных животных методом микроинъекций.

– Яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гиперовуляция и проведено спаривание с самцами. Гиперовуляция вызывается введением самкам сыворотки беременной кобылы и хорионического гонадотропина человека (увеличивается образование яйцеклеток в 3–7 раз).

– Трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки.

– Яйцеклетки имплантируют в «суррогатную» мать, которая производит на свет трансгенное потомство.

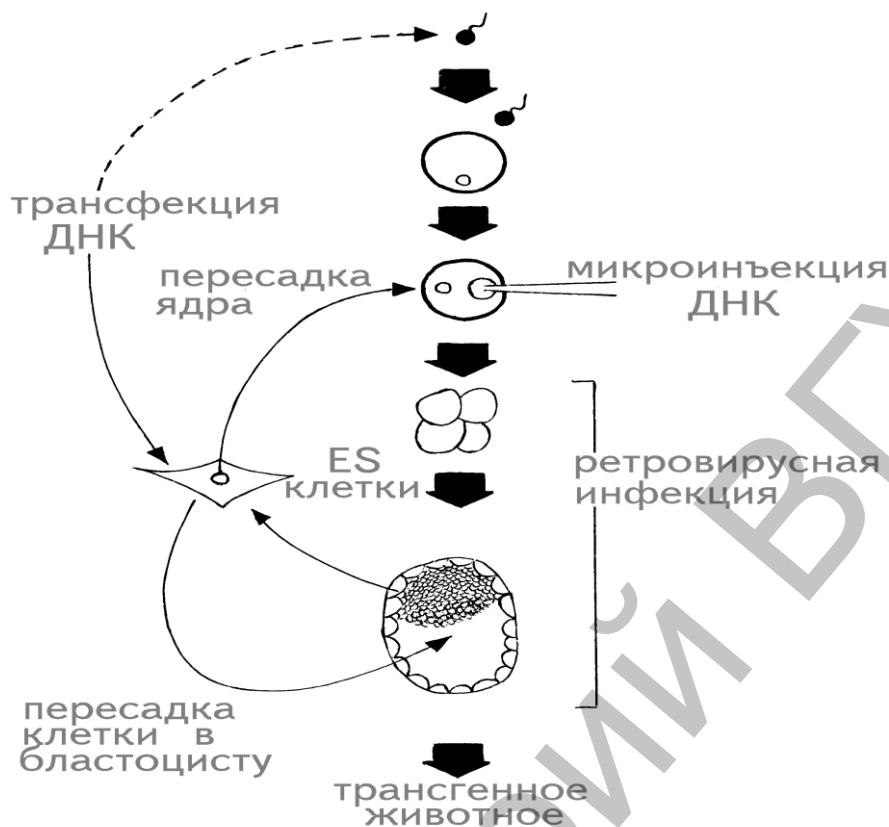


Рис. 3. Пути интродукции чужеродной генетической информации в клетки зародышевого пути (Гловер, 1989, с изменениями)

3. Введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития. Этот метод получил развитие в экспериментах на мышах. Клетки, выделенные из мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки в культуре легко модифицировать методами генетической инженерии без нарушения их плюрипотентности.

– ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши.

– Их трансформируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансформированные клетки методом позитивно-негативной селекции или ПЦР.

– Популяцию трансформированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей.

– Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей (рис. 3) (А.В. Кузнецов, И.В. Кузнецова, 1998).

4. Клонированием с помощью переноса ядра. Опыты были поставлены на овцах (у этих животных в течение первых трех делений зиготы, за-

нимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК, и ни один из генов не экспрессируется). Клонирование овечки Долли из ядра дифференцированной клетки осуществляли следующим образом:

- ядро яйцеклетки удаляли с помощью микропипетки.
- Культивировали эпителиальные клетки молочной железы (дифференцированные клетки) взрослой особи и переводили их в фазу клеточного цикла G_0 .
- Осуществляли слияние эпителиальных клеток в G_0 -фазе и яйцеклеток, лишенных ядра. Получали яйцеклетки с ядрами от эпителиальных клеток.
- Выращивали восстановленные яйцеклетки в культуре или в яйцеводе с наложенной лигатурой до ранних стадий эмбриогенеза.
- Имплантировали яйцеклетки с ядрами эпителиальных клеток молочной железы в матку «суррогатной» матери, где и происходило развитие плода.

Все перечисленные методы обладают крайне низкой эффективностью и не могут пока найти широкого применения в практике. Так, например, при получении клонированной овечки было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами клеток молочной железы в фазе G_0 ; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.

5. Для трансгеноза используют также искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), несущие множество генов. Напомним, что дрожжи – это эукариотические клетки, в которых возможна посттрансляционная модификация белков. Таким образом были получены мыши, синтезирующие только человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических болезней человека (например, болезни Альцгеймера).

Трансгенные сельскохозяйственные животные. Для создания трансгенных коров использовали схему трансгеноза методом микроинъекций ДНК:

- отбор ооцитов коров, забитых на скотобойне;
- созревание ооцитов *in vitro*;
- оплодотворение бычьей спермой *in vitro*;
- центрифугирование оплодотворенных яйцеклеток для концентрирования желтка, который в нормальных яйцеклетках мешает визуализации мужского пронуклеуса с помощью секционного микроскопа;
- микроинъекция ДНК в мужской пронуклеус;
- развитие эмбрионов *in vitro*;
- нехирургическая имплантация одного эмбриона реципиентной самке во время течки;
- скрининг ДНК потомков на наличие трансгена.

В тестовых экспериментах из пула в 2470 ооцитов были получены два трансгенных теленка. Метод дает результат, но пока характеризуется

низкой эффективностью.

Трансгенез крупного рогатого скота может преследовать следующие цели:

– изменение содержания в молоке различных его компонентов. Например, увеличение доли капа-казеина позволит увеличить получение сыра.

– Введение гена лактазы позволит получить молоко, в котором разрушена лактоза. Такое молоко могут употреблять в пищу люди с дефектом лактазы пищеварительного тракта (непереносимость молока).

– Выведение животных, устойчивых к вирусным и бактериальным инфекциям, а также к паразитарным инвазиям. Разрабатываются методы введения генов, ответственных за продукцию белков неспецифической и иммунной резистентности.

– Использование молочной железы коров как биореактора. Предположим, что корова дает в год 10000 л молока, содержащего 35 г белка в 1 л. Если в молоке будет содержаться такое количество рекомбинантного белка и эффективность его очистки составит 50%, то от 20 трансгенных коров можно будет получать примерно 100 кг такого белка в год. Примерно столько белка С требуется ежегодно, например, для предотвращения тромбообразования в сосудистом русле больных людей.

Трансгенные овцы и козы создавались для биосинтеза и секреции в молоко белков человека: активатор пламиногена, антитрипсин, фактор IX системы свертывания крови, лактоферрина, урокиназы, интерлейкина-2 и др. В отличие от трансгенных бактерий-прокариот, в молочных железах биореакторах достигалась посттрансляционная модификация человеческого белка, в частности, гликозилирование. Были созданы трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шерсти. Удалось создать трансгенных свиней, способных синтезировать человеческий гемоглобин.

Потери в животноводстве, которые вызываются различными патологическими процессами, достаточно велики. Например, у всех поросят второго месяца жизни можно обнаружить в той или иной степени выраженности железодефицитную анемию. Поэтому все более важное значение приобретает селекция животных по резистентности к болезням, вызываемым токсинами, вирусами, микроорганизмами и паразитами. Получены первые обнадеживающие результаты. Так, например, созданы стада крупного рогатого скота с примесью крови зебу, устойчивые к ряду кровепаразитарных заболеваний. Ведутся исследования с целью получения трансгенных животных, резистентных к маститу за счет повышения содержания белка лактоферрина в тканях молочной железы. Л.К. Эрнст показал устойчивость трансгенных животных с геном антисмысловой РНК к лейкозу крупного рогатого скота, к заражению вирусом лейкоза.

Большой интерес представляет ксенотрансплантация клеток и тканей животных человеку. Например, трансплантация гормонпродуцирующих клеток инсулярного аппарата поджелудочной железы больным диабетом.

Основная проблема таких операций заключается в остром отторжении ксенотрансплантата за счет активации комплемента. Были созданы трансгенные свиньи, пересаживаемые клетки которых содержали гены ингибиторов комплемента. Благодаря их экспрессии синтезировались белки, предотвращающие острую реакцию отторжения пересаженных человеку клеток свиньи.

Трансгенные птицы и рыбы. Получение трансгенных птиц оказалось достаточно сложной проблемой. В настоящее время трансгенные цыплята воспроизводятся трансфекцией изолированных клеток бластодермы. Выделенные клетки трансфицируют трансгеном с помощью липосом и вводят в подзародышевую область облученной бластодермы реципиента. Часть полученных потомков являются химерами, а некоторые из них, несущие трансген в клетках зародышевой линии, при скрещивании могут дать начало трансгенным линиям.

Трансгенных цыплят можно использовать для улучшения генотипа уже существующих пород – для придания им устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызываемым кокцидиями, повышения эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в яйцах, повышения качества мяса. Было предложено также использовать яйцо с его высоким содержанием белка в качестве источника белковых продуктов, используемых в фармацевтической промышленности. Экспрессия трансгена в клетках репродуктивного пути курицы, где обычно секретруется большое количество овальбумина, может способствовать накоплению соответствующего белкового продукта в яйце, откуда его можно затем выделить.

По мере истощения природных рыбных запасов все большую роль будет приобретать разведение рекомбинантной рыбы в искусственных условиях путем трансгеноза. Трансгены вводят микроинъекцией ДНК или электропорацией оплодотворенных яйцеклеток. Эмбриогенез рыб протекает в водной среде вне организма, поэтому в имплантации нет необходимости. Все дальнейшие процессы могут протекать в резервуарах с регулируемой температурой. Выживаемость эмбрионов рыб после микроинъекций высокая (35–80%), а доля трансгенных потомков колеблется от 10 до 70%. Изучено влияние трансгена гормона роста на скорость роста рыб.

Приведем технологию трансгеноза, пригодного «для всех рыб», обитающих в холодной воде. В яйцеклетки атлантического лосося введен трансген, состоящий из следующих элементов:

- промотор гена антифризного белка американской бельдюги;
- кДНК гормона роста лосося;
- сигналы терминации/полиаденилирования 3'-конца гена антифризного белка американской бельдюги.

Антифризный белок – это богатый аланином белок, вырабатываемый в печени некоторых водных организмов и предотвращающий замерзание плазмы крови. Обнаружен также в клетках некоторых насекомых, расте-

ний и бактерий, где он регулирует образование кристаллов льда при низких температурах.

Полученные трансгенные лососи были крупнее и быстрее прибавляли в весе, чем контрольные нетрансформированные рыбы. Годовалые трансгенные особи, полученные в результате введения в яйцеклетки нерки генетической конструкции гормона роста, весили в 11 раз больше, чем нетрансгенные.

Предполагается, что в будущем гены устойчивости к болезням и стрессовым воздействиям, а также гены, обуславливающие другие биологические особенности, будут введены как рыбам умеренных широт, так и тропическим рыбам.

Имеется надежда, что трансгеноз позволит улучшать генотип существующих пород домашнего скота и выводить породы животных с новыми признаками.

Молекулярная генетика человека

Основные причины смерти людей в XX веке представлены в табл. 9.

Таблица 9

Причины смертности людей в XX веке (The Robert Wood Johnson Institute. Clin. Lab. Strategies, 1997, Vol. 2, №5, P. 6)

Год	Инфекционные заболевания	Сердечно-сосудистые заболевания	Опухоли
1900	30%	20,1%	3,7%
1950	6,3%	53,2%	15,6%
1990	5,3%	42,0%	23,2%

За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в диагностике, лечении и профилактике инфекционных заболеваний. Поэтому более очевидным стало влияние генетических факторов (сердечно-сосудистые заболевания, опухоли), особенно в развитых странах. Например, в Канаде, согласно статистическим данным, у 5% населения в возрасте 25 лет обнаруживаются наследственные дефекты, приводящие к инвалидности. Здесь у каждого второго человека развивается заболевание, имеющее в той или иной степени наследственную природу. В настоящее время более половины случаев обращения в детские лечебные учреждения связаны с генетическими заболеваниями.

Наследственные заболевания. Основные понятия. Наследственными являются свыше 1000 болезней человека. Большинство из них очень редки (10^{-5}), но некоторые встречаются относительно часто (10^{-4} , например, фенилпировиноградная олигофрения). Многие наследственные заболевания человека обуславливаются мутациями в единственном гене, одна-

ко ряд сложных патологий (например, рак) определяется мутациями в нескольких генах. Напомним, что ген – это транскрибируемый участок хромосомы, кодирующий функциональный белок, либо тРНК или рРНК.

В том случае, когда имеется полное, точное и последовательное описание симптомов заболевания (фенотипа), определяемого единственным геном, генетическую природу заболевания можно установить исходя из типа его наследования в семьях, представленных несколькими поколениями. Зная характер наследования в семьях, можно установить, является ли данное генетическое заболевание аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным, X-сцепленным доминантным или X-сцепленным рецессивным. В случае X-сцепленного заболевания его ген расположен на X-хромосоме, для аутосомных болезней хромосомная локализация гена неизвестна. Термин «аутосомный» относится к 22 парам неполовых хромосом (аутосом) человека. Аутосомное наследование – это не сцепленное с полом наследование какого-либо признака.

Доминантным называют такое состояние, когда для проявления заболевания достаточно присутствия одного мутантного аллеля данного гена. (Напомним, что аллель – одна из двух или нескольких альтернативных структурных форм гена). В случае рецессивного заболевания дефектными должны быть оба аллеля. У мужчин в ядре присутствует одна X-хромосома, поэтому большинство X-сцепленных генов, независимо от того, являются они доминантными или рецессивными, приводят к проявлению заболевания.

Успех в установлении диагноза наследственных заболеваний зависит от того, удастся ли идентифицировать и изолировать (клонировать) конкретный ген. Зная нуклеотидную последовательность гена, можно определить, какую функцию выполняет его продукт в норме, как нарушается эта функция в результате мутации, в какой степени различные мутации в разных экзонах ответственны за проявление заболевания.

Для идентификации генов, ассоциированных с различными заболеваниями, необходимы генетические и физические карты. *Генетическая карта (карта сцепления)* показывает расположение определенных сайтов (локусов) вдоль хромосомы. (Лocus – место на хромосоме, где находится специфический ген). Для построения полных карт сцепления необходимо, чтобы локусы каждой хромосомы были представлены часто встречающимися аллелями, и чтобы можно было легко идентифицировать каждый из них. *Физическая карта* – это набор упорядоченных клонов ДНК, охватывающих всю хромосому или какую-то ее область. Непрерывный набор клонов, охватывающих данную область хромосомы или всю хромосому, называют *контигом*. Длина участка, охватываемого контигом, выражается в парах нуклеотидов. Физическая карта, состоящая из контигов, служит основой при построении окончательной физической карты, которая представляет собой полную нуклеотидную последовательность хромосомы.

В настоящее время полная нуклеотидная последовательность каждой из хромосом человека уже определена. Более того, идентифицирована значительная часть генов, определена их структура. На II съезде токсикологов России (ноябрь, 2003 года) было указано, что в ближайшие три года будет создана материальная база для создания генетического паспорта населения.

Картирование генов. Чтобы картировать ген в специфическом районе хромосомы, можно идентифицировать сцепленные с ним маркерные сайты, используя для этого метод ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) и STRP-картирование. Полиморфные сайты рестрикции определяют с помощью специфичных рестриктаз и они образуют маркерные локусы на той хромосоме, где они присутствуют. ПДРФ-анализ основан на гибридизации зонда с рестрицированной ДНК. Метод трудоемок и дает ошибки. Генетический статус каждого ПДРФ-локуса на одной хромосоме называют гаплотипом. Определение аллелей ПДРФ-локуса (или любых других полиморфных локусов), присутствующих на хромосомах данного индивидуума, называется гаплотипированием (генотипированием, ДНК-типированием). (Напомним, что гаплотип – комбинация аллелей на одной хромосоме диплоидного организма). Наследование ПДРФ-локусов происходит в соответствии с законами Менделя. Уже идентифицированы тысячи ПДРФ-локусов, благодаря чему значительно увеличилось число аллелей, которые можно использовать для генетических исследований. Сцепление между ПДРФ-локусом (локусами) и геном того или иного заболевания можно установить, подсчитав «парный» («двухлокусный») лодбалл для гаплотипированных семей, в которых выявлены случаи изучаемого генетического заболевания.

В геноме человека в большом количестве (>100000) встречаются другие полиморфные локусы, содержащие простые повторяющиеся элементы из двух, трех или четырех пар нуклеотидов – короткие тандемные повторы (STR, от англ. short tandem repeats); они легко регистрируются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время для картирования генома человека чаще используется STRP-метод. В отличие от ПДРФ-зондов, которые необходимо клонировать в векторе, очищать и метить, в случае STRP-локусов нужна информация лишь о нуклеотидной последовательности пары праймеров (см. описание ПЦР), которая может храниться в компьютерной базе данных.

Для оценки сцепления между маркерным сайтом и геном заболевания используют метод максимального правдоподобия.

Порядок расположения ПДРФ и STRP-сайтов на хромосоме определяют при помощи анализа наследования гаплотипов в группе семей, представленных тремя поколениями и имеющих большое количество детей (СЕРН-семей). СЕРН – Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) в Париже имеет банк ДНК 65 семей в трех поколениях и имеющих в среднем по 8 детей. Этот банк представляет информацию о генотипах всех членов се-

мей лабораториям всего мира, занимающихся картированием. Этот центр располагает базой данных по генетической и молекулярно-генетической изменчивости популяций человека из большинства регионов земного шара.

Кроме того, порядок расположения на хромосоме уникальных сайтов идентифицируют при помощи ПЦР (STS, от англ. sequence tagged sites). STS – это короткий однокопийный участок ДНК (примерно 100–300 п.н.), который можно выявить при помощи ПЦР с использованием уникального набора праймеров. Для получения протяженного контига, охватывающего значительный участок хромосомы, требуется большое число STS, находящихся на расстоянии 50–100 т.п.н. друг от друга. Например, для физического картирования хромосомы длиной примерно 2000 миллионов пар нуклеотидов необходимо от 1500 до 3000 STS. Для построения точной физической карты всего генома человека их нужно по меньшей мере 30000.

Физические карты хромосом (контиги) строят на основе геномных библиотек, содержащих крупные (YAC, BAC, PAC) и небольшие (космиды, P1, λ) фрагменты ДНК человека, используя STS-картирование или другие подходы, в том числе геномную дактилоскопию.

Праймер-опосредованная прогулка («блуждающая затравка») является одним из методов секвенирования протяженных сегментов ДНК (более 1 тысячи пар нуклеотидов). В этом методе используют праймер, комплементарный концу уже известной последовательности нуклеотидов. На основании данных, полученных на первом этапе, синтезируют новый праймер, перекрывающийся с концом уже секвенированного участка, и используют его для определения нуклеотидной последовательности следующего участка клонированной ДНК. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока не секвенируют весь сегмент.

Транскрипционные карты состоят из участков кДНК и маркерных экспрессируемых последовательностей (EST), расположенных вдоль хромосомы. EST (expressed sequence tags) – короткие кодирующие последовательности ДНК (150–300 нуклеотидов) для каждого экспрессируемого гена человека. С их помощью можно изучать размеры, разнообразие и транскрипционную активность экспрессирующихся генов человека. В настоящее время из идентифицированных 90000 EST выявлено более 10000 соответствующих генам с известным белковым продуктом экспрессии (т.е. с известной функцией генов).

Построение генетических, физических и транскрипционных карт облегчает идентификацию и характеристику генов заболеваний.

Идентификация генов. Аутентичность обнаруженного гена человека можно считать доказанной, если у больных индивидов в нем найдены изменения, отсутствующие в генах здоровых лиц. Для выявления мутаций часто используют анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP – single-strand conformational polymorphism).

Для идентификации нужного гена человека используют четыре ме-

тогда:

1. *Функциональное картирование*: на основе данных о геномном продукте синтезируют зонды для скрининга кДНК-библиотеки. Положительный кДНК-клон, содержащий кодирующую область гена-мишени, используют для отбора геномных клонов и характеристики гена в целом. Последовательность операций: белок с известной функцией → определение аминокислотной последовательности → реконструкция нуклеотидной последовательности → синтез олигонуклеотидного зонда → выделение кДНК-клона → отбор геномного клона → характеристика геномного клона → выявление мутаций.

2. *Кандидатное картирование* основывается на выборе генов, которые по имеющимся данным могут отвечать за данное генетическое заболевание. В этом случае проводят поиск мутаций в генах-кандидатах у больных и здоровых индивидов и по результатам поиска делают вывод, какой из них является геном заболевания. Последовательность операций: генетическое заболевание → анализ симптомов → выбор возможного белка-кандидата → выбор гена-кандидата → выявление мутаций.

3. *Позиционное картирование* применяют в тех случаях, когда ничего не известно ни о возможном гене заболевания, ни о его продукте. Этот подход весьма трудоемок и имеет множество модификаций. Сначала, используя ПДРФ- или STRP-зонды и данные о семьях с исследуемым наследственным заболеванием, определяют район хромосомы, в котором локализован искомый ген. Затем с помощью зондов, специфичных в отношении тесно сцепленных с ним маркеров, выявляют клоны, охватывающие район локализации гена заболевания. Проверяют геномные клоны или полученные из них субклоны на наличие в них экзонов. Используя данные о нуклеотидных последовательностях различных экзонов, в той или иной степени соответствующих нуклеотидной последовательности гена заболевания, разрабатывают стратегию поиска мутаций. Последовательность операций: генетическое заболевание → картирование с точностью до хромосомного сайта → выделение геномных клонов, охватывающих картированный сайт → идентификация и анализ экзонов разными методами → выделение кДНК-клона → отбор геномного клона → характеристика геномного клона → применение мутационного анализа.

4. *Позиционно-кандидатное картирование* состоит в картировании гена заболевания в определенном районе хромосомы, просмотре функциональных генов и маркерных экспрессируемых последовательностей (EST), локализованных в том же хромосомном районе, и выборе тех из них, которые могут являться искомым геном. Чтобы определить, какой именно из генов-кандидатов является таковым на самом деле, используют мутационный анализ.

Программа «Геном человека». «Геном человека» – это крупномасштабная исследовательская программа, конечной целью которой является полное секвенирование генома человека. Официально работа над программой начата 1 октября 1990 года. Стоимость секвенирования пары оснований около 0,3 доллара США. Предполагалось, что при помощи 30 автоматических секвенаторов, работающих круглые сутки, и полного набора физических карт космидных клонов можно будет секвенировать примерно 3000 миллионов пар нуклеотидов ДНК за 6 лет, потратив на это около 1 миллиарда долларов США. Различные направления программы включают:

- построение генетических и физических карт всех хромосом человека с высоким разрешением;
- секвенирование геномов различных модельных организмов типа

E. coli, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *M. musculus*, *A. thaliana*;

– создание компьютерных технологий для обработки и анализа данных по генетическому и физическому картированию и секвенированию ДНК;

– информирование общественности по всем проблемам, связанным с получением и использованием данных по генетике человека, изучение этических, правовых и социальных аспектов генетических исследований.

Считают, что геном человека будет секвенирован к 2005 г.

Общие представления о лечении наследственных заболеваний

Классический подход:

1. Выявление наследуемого заболевания по накоплению метаболита, находящегося выше дефектного фермента (накопление в крови, тканях, повышенное содержание в моче и других жидкостях) или по выявлению ферментативного дефекта в клетках (ядросодержащие клетки крови, биопсии).

2. Исключение из пищи метаболита, который не превращается из-за дефекта фермента; из-за накопления этого метаболита или его продуктов превращения страдают жизненно важные ткани (чаще всего, нервная).

3. Перевод ребенка на кормление искусственной диетой, лишенной неспособного к нормальному превращению и токсичного метаболита, но обогащенной веществами, которые в норме получают из этого метаболита. Например, при фенилпировиноградной олигофрении из-за дефекта гидроксилазы фенилаланина накапливается фенилаланин, который, трансаминируясь, превращается в фенилпироват (фенилкетонурия). Фенилпироват является причиной развития олигофрении. Если вовремя обнаружить этот дефект, то следует перевести ребенка на питание без фенилаланина, но с тирозином (фенилаланин – незаменимая аминокислота и при ее поступлении в норме из нее образуется важнейшая аминокислота тирозин, используемая для синтеза белков, гормонов щитовидной железы, катехоламинов, меланина и др.).

Генно-инженерный подход:

1. При генной терапии *ex vivo* «терапевтический ген» переносят в изолированные клетки больного с помощью ретровирусных векторов или других систем доставки. Трансдуцированные клетки культивируют и вводят (возвращают) пациенту. При такой операции отсутствует иммунологическая реакция отторжения введенных клеток, так как имеет место ауто-трансплантация.

2. При генной терапии *in vivo* «терапевтический ген» вводят непосредственно в клетки ткани-мишени больного (с помощью вирусных технологий, микроинъекция ДНК, бомбардировка покрытыми ДНК частицами и др.). Важным моментом такой терапии является адресная доставка гена в нужные клетки.

3. С помощью «антисмысловых» олигонуклеотидов можно полностью или частично подавить экспрессию гена того или иного наследственного заболевания. При этом введенный в клетку-мишень «антисмысловой»

олигонуклеотид гибридизуется со специфической иРНК и блокирует ее трансляцию.

4. Ведется интенсивное изучение возможности применения других олигонуклеотидов: модифицированных с помощью генетической инженерии рибозимов, расщепляющих специфические иРНК (в данном случае ферментативную активность проявляют не белки, а олигонуклеотиды!); аптамеры, которые связываются со специфическими белками и блокируют их функции и др.

5. Перспективный вариант заключается в изменении генотипа клеток зародышевой линии (сперматозоидов или яйцеклеток) или оплодотворенных яйцеклеток (зигот), чтобы все клетки развившегося из них индивидуума имели «исправленные» гены. В этом случае генетические изменения будут передаваться из поколения в поколение.

Контроль применения генно-инженерных методов

Внедрение молекулярной биотехнологии и генной инженерии сопровождается решением ряда смежных проблем – этических, правовых, экономических и социальных. Уже при возникновении этих наук были высказаны опасения по поводу безопасности технологии рекомбинантных ДНК. Ученым пришлось наложить мораторий на некоторые исследования в этой области до принятия официальных правил работы с рекомбинантными микроорганизмами. Согласно этим правилам, эксперименты можно было проводить только с теми из них, которые неспособны размножаться вне лаборатории, а сами исследователи должны были быть защищены от какой бы то ни было опасности (1974–1975 гг.). Широко распространено мнение, что попадание генетически модифицированных организмов в окружающую среду может привести к неконтролируемому распространению их в экосистемах.

Контроль экспериментов с рекомбинантными ДНК. В 1976 г. Национальные институты здравоохранения США (НИИ, от National Institutes of Health), финансирующие и координирующие этот тип исследований, издали инструкцию, в которой:

- сформулировано требование, чтобы в качестве хозяев для чужеродных ДНК использовались только микроорганизмы, неспособные размножаться и передавать свою ДНК другим микроорганизмам вне лаборатории;

- рекомендовалось работы с патогенными микроорганизмами проводить в боксах с отрицательным давлением;

- предлагалось работы с микроорганизмами проводить в помещениях, оборудованных высокоэффективными системами фильтрации;

- полностью запрещались эксперименты с преднамеренным высвобождением в окружающую среду любых организмов, содержащих реком-

бинантную ДНК.

Однако само создание генетически модифицированных организмов (ГМО), способных выживать в природных экосистемах, было неизбежным. И тогда был создан Консультативный комитет НИИ по рекомбинантным ДНК (NIH Recombinant DNA Advisory Committee, NIH-RAC). Он должен был контролировать исследования, связанные с рекомбинантными ДНК, и при необходимости изменять действующие правила.

До настоящего времени три проблемы еще не нашли адекватного решения:

- как контролировать производство и потребление пищевых продуктов, содержащих генетически измененные организмы или полученных с их использованием;
- как контролировать преднамеренное высвобождение ГМО в окружающую среду (военные разработки, терроризм);
- как контролировать лекарственные препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

Производство и использование объектов генной инженерии

1. Производство и потребление пищи. В большинстве стран имеются Центры сертификации и контроля пищевых продуктов и пищевых добавок. Одним из первых такой центр был создан в США – Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA, от Food and Drug Administration). Документы и Правила FDA явились основой для многих национальных Центров сертификации и контроля пищи. Каждый продукт должен пройти тестирование на соответствие ряду специфических критериев в зависимости от своей природы, прежде чем он будет разрешен к употреблению человеком.

Приведем поучительные примеры сертификации пищевых продуктов, полученных генно-инженерными технологиями, заимствованными из книги Б. Глика и Дж. Пастернака, 2002.

– При лицензировании нового продукта учитывается его сходство с известным продуктом. При производстве сыра используют химозин. Это фермент, получаемый из четвертого отдела желудка (сычуга) жвачных животных. Химозин сбраживает молоко путем гидролиза капа-казеина. Образующийся сгусток ферментируется с образованием сыра. Чтобы обеспечить надежный и экономически выгодный источник химозина, его ген клонировали и экспрессировали в *E. coli* K-12. Готовый фермент выделяли из бактериальных клеток.

В FDA была направлена просьба дать разрешение на коммерческое использование рекомбинантного химозина при производстве сыров. Здесь было принято решение, что если рекомбинантный химозин идентичен природному ферменту, то дополнительное тестирование проводить не обязательно. Действительно, идентичность клонированного и природного генов химозина была подтверждена рестрикционным картированием, ДНК-гибридизацией и секвенированием ДНК. Рекомбинантный химозин обладал такой же молекулярной массой, что и природный очищенный химозин телянка и оди-

наковой биологической активностью. Безопасность применения рекомбинантного химозина была доказана: а) отсутствием загрязнения препарата ДНК или клетками, б) нетоксичностью для человека *E. coli* K-12, в) отсутствием негативных эффектов в опытах на животных.

– В течение 1989–1990 гг. в США отмечалось резкое увеличение встречаемости обычно редкого синдрома эозинофилии-миалгии (СЭМ): изнурительные мышечные боли и даже смерть от спазма дыхательных путей. Оказалось, что большинство пациентов с СЭМ принимали в больших количествах пищевую добавку с триптофаном, причем ее производила одна и та же фирма. Ранее аналогичные пищевые добавки других фирм такого эффекта не давали. Оказалось, что все партии «некачественного» триптофана были получены с помощью штамма генетически трансформированных бактерий, специально сконструированного для того, чтобы обеспечить сверхпродукцию триптофана. Процесс получения триптофана и контроль качества продукции были аналогичными, как и при использовании основного микробного продуцента. Была изменена лишь стадия очистки. Фирма посчитала это не существенным и не провела тестирования на безопасность препарата. При расследовании оказалось, что в продукте генетически модифицированного штамма, кроме триптофана, присутствует 1-1'-этиленбис[триптофан]. Это вещество и индуцировало синдром СЭМ. Но в углубленных исследованиях оказалось, что и сам триптофан в высоких дозах способствует развитию СЭМ. В связи с этим даже очищенный L-триптофан запрещен к использованию человеком в США.

Это имеет и дополнительное следствие. Известно, что из 8 незаменимых аминокислот в растительных экстрактах содержится 7: отсутствует триптофан. Просто создать биологически полноценную пищевую добавку на основе растительных экстрактов с добавлением триптофана. Однако риск развития синдрома СЭМ привел к запрету таких пищевых добавок во многих странах мира.

– В конце первой трети XX века было установлено, что введение бычьего соматотропина (БСТ) коровам повышает их удои. Природный БСТ дорог, поэтому ген БСТ был клонирован в *E. coli*, синтезированный рекомбинантный БСТ выделен из бактериальных клеток и очищен. Его применение повысило удои коров на 25–30%. Рекомбинантный БСТ был всесторонне проверен и FDA дала разрешение на его коммерческое использование. Однако возникли две группы противников, которые пытались заблокировать положительное решение FDA: первая доказывала, что применение рекомбинантного БСТ разорит многих мелких фермеров, вторая доказывала, что рекомбинантные гормоны могут вызывать развитие опухолей у человека. Эти экономические и социально-медицинские доводы не стали основанием для отмены лицензирования БСТ в США. Однако во многих других странах до сих пор существует временный запрет на продажу молока от коров, получающих рекомбинантный БСТ.

2. Высвобождение организмов, полученных с помощью методов генной инженерии, в окружающую среду регулируется на основании жестких правил, регламентирующих полевые испытания организмов. В настоящее время за оценку заявок, предусматривающих контролируемое высвобождение ГМО в окружающую среду, в США отвечают Агентство по охране окружающей среды и Министерство сельского хозяйства. Например, тестирование генетически модифицированного штамма микроорганизма *Pseudomonas syringae*, созданного для снижения уровня повреждения растений при заморозках. Генетическое модифицирование *P. syringae* включало удаление гена, который кодирует белок, ответственный за образование кристаллов льда. Тестирование должно было оп-

ределить, способен ли модифицированный штамм при распылении на листьях растений предотвращать их повреждение при заморозках. Получая заявки на проведение полевых испытаний ГМО, NIH-RAC предпринимал такие же действия, как и для тестирования экспериментов с рекомбинантными ДНК, а именно:

- заявки включались в Федеральный регистр США;
- информация о них рассылалась 3000 заинтересованным лицам;
- предложения рассматривала коллегия экспертов;
- каждое предложение обсуждалось на открытых слушаниях;
- параллельно заявки рассматривались и самим NIH-RAC, а также Министерством сельского хозяйства США.

NIH-RAC вынес положительное решение. Но в этот же день в суд был подан иск Фондом экономической политики, находящимся в оппозиции к генной инженерии, и решение NIH-RAC было заблокировано. Тем самым было продемонстрировано, что, несмотря на научно обоснованное мнение NIH-RAC и заключение работающих в нем экспертов, существующие нормы, регулирующие полевые испытания ГМО, нельзя признать адекватными. Считали, что попадание генетически модифицированного организма в окружающую среду может иметь отдаленные последствия, поскольку живые микроорганизмы размножаются, персистируют и распространяются в окружающей среде и иногда передают свою генетическую информацию другим микроорганизмам. Некоторые критики утверждали, что генетически модифицированные организмы вытеснят существующие виды из их экологических ниш, что приведет к серьезным неблагоприятным изменениям в окружающей среде. Высказывалось опасение, что гены могут передаваться от ГМО природным штаммам, а значит, могут появиться (хотя и непредумышленным путем) экологически опасные организмы.

После сложной экспертизы Агенством по охране окружающей среды было выдано разрешение на проведение полевых испытаний. Однако, местные жители, обеспокоенные высвобождением ГМО в окружающую среду в непосредственной близости от их домов, получили решение суда о временной приостановке таких испытаний.

К настоящему времени установлено, что внесенные в окружающую среду ГМО не распространяются за пределы участка, где проводится тестирование, не персистируют, не передают свои гены природным микроорганизмам и проявляют сходную биологическую активность как в лабораторных, так и в природных условиях.

Испытания трансгенных рыб, млекопитающих требуют специальных условий для защиты окружающей среды. В отличие от этого испытания трансгенных растений менее строги. Законодательство различных стран существенно отличается. Так, в США трансгенные растения, несущие ген токсина *Bacillus thuringiensis*, в том числе кукуруза, соя, картофель и хлопок, были утверждены к использованию всеми компетентными организациями. Но во Франции или на Филиппинах эти растения запрещены к использованию.

3. Возможность генетического изменения человека всегда вызывала серьезные беспокойства. С методологической точки зрения генная инженерия человека подразделяется на генную терапию соматических клеток и генную терапию клеток зародышевой линии. Поскольку генная терапия клеток зародышевой линии может оказать нежелательное воздействие на последующие поколения, в настоящее время она запрещена. В то же время генная терапия соматических клеток становится все более важным методом лечения различных заболеваний человека.

4. После того как в 1997 г. удалось клонировать млекопитающее – овечку Долли, вопрос о клонировании человека будоражит биологов, ме-

диков и общественность. В настоящее время все эксперименты по клонированию человека в большинстве стран запрещены.

Существуют ли правила для испытания химических продуктов, результатов генно-инженерных экспериментов?

Понятие о GMP, GLP и GCP. Для изучения фармакологической активности химических веществ и безопасности их воздействия на человека используют правила GLP и GCP.

1. Правила добротного и безопасного производства (GMP – Good Manufacturing Practice) включают требования к биотехнологическому производству. Здесь учитываются не только технологические процессы получения рекомбинантных белков и других продуктов, но и безопасность производства.

2. Правила GLP. Начиная с 1976 года, когда в США были впервые предложены правила добротной лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP), во многих странах происходит совершенствование технологий доклинического испытания ксенобиотиков – потенциальных лекарств и других биологически активных веществ. Основная цель GLP – обеспечение достоверности результатов доклинических испытаний природных и синтетических ксенобиотиков, гарантирующих их безопасность для человека и животных. В 1992 году в России были приняты Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP, ЗВ 64-126-91). Основные задачи Правил:

- обеспечить высокое качество и надежность доклинических испытаний безопасности фармакологических средств;
- создать современную и функционально-надежную административную структуру испытательного центра для выполнения доклинических исследований в соответствии с международными требованиями;
- разработать и внедрить в практику центра четкую документацию доклинических испытаний (протокол, стандарты на методы исследований, форму регистрации данных и заключительного отчета);
- определить требования к испытуемым веществам и эталонным препаратам;
- обеспечить испытание стандартными биомоделями на животных и гарантировать необходимые условия их содержания, кормления, использования в эксперименте и гуманное обращение;
- создать службу качественной оценки проведенных испытаний, правила их контроля и выдачи заключения по результатам проверки.

Сферой обязательного применения Правил являются:

- доклинические испытания субстанций, безопасность которых оценивается, должны явиться объектом применения Правил GLP;
- изучение общетоксического действия (острая, подострая, хроническая токсичность, местное раздражающее действие, цитотоксичность);
- оценка специфической токсичности (антигенность, тератогенность,

- мутагенность, канцерогенность, лекарственная зависимость);
- исследование всасывания, распределения, выделения, метаболизма и биодоступности;
- изучение фармакологического действия на основные функциональные системы организма.

В Правилах рассматриваются:

- административная структура испытательного центра или структурного подразделения организации, проводящих доклиническую оценку безопасности фармакологических средств;
- основные требования к экспериментально-биологической клинике;
- основные правила содержания лабораторных животных;
- требуемые характеристики испытуемых и контрольных веществ;
- используемые приборы, оборудование и их метрологический контроль;
- перечень обязательных стандартов на операции, проводимые в доклинических исследованиях;
- требования к документации;
- основные требования к объему доклинических испытаний.

Изучение безопасности ксенобиотиков (новых оригинальных потенциальных лекарственных средств) проводится в полном объеме: общая токсичность (острая, подострая, хроническая, местное раздражающее действие, цитотоксичность), специфическая токсичность (лекарственная зависимость, антигенность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность), фармакокинетические исследования (всасывание, распределение, выделение, метаболизм, биодоступность), общепармакологическое действие и пирогенность инъекционных ксенобиотиков.

3. Правила GCP. Правила проведения клинических испытаний химических веществ – лекарственных средств (Good Clinical Practice – GCP) представляют собой международный этический и научный стандарт качества для планирования и проведения исследований на людях, а также документального оформления и представления их результатов. Требования данных правил должны соблюдаться при проведении клинических испытаний лекарственных средств, результаты которых утверждаются государственными органами.

Безопасность пищевых продуктов и пищевых ингредиентов, в том числе добавок, придающих продуктам специфический вкус и запах, должна быть гарантирована еще до получения лицензии, разрешающей их введение в товарооборот и подтверждающей, что такие продукты можно употреблять в пищу. Правила, регламентирующие проведение экспериментов с рекомбинантными ДНК, были разработаны Национальными институтами здравоохранения США в конце 70-х годов прошлого века и пересмотрены спустя 10 лет. В России с 1 июля 1999 г. вступило в силу постановление Министерства здравоохранения РФ «О порядке гигиениче-

ской оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников». Согласно этому документу гигиеническая экспертиза пищевых продуктов и продовольственного сырья, а также компонентов (фрагментов) для их производства, полученных из генетически модифицированных источников должна включать определение носимой последовательности генов, маркерных генов антибиотиков, промоторов, стабильности генетически модифицированных организмов на протяжении нескольких поколений, а также санитарно-химические показатели качества и безопасности, результаты токсикологических исследований на лабораторных животных, оценку аллергенных свойств продукта, возможных мутагенных, канцерогенных и тератогенных эффектов. Кроме этого, обязательна технологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированного сырья – органолептических свойств и физико-химических параметров. В Республике Беларусь аналогичные функции выполняет государственное предприятие «Республиканский центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». Научные и практические санитарно-гигиенические исследования ведет сеть областных центров, возглавляемая научно-исследовательским институтом.

Патентование биотехнологических изобретений. Самая важная форма интеллектуальной собственности для биотехнологии – это изобретение. Изобретение охраняется патентом, который представляет собой законный документ, обеспечивающий исключительные права патентовладельца на коммерческое использование изобретения. Более того, опираясь на формулу изобретения, защищенную патентом, патентовладелец имеет право разрабатывать другие продукты, которые могут быть получены на основе его изобретения. Конкуренты вынуждены покупать для этого права на использование изобретения. Патент – это общедоступный документ, который содержит подробное описание изобретения и таким образом информирует третьи лица о сущности новшества и его ограничениях.

Ключевым в признании генетически модифицированных микроорганизмов охраноспособными стало судебное решение, касающееся рекомбинантных бактерий, созданных А. Чакрабарти. В 1980 г. Верховный суд США постановил, что на бактерии, полученные в результате генетических манипуляций, может быть выдан патент. Традиционно патентуются микроорганизмы; разработаны нормы, согласно которым селекционерам предоставляются права на новые сорта растений; в США и Европе запатентована трансгенная мышь («онкомышь»), несущая активируемый ген, отвечающий за формирование опухоли; охраноспособными изобретениями считаются растения, полученные с помощью методов генной инженерии.

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Работа 1. Введение в лабораторный практикум по генной инженерии.

Обычное оборудование для молекулярно-биологических исследований: автоматические микропипетки, наконечники для пипеток в штативах (автоклавированные и высушенные), настольная микроцентрифуга, микроцентрифужные пробирки Эппендорф на 1,75 мл (стерилизованные в закрытом фольгой стакане из пирекса), измельченный лед, плавающий штатив из полистирола для пробирок типа Эппендорф, водяные бани для неподвижной инкубации, кипящая водяная баня, морозильники (-20°C и -80°C), холодильник, термостаты, электронные весы, магнитные мешалки, миксер, пластиковая одноразовая посуда (чашки Петри, пробирки, пипетки и пр.), средства защиты (одноразовые резиновые перчатки, халаты, маски, фартуки и пр.), стерильные боксы или ламинары, емкости с дезинфицирующим раствором для сбора отходов, контейнеры для сбора загрязненных бактериями или радионуклидами наконечников).

Примеры антибиотиков, используемых при селекции бактерий

Наименование	<i>E.coli</i> , мкг/мл	<i>A.tumefaciens</i> , мкг/мл	Исходный раствор, мг/мл	Растворитель
Ампициллин	50,0	-	25,0	Вода
Карбенициллин	100,0	100,0	50,0	Вода
Канамицин	100,0	100,0	100,0	Вода
Рифампицин	100,0	100,0	50,0	Метанол
Тетрациклин	15,0	2,5	12,5	Этанол
Стрептомицин	12,5	300,0	900,0	Вода
Спектиномицин	50,0	100,0	50,0	Вода
Цефотаксим	-	250,0	250,0	Вода

Все водорастворимые антибиотики стерилизуют фильтрованием (размер пор фильтра 0,22 мкм), а затем хранят в виде замороженных исходных растворов при -20°C. Канамицин и карбенициллин относительно стабильны и часто могут сохраняться без разрушения до 1 мес при 4°C. Рифампицин и тетрациклин следует взвесить в стерильных пробирках и затем добавить необходимое количество метанола или этанола соответственно. После тщательного встряхивания антибиотики должны раствориться и также будут стерильны. Следует готовить такие количества растворов антибиотиков, которые следует расходовать за 2-3 недели. При комнатной и более высоких температурах и на свету многие антибиотики быстро разрушаются и теряют активность. Антибиотики можно добавлять непосредственно в жидкую среду или в расплавленную и охлажденную (45-55°C) агаризованную твердую среду.

Общие молекулярно-биологические рекомендации.

Для полной уверенности в том, что ферментативные реакции происходят предсказуемо и воспроизводимо, пробы не содержат примесей других, неспецифичных нуклеиновых кислот и нужные молекулы ДНК не деградируют во время манипуляций, необходим опыт практической работы. Источником значительных нуклеазных загрязнений может быть кожа рук и, следовательно, необходимо принимать меры предосторожности от возможного загрязнения. Назовем некоторые из них.

- Растворы лучше хранить в посуде из пирексного стекла, так как натриевое стекло содержит выщелачиваемые примеси.

- Стекланные и термостойкие пластиковые пробирки моют хромпиком, замачиваются и вымываются щеткой в присутствии детергента, тщательно ополаскиваются бидистиллированной водой, автоклавируются 15 мин при 121°C и высушиваются перед использованием.

- Супернатанты после центрифугирования бактериальных культур сливают в контейнеры с дезинфицирующим раствором. При повторном использовании загрязнен-

ной пластиковой или стеклянной посуды перед мытьем ее следует замочить в дезинфицирующем растворе или автоклавировать. Все многократно используемые приспособления, загрязненные в процессе контакта с суспензиями или экстрактами бактерий, перед повторным использованием следует простерилизовать.

- Все стекло, предназначенное для манипуляций в непосредственном контакте с РНК-содержащими растворами, перед использованием, кроме описанной процедуры мытья, следует силиконировать и прогреть в суховоздушном шкафу при температуре 180°C в течение 2 ч.

- Одноразовые пластиковые наконечники и микроцентрифужные пробирки перед использованием необходимо автоклавировать, высушить и перенести в штативы, используя при этом чистые одноразовые перчатки.

- В течение всего времени работать за столом следует в сменных перчатках.

- Для приготовления растворов следует использовать воду высокой чистоты, как минимум, деионизованную и дистиллированную.

- Для приготовления растворов необходимо использовать реактивы по крайней мере квалификации ХЧ (analytical grade).

- Во избежание перекрестных загрязнений и попадания РНКаз при взвешивании реактивов не следует пользоваться шпателями.

- Большинство растворов перед хранением автоклавируют или стерилизуют фильтрованием.

- Концентрированные растворы рестриктаз и других ферментов, модифицирующих ДНК, следует хранить при -20°C, а непосредственно перед употреблением перенести в лед. Оставшиеся ферменты сразу же следует поместить в холодильник на -20°C.

- Для уверенности в точности и воспроизводимости используют автоматические пипетки, регулярно проверяя их точность и меняя наконечники перед каждой операцией.

- Два часто используемых вещества, фенол и бромистый этидий, чрезвычайно опасны, их необходимо применять очень осторожно. Пятно фенола, покрывающее участок кожи размером в две ладони, может быть опасным для жизни, поэтому важно всегда иметь под рукой раствор ПЭГ 3000/этанол (7:3, масса на объем), которым необходимо сразу же обработать пораженную поверхность. Бромистый этидий является мутагеном и его контактов с кожей следует избегать.

Работа 1. Выделение небольших количеств ДНК с помощью СТАВ-буфера

Реагенты и оборудование

1. Однократный СТАВ-буфер для экстракции (50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 0,7 М NaCl; 10 мМ ЭДТА; 1%-ный СТАВ (масса на объем), 20 мМ 2-меркаптоэтанол). На 100 мл: 2,0 М трис-НСl, рН 8,0 2,5 мл; 5,0 М NaCl 14 мл; 0,5 М ЭДТА 2,0 мл; СТАВ (Sigma H-5882) 1,0 г; 2-Меркаптоэтанол (2-МЭ) 140 мкл. Раствор вначале следует приготовить без 2-МЭ, избегая пенообразования, на подогреваемой мешалке, затем его автоклавируют и хранят при температуре выше 15°C. Непосредственно перед использованием добавляют соответствующую аликвоту 2-МЭ.

2. Однократный СТАВ-буфер для осаждения (50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 10 мМ ЭДТА, 1%-ный (масса на объем) СТАВ). На 100 мл: 2,0 М трис-НСl, рН 8,0 2,5 мл; 0,5 М ЭДТА 2,0 мл; СТАВ – готовят так же, как и для СТАВ-буфер для экстракции.

3. 10%-ный СТАВ (10% масса на объем СТАВ, 0,7 М NaCl). На 100 мл: СТАВ 10,0 г; 5,0 NaCl 14,0 мл.

4. 1 М NaCl (стерильный).

5. Стерильная дистиллированная вода.

- Смесь хлороформ/октанол (24:1) в обычном стеклянном флаконе.

- Растворы спирта (100-, 85- и 65%-ный спирт).

Ход выделения

1. Взвешивают 0,1 г лиофилизированного каллуса или 0,07 г лиофилизированных листьев с удаленными главными жилками. Надев респиратор, растирают ткань с 0,3 г окиси алюминия в небольшой ступке с пестиком (диаметром 9 см).
2. Помещают растертую в порошок растительную ткань в пробирку Эппендорф. Добавляют 600 мкл однократного СТАВ-буфера для экстракции и осторожно размешивают порошок пластмассовой мешалкой. Инкубируют 10-20 мин при 56°C. Время от времени необходимо постукивать по дну пробирки, чтобы перемешивание проходило интенсивнее.
3. Добавляют 600 мкл смеси хлороформ/октанол и эмульгируют встряхиванием. Центрифугируют 2 мин в микроцентрифуге и переносят водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку Эппендорф.
4. Промывают интерфазу, образованную денатурированным белком, в исходной пробирке 100 мкл однократного СТАВ-буфера для экстракции. Вновь центрифугируют, удаляют водную фазу и соединяют ее с первой.
5. Добавляют 0,1 объема 10%-ного СТАВ (70 мкл) к собранной водной фазе и перемешивают. Повторяют экстракцию смесью хлороформ/октанол.
6. Стараясь не захватить клеточный дебрис, переносят водную фазу в силиконированную центрифужную пробирку из пирекса либо в устойчивую к хлороформу пластмассовую пробирку. Добавляют равный объем СТАВ-буфера для осаждения (600 мкл), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин.
7. Осаждают центрифугированием в настольной центрифуге (2000 g, 15 мин). Удаляют супернатант и высушивают осадок. Если осаждения не происходит, центрифугируют при больших скоростях в силиконированных пробирках.
8. Вновь растворяют осадок нуклеиновая кислота-СТАВ в 400 мкл NaCl, при необходимости нагревая его до 56°C. Переносят раствор в стерильную пробирку Эппендорф.
9. После окончательного растворения осадка добавляют два объема (800 мкл) этанола, перемешивают и оставляют при -70°C (сухой лед/этанол) на 30 мин либо на ночь при -20°C.
10. Осаждают выпавшие в осадок нуклеиновые кислоты в микроцентрифуге (2 мин) и промывают 1 мл 65%-ного этанола в течение 1 мин. Сливают этанол и промывают осадок еще два раза. Аналогичным образом промывают осадок 85%-ным этанолом. Если в какой-нибудь момент осадок взмутится, осаждают его в микроцентрифуге.
11. Высушивают осадок в вакуумном эксикаторе и вновь растворяют нуклеиновые кислоты в 85 мкл стерильной дистиллированной воды. Хранят при -20°C.
12. Определяют концентрацию ДНК путем реакции с дифениламином. Данный метод в зависимости от типа ткани дает выход от 50 до 200 мкг ДНК на 0,1 г лиофилизированного материала.

Работа 2. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот

Принцип метода. В основе спектрофотометрического метода определения суммарного содержания нуклеиновых кислот, разработанного А.С. Спириным, лежит экстракция их из биологического материала горячей хлорной кислотой с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм.

РЕАКТИВЫ

НСlO₄, 0,2 н и 0,5 н растворы.

ХОД РАБОТЫ

100–200 мг измельченной на холоду ткани помещают в центрифужную пробирку с 5–10 мл охлажденного 0,2 н раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием при 3000 g, 10 мин при охлаждении. Центрифугат отбрасывают и осадок повторно отмывают хлорной кислотой. Такая обработка необходима для удаления кислоторастворимых нуклеотидов. К осадку добавляют 5–10 мл 0,5 н раствора хлорной кислоты и, закрыв пробирки пробками с воздушными холодильниками, нагревают их в кипящей водяной бане 30 мин. Эта процедура необходима для количественной экстракции нуклеиновых кислот из исследуемой ткани и кислотного гидролиза. Гидролизаты охлаждают и центрифугируют. Осадок подвергают повторной экстракции 0,5 н раствором хлорной кислоты. Гидролизаты объединяют, учитывают объем и определяют поглощение на спектрофотометре при 270 и 290 нм против 0,5 н раствора хлорной кислоты. При необходимости гидролизат разводят тем же раствором. Рассчитывают содержание фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл исследуемого раствора по формуле: $C_{\text{мкг фосфора}} = A_{270} - A_{290}/0,19$, где 0,19 – значение ΔA ($A_{270} - A_{290}$), которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора. При дальнейших расчетах учитывают общий объем гидролизата и разведения. Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот пользуются пересчетным коэффициентом 10,3: $C_{\text{мкг НК}} = C_{\text{мкг фосфора}} \cdot 10,3$.

Примечание: для ориентировочного количественного определения нуклеиновых кислот в водных растворах используют измерение оптической плотности при 260 нм.

Работа 3. Количественное определение ДНК колориметрическим методом

Принцип метода. Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, давать синее окрашивание с дифениламиновым реактивом.

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Дифениламиновый реактив, 1% раствор.
2. Водный раствор ДНК.

ХОД РАБОТЫ

1. В опытную пробирку наливают 1 мл водного раствора ДНК и 2 мл дифениламинового реактива. В контрольную пробирку наливают 1 мл дистиллированной воды и 2 мл дифениламинового реактива. Обе пробирки нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность при красном светофильтре (КФК, кюветы шириной 5 мм). При использовании спектрофотометра оптическую плотность определяют при 600 нм.

2. Построение калибровочного графика. В три пробирки помещают

по 1 мл раствора ДНК с концентрациями 50, 100 и 200 мкг/мл соответственно. Добавляют в каждую пробирку по 2 мл дифениламинового реактива и нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрации использованных растворов ДНК, а на оси ординат значения оптической плотности.

Примечание: специфичность реакции на ДНК подразумевает, что такой способ определения в отличие от измерения при 260 нм, позволяет отличить РНК и ДНК. Таким образом, различие в содержании нуклеиновых кислот, определенное с помощью дифениламина и измерения оптической плотности при 260 нм позволяет установить содержание примеси РНК в препарате.

Работа 4. Выделение тотальной РНК из растений.

Главное внимание при выделении РНК должно быть сосредоточено на подавлении активности рибонуклеаз: работать с автоклавированной посудой, высушенной при 150°C; работать в перчатках; РНК хранить в присутствии детергента либо под этанолом при низких температурах; использовать в работе вещества высокой степени очистки без признаков наличия РНКаз.

Реагенты

1. Буфер для растирания (6%-ный 4-аминосалицилат; 1%-ный триизопропилнафталинсульфонат (ТНС); 6%-ный фенол; 50 мМ трис-НСl, рН 8,4).
2. Смесь фенол/хлороформ (50,0% фенола, 48,0% хлороформа, 2% изоамилового спирта, 0,1% 8-гидроксихинолина). Раствор следует готовить заново непосредственно перед употреблением.
3. 4 М ацетат натрия, рН 6,0.
4. Этанол (абсолютный).
5. Стерильная дистиллированная вода (фильтруют через миллипоровый фильтр и автоклавируют).

Ход выделения

1. Быстро готовят необходимые навески свежего растительного материала массой 1-5 г и как можно быстрее замораживают после нарезания в жидком азоте. До использования хранят в жидком азоте.
2. Добавляют 0,5 г окиси алюминия к соответствующему количеству замороженного исходного материала (3 г культуры клеток или 10 г листьев) в предварительно охлажденной ступке и растирают предварительно охлажденным пестиком в мелкий порошок.
3. Добавляя по каплям (2 мл/г ткани) буфер для растирания, продолжают измельчение. Время от времени, чтобы ткань не оттаивала, добавляют жидкий азот. Тщательно растирают ткань и переносят ее в замороженном состоянии в колбу объемом 250 мл.
4. Добавляют равный объем смеси фенол/хлороформ и дают смеси оттаять на льду. Надев защитные очки, периодически встряхивают колбу, чтобы измельченная в порошок ткань равномерно распределилась по всему объему. Когда гомогенат оттает, переносят его в две полиалломерные пробирки объемом 38 мл и перемешивают, переворачивая их. Разделяют фазы центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C.
5. Стараясь не захватить выпавший в осадок белок интерфазы, переносят силиконированной пастеровской пипеткой водную фазу в новые пробирки и трижды повторяют экстракцию смесью фенол/хлороформ.
6. Переносят аликвоты водной фазы объемом 7 мл в четыре пробирки из корекса объе-

мом 30 мл, добавляют 4 М ацетат натрия (рН 6,0) до конечной концентрации 0,2 М и тщательно перемешивают. Добавляют 2,5 объема холодного (-20°C) этанола, перемешивают, переворачивая пробирки, и собирают общий осадок нуклеиновых кислот центрифугированием (10000 об/мин, 4°C, 10 мин). Осадок должен быть белым; если он окрашен, то для удаления примесей следует несколько раз переосадить его спиртом. Осторожно сливают супернатант и тщательно растворяют осадок в минимальном объеме стерильной дистиллированной воды (не более 0,5 мл/г ткани).

7. Добавляют 4 М ацетат натрия до конечной концентрации 3,0 М, тщательно перемешивают, помещают на 2-3 ч на лед и центрифугируют при 10000 об/мин при 4°C 10 мин, чтобы отделить РНК от ДНК. Если осадок не образуется, центрифугируют еще 20 мин. Заново растворяют осадок РНК в минимальном объеме (200-1000 мкл) 0,2 М ацетата натрия и осаждают спиртом.

8. Высушивают в эксикаторе осадок РНК и растворяют его в минимальном объеме (100 мкл) дистиллированной воды. Разводят аликвоту тотального препарата РНК и определяют концентрацию РНК на спектрофотометре (СФ 2000), измеряя оптическую плотность между 200 и 300 нм (1,00 при 260 нм = 37 мкг/мл). По спектру образца можно судить о чистоте препарата. Чистые препараты РНК имеют соотношение оптических плотностей при 260 нм и 280 нм около 2,0.

9. Разводят раствор РНК водой до концентрации 5 мг/мл и хранят в замороженном состоянии (-70°C).

Работа 5. Количественное определение РНК колориметрическим методом

Принцип метода. Метод основан на цветной реакции орцинового реактива с пентозой, входящей в состав РНК.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛ

1. Орциновый реактив (50 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 250 мл концентрированной HCl и перед опытом к нужному количеству этого раствора добавляют орцин из расчета 4,76 мг/мл). 2. Водный раствор РНК.

ХОД РАБОТЫ

1. В опытную пробирку помещают 1 мл раствора РНК и 1 мл орцинового реактива. В контрольную пробирку помещают 1 мл дистиллированной воды и 1 мл орцинового реактива. Обе пробирки помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность при красном светофильтре.

2. В три пробирки наливают по 1 мл раствора РНК с концентрациями 50, 100 и 200 мкг/мл и по 1 мл орцинового реактива. Пробы нагревают на кипящей водяной бане 20 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность проб при красном светофильтре. Построение калибровочного графика аналогично предыдущей работе.

Работа 6. Электрофорез ДНК

Для разделения фрагментов ДНК обычно используют агарозные или полиакриламидные гели. Наиболее распространенные буферные системы приведены в таблице:

Буфер	Состав концентрированного буфера
ТАЕ 50 ×	242 г трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты и 18,6 г ЭДТА

ТБЕ 10 ×	108 г трис, 55 г борной кислоты и 9,3 г ЭДТА
----------	--

Величина рН буфера может варьировать от 7,5 до 8,5, что практически не сказывается на качестве разделения.

А. Электрофорез в агарозных гелях

Агарозные гели, как правило, применяют для разделения ДНК размером более 1 т.п.н. В таблице приведен диапазон эффективного разделения линейных молекул ДНК при различных концентрациях агарозного геля:

% геля	Диапазон (т.п.н.)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Эффективность разделения в агарозном геле не зависит от состава ДНК и температуры. Обычно электрофорез ведут при комнатной температуре. Большое значение имеет напряженность электрического поля, с увеличением которой понижается эффективность разделения. Для достижения максимальной эффективности разделения фрагментов ДНК напряженность не должна превышать 5 вольт на см геля.

Конформация ДНК. Суперскручивание, кольцевая и линейная молекулы ДНК имеют различную подвижность в агарозных гелях. Их относительная подвижность зависит от концентрации геля, напряженности поля, ионной силы буфера. Обычно максимальную подвижность имеет суперскрученная форма, затем линейная, а минимальную – кольцевая.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АГАРОЗНОГО ГЕЛЯ

1. Смешивают необходимые количества агарозы, концентрированного электродного буфера и воды (для агарозных гелей обычно используют ТАЕ, но можно использовать и ТБЕ).

2. Нагревают на водяной бане или на плитке при постоянном перемешивании до полного растворения агарозы.

3. Охлаждают раствор приблизительно до 50°C (температура, которую терпит рука). На этом этапе можно добавить хлористый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл. В этом случае не надо окрашивать гель после проведения электрофореза.

4. Приготавливают ванночку для заливки геля и устанавливают в ней гребенку для формирования карманов таким образом, чтобы между зубьями гребенки и дном ванночки остался просвет около 1 мм.

5. Заливают расплав геля в ванночку и оставьте до полной полимеризации геля.

6. Аккуратно вынимают гребенку и переносят гель в камеру для электрофореза.

7. Заливают в камеру электродный буфер так, чтобы слой буфера над гелем был около 1 мм. В буфер можно добавить бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл.

8. Добавляют в анализируемые образцы 1/10 объема раствора, содержащего 50% глицерин, 0,2% бромфеноловый синий и/или ксиленцианол, тщательно перемешивают и наносят в капманы.

9. Подают необходимое напряжение на электроды. ДНК движется от (-) к (+).

Б. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ (ПААГ)

Для разделения фрагментов ДНК длиной менее 1 т.п.н. используют ПААГ 2-х типов: нативный (без мочевины) для разделения двухцепочечных фрагментов и денатурирующий, содержащий 6-8 М мочевины, - для разделения одноцепочечных фрагмен-

тов.

В таблице приведен диапазон эффективного разделения фрагментов ДНК при различных концентрациях геля:

% акриламида	Нативный ПААГ, п.н.	Денатурирующий ПААГ, п.н.
3,5	100-1000	-
4	-	200
5	80-500	80-200
8	60-400	40-100
12	40-200	10-50
20	10-100	20

Подвижность фрагментов ДНК в денатурирующем ПААГ зависит от их состава. Напряжение, при котором ведется электрофорез, не имеет принципиального значения. При проведении электрофореза в нативных условиях следят за тем, чтобы гель не перегревался, т.к. это может привести к плавлению цепей низкомолекулярных фрагментов. При проведении электрофореза в денатурирующих условиях разогрев геля даже желателен, но чрезмерно большой ток может привести к искривлению фронта и растрескиванию стекла.

Подвижность ДНК в ПААГ. О разделении фрагментов в ПААГ можно судить по положению маркерных красителей. В таблице приведены размеры ДНК, мигрирующие с красителями в ПААГ различной концентрации:

%	Нативный ПААГ		Денатурирующий ПААГ	
	ВР	ХС	ВР	ХС
3,5	100	460		
5	65	260	35	130
6			26	106
8	45	160	19	70-80
10			12	55
12	20	70		
20	12	45	8	28

Разделяющая способность ПААГ довольно высока. На 1 мм² площади кармана может быть нанесено до 0,1 мкг ДНК.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПААГ

1. Для ПААГ используют ТБЕ-буфер.
2. Раствор мономеров: обычно готовят 30% или 40% раствор с соотношением АА(акриламид)/бисАА(бисакриламид)=30/1. Раствор хранится длительное время при 4°C.

Компонент	30% раствор	40% раствор
Акриламид	29 г	38,7 г
Метиленбисакриламид	1 г	1,3 г
Вода	До 100 мл	До 100 мл

Примечание: акриламид токсичен, следует работать в перчатках

3. Готовят 10% водный раствор персульфата аммония (ПСА). ПСА быстро разлагается в водных растворах. Для приготовления раствора необходимо брать не обводненные партии кристаллического ПСА. Раствор хранится при 4°C не более недели.

Для приготовления нативного ПААГ следует рассчитать и смешать необходимое количество раствора мономеров, концентрированного электродного буфера и воды. Добавляют 1/100-1/500 объема 10% ПСА. Фильтруют раствор под вакуумом через ватман или стеклянный фильтр типа GF/A, GF/B, GF/C.

Для приготовления денатурирующего ПААГ проводят аналогичный расчет,

смешивают необходимое количество мочевины (конечная концентрация в геле должна быть 6-8 М), мономеров и воды. Для деионизации мономеров и мочевины добавляют смесь ионообменных смол типа Amberlite. Оставляют при постоянном перемешивании на 0,5-1 час при комнатной температуре. Фильтруют под вакуумом необходимое количество концентрированного электродного буфера, затем раствор мономеров с мочевиной. К фильтрату добавляют 1/100-1/500 объема 10% ПСА.

ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ГЕЛЯ

1. Для полимеризации геля добавляют ТЕМЕД из расчета 30 мкл на 100 мл геля. Быстро перемешивают и заливают без пузырей между заранее приготовленными стеклами. Метод заливки геля не имеет принципиального значения и различается в разных лабораториях.

2. Вставляют гребенку для формирования карманов и оставляют до полимеризации геля, которая обычно происходит за 5-15 мин, но не более часа.

3. Вынимают гребенку, от остатков незаполимеризовавшегося акриламида медленно промывают карманы дистиллированной водой.

4. Устанавливают гель в камеру для электрофореза, заполненную ТВЕ буфером, и подают напряжение на электроды.

5. Проводят преэлектрофорез (1 час или более).

6. По окончании преэлектрофореза промывают карманы, наносят образцы и подают напряжение на электроды.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. При проведении электрофореза в денатурирующих условиях растворяют образец в 90% формамиде, содержащем 0,02% маркерных красок. Прогревают на кипящей бане 1 мин, быстро охлаждают, после чего наносят на гель.

2. При проведении электрофореза в нативных условиях добавляют к образцу 1/10 объема раствора, содержащего 50% глицерин, 0,2% бромфеноловый синий и/или ксиленианол, перемешивают и наносят на гель.

Работа 6. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ФЕРМЕНТА

Обычно активность ферментов выражают в относительных единицах, где за 1 ед. принято количество фермента, необходимое для полного гидролиза 1 мкг ДНК фага λ в течение 1 часа при 37°C. Поскольку размер фага λ известен, можно, зная количество сайтов рестрикции для той или иной рестриктазы выразить активность фермента в молях сайтов за час и, исходя из этой величины, рассчитать количество фермента, необходимое для гидролиза какой-либо иной ДНК, отличной от ДНК фага λ .

Пример: Bam HI

ДНК 48,5 т.п.н. - 5 сайтов

ДНК pBR322 4,3 т.п.н. - 1 сайт

Количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг pBR322 в течение 1 часа при 37°C будет равно $(48,5 \times 1):(4,3 \times 5)=2,3$ ед.

Не стоит брать большой избыток фермента, так как практически любой из них загрязнен другими экзо- и/или эндонуклеазами. Поэтому добавление в реакционную смесь большого избытка фермента приводит лишь к неоправданному увеличению степени деградации препарата ДНК.

Ферменты непосредственно перед использованием можно разбавлять реакционным буферным раствором. Если предполагается длительное хранение разбавленного препарата, для разбавления используют буфер хранения, содержащий 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, свободного от нуклеаз.

УСЛОВИЯ РЕСТРИКЦИИ

Обычно реакционная смесь содержит 0,1-5 мкг ДНК в объеме 10-50 мкл. Реакцию проводят в оптимальном для данной рестриктазы буфере. Несмотря на разнообразие рестриктаз, для большинства из них можно использовать один из трех, приведенных в таблице:

Буфер	NaCl	Tris-HCl	MgCl ₂	2-меркапто-этанол
Low	0	10 ммоль	10 ммоль	5 ммоль
Medium	50 ммоль	10 ммоль	10 ммоль	5 ммоль
High	100 ммоль	50 ммоль	10 ммоль	5 ммоль

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ

Реакцию обычно проводят в пластиковых пробирках объемом 0,5-1,5 мл. Большое количество реакций удобно проводить в титровальных платах, однако в этом случае надо по возможности свести к минимуму испарение воды из реакционных смесей.

1. В пробирку с ДНК добавляют стерильной дистиллированной воды или TE до объема 18 мкл.

2. Добавляют 2 мкл десятикратного буфера рестрикции и перемешивают.

3. Добавляют необходимое количество фермента и быстро перемешивают.

4. Помещают пробирку в термостат и инкубируют необходимое время.

5. Останавливают реакцию добавлением ЭДТА до концентрации 10 ммоль.

Следует помнить, что рестриктазы быстро инактивируются при комнатной температуре. Хранят ферменты в морозильной камере. Вынув фермент из холодильника, немедленно ставят его в лед. Отбирать фермент необходимо новым или, в крайнем случае, автоклавированным наконечником. Объем добавляемого фермента не должен быть больше 1/10 объема реакционной смеси, так как в противном случае реакция может ингибироваться глицерином.

ПРИМЕНЕНИЕ ОБРАБОТКИ РЕСТРИКТАЗАМИ ДНК И ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

1. Обрабатывают образец ДНК определенными рестриктазами.

2. ДНК разделяют путем электрофореза в агарозном геле.

3. Перенос (блоттинг) разделенных фрагментов ДНК на соответствующий фильтр.

Впервые метод блоттинга и гибридизации описан Саузерном для изучения организации последовательностей ДНК после их разделения с помощью гель-электрофореза. Процедура подразделяется на два этапа. Первый этап – перенос разделенных фрагментов ДНК на нитроцеллюлозную (в последующих модификациях – на нейлоновую) мембрану, осуществляемый под действием капиллярных сил (в последующих модификациях посредством электропереноса) таким образом, чтобы относительное положение каждой молекулы ДНК осталось неизменным. Второй этап - гибридизация связанной ДНК с пробами, мечеными изотопами (комплементарной ДНК, зондом), для выявления определенных последовательностей ДНК.

Анализ ДНК по Саузерну включает в себя апуринизацию, денатурацию и нейтрализацию ДНК внутри геля с последующим переносом и связыванием нуклеиновой кислоты с мембраной. Далее мембрану инкубируют с одноцепочечной пробой ДНК, меченной радиоактивным изотопом.

После отмывания выявляют гибридизовавшиеся гомологичные фрагменты ДНК путем автордиографии с использованием рентгеновской пленки.

Работа 7. Определение концентрации общего белка в сыворотке (плазме) крови биуретовым методом (набор НТК «Анализ-Х») – УИРС

Диагностическое значение и принцип метода. Значение концентрации общего белка в сыворотке крови практически здоровых людей составляют: у взрослых 65–85 г/л, у детей до 6 лет – 56–85 г/л, у новорожденных – 53–89 г/л.

Из колориметрических методов количественного определения белка особого внимания заслуживает биуретовый метод, основанный на биуретовой реакции.

Принцип: в щелочной среде ионы меди образуют с белками комплексы фиолетового цвета. Интенсивность окрашивания в определенных пределах пропорциональна концентрации белка. Содержание белка устанавливается по интенсивности светопоглощения при 540–560 нм фотометрически. Для расчета количества белка в исследуемом растворе необходимо пользоваться калибровочным графиком, построенным по стандартным растворам белка.

СОСТАВ НАБОРА

1. Биуретовый реактив (3 флакона по 3,5 г). Приготовление раствора биуретового реактива: содержимое одного флакона растворить в 250 мл дистиллированной воды. Раствор хранится в холодильнике 7 суток.
2. Стандарт белка (раствор или лиофилизат).
3. В лаборатории биуретовый реактив можно приготовить по прописи: растворить 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (винно-кислый натрий-калий, или сегнетова соль) в 50 мл воды при энергичном перемешивании, добавляют 30 мл 10% раствора NaOH и 0,1 г KJ и доводят раствор до объема 100 мл.

ХОД РАБОТЫ

В пробирки помещают 0,05 мл сыворотки крови и 2,5 мл биуретового реактива, тщательно перемешивают, избегая образования пены. Через 30 мин измеряют оптическую плотность на КФК в кювете с толщиной слоя 5 мм при длине волны 540–560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Холостую пробу ставят также, как опытную, но вместо сыворотки добавляют 0,05 мл физиологического раствора. Расчет ведут по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой готовят ряд разведений стандартного раствора белка, как указано в таблице:

№ п/п	Стандартный раствор белка (мл)	0,9% раствор хлорида натрия (мл)	Содержание белка (г/л)
1	0,2	0,3	$0,4 \times A$
2	0,3	0,2	$0,6 \times A$

3	0,4	0,1	$0,8 \times A$
4	Осн. станд. раствор	–	Осн. станд. раствор

A – концентрация стандартного раствора белка, указанная на флаконе.

Из каждого разведения необходимо взять по 0,05 мл и обработать как пробу. Через 30–60 мин измеряют оптическую плотность против холостой пробы. По полученным данным строят калибровочный график. Вычисляют факторы пересчета делением концентраций стандартных растворов на экстинкцию (оптическую плотность). Выводят средний фактор (F). Расчет ведут по формуле: $C_{оп} = E_{оп} \times F$, где $C_{оп}$ – концентрация белка в пробе, F – усредненный фактор. При содержании белка в сыворотке больше 100 г/л, сыворотку разводят физиологическим раствором, а результат умножают на разведение.

Работа 8. Определение концентрации белка по Брэдфорду – УИРС

Раствор для определения: 100 мг кумасси синего G-250 растворяют в 50 мл 95% этанола и 100 мл 85% (вес на объем) фосфорной кислоты, затем доводят до 1 л дистиллированной водой. Раствор оставляют на ночь и затем фильтруют.

Для каждого определения используют компоненты в следующем соотношении: образец – 100 мкл, дистиллированная вода – 1 мл, раствор для определения – 1 мл. Определяют поглощение пробы при 595 нм. Строят калибровочную кривую, используя бычий сывороточный альбумин в концентрации от 0 до 100 мкг.

Работа 9. Электрофорез белков (УИРС)

Принцип метода. Белковые молекулы в растворе имеют определенный заряд, который определяется наличием функциональных групп радикалов аминокислотных остатков, способных к электролитической диссоциации. Заряженные частицы белка в электрическом поле перемещаются к катоду или аноду в зависимости от знака их заряда (электрофорез). Мерой электрофоретической подвижности частиц белков является скорость ее движения (см/с) при напряжении электрического поля 1 В/см².

Существует три типа электрофоретических систем: электрофорез по Тизелиусу (с подвижной границей); зональный электрофорез (например, в среде с капиллярной структурой); стационарный электрофорез (изоэлектрическое фокусирование, изотахофорез). В медицинской и фармацевтической практике чаще применяется зональный электрофорез на фильтровальной бумаге, пленке из ацетатцеллюлозы, агаровом, агарозном, крахмальном или полиакриламидном гелях. Электрофорез белков сыворотки крови ведут в буферной среде с pH 8,6, когда молекулы белка и липопротеинов заряжаются отрицательно и движутся к аноду. После завершения электрофоретического разделения электрофореграммы фиксируются и окрашиваются. Затем производят визуальную и денситометрическую оценку разделения белков. Для окраски различных белков на электрофореграммах используют специальные красители, часть из которых представлена в таблице (по Ю. Киселевскому и соавт., 1999).

Определяемый белок	Краситель	Среда разделения
Белки сыворотки	Ponceau S, Amido Black, Coomassi Blue R-250, Colloidal Gold	Ацетат целлюлозы, агароза, ПВДФмембрана, полиакриламид и др.
Липопротеины	Oil Red O, Sudan Black	То же
Гемоглобин	SilverStain, o-Dianisidin, Ferrocyanide, Peroxide	То же
ЛДГ – 1, 2, 3, 4, 5	Флюоресценция НАДН, Тетразолий	Агароза
Креатинкиназа ММ, МВ, ВВ	Флюоресценция НАДФН, тетразолий	Агароза
Щелочная фосфатаза	1-нафтилфосфат, Fast blue В, 5-бром-4-хлориндолил фосфат	Полиакриламид, ацетат целлюлозы, агароза
Иммуноглобулины	Amido Black, Coomassi Blue R-250	Агароза

В результате электрофоретического разделения белков сыворотки крови выделяют 5–6 фракций, состав которых представлен в таблице (по Ю. Киселевскому, 1999).

Зона	Главные белки зоны	Другие белки зоны
Альбумина	Альбумин	Преальбумин (транспорт тироксина)
α 1-глобулина	α -ЛП (ЛПВП), α 1-антитрипсин	α 1-антихимотрипсин, α 1-кислый гликопротеин
α 1- α 2 зона		Тироглобулин, церулоплазмин
α 2-глобулина	α 2-макроглобулин, гаптоглобин	Гемопектин, антитромбин, С1-эстеразы ингибитор
β 1-глобулина	Трансферрин, β -ЛП (ЛПНП)	С4-комплемент
β 2-глобулина	С3-комплемент	β 2-микроглобулин, пропердин
β 2- γ (ф) зона	Фибриноген плазмы	С-реактивный белок
γ -глобулина	IgA, IgM, IgG	IgD, IgE, легкие цепи Ig

В Республике Беларусь ЗАО «SOLAR» создан комплекс для клинического электрофореза, который включает электрофоретическую камеру ЕС2120, источник постоянного тока РЕ2120, сканирующий денситометр ДМ2120. Эти три компонента являются необходимыми элементами для проведения электрофоретического исследования различных белков. Фирма «Кормэй ДиАна» поставляет аналогичный комплект приборов, а также агарозные гели и наборы реагентов для определения методом электрофореза белков сыворотки крови и мочи, спектра липопротеинов, аполипротеинов, иммуноглобулинов, гемоглобинов и изоферментов лактатдегидро-

геназы и креатинфосфокиназы.

Для иллюстрации приводится описание метода разделения липопротеинов методом электрофореза (набор CORMAY GEL LIPO+Lp(a) 100). Такой набор служит для проведения анализа 100 образцов сыворотки крови.

РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Электрофоретические пластинки с агарозой – 10 шт. 2. Концентрированный вероналовый буфер – 3 упаковки по 75 мл. 3. Концентрированный краситель (судан черный) – 21 мл. 4. Фольга для нанесения проб – 10 шт. 5. Бумажные полоски – 20 шт.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Буфер: содержимое одного флакона концентрированного буфера разбавить дистиллированной водой до 1 л. 2. Краситель: в сосуд с 160 мл этанола медленно добавить при энергичном перемешивании 2 мл концентрированного раствора красителя и 140 мл дистиллированной воды. 3. Обесцвечиватель: 45% раствор этанола.

ХОД РАБОТЫ

На пластинку для электрофореза к месту нанесения проб приложить фольгу для нанесения проб. В каждый вырез фольги нанести пробы сыворотки по 2 мкл. Через 10 мин снять фольгу, а пластинку поместить в камеру для электрофореза (сыворотка нанесена со стороны катода). Закрывать камеру крышкой и проводить электрофорез при напряжении 50В 90 мин. Затем извлеченные пластины высушить в струе теплого воздуха или в сушильном шкафу при 70–80°C. Пластинку погрузить в сосуд с красителем на 15 мин и через 5 мин обесцвечивать в 45%-м растворе этанола, промыть дистиллированной водой и высушить. Оценить электрофореграммы визуально и затем с помощью денситометра. Фракция Lp(a) располагается между α -ЛП и пре- β -ЛП.

УКАЗАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

В протоколе отметить принцип метода, диагностическое значение; ход работы оформить в виде таблиц. Сделайте вывод о содержании общего белка и его фракций (фракций липопротеинов) в исследуемом материале.

Работа 10. Определение белка методом вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг – это метод иммунологического выявления электрофоретически разделенных антигенов, связанных с твердой подложкой. В качестве подложки используют нитроцеллюлозный фильтр. Разделение обычно проводят методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Такая система позволяет разделить белки по их молекулярной массе, что повышает ценность метода. Кроме определения массы вестерн-блоттинг можно использовать для выявления антигена в изучаемом препарате белка; кроме того, можно определить его относительное содержание, а также выяснить, подвержен ли этот белок распаду.

После электрофоретического разделения белки переносят на нитроцеллюлозный фильтр путем электроблоттинга, при этом они прочно связываются с нитроцеллюлоз-

ной основой. Затем весь фильтр инкубируют в растворе с высокой концентрацией белка (обычно это бычий сывороточный альбумин, а недавно стали использовать сухое молоко), чтобы блокировать неспецифическое связывание молекул антител. После этого фильтр инкубируют со специфическими антителами, которые связываются с соответствующими иммобилизованными антигенами. Образовавшийся комплекс антиген-антитело можно выявить каким-либо методом (использование меченых специфических антииммуноглобулинов).

Вестерн-блоттинг – это исключительно чувствительный аналитический метод. С его помощью в грубом белковом экстракте можно выявить до 50 нг антигена.

Работа 11. Исследование активности амилазы в сыворотке крови и моче по методу Каравея со стойким крахмальным субстратом «Амилаза СКС» – набор НТК «Анализ Х» (УИРС)

Принцип метода. Метод основан на колориметрическом определении концентрации крахмала до и после его ферментативного гидролиза. В качестве рабочего раствора используется 0,01 н раствор йода.

Диагностическое значение. α -Амилаза (диастаза, α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза; КФ 3.2.1.1) – фермент, осуществляющий расщепление полисахаридов (крахмала, гликогена) до декстринов и мальтозы. Наиболее богаты амилазой поджелудочная и слюнные железы. Амилаза секретируется в кровь главным образом из этих органов. Плазма крови человека содержит α -амилазы двух типов: панкреатическую (р-тип), вырабатываемую поджелудочной железой, и слюнную (s-тип), продуцируемую слюнными железами.

Нормальные показатели активности фермента для сыворотки крови – 16–30 г/(ч·л), в моче – 28–160 г/(ч·л) (в среднем – $107 \pm 5,1$ г/(ч·л)).

РЕАКТИВЫ (СОСТАВ НАБОРА), ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Раствор Люголя (0,1 н раствор йода) – 20 мл.
2. Крахмал растворимый – 0,08 г.
3. Консервант (натрий фосфорно-кислый двузамещенный – 5,32 г, бензойная кислота – 1,72 г).
4. Сыворотка крови или моча.

Приготовление рабочих растворов.

1. Раствор Люголя перед использованием разбавляют в 10 раз дистиллированной водой и получают 0,01 н рабочий раствор йода.
2. Приготовление стойкого крахмального субстрата:
 - 2.1. В стакан вносят консервант, растворяют в 100–150 мл дистиллированной воды и нагревают до бурного кипения раствора.
 - 2.2. Во флакон с крахмалом вносят 10–15 мл холодной дистиллированной воды, взбалтывают и выливают в кипящий раствор консерванта. Ополаскивают флакон из-под крахмала еще раз холодной дистиллированной водой и выливают в кипящий раствор консерванта.

Раствор кипятят не менее 1 мин, затем после осаждения раствор переносят в мерную колбу на 200 мл, доводят дистиллированной водой до

метки и тщательно перемешивают. Концентрация полученного раствора по крахмалу составляет 0,40 г/л.

ХОД РАБОТЫ

Реактивы	Опыт	Контроль
Раствор крахмала, мл	1,0	1,0
	Инкубировать 37°С 5 мин	
Сыворотка крови (моча), мл	0,02	–
	Инкубировать 37°С 5 мин	
Рабочий раствор йода, мл	1,0	1,0
Дистиллированная вода, мл	8,0	8,0
Сыворотка крови (моча), мл	–	0,02

Пробирки встряхивают и растворы фотометрируют против воды в кюветах шириной 10 мм на КФК при красном светофильтре (630–690 нм)

Расчет активности α -амилазы в г расщепленного крахмала на 1 л сыворотки за 1 час инкубации при 37°С произвести по формуле:

$$\frac{E_{к. пр.} - E_{оп. пр.}}{E_{к. пр.}} \cdot 10 \cdot 20 = X$$

где $E_{к. пр.}$ – экстинкция контрольной пробы; $E_{оп. пр.}$ – экстинкция опытной пробы.

Примечание: при повышенной активности фермента сыворотку или мочу разводят дистиллированной водой в 5–10 раз, т.к. субстрата может быть недостаточно (об этом свидетельствует почти исчезнувшее окрашивание в опытной пробе). Разведение учитывают при расчете активности фермента.

Работа 12. Определение активности амилазы крови с помощью метода «сухой химии» в сочетании с рефлометрией

Под «сухой» химией понимается процедура, когда реагенты, необходимые для химического анализа, наносятся в определенных пропорциях на бумагу или пленку, высушиваются и стабилизируются. После введения точного объема образца крови, сыворотки или плазмы реагенты вновь активируются и химическая реакция протекает так же, как и в «жидкой» химии. Изменения окраски продуктов реакции регистрируются с помощью отражательного фотометра (рефлектофотометра, рефлотрона). Таким образом, для реализации метода «сухой» химии необходимы два основных компонента системы: тест-полоски и рефлотрон.

Тест-полоски имеют довольно сложное строение. В верхней части полоски находится многослойная структура, причем наружный слой состоит из стекловолокна. Здесь происходит отделение сыворотки крови от форменных элементов. Сыворотка распределяется равномерно и проникает в следующие слои, содержащие химические реагенты. Эти реагенты отделены друг от друга и стабилизированы в сухой форме. Благодаря этому

тест-полоски могут храниться до года при комнатной температуре. По мере проникновения сыворотки крови через слои реагентов осуществляется заданная химическая реакция. Измерение интенсивности возникшей окраски осуществляется в рефлотроне и результат представляется в избранных единицах на табло. В нижней части тест-полоски находится магнитная лента. Она содержит информацию для управления рефлотроном: название измеряемого параметра, время отделения плазмы, время протекания реакции, длина волн света для регистрации, факторы пересчета, единицы измерения, калибровка. Весь процесс управления ходом анализа осуществляется микропроцессором рефлотрона.

Принцип: α -амилаза

Индолил- α , D-мальтогептаозид $\xrightarrow{\alpha\text{-глюкозидаза}}$ индоксил + глюкоза

Индоксил + 2-метокси-4-морфолинофенил-дiazонийтетрахлороцинкат \rightarrow красно-фиолетовое окрашивание

Нормальные значения активности в крови, сыворотке, плазме

37°C	30°C	25°C
< 220 Е/л	< 160 Е/л	< 120 Е/л

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Капиллярная кровь, сыворотка или плазма

ХОД РАБОТЫ

1. Включить прибор.
2. Вынуть тест-полоску из вials.
3. Удалить защитную фольгу.
4. Нанести 32 мкл исследуемого образца с помощью пипетки для рефлотрона в центр красной аппликационной зоны тест-полоски «Amylase» (наконечник пипетки не должен соприкасаться с тест-полоской).
5. В течение 15 секунд вставить полоску в рефлотрон (надпись «AMYL» показывает, что полоска правильно вставлена и специфический магнитный код прочитан прибором).
6. Прочитать результат через время, указанное на дисплее прибора (в секундах).
7. Открыть приемное отделение рефлотрона и удалить использованную полоску.

Работа 13. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови по гидролизу β -глицерофосфата (метод Боданского), УИРС

Принцип метода определения активности фосфатаз основан на способности ферментов отщеплять неорганический фосфат от β -глицерофосфата. Для определения активности щелочной фосфатазы используют щелочной раствор β -глицерофосфата, для кислой – кислый рас-

твор β -глицерофосфата.

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Щелочной раствор β -глицерофосфата, 5 г/л, рН 8,6. 2. Кислый раствор β -глицерофосфата, 5 г/л, рН 5,0. 3. Раствор молибденово-кислого аммония, 25 г/л (в 2,5 н растворе серной кислоты). 4. Раствор трихлоруксусной кислоты, 100 г/л. 5. Рабочий стандартный раствор фосфора (содержит 0,01 мг фосфора в 1 мл). 6. Раствор аскорбиновой кислоты, 10 г/л (в 0,1 н растворе HCl).

ХОД РАБОТЫ

В центрифужную пробирку с надписью $P_{щ}$ внести 1 мл щелочного раствора, в пробирку с надписью $P_{к}$ – 1 мл кислого раствора β -глицерофосфата и поместить их на 5 мин в термостат при 37°C для прогревания субстратов. Затем осторожно, избегая образования пузырьков воздуха, в пробирки внести по 0,1 мл сыворотки крови и полученную фермент-субстратную смесь инкубировать в течение 1 ч при 37°C. Время термостатирования опытных проб использовать для определения содержания неорганического фосфата в контрольных пробах. Для этого в центрифужные пробирки с надписью $K_{щ}$ и $K_{к}$ внести соответственно по 1 мл щелочного или кислого раствора β -глицерофосфата, прилить по 1,1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, после чего добавить по 0,1 мл той же сыворотки крови, пробы перемешать и через 5 мин центрифугировать в течение 10 мин при 3000 об/мин. Затем отобрать по 1,5 мл центрифугата и перенести в обычные пробирки с соответствующей маркировкой ($K_{щ}$ и $K_{к}$), прибавить по 1 мл молибденового раствора, 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, перемешать. Пробы выдерживают 10 мин при комнатной температуре, после чего их колориметрируют при красном светофильтре в кюветах шириной 5 мм. В качестве пробы сравнения используют дистиллированную воду. К опытным пробам после инкубации в термостате добавить по 1,1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешать и далее обработать и колориметрировать, как контрольные пробы. Активность щелочной и кислой фосфатаз рассчитывают, используя калибровочный график. Для построения калибровочной кривой готовят следующие растворы.

Реактивы	Номера пробирок					
	1	2	3	4	5	6
Рабочий раствор Рн, мл	0,6	1,2	2,4	3,6	4,8	6,0
ТХУ, мл	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Вода, мл	5,9	5,3	4,1	2,9	1,7	0,5
Перемешать						
Отобрать в другие пробирки	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

Реактивы	Номера пробирок					
	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Молибденовый раствор, мл						
Аскорбиновая кислота	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Содержание Рн (мг) в пробах	0,001	0,002	0,004	0,006	0,008	0,010

Через 10 мин после прибавления аскорбиновой кислоты пробы колориметрировать при красном светофильтре в кювете шириной 5 мм против дистиллированной воды. При построении калибровочной кривой на оси абсцисс откладывать содержание Рн в пробах, а на оси ординат – величины оптической плотности. В качестве единицы масштаба взять 10 мм на 0,001 мг фосфора.

По калибровочной кривой рассчитать число мг Рн в опытных и контрольных пробах.

Активность щелочной фосфатазы = $(\Pi_{\text{ш}} - K_{\text{ш}}) \cdot 1,47 \cdot 10^5 / 31$ ммоль/ч·л

Активность кислой фосфатазы = $(\Pi_{\text{к}} - K_{\text{к}}) \cdot 1,47 \cdot 10^5 / 31$ ммоль/ч·л,

где $(\Pi_{\text{ш}} - K_{\text{ш}})$ или $(\Pi_{\text{к}} - K_{\text{к}})$ – количество Рн, которое освободилось при действии фосфатазы; $1,47 \cdot 10^5$ – коэффициент пересчета с 0,068 мл на 1 л сыворотки; 31 – масса 1 ммоль Рн (мг).

Работа 14. Разделение изоферментов лактатдегидрогеназы в полиакриламидном геле

Принцип метода. После разделения белков сыворотки крови методом электрофореза в столбиках полиакриламидного геля производят выявление фракций лактатдегидрогеназы специальными красителями. В норме имеет место следующее распределение изоферментов в сыворотке крови: ЛДГ₁– 31,3%, ЛДГ₂–46,5%, ЛДГ₃–11,3%, ЛДГ₄–4,6%, ЛДГ₅–4,1%.

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Полиакриламидный гель с концентрацией 5,5 г акриламида/100 мл. 2. Раствор лактата лития, 1 моль/л. 3. Раствор НАД, 20 мг/мл. 4. р-Нитротетразолевый синий (НТС), 1 мг/мл. 5. Феназинметасульфат (ФМС), 1 мг/мл. 6. Раствор NaCl, 0,1 моль/л. 7. Раствор MgCl₂, 0,005 моль/л. 8. Фосфатный буфер, рН 7,4, 0,5 моль/л. 9. Основной раствор электродного буфера: ТРИС – 6,0 г, глицин – 28,8 г, вода дистиллированная – до 1л, рН 8,3. Перед употреблением разбавлять в 10 раз. 10. Сыворотка крови.

ХОД РАБОТЫ

На столбик полиакриламидного геля нанести сыворотку, разведенную раствором сахарозы в отношении 1:2 (на 1 часть сыворотки – 2 части раствора сахарозы, 400 г/л). Количество сыворотки может варьировать в пределах от 0,01 мл до 0,075 мл (подбирается опытным путем). На слой исследуемого материала прилить электродный буфер. После помещения колонок в электрофоретическую камеру нижний и верхний ее резервуары

заполнить разведенным (1:10) электродным буфером, рН 8,3. После разделения изоферментов ЛДГ на фракции (для этого требуется около 90 мин, сила тока 25 мА на колонку) извлеченные из стеклянных колонок столбики полиакриламидного геля обработать в инкубационной среде (красящей смеси). Эту смесь готовят согласно таблице.

Реактивы, мл	6 трубочек	9 трубочек	12 трубочек
Лактат лития	4,0	6,0	8,0
НАД	2,0	3,0	4,0
NaCl	4,0	6,0	8,0
MgCl ₂	4,0	6,0	8,0
Фосфатный буфер	5,0	7,5	10,0
НТС	10,0	15,0	20,0
Выдержать смесь 15 мин при 37°C			
ФМС	1,0	1,5	2,0
Общее количество	30,0	45,0	60,0

Каждый столбик полиакриламидного геля поместить в отдельную пробирку, залить инкубационной средой и поставить в термостат при 37°C на 1,0–1,5 часа. Затем столбики геля обмыть водой и перенести в пробирки, содержащие раствор уксусной кислоты (75 г/л). Отдельные изоферменты ЛДГ можно элюировать в подогретый до 80–85°C раствор диметилформамида (100 г/л). Колориметрировать. Относительную активность изоферментов выразить в процентах от суммы, полученной после сложения величин оптической плотности всех изоферментов ЛДГ.

УКАЗАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

В протоколе отметьте принципы методов, диагностическое значение, ход работ (в виде таблицы). Сделайте вывод об активности амилазы в исследуемом материале. Опишите в тетради метод «сухой химии», принцип и ход работы определения амилазы. Сделайте вывод об активности фермента в исследуемом материале. Оформите метод определения щелочной и кислой фосфатаз в виде таблицы (схемы определения). Зарисуйте распределение изоферментов ЛДГ.

Работа 15. Определение активности рибонуклеазы

Принцип метода. Рибонуклеаза – это фермент, расщепляющий полимерную молекулу РНК на низкомолекулярные фрагменты, количественное определение которых проводят при 260 нм.

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Раствор дрожжевой РНК (1 мг/мл) в ацетате натрия (0,1 моль/л).
2. 0,2%-й водный раствор панкреатической РНКазы.
3. Спирто-магниевый осадитель – 80%-й раствор этанола, содержащий 0,01 моль/л MgCl₂.

ХОД РАБОТЫ

К 0,4 мл раствора дрожжевой РНК в центрифужную пробирку вносят 0,2 мл раствора РНКазы (в качестве источника фермента можно использовать 5%-ные водные гомогенаты тканей объемом 0,5 мл, а также разбавленную в 10 раз слюну), перемешивают и помещают в термостат на 30–60 мин при 37°C. В пробирку вносят 1 мл спирто-магниевого осадителя и помещают на ледяную баню. Через 1 час образуется осадок РНК, который удаляют центрифугированием при 8000 g в течение 20 мин. Затем отбирают 2–3 пробы надосадочной жидкости (0,5 мл), прибавляют к каждой по 3 мл дистиллированной воды, перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора при 260 нм против воды. Прирост поглощения в опытной пробе по отношению к контрольной (ΔA_{260}) служит показателем активности РНКазы и используется для расчета активности фермента по формуле

$$A = \Delta A_{260} V_1 V_2 / V_3 t W,$$

где V_1 – объем пробы после разбавления, V_2 – объем пробы после осаждения РНК спирто-магниевым раствором, ΔA_{260} – прирост оптической плотности опытной пробы по отношению к контрольной, t – время инкубации (мин), W – масса белка (фермента) в пробе (мг).

Работа 16. Определение активности дезоксирибонуклеазы

Принцип метода. При действии дезоксирибонуклеазы на ДНК образуются кислотные группы, которые обесцвечивают индикатор феноловый красный.

РЕАКТИВЫ И ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

1. NaCl, раствор 0,14 моль/л. 2. Субстратный раствор (1 мл – 2 мг раствора натриевой соли ДНК, 1 мл раствора сульфата натрия (0,05 моль/л) и 0,4 мл раствора фенолового красного (10 мг фенолсульффталеина, 0,28 мл 0,1 М раствора NaOH, 3 мл 96%-го этанола, 40 мл 0,02 М фосфатного буфера (рН 7,55)). Смесь заливают водой до объема 100 мл, рН субстратного раствора (2,4 мл) доводят до 7,55, добавляя 0,01 н раствор NaOH и доливают водой до 3 мл.

ХОД РАБОТЫ

В 10 мл охлажденного раствора NaCl растирают 15 мг ткани. Гомогенат центрифугируют 15 мин при 10000 g. К 3 мл субстратного раствора прибавляют 1 мл полученной надосадочной жидкости ферментного раствора. Смесь помещают в кювету спектрофотометра и измеряют оптическую плотность при 558 нм (зеленый светофильтр) в течение 10–15 мин с интервалом 1 мин. Активность фермента оценивают графически. По оси абсцисс откладывают время в мин, а по оси ординат – значения оптической плотности. Активность фермента выражают снижением оптической плотности комплекса ДНК и красителя, разрушающегося в результате гидролиза дезоксирибонуклеиновой кислоты за первые 3 мин инкубации.

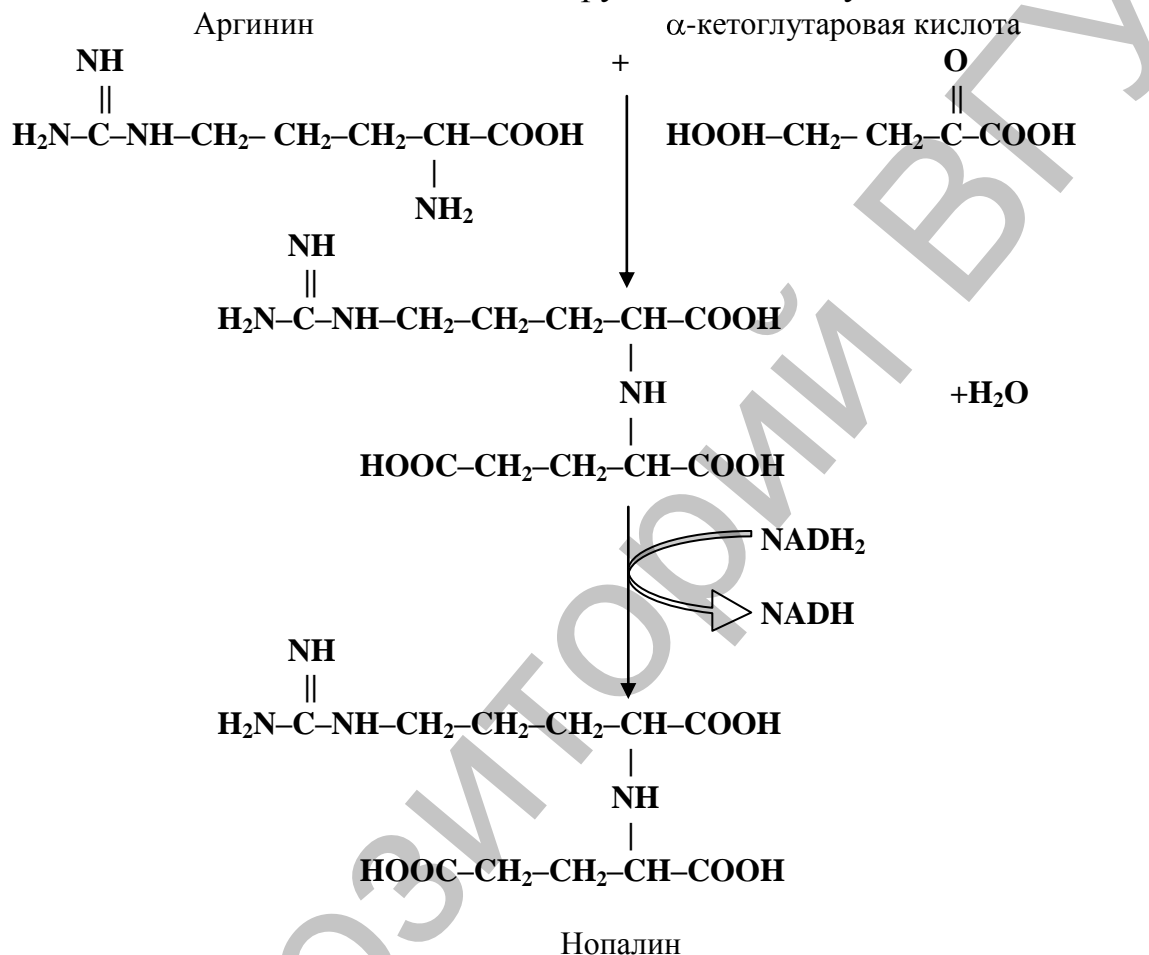
УКАЗАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

В рабочую тетрадь записать принципы методов, результаты измере-

ний и нарисовать калибровочные графики.

Работа 17. Определение нопалина в трансформированных растительных тканях

Одна из наиболее подробно изученных функций Т-ДНК в опухолях корончатых галлов – экспрессия транскрипта 3, который в опухолях октопинового и нопалинового типа кодирует опинсинтазу.



Гуанидовая руппа окрашивается фенантренхиноном

Нопалинсинтаза катализирует синтез нопалина из аргинина и α -кетоглутаровой кислоты. Данный фермент широко используется в экспериментах по транскрипции как селективный маркер. Среди генов Т-ДНК нуклеотидная последовательность гена нопалинсинтазы была определена первой. Оказалось, что его промотор сходен с эукариотическим и в состав гена нопалинсинтазы входят последовательности, обеспечивающие полиаденилирование. Эти особенности впоследствии использовались для конструирования многих химерных генов и было показано, что они контролируют экспрессию генов в трансформированных тканях растений. С помощью простого электрофоретического анализа на бумаге по наличию нопалина можно проводить отбор трансформированного растительного материала из самых разнообразных источников.

Ткани сперва насыщают аргинином и α -кетоглутаровой кислотой. За-

тем избыток аргинина отмывают, ткани подсушивают фильтровальной бумагой и размалывают. Грубый экстракт вместе с аргининовым и нопалиновым контролями наносят на бумажную электрофореграмму и для разделения аминокислот подвергают электрофорезу. Вещества, имеющие гуанидиновую группу, такие, как аргинин и нопалин, визуализируют с помощью метода чувствительного флуоресцентного окрашивания, при котором используют фенантренхинон.

Краткий словарь используемых понятий

Краткий словарь используемых понятий необходим для понимания языка молекулярной биотехнологии:

1. Аллель – одна из двух (или нескольких) альтернативных структурных форм гена, отличающаяся от других вариантов определенными особенностями нуклеотидного состава.

- доминантный – аллель, наличие одной копии которого достаточно для проявления соответствующего фенотипического признака;

- мутантный – вариант гена, несущий патогенетически значимую мутацию;

- нормальный (дикого типа) – вариант гена, функция которого не изменена;

- «промежуточный» (при заболеваниях с динамическими мутациями) – аллель, представляющий собой «премутацию», в составе которого число копий tandemных тринуклеотидных повторов превышает общепопуляционную норму, но не достигает нижней патогенетически значимой границы экспансии повторов;

- рецессивный – аллель, фенотипически проявляющийся только в гомозиготном состоянии и подавляющийся доминантным аллелем.

2. Ампликон – фрагмент гена (ДНК), амплифицируемый в полимеразной цепной реакции. Амплификация – увеличение числа копий определенного фрагмента ДНК (например, на основе полимеразной цепной реакции).

3. Антибиотик (например, пенициллин) – вещество, синтезируемое одним микроорганизмом и оказывающее ингибирующее действие на другие микроорганизмы и раковые клетки.

4. Антикодон – нуклеотидный триплет в составе молекулы тРНК, комплементарно взаимодействующий со специфическим кодоном мРНК в процессе трансляции.

5. Аутосома – неполовая хромосома (любая кроме хромосом X и Y).

6. Блот-гибридизация (блоттинг) – метод идентификации макромолекул, разделенных гель-электрофорезом и фиксированных на твердом матриксе, путем гибридизации содержимого образцов с мечеными комплементарными зондами:

- вестерн-блоттинг (иммуноблоттинг) – идентификация искомого белка путем гибридизации разделенных гель-электрофорезом белковых молекул с меченым антителом;

- нозерн-блоттинг – идентификация искомой последовательности РНК путем гибридизации разделенных гель-электрофорезом молекул мРНК с меченым комплементарным ДНК-зондом;

- саузерн-блоттинг – идентификация участка ДНК, содержащего искомую нуклеотидную последовательность, путем гибридизации разделенных гель-электрофорезом фрагментов ДНК с меченым комплементарным ДНК-зондом.

7. Болезни:

-аутосомные – обусловленные мутацией гена, локализованного в аутосоме;

- доминантные – обусловленные доминантным мутантным аллелем;

- менделирующие – наследующиеся в соответствии с законами Менделя;

- митохондриальные – обусловленные генетическими и структурно-биохимическими дефектами митохондрий;
- моногенные – обусловленные мутацией одного главного гена;
- мультифакториальные (полигенные, болезни предрасположенности) – обусловленные совместным действием ряда генов и средовых факторов;
- наследственные – связанные с повреждением генов, передающиеся потомству;
- рецессивные – обусловленные двумя мутантными рецессивными аллелями;
- сцепленные с полом – обусловленные мутацией гена, локализованного в половых хромосомах;
- хромосомные – обусловленные нарушением количественного состава и структуры хромосом;
- экспансия – обусловленные экспансией (патологическим увеличением числа копий) тандемных тринуклеотидных повторов.

8. Вектор – биологическая конструкция (на основе вируса, плазмиды и др.), способная встраивать фрагменты чужеродной ДНК и переносить в реципиентные клетки.

9. Гаплоидный – содержащий одинарный (однокопийный) набор хромосом.

10. Гаплотип – комбинация конкретных аллелей сцепленных генов (локусов) на одной хромосоме.

11. Ген – транскрибируемый участок молекулы ДНК, последовательность которого включает в себе всю информацию, необходимую для синтеза молекулы белка или РНК.

12. Генетический код – система записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждые три нуклеотида, составляющие кодон, кодируют одну аминокислоту. Состоит из 64 кодонов, кодирующих иницирующую аминокислоту (начало синтеза полипептидной цепи), все 20 аминокислот и три терминирующих кодона.

13. Генетический маркер – полиморфный участок ДНК строго определенной локализации, многообразные аллели которого позволяют дифференцировать различные по происхождению хромосомы и анализировать их расхождение в родословной.

14. Генетический полиморфизм – наличие двух или более аллельных форм отдельных генов.

15. Генетическое сцепление – близкое расположение генов (локусов) на хромосоме, позволяющее им наследоваться как единое целое.

16. Генная терапия *ex vivo* – введение гена (или генов) в изолированные клетки больного; после культивирования и трансформации клетки возвращают в организм больного (для устранения генетического дефекта).

17. Генная терапия *in vivo* – введение гена (генов) непосредственно в ткань или орган с целью устранения генетического нарушения.

18. Генная терапия с использованием клеток зародышевой линии – введение гена (генов) в оплодотворенное яйцо или клетки эмбриона на ранней стадии; чужеродный ген оказывается в ядрах всех клеток развивающегося организма, в том числе половых, и изменяет его фенотип.

19. Генодиагностика (генная диагностика, ДНК-диагностика) - совокупность методов по выявлению изменений в структуре генома с целью диагностики наследственных заболеваний.

20. Геном – а) совокупность всех генов определенного биологического вида; б) полная генетическая система отдельной клетки или конкретного организма.

21. Геномная (генетическая) классификация – классификация наследственных заболеваний, основанная на взаимосвязи между конкретной нозологической формой и повреждением определенного гена, лежащим в основе болезни.

22. Генотип – генетическая конструкция организма, набор всех его аллелей. Набор генов, определяющих развитие фенотипического признака или ряда признаков организма.

23. Генотипирование – определение всех аллелей всех локусов данной хромосомы.

24. Гетерозигота – носитель двух различных аллелей в определенном локусе.

25. Гибридизация (ренатурация) – взаимодействие комплементарных цепей ДНК (или ДНК и РНК), приводящее к образованию двухцепочечной молекулы:

- дот (слот)-гибридизация – модификация Саузерн-блоттинга, при которой проводится гибридизация с молекулярным зондом амплифицированных молекул ДНК, нанесенных на фильтр в виде округлых или вытянутых пятен;

- in situ – реакция гибридизации меченого ДНК- или РНК-зонда с денатурированной хромосомной ДНК клеток на гистологических препаратах;

- FISH (fluorescent in situ hybridization) – модификация гибридизации in situ с использованием меченных флюорохромами ДНК-зондов.

26. Гистоны – ядерные белки, образующие комплекс с молекулой ДНК и принимающие участие в формировании и поддержании структуры хромосом.

27. Гомозигота – носитель двух одинаковых аллелей в определенном локусе.

28. Гомология – сходство в последовательности макромолекул между организмами одного или разных видов:

- гомологичные участки ДНК (гены) – участки ДНК, имеющие сходство в нуклеотидной последовательности;

- гомологичные хромосомы (гомологи) – пара хромосом, имеющих одинаковое цитогенетическое строение и набор генов.

29. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – нитевидная самореплицирующаяся молекула, состоящая из отдельных дезоксирибоза-содержащих нуклеотидов и являющаяся хранителем генетической информации, закодированной посредством триплетного кода:

- геномная – тотальная ДНК, выделенная из ядросодержащих клеток;

- кДНК (комплементарная) – одноцепочечная молекула, полученная путем обратной транскрипции мРНК и содержащая только кодирующие участки гена;

- мтДНК (митохондриальная) – кольцевидная молекула, локализованная в митохондриях;

- рекомбинантная – состоящая из фрагментов различного происхождения.

30. Дикый тип (Wild type) – наиболее часто встречающийся в природной популяции фенотип с признаками, детерминированными «нормальными» (немутантными) аллелями.

31. Диплоид – организм, клетки которого содержат два гомологичных набора хромосом. Диплоидный – содержащий двойной набор хромосом (по две копии каждой из аутосом и две половые хромосомы).

32. ДНК-диагностика (генодиагностика) – совокупность методов по выявлению изменений в структуре генома с целью диагностики наследственных заболеваний:

- косвенная (непрямая) – основана на анализе наследования в ряду поколений мутантной хромосомы с помощью генетических маркеров;

- преимплантационная – диагностика мутации на ранней стадии развития зародыша, предшествующей его имплантации в стенку матки;

- пренатальная – диагностика мутации или мутантной хромосомы у плода;

- пресимптоматическая – диагностика мутации или мутантной хромосомы у клинически здорового индивида, относящегося к «группе риска»;

- прямая – основана на непосредственной идентификации мутации в изучаемом

гене.

33. Картирование (генетическое) – определение расположения изучаемого гена по отношению к другим локусам в определенной хромосомной области.

34. Килобаза (кб) – единица длины молекулы ДНК, равная тысяче пар оснований.

35. Клон – популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

36. Клонирование – совокупность процедур, использующихся для получения клонов; клонирование многоклеточных организмов включает пересадку ядер соматических клеток в оплодотворенную яйцеклетку с удаленным пронуклеусом (ядром).

37. Клонирование генов – система методов, использующаяся для получения клонированных ДНК: выделение нужного гена из какого-либо организма, встраивание его в плазмиду (вектор), введение в клетку организма-хозяина, многократная репликация.

38. Клонировующий вектор – молекула ДНК (плазмидная или вирусная ДНК), предназначенная для клонирования ДНК-мишени.

39. Кроссинговер – взаимный обмен участками гомологичных хромосом, основанный на разрыве-соединении хроматид и приводящий к новой комбинации аллелей (рекомбинация).

40. Лод-балл – логарифм соотношения правдоподобий, выражающий количественную оценку генетического сцепления.

41. Лocus – область локализации определенного генетического элемента на хромосоме.

42. Молекулярная диагностика – выявление молекулярно-биологическими методами патогенного микроорганизма, специфического вещества или измененной нуклеотидной последовательности, ответственных за то или иное заболевание.

43. Моноклональные антитела – однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты). Синтезируются гибридами – клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту. Некоторые миеломные клетки синтезируют моноклональные антитела самостоятельно.

44. Мутация – любое изменение структуры ДНК:

- генная – изменение последовательности нуклеотидов в определенном участке молекулы ДНК (гена);

- геномная – нарушение состава генома в связи с нарушением числа хромосом;

- динамическая – мутация по типу экспансии tandemных тринуклеотидных повторов;

- мажорная – встречающаяся с высокой частотой в определенной популяции;

- миссенс – замена нуклеотида, сопровождающаяся изменением аминокислотного шифра кодона и ведущая к замене аминокислоты в составе белка;

- нейтральная (молчащая) – не сопровождающаяся изменением фенотипа;

- нонсенс – замена нуклеотида, приводящая к замещению информационно значимого кодона на стоп-кодон (терминирующий кодон) и сопровождающаяся преждевременным обрывом трансляции;

- нулевая – приводящая к отсутствию синтеза сколько-нибудь значимого белка (функционального продукта);

- регуляторная – затрагивающая регуляторные последовательности гена и нарушающая его экспрессию;

- со сдвигом рамки – приводящая к нарушению нормального отсчета кодирующих триплетов;

- сплайсинговая – затрагивающая сайт сплайсинга и приводящая к неправильному вырезанию интрона либо к удалению из молекулы РНК информационно значимой экзонной последовательности;

- структурная – приводящая к протяженному (мультинуклеотидному) дефекту гена;

- точковая (точечная) – затрагивающая один нуклеотид либо один-два соседних нуклеотида;

- хромосомная – нарушение количественного состава либо структуры хромосом.

45. Обратная транскриптаза – фермент, осуществляющий обратную транскрипцию (перевод мРНК в молекулу кДНК).

46. п.о. – пара оснований (единица длины молекулы ДНК).

47. Пенетрантность – вероятность фенотипического проявления мутантного гена.

48. Плаزمид – внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК длиной 1–200 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов).

49. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации специфического сегмента ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы с использованием олигонуклеотидных ДНК-зондов, комплементарных последовательностям противоположных цепей ДНК, фланкирующим амплифицируемый сегмент. Процесс состоит из серии циклически повторяющихся реакций: денатурации ДНК, отжига зондов, синтеза ДНК. Различают:

- количественная – реакция, по результатам которой оценивается количественный выход продуктов амплификации с помощью соответствующих сканирующих устройств;

- мультиплексная (мультипраймерная) – одновременная амплификация в одной реакции нескольких участков исследуемого гена;

- обратно-транскриптная – реакция, в которой матрицей служат молекулы кДНК, получаемые в результате обратной транскрипции мРНК.

50. Праймер – олигонуклеотид, выполняющий роль «затравки» и иницирующий синтез полинуклеотидной цепи на ДНК- или РНК-матрице.

51. Прогностическое (предсказательное) ДНК-тестирование - проведение ДНК-диагностики у клинически здорового члена отягощенной семьи из «группы риска», позволяющее установить его генетический статус, риск развития заболевания, вероятный возраст манифестации и характер течения болезни.

52. Проект «Геном человека» – международная программа, целью которой является построение генетической и физической карт генома человека и определение полной нуклеотидной последовательности ДНК.

53. Промотор – регуляторный участок гена, с которым связывается РНК-полимераза перед началом транскрипции.

54. Рестриктаза (рестрицирующая эндонуклеаза) – бактериальный фермент, расщепляющий двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах (в местах строго определенными нуклеотидными последовательностями).

55. Сайт – определенное место (позиция) в молекуле ДНК:

- рестрикции (узнавания) – специфическая нуклеотидная последовательность длиной 4-10 п.о., распознаваемая рестрикционной эндонуклеазой;

- сплайсинга – специфическая нуклеотидная последовательность на границе между экзоном и интроном, выполняющая важную сигнальную роль для правильного протекания сплайсинга.

56. Секвенирование – определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК или последовательности аминокислот в молекуле белка.

57. Тандемные повторы – множественные и расположенные друг за другом копии определенной последовательности ДНК, число которых у различных индивидов является чрезвычайно вариабельным:

- динуклеотидные – множественные копии последовательности из двух нуклеотидов (обычно ЦА), используемые в качестве генетических маркеров;
- тринуклеотидные – множественные копии последовательности из трех нуклеотидов, увеличение числа которых (экспансия) является особым типом мутаций (динамические мутации).

58. Теломера – концевой участок хромосомы.

59. Тип наследования – одна из основных характеристик моногенного заболевания, описывающая закономерности сегрегации патологического фенотипа в родословной:

- аутосомно-доминантный – связан с наследованием доминантного аллеля, расположенного на неполовой хромосоме;
- аутосомно-рецессивный – связан с наследованием рецессивного аллеля, расположенного на неполовой хромосоме;
- голандрический (Y-сцепленный) – связан с наследованием гена, расположенного на Y-хромосоме;
- митохондриальный (материнский, цитоплазматический) – связан с наследованием от матери всеми потомками мутантной митохондриальной ДНК;
- псевдоминантный – особый случай наследования аутосомно-рецессивного заболевания, при котором болезнь регистрируется в двух и более последовательных поколениях родословной в результате браков между больными индивидами либо между больным индивидом и гетерозиготным носителем мутантного гена;
- X-сцепленный (доминантный и рецессивный) – связан с наследованием доминантного или рецессивного аллеля, расположенного на X-хромосоме.

60. Трансгенный организм – организм, геном которого содержит чужеродный генетический материал, включенный методами генетической инженерии.

61. Трансгеноз – введение чужеродного гена в растительную или животную клетку и его передача в ряду поколений.

62. Трансдукция – перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую с помощью бактериофагов.

63. Трансфекция – искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК.

64. Трансформация: 1) перенос генетической информации в бактериальные клетки с участием плазмид или без них, но всегда – без участия вирусов; часто приводит к изменению фенотипа реципиентной клетки (т.е. клетка, в которую осуществлен перенос); 2) превращение нормальных клеток животных в опухолевые.

65. Фенотип – совокупность всех признаков особи, формирующаяся в процессе взаимодействия ее генотипа и внешней среды.

66. Хромосома – структура, основу которой составляет конденсированная молекула ДНК; носитель генетической информации. Способна к воспроизведению с сохранением структурно-функциональной индивидуальности в ряду поколений. У эукариот находится в ядре клеток, у прокариот – непосредственно в цитоплазме:

- акроцентрическая – хромосома с центромерой, локализованной недалеко от концевого участка (теломеры);
- аутосома – неполовая хромосома (у человека – 22 пары аутосом и одна пара половых хромосом X и Y);
- метацентрическая – хромосома с центрально расположенной центромерой;
- мутантная – содержащая мутацию в определенном локусе;

- М-хромосома – кольцевидная молекула митохондриальной ДНК;
 - половая – одна из пары хромосом X и Y, детерминирующих пол (XY – мужской, XX – женский);
 - рекомбинантная – образующаяся в результате рекомбинации (кроссинговера) в мейозе и состоящая из фрагментов хромосом, имеющих разное генетическое происхождение (мейоз – особое двухступенчатое деление клетки, приводящее к образованию из одной диплоидной клетки четырех гамет, имеющих гаплоидный набор хромосом);
 - телоцентрическая – хромосома с центромерой, расположенной на ее самом концевом участке.
67. Штамм – культура генетически однородных микроорганизмов.
68. Экспрессия (гена) – переход гена в активное состояние, при котором происходит реализация записанной в нем генетической информации, приводящая к синтезу первичных молекулярных продуктов гена – РНК и белка (транскрипция и трансляция гена).

ВОПРОСЫ ИТОГОВОГО КОНТРОЛЯ (ЗАЧЕТ)

1. Опишите историю генной инженерии.
2. Объясните понятия прокариоты и эукариоты.
3. Опишите строение нуклеиновых кислот. Какие особенности строения ДНК лежат в основе генной инженерии.
4. Опишите процесс репликации.
5. Опишите процесс транскрипции.
6. Опишите процесс трансляции.
7. Что такое обратная транскрипция? Каково ее значение в генной инженерии.
8. Что такое рестриктазы? Какова их роль в технологии рекомбинантных ДНК?
9. Опишите применение плазмиды pBR322 в качестве вектора.
10. Какими способами передается генетическая информация в естественных условиях клетками прокариот и эукариот?
11. Опишите общие этапы технологии рекомбинантных ДНК.
12. На месте преступления найден волос преступника, содержащий 10^{-12} г ДНК. Мы можем определить только 10^{-9} г ДНК. Можно ли получить такое количество ДНК из 1 волоса? Если возможно, опишите метод.
13. Как можно превратить фрагменты иРНК (mRNA) в кДНК (cDNA)?
14. Какими способами можно влиять на экспрессию генов, клонированных в прокариотических организмах?
15. Иногда рекомбинантный белок получают в виде химерного продукта. Почему?
16. Какие ограничения и различия существуют при биосинтезе белков прокариотами и эукариотами?
17. Какие свойства ферментов можно изменить с помощью направленного мутагенеза?
18. Опишите стратегию олигонуклеотид-направленного мутагенеза с

использованием плазмидной ДНК.

19. Опишите роль остатков цистеина в повышении стабильности белка.
20. Как изменяется стабильность белка при замене аспарагина на другой аминокислотный остаток?
21. Изложите принцип метода ПЦР (полимеразная цепная реакция).
22. Изложите принцип метода ELISA (иммуноферментный анализ). Что такое моноклональные антитела?
23. С помощью какого метода можно выявить доклиническую стадию заболевания, вызванного ДНК-содержащим вирусом?
24. Что такое геномная дактилоскопия и как ее используют для характеристики следовых количеств ДНК?
25. Какие ферменты используются при производстве этанола? Можно ли с помощью генной инженерии изменить их эффективность и технологичность применения?
26. Что такое «супербацилла»?
27. Как повысить пищевые качества силоса?
28. Как можно модифицировать бактерии рубца с целью обеспечения жвачных животных незаменимыми аминокислотами?
29. Какова вероятность создания рекомбинантных растений, способных фиксировать азот?
30. Каков естественный механизм, по которому почвенные бактерии заставляют растения обеспечивать их питательными веществами?
31. Каковы преимущества биологических инсектицидов перед химическими?
32. Можно ли по классу белка Сгу судить о чувствительности к нему насекомых?
33. Можно ли методами генной инженерии повысить эффективность бакуловирусов как инсектицидных агентов?
34. Почему Ti-плазмида из *Agrobacterium tumefaciens* является наилучшим кандидатом для создания вектора-переносчика чужеродного гена в хромосомную ДНК растения?
35. Что такое репортерные гены?
36. В чем заключается метод бомбардировки клеток микрочастицами для трансформации растений?
37. Как повысить устойчивость растений к насекомым-вредителям, используя методы генной инженерии?
38. Как повысить устойчивость культурных растений к гербицидам, используя методы генной инженерии?
39. Как повысить устойчивость растений к патогенным бактериям, используя методы генной инженерии?
40. Какой подход можно применить для создания растения, устойчивого к высоким концентрациям солей?
41. Как получают трансгенных животных?

42. Что такое клонирование?
43. Опишите возможности использования молочной железы животного как биореактора.
44. Какие подходы используют для выведения трансгенных птиц и рыб?
45. Что такое банк CEPH-семей? Для чего он создан?
46. Что такое контиг хромосомы?
47. Что такое генная терапия *ex vivo* и *in vivo*?
48. Какие опасности может принести широкое использование методов генной инженерии?
49. Объясните, почему запрещены исследования в области терапии клеток зародышевой линии?
50. Что такое правила GMP, GLP, GCP?