**Ферменты генетической инженерии**

**Введение**

Осуществить рекомбинацию негомологичных молекул ДНК in vitro стало возможно лишь после открытия в конце 1960-х - начале 1970-х гг. ряда новых ферментов с уникальными свойствами, имеющих в качестве субстратов катализируемых ими реакций нуклеиновые кислоты, и в первую очередь ДНК.

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 свойства ферментов, наиболее часто используемых в генно-инженерных работах.

**Рестриктазы**

Ферменты этого типа были открыты в результате подробного изучения механизма явления, получившего название «рестрикция, контролируемая хозяином». В 1950-х гг. в нескольких лабораториях, изучавших развитие фагов в бактериальных клетках, было установлено, что способность бактериального вируса расти на определенных бактериальных культурах может зависеть от штамма, в котором этот фаг размножался в последний раз.

Наиболее подробно данное явление изучено для бактериофага лямбда л. Природным хозяином лямбды л является кишечная палочка Escherichia coli К12. Фаг, выросший на этом штамме, обозначают л. К. Другим хозяином фага л может быть штамм Е. coli С. Фаговое потомство, полученное на этой бактериальной культуре обозначают л С. В1953 г. Г. Бертани и Дж. Уэйгл обнаружили, что фаг л С размножается в клетках Е. coli К12 с очень низкой эффективностью, в то время как на Е. coli С - хорошо.

Эффективность размножения фага определяли титрованием его препарата на газоне бактериальных клеток. Данная процедура заключается в том, что к суспензии клеток добавляют определенное количество фагового препарата и затем эту смесь равномерно наносят на прозрачную агаризованную питательную среду в чашках Петри. Через определенное время клетки образуют на поверхности твердой среды мутную пленку газона (сплошного роста) бактериальной культуры. В тех местах, где находились клетки, инфицированные фагом, возникают прозрачные зоны лизиса, называемые обычно бляшками или негативными колониями. Подсчитав число бляшек и зная количество фагового препарата, которое обусловило образование этих бляшек, можно вычислить титр жизнеспособных фаговых частиц в анализируемом препарате. Титр фага выражают числом бляшкообразующих единиц в 1 мл (БОЕ/мл).

Обнаружилось, что эффективность титрования л С на Е. coli К12 составляла лишь 2 относительно того же показателя на Е. coli С. Однако немногочисленное потомство фага л С, выросшее на Е. coli К12, уже с одинаковой эффективностью титровалось на обоих штаммах Е. coli. Было показано, что фаг л К не является генетическим мутантом фага л С. Поэтому предположили, что л К представляет собой модифицированный вариант фага л С и этй модификацию осуществляет клетка-хозяин.

Эксперименты с радиоактивно меченными бактериофагами показали, что ограничение роста (рестрикция) фага связано с ферментативной деградацией его ДНК в бактериальной клетке. Клеточная ДНК защищена от деградации щтаммоспецифичной модификацией, которая, как выяснилось, состоит в метилировании нуклеотидов. Эти результаты позволили выдвинуть исчерпывающую гипотезу о биохимических механизмах рестрикции и модификации.

Гипотеза оказалась плодотворной, и открытие ферментов рестрикции - эндодезоксирибонуклеаз, или рестриктаз, и ферментов модификации - ДНК-метилтрасфераз, часто называемых ДНК-метилазами, полностью ее подтвердило.

Таким образом, при инфицировании немодифицированным фагом л С клеток Е. coli К12 происходит одновременное расщепление фаговых молекул ДНК рестриктазой и метилирование их ДНК-метилазой. В результате конкуренции этих двух ферментативных процессов часть молекул ДНК фага л (2 ) успевают модифицироваться прежде, чем они подвергнутся нуклеазной атаке. Такая метилированная ДНК дает начало модифицированному фаговому потомству л К. Данная модификация не наследуется фагом, и при размножении л К на Е. coli С образуется фаговое потомство, ДНК которого снова неметилирована.

Рестриктазы узнают определенные последовательности нуклеотидов и разрезают двунитевую ДНК на фрагменты. Модификация заключается в метилировании определенных оснований в последовательности, узнаваемой сопряженной рестриктазой; тем самым обеспечивается защита данного участка ДНК от воздействия рестриктазы. Одновременное наличие в клетке этих двух ферментативных активностей (так называемая R-M система) препятствует гидролизу собственной нуклеиновой кислоты. Чужеродная же ДНК при проникновении в бактериальную клетку служит субстратом для обоих ферментов.

Первоначально многие считали, что единственной функцией R-M систем является защита клеток от инфицирования фагами. Однако дальнейшие исследования позволили сделать предположение о том, что R-M системы осуществляют функцию ограничения скрещивания между различными бактериальными видами и штаммами, которая, однако, не абсолютна и позволяет части чужеродной ДНК проникать в клетку, рекомбинационно встраиваться и поддерживаться в качестве генетического фонда для получения эволюционного преимущества. Уместно заметить, что у бактерий весьма проблематично определение вида. Существуют даже предположения об общем генофонде всех микроорганизмов, что должно было бы привести к бесконечному появлению новых видов бактерий во времени. Реально же мы видим, что бактерии проявляют определенное постоянство морфологических, генетических и биохимических характеристик. Достойными кандидатами для обеспечения относительной стабильности генетического материала, т.е. для осуществления генетической изоляции, не отрицающей обмена определенными блоками, являются системы рестрикции модификации.

В 1968 г. М. Мезельсон и Р. Юань сообщили о выделении первой рестриктазы из штамма Е. coli К12. Подобный фермент был получен и из штамма Е. coli В. Данные эндонуклеазы ЕcoК и ЕcoВ отличались высокой специфичностью по отношению к узнаваемой последовательности нуклеотидов, но расщепляли молекулы ДНК неспецифически в другом месте, отстоящем от участка (сайта) узнавания. В 1970 г. Х. Смит и К. Вилькокс выделили из Haemophius influenza рестриктазу HindII, не только специфически узнающую, но и специфически расщепляющую молекулы ДНК. При гидролизе вирусной или плазмидной ДНК рестриктазами такого типа образуется строго определенный набор фрагментов. Это наглядно выявляется при электрофоретическом разделении смеси получающихся фрагментов.

Принципиальное значение для разработки методологии генетической инженерии имело открытие в 1971 г. Р. Ёшимори рестриктаз ЕcoRI и ЕcoRII. С помощью первой из них удалось выполнить пионерскую работу по направленной реконструкции генетического материала in vitro. В настоящее время рестриктазы используют практически во всех генно-инженерных экспериментах. Такое широкое применение ферментов данного типа обусловлено их высокой специфичностью, а также особенностями структуры концов фрагментов ДНК, образуемых рестриктазами. Общепринято термины рестриктаза, эндонуклеаза рестрикции, сайтспецифическая эндодезоксирибонуклеаза считать синонимами.

Х. Смит и Д. Натас в 1973 г. предложили номенклатуру рестриктаз, которая включает следующие пункты:

1. Название каждого фермента является производным от бинарного родовидового обозначения микроорганизма-хозяина, содержащего данную R-M систему, и составляется по следующему правилу: к первой прописной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида.

2. За родовидовым названием следует, в случае необходимости, обозначение серотипа или штамма.

3. Различные системы рестрикции-модификации, кодируемые одной и той же бактериальной клеткой, обозначаются римскими цифрами.

4. Ферменты рестрикции- модификации в общем виде обозначаются как эндонуклеаза R или метилаза M с последующим определением названия системы.

5. Если система генетически локализована в геноме фага или на плазмиде, то после родовидового названия указывается символ внехромосомного элемента. Штаммовая принадлежность в этих случаях указывается в скобках.

Открытие большого числа рестриктаз и изучение их свойств позволило выявить некоторые закономерности функционирования ферментов и разделить их на три класса. Основной классификации служат в первую очередь потребность фермента в кофакторах и характер расщепления ДНК.

Наиболее изученными **рестриктазами класса 1** являются ферменты ЕcoК и ЕcoВ, выделенные соответственно из клеток Е. coliК12 и Е. coli В. Это ферменты с очень схожей структурой. Оба содержат три типа неидентичных субъединиц с молекулярной массой 135,60 и 50 кДа, хотя соотношение субъединиц различается для этих двух ферментов. В случае ЕcoВ ситуация более сложная, так как выявлены по крайней мере три активные олигомерные структуры. Основная из которых имеет состав б2в4Y2.

Рестриктазы класса 1 специфичны к немодифицированной двухцепочечной ДНК и обладают следующими свойствами: требуют в качестве кофакторов аденозинтрифосфат (АТР), S-аденозинмонофосфат. Расщепление ДНК совмещено с гидролизом АТР. В едином субъединичном белке имеются такие ферментативные активности, как расщепление ДНК, метилированные ДНК и узнавание специфической последовательности ДНК.

Однако разрыв ДНК происходит случайным образом на значительном расстоянии от участка узнавания- от 400 до 7000 пар нуклеотидов. Продукты расщепления ДНК гетерогенны.

Ф. Студиэр и П. Бэндепедхяй в 1988 г. На основе подробного изучения гидролиза ДНК фага Т7 рестриктазой ЕcoК предложил общую модель действия рестриктаз класса 1 на ДНК. Суть этой модели состоит в том, что рестриктаза класса 1 после взаимодействия с ДНК в участке узнавания начинает осуществлять АТР- зависимую транслокацию цепей ДНК через себя в обоих направлениях. При встрече двух соседних молекул фермента, транслоцирующих ДНК, они разрезают двухцепочечную ДНК в районе контакта. Гетерогенность продуктов гидролиза ДНК рестриктазами класса 1 может объясняться неодновременным случайным взаимодействием молекул фермента с разными участками узнавания на каждой молекуле ДНК, а следовательно, неодновременным началом транслокации цепей ДНК. Кроме того, не исключена возможность неравномерной транслокации цепей на разных молекулах препарата ДНК.

Системы **рестриктации-модификации класса 2** состоят из отдельных белков рестрикционной эндонуклеазы и модификационной метилазы. Поэтому рестриктазы данного класса можно выделить в индивидуальном состоянии, свободном от метилазной активности, что в значительной мере упрощает их изучение и последующее использование для расщепления молекул ДНК.

Рестриктазы класса 2 - относительно просто организованные белки, состоящие из двух субъединиц одного типа со сравнительно небольшой молекулярной массой. Отличительной чертой рестриктаз класса 2 является то, что они узнают и разрезают немодифицированную двухцепочечную молекулу ДНК по специфичным нуклеотидным последовательностям, и это приводит к образованию дискретного набора фрагментов анализируемой ДНК. Для специфического действия этих ферментов требуются только ионы Mg2+ в физиологических концентрациях. Рестриктазы класса 2 обычно узнают последовательности двухцепочечной ДНК длиной от 4 до 8 пн, имеющие ось симметрии второго порядка,- палиндромы.

При этом ряд рестриктаз расщепляет ДНК строго по оси симметрии узнаваемой последовательности, что приводит к образованию фрагментов ДНК с тупыми концами, не имеющими выступающих одноцепочечных участков.

Другой фермент - ЕcoRI- узнает гексануклеотидную последовательность и расщепляет ее с образованием взаимокомплементарных одноцепочечных липких концов.

Если гидролизировать молекулы ДНК различного происхождения рестриктазой ЕcoRI, то в каждом случае будет образовываться строго определенный специфический набор фрагментов ДНК. Важно подчеркнуть, что все фрагменты будут иметь идентичные липкие концы. При смешивании разных препаратов таких фрагментов ДНК в определенных условиях липкие концы могут реассоциировать за счет комплементарных взаимодействий, и таким образом могут стыковаться фрагменты молекул ДНК, выделенных из любых организмов.

Размер узнаваемой рестриктазой последовательности, как правило, обусловливает частоту встречаемости этих участков в природных ДНК. Для случайной последовательности ДНК бесконечной длины с равным содержанием каждого из четырёх нуклеотидов вероятность наличия определенной последовательности длиной N на молекуле ДНК будет равна , причем вырожденность последовательности участков узнавания, обнаруженная для некоторых рестриктаз, увеличивает данную вероятность.

Большой интерес для экспериментов по клонированию фрагментов ДНК представляют рестриктазы, которые, обладая разной специфичностью, дают при гидролизе ДНК одинаковые липкие концы. После соединения одинаковых липких концов, возникающих при действии на ДНК различных рестриктаз, обычно образуются гибридные последовательности, уже не узнаваемые некоторыми из этих ферментов.

Целенаправленный поиск эндонуклеаз рестрикции класса 2, обусловленный значением этих ферментов, привел к открытию большого числа новых рестриктаз. Новой считается любая рестриктаза, найденная в не изученном ранее штамме. Дальнейшие исследования позволяют решить, действительно ли данный фермент узнает новую последовательность нуклеотидов или же является аналогом уже известной рестриктазы. В том случае, если обнаруженная рестриктаза узнает ранее неизвестную последовательность, она называется прототипом. Однако часто ферменты, выделенные из различных микроорганизмов, узнают одну и ту же последовательность и при гидролизе определенной ДНК образуют одинаковый спектр фрагментов.

Такие рестриктазы называются изошизомерами. В то время, узнавая одну и ту же последовательность, рестриктазы могут по-разному расщеплять двухцепочечную ДНК. Поэтому ферменты, имеющие одинаково узнаваемые последовательности и одинаково их расщепляющие, принято называть истинными изошизомерами.

Как уже отмечалось, подавляющее большинство рестриктаз класса 2 используют в качестве субстрата немодифицированную ДНК. Однако выявлены рестриктазы данного класса, которые расщепляют in vitro только метилированные последовательности ДНК.

**Рестриктазы класса 3**имеют некоторое сходство с рестриктазами класса 1. Нативный фермент состоит из двух различных субъединиц и бифункционален, т. е. обладает как рестриктазной, так и иетилазной активностью.

Рестриктазы класса 3 узнают несимметричные последовательности длиной 5-6 пн и расщепляют ДНК в стороне от участков узнавания на расстоянии 24-27 пн, образуя одноцепочечные - концы длиной 2-3 нуклеотида. Для проявления эндонуклеазной активности требуется только АТР и ионы Mg2+, а SAM лишь стимулирует реакцию, причем расщепление ДНК не сопровождается гидролизом АТР. При действии ферментов данного класса in vitro не удается исчерпывающе гидролизировать ДНК. Причины этого пока не известны.

Рестриктазы необычайно широко распространены в мире микроорганизмов. Показано, что рестрикция и модификация не коррелируют с патогенностью. Не обнаружено и зависимости от потребления кислорода, т.е. R-М системы имеются и в аэробах, и в анаэробах. Строение клеточной стенки также не накладывает ограничений на присутствие систем рестрикции-модификации. Необходимо подчеркнуть, что рестриктазы и метилазы не являются обязательными компонентами клетки. Штаммы, не содержащие R-М систем, иногда называют «нулевыми».

**ДНК-лигаза**

В 1961 г. М. Мезельсон и Дж. Вейгл на примере л показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Эта работа дала импульс поиску ферментов, участвующих в процессе рекомбинации. Вскоре при изучении фагов л и Т4 были выявлены фагоспецифичные нуклеазы, необходимые для осуществления фаговой рекомбинации. Это указывало на правильность предложенной гипотезы о механизме кроссинговера. Начались интенсивные поиски фермента, участвующего в воссоединении расщепленных нуклеазами молекул ДНК. В 1967 г. Независимо в нескольких лабораториях был открыт фермент, названный ДНК-лигазой, который катализирует синтез фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК.

Удалось обнаружить два типа ДНК-лигаз: фермент, синтезируемый в клетках E.coli, и фермент, появляющийся в клетках E.coli, инфицированных фагом Т4. Они различались по потребностям в кофакторах. ДНК-лигаза E.coli в качестве кофактора требует дифосфопириидиддуклеотид, в то время как лигаза фага Т4- аденозинтрифосфат. Кроме того, ДНК-лигаза фага Т4 в отличии от ДНК-лигазы E.coli способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами, т.е. фрагментов без перекрывающихся одноцепочечных комплементарных участков. Поэтому в настоящее время в генно-инженерных экспериментах предпочитают использовать ДНК-лигазу фага Т4, как более универсальный фермент.

ДНК-лигаза фага Т4 является мономерным полипептидом с молекулярной массой 68 кДа и катализирует образование фосфодиэфирной связи между прилегающими 5-фосфатным и 3- гидроксильным концами цепей ДНК. При этом возможны два типа реакций: 1) легирование липких концов; 2) легирование тупых концов.

**ДНК-полимераза I E.coli**

ДНК-полимераза I E.coli была обнаружена А. Корнбергом с сотрудниками в 1958 г. Этот фермент явился первой найденной полимеразой. Он представляет собой мономерную полипептидную цепь с молекулярной массой 103 кДа и имеет трехмерную структуру. Каждый домен белка обладает отдельной ферментативной активностью.

ДНК-полимераза I E.coli не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК. Однако если такие молекулы денатурировать и получить одноцепочечные формы, то с ними полимераза связывается в количествах, пропорциональных длине этих участков,- примерно одна молекула на 300 нуклеотидных остатков. Poll связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК.

**Обратная транскриптаза**

При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития они проходят стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Х. Темин выдвинул гипотезу о существовании вирусспецифического фермента, способного синтезировать на РНК- матрице комплементарную ДНК. А 1970 г. Х. Темин и С. Мизутани, а также независимо от них Д. Балтимор открыли такой фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название ревертаза.

Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц. Каждый вирион содержит около 50 молекул этого фермента. Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц - б(65 кДа) и в(95 кДа), присутствующих в эквимолярном количестве. б-Субъединица представляет собой N-концевую часть (две трети) в-субъединицы.

Обратная транскриптаза обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

· ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;

· Активностью РНКазы Н, гидролизирующей РНК в составе гибрида РНК-ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;

· ДНК-эндонуклеазной.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеаза, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина.

в-Субъединица ревертазы обладает всеми тремя активностями, в то время как б-субъединица- только полимеразной и РНКазы Н.

Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК, так и на ДНК-матрицах. Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий двухцепочечный участок-праймер. Праймером служит одноцепочечный сегмент РНК или ДНК, которые в процессе реакции оказываются ковалентно связанными с новосинтезированной цепью ДНК.

Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК (кДНК). Реакцию обратной транскрипции проводят в присутствии сильных ингибиторов РНКазной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК. В качестве праймера при обратной транскрипции поли(А)- содержащих мРНК используют олиго, а для молекул РНК, не имеющих 3-поли(А)-концов,- химически синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные 3-концу изучаемой РНК. Кроме того, последний тип молекул РНК можно перевести в поли(А)-содержащие с помощью поли(А)-полимеразы E.coli.

После синтеза на мРНК комплементарной цепи ДНК и разрушения РНК осуществляют синтез второй цепи ДНК. При этом используют способность ревертазы образовывать на 3-концах одноцепочечных кДНК самокомплементарные шпильки, которые могут выполнять функции праймера. Матрицей служит первая цепь кДНК. Данная реакция может катализироваться как ревертазой, так и ДНК-полимеразой I E.coli. Сочетание этих двух ферментов позволяет повысить выход полноценных двухцепочечных молекул кДНК.

По окончании синтеза первая и вторая цепи кДНК остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей праймером при синтезе второй цепи. Эту петлю расщепляют эндонуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются тупыми, и для повышения эффективности последующего клонирования их репарируют до тупых с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I E.coli. Полученную двухцепочечную кДНК можно затем встраивать в клонирующие векторы, размножать в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований.

**Нуклеаза Bal31**

В 1975 г. Х. Грей с соавторами обнаружил фермент, который функционирует: 1) как экзонуклеаза, катализирующая удаление малых олигонуклеотидов или мононуклеотидов одновременно с 5 и 3 концов двухцепочечной ДНК, причем обе цепи ДНК деградируют примерно с одинаковой скоростью; 2) как эндонуклеаза, специфичная к одноцепочечной ДНК. Данный фермент получил название нуклеаза Bal31.

Способность нуклеазы Bal31 вызвать деградацию с концов одновременно обеих цепей молекулы ДНК привела к этому ферменту внимание исследователей. Оказалось, что образовавшиеся после обработки Bal31 фрагменты ДНК можно сшить с помощью ДНК-лигазы фага Т4 с другими молекулами ДНК, имеющими тупые концы. Эффективность лигирования сещественно повышается, если укороченные с помощью Bal31 молекулы ДНК обработать фрагментом Кленова ДНК - полимеразы I E.coli. Это указывает на то, что в результате гидролиза нуклеазой Bal31 образуются фрагменты ДНК как с тупыми, так и с одноцепочечными концами.

В определенных условиях линейную двхцепочечную ДНК можно контролируемо гидролизовать с обоих концов нуклеазой Bal31, что используется при конструировании гибридных молекул ДНК, когда необходимо в их составе сблизить какие-либо функционально значимые генетические элементы.

**Концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза**

фермент генетический инженерия рестриктаза

В 1962 г. Ф. Боллум обнаружил в тимусе теленка необычный фермент, названный концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой, или терминальной трансферазой.

Данный фермент катализирует последовательное присоединение дезоксинуклеотидов к 3-ОН концу молекулы ДНК. Субстратом терминальной трансферазы при использовании в качестве кофактора ионов является одноцепочечная ДНК с 3-ОН концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одноцепочечным 3-ОН концом. При использовании в качестве кофактора ионов этот фермент может катализировать присоединение дезоксинуклеотидов к 3-ОН концу двухцепочечной ДНК с тупыми концами или даже к 3-ОН концу двухцепочечной ДНК с выступающим одноцепочечным 5-р концом.

При введении в реакцию, направляемую терминальной трансферазой, лишь одного типа дезоксинуклеотидов образуются молекулы ДНК, имеющие гомополимерные одноцепочечные 3-концы. Таким же образом можно достроить другим молекулам ДНК гомополимерные 3-концы, комплементарные первым.

Смешение полученных препаратов ДНК при определенных условиях может приводить к формированию гибридных молекул ДНК. Именно с помощью концевой дезоксинуклеотидлитрансферазы в 1972 г. Был выполнен первый эксперимент по рекомбинации молекул ДНК in vitro.

**Поли(А)-полимераза E.coli**

Данный фермент, открытый А. Сиппелом в 1973 г., катализирует присоединение к свободному 3-ОН концу одноцепочечных молекул РНК поли(А)-последовательностей.

Поли(А)-полимераза находит применение при подготовке молекул РНК к копированию с них комплементарных ДНК. Этот фермент можно использовать и для введения радиоактивной метки в 3-конец РНК.

Кроме рассмотренных выше, в экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и анализу структуры гибридных ДНК используют большой набор других ферментов нуклеинового обмена. К ним относятся полинуклеотидкиназа, щелочная фосфотаза, 5-экзонуклеаза фага л, экзонуклеаза lll E.coli, рибонуклеазы, метилазы и др.

Все используемые при конструировании гибридных молекул ДНК ферменты должны быть высокоочищенными, так как даже незначительные посторонние нуклеазные загрязнения могут приводить к побочным реакциям и резко снижать эффективность получения целевых генетических конструкций.

Поэтому изучение ферментов, разработка методов их глубокой очистки, а также поиск новых ферментов, специфически действующих на нуклеиновые кислоты, активно продолжаются. Важной областью исследований, которой не всегда уделяется должное внимание, является оптимизация условий культивирования микроорганизмов- продуцентов ферментов нуклеинового обмена.

В ряде лабораторий показано, что, оптимизируя параметры процесса культивирования путем применения методов математического планирования эксперимента, можно повысить удельный выход этих ферментов в десятки раз.

В совокупности многочисленные ферменты, имеющие в качестве субстрата катализируемых ими реакций нуклеиновые кислоты, составляют биохимическую базу экспериментов по конструированию in vitro и анализу гибридных молекул ДНК.