**Ферменты генетической инженерии**

Ферменты генетической инженерии - это ферменты, позволяющие проводить различные манипуляции с молекулами ДНК: разрезать в определенных местах, соединять различные по происхождению фрагменты, синтезировать новые, не существующие в природе последовательности, и т.д. Рассмотрим основные ферменты генетической инженерии.

ДНК-полимеразы. Одним из наиболее часто используемых в генетической инженерии ферментов является ДНК-полимераза I, выделенная из E.coli или фага Т4. ДНК-полимераза I обладает способностью удлинять цепь ДНК в направлении 5м> 3 м путем присоединения комплементарного нуклеотида. Это свойство ДНК-полимераз используется в генной инженерии для построения второй комплементарной цепи: при добавлении фермента к одноцепочной ДНК-матрице в присутствии праймера произойдет ее удвоение. Это свойство используется, например, при создании Кднк-библиотек. ДНК-полимераза применяется также для заполнения «бреши» в цепи ДНК, например, при застраивании фрагментов с выступающими 5 м- концами. экзонуклеазная активность ДНК-полимераз используется для введения радиоактивной метки во фрагмент ДНК.

Использование специфических термостабильных ДНК-полимераз - Tth- и Taq- полимераз - выделенных из бактерий, живущих в гейзерах, позволило проводить амплификацию - множественную наработку любого фрагмента ДНК методомполимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР, в основу которого положена Taq-полимераза, не только упростил некоторые старые методики генной инженерии, но и позволил проводить молекулярное маркирование как отдельных генов, так и целых геномов.

Из некоторых вирусов была выделена специфическая ДНК-полимераза - РНК-зависимая ДНК-полимераза, названная обратнгой транскриптазой, или ревертазой. Ревертазы могут синтезировать комплементарную цепь ДНК на РНК-матрице. С помощью ревертаз можно получать кДНК-ДНК-копии мРНК. кДНК позволяют изучать строение генов и идентифицировать полноценные копии этих генов в геноме.

ДНК-лигаза осуществляет одну функцию - соединение фрагментов ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соединениями нуклеотидами. Этот процесс называется лигированием. Наиболее часто для лигирования в генной инженерии используют ДНК-лигазу фага Т4. с помощью лигазы Т4 соединяют любые фрагменты ДНК с любыми концами: «липкими» или «тупыми». Это один из наиболее часто использующихся ферментов.

Нуклеазы - это большая группа ферментов, катализирующих реакцию гидролиза молекул нуклеиновых кислот. В результате действия нуклеаз молекула ДНК или РНК распадается на фрагменты или отдельные нуклеотиды. Исходная функция нуклеаз в клетке - деградация ненужных в данный момент жизнедеятельности молекул (например, деградация мРНК после трансляции) и защита от чужеродных молекул нуклеиновых кислот (расщепление фаговой ДНК бактериальными нуклеазами при заражении бактерии фагом).

Нуклеазы по типу их действия можно поделить на группы. Нуклеазы могут действовать только на молекулы и ДНК, и РНК одновременно (нуклеаза золотистой фасоли). Нуклеазы избирательно могут действовать на одноцепочечную (нуклеаза S1), или двуцепочечную (экзонуклеаза III) молекулы ДНК , или на гибридную ДНК - РНК-молекулу (рибонуклеаза Н).

Кроме того, нуклеазы можно разделить на два типа: на экзонуклеазы и эндонуклеазы. Экзонуклеазы обычно гидролизуют молекулы с 5 м- или 3 м- свободных концов, а эндонуклеазы могут расщеплять внутри последовательности фрагмента или кольцевой молекулы ДНК.

Рестриктазы. Отдельную группу, особенно с утилитарной точки зрения ее применения в генной инжененрии, представляют специфические эндонуклеазы - рестриктазы.

В основе метода, позволившего непосредственно приступить к манипуляциям с генами, лежит открытие ферментов, названных рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами). Еще в 1953г. было обнаружено, что ДНК определенного штамма E. Coli, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В в клетки штамма С), не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на фрагменты ДНК-специфическими ферментами - рестриктазами. К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз. В генетической инженерии наиболее широко используются коло 200.

Рестриктазы предщставляют собой особый класс эндонуклеаз, которые гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, называются сайтами рестрикции.каждая из рестриктаз узнает свой свой сайт рестрикции и разрезает ДНК либо внутри последовательности сайта рестрикции, либо в непосредственной близости от него. Таким образом, при действии конкретной рестриктазы одна и та же последовательность ДНК будет всегда образовывать одинаковый набор фрагментов. Обозначение рестриктаз складывается из начальных букв латинского названия вида бактерий, из которого был выделен фермент, и дополнительного обозначения, так как из бактерий одного вида может быть выделено несколько различных рестриктаз: Eschrichia coli - EcoR I. EcoRV. Haemophilus influenzae - Hinf I. Streptomices albus - Sal I. Thermus aquaticus - Taq I.

Рестриктазы делятся на несколько типов по характеру расщепления нуклеотидной последовательности. Рестриктазы I ТИПА УЗНАЮТ САЙТ РЕСТРИКЦИИ, НО РАСЩЕПЛЯЮТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК на произвольном расстоянии (от нскольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов) от сайта узнавания. Такие рестриктазы невозможно использовать для решения генно-инженерных задач. Рестриктазы III типа похожи на рестриктазы I типа, они гидролизуют ДНК на на рвсстоянии 20 - 35 н.п. от сайтов узнавания и также довольно редко используются в практических целях.

Ферменты, используемые для получения рекомбинантных молекул, - рестриктазы II типа. Основной характеристикой таких рестриктаз является то, что у них сайты узнавания и места рестрикции совпадают. Обычно рестриктаза II типа узнает определенную последовательность на ДНК и гидролизует ее внутри последовательности сайта рестрикции. Сайты рестрикции рестриктаз II типа представлены симметричными при поаороте на 180 градусов последовательностями - палиндромами:

5 GAATTC 3

3 CTTAAG 5 сайт рестрикции рестриктазы EcoR I

5 TAGA 3

3 ATCT 5 сайт рестрикции рестриктазы Taq I

Рестриктазы II типа делятся на несколько классов в зависимости от раразмера сайта рестрикции и длины получаемых фрагментов ДНК:

1) мелкощепящие - сайт рестрикции которых представлен четырьмя нуклеотидными парами;

2) среднещепящие - сайт рестрикции - 6 - 8 н.п.;

3) крупнощепящие - сайт рестрикции - 10 - 14 н.п.

Рестриктазы II типа можно отнести к двум группам по тому , как они расщепляют последовательность ДНК. Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности, а другие - со сдвигом, с образованием «ступеньки». В первом случае образуются так называемые «тупые» концы, а во втором - «липкие»,т.е. фрагменты имеют на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки.

Образование при расщеплении рестриктазами фрагментов с «липкими» концами:

5 G v AATTC 3 5 C v CGG 3

EcoR I 3 CTTAA ^ G 5 Hpa II 3 GGC ^ C 5

Образование при расщеплении рестриктазами фрагментов с «тупыми» концами:

TA v GA 3 5 GTT v AAC 3

Taq I 3 AT ^ CT 5 Hinc I 3 CAA ^ TTG 5

Фрагменты ДНК,имеющие одинаковые «липкие» концы, могут соединяться друг с другом с помощью ДНК-лигазы, при этом сайт рестрикции восстанавливается. Фрагменты с «липкими» концами более удобны для создания рекомбинантных ДНК, так как ДНК-лигаза обеспечивает беспрепятственное соединение фрагментов.

Ферментативная активность рестриктаз измеряется в единицах активности. Это такое количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза за один час 1 мкг ДНК фага ? при оптимальных условиях. оптимальные условия рестрикции для каждой рестриктазы являются индивидуальными и зависят от рН, ионной силы, присутствия определенных ионов, температуры проведения реакции. Рестриктазы являются основными ферментами, используемыми в генетической инженерии.