

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.07 Генная инженерия

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Введение в генную инженерию	3
1.2 Лекция № 2-3 Векторы клонирования в бактериях.	10
1.4 Лекция № 4 Методы конструирования гибридных молекул ДНК in vitro.	17
1.5 Лекция № 5 Клонирование и синтез молекул ДНК.	20
1.6 Лекция № 6 Полимеразная цепная реакция (ПЦР). История открытия и сущность метода.	23
1.7 Лекция № 7. Модификации ПЦР. Применение метода.	28
1.8 Лекция № 8 Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК.	31
1.9 Лекция № 9 Методы секвенирования нового поколения	34
1.10 Лекция № 10 Создание геномных библиотек.	42
1.11 Лекция № 11 Экспрессия чужеродных ДНК в бактериальных клетках.	45
1.12 Лекция № 12 Генетическая инженерия белков.	49
1.13 Лекция № 13 Генно-инженерные организмы в деятельности человека.	51
1.14 Лекция № 14 Генетическая инженерия дрожжей.	55
1.15 Лекция № 15 Контроль применения биотехнологических методов.	57
2. Методические материалы по проведению практических занятий	62
2.1 Практическое занятие 1-2 (ПЗ-1-2) Ферменты генной инженерии.	62
2.3 Практическое занятие 3 (ПЗ -3) Итоговое занятие за 1 модуль.	66
2.4 Практическое занятие 4 (ПЗ -4) Методы отбора гибридных клонов.	69
2.5 Практическое занятие 5 (ПЗ -5) Полимеразная цепная реакция. Техника выделения нукleinовых кислот. Амплификация.	70
2.6 Практическое занятие 6 (ПЗ -6) Полимеразная цепная реакция. Учёт результатов.	71
2.7 Практическое занятие 7 (ПЗ -7) Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК.	72
2.8 Практическое занятие 8 (ПЗ -8) Итоговое занятие за 2 модуль.	73
2.9 Практическое занятие 9 (ПЗ -9) Скрининг геномных библиотек.	73
2.10 Практическое занятие 10 (ПЗ -10) Экспрессия про- и эукариотических генов.	75
2.11 Практическое занятие 11 (ПЗ -11) Генетическая инженерия белков.	76
2.12 Практическое занятие 12 (ПЗ -12) Итоговое занятие за 3 модуль.	79
2.13 Практическое занятие 13 (ПЗ -13) Трансгенные животные.	79
2.14 Практическое занятие 14 (ПЗ -14) Трансгенные растения.	84

КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Введение в генную инженерию».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Определение генной инженерии, цель, объект исследования
2. История развития генетической инженерии
3. Этапы генной инженерии
4. Достижения и перспективы

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение генной инженерии, цель, объект исследования

1. ГИ – искусство использовать знания основ и методов молекулярной биологии для конструирования организмов с заданными наследственными свойствами. (Рыбчин, 1999).

2. ГИ это манипуляция с генами *invitro* с целью получения новых рекомбинантных организмов и изучения структуры генов. (Матвиенко Н.И. 2001). Программа-максимум генной инженерии – создание жизнеспособного организма *de novo* по чертежам, разработанным в лаборатории - «синтетическая биология»

Генетическая инженерия и современная биотехнология возникли в результате развития микробиологии, генетики и биохимии. Достижения молекулярной биологии, молекулярной генетики, биологии клетки, а также вновь открытые экспериментальные методы и новое оборудование обеспечили немыслимые темпы развития генетической инженерии и биотехнологии.

Цель генной инженерии

Целью генной инженерии является изменение строения генов, их расположения в хромосоме и регулирование их деятельности в соответствии с потребностями человека. Для достижения этой цели применяются различные методы, позволяющие осуществлять в промышленных масштабах производство белков, создавать новые сорта растений и породы животных, наиболее отвечающие требованиям, диагностировать и лечить различные инфекционные и наследственные болезни человека.

Объекты исследования. Объектами исследования генетической инженерии являются вирусы, бактерии, грибы, животные (в том числе организм человека) и растительные клетки. После очищения молекулы ДНК этих живых существ от других веществ клетки материальные различия между ними исчезают. Очищенная молекула ДНК может быть расщеплена с помощью энзимов на специфические отрезки, которые затем при необходимости можно с помощью сшивающих энзимов соединить между собой. Современные методы генетической инженерии позволяют размножать любой отрезок ДНК или заменять любой нуклеотид в цепи ДНК другим. Разумеется, эти успехи достигнуты в результате последовательного изучения закономерностей наследственности.

2. История развития генетической инженерии

Генетическая инженерия (генная инженерия) возникла в результате открытия энзимов, специфическим образом разделяющих материальную основу наследственности — молекулу ДНК на отрезки и соединяющих эти отрезки концами друг с другом, а также электрофоретического метода, позволяющего с высокой точностью разделять по длине отрезки ДНК. Создание методов и оборудования для определения специфической последовательности нуклеотидов, образующих молекулу ДНК, а также для автоматического синтеза любого желаемого отрезка ДНК обеспечило развитие генетической инженерии быстрыми темпами.

Развитию у учёных стремления управлять наследственностью способствовали доказательства, свидетельствующие о том, что основу наследственности всех растений и животных составляет молекула ДНК, что бактерии и фаги также подчиняются законам наследственности, что мутационный процесс является общим для всех живых существ и может регулироваться экспериментальными методами.

1869 г. — В 1869 году Иоганн Фридрих Мишер выделил из лейкоцитов вещество нуклеин, содержащее ДНК. Поначалу странно-кислое вещество из ядер нейтрофилов гноя называли нуклеином и считали, что оно служит хранилищем фосфора — уж больно много его там было

1888–1909 гг. — Начала формироваться генетическая терминология: появились понятия «ген», «генотип», «фенотип», «хромосома», «мутация».

В 1892 году русский микробиолог и физиолог растений, работая с растениями табака, зараженными мозаичной болезнью, описал передачу болезнетворного начала посредством совершенно новых инфекционных агентов, проходящие через мельчайшие бактериальные фильтры. Наблюдавший то же самое, но чуть позже, Мартин Бейеринк назвал эти биологические объекты *вирусами*.

1901 г. — Альбрехт Коссель обнаружил в составе белкового компонента нуклеина — нуклеиновых кислот — азотистые основания: аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил.

1903 г. — Уолтер Саттон и Теодор Бовери предположили, что физическим субстратом mendeleевского наследования служат хромосомы.

1910 г. и позже — Морган, Бриджес, Стёртвант и Мёллер показали, как гены расположены на хромосомах, и развили хромосомную теорию наследственности Саттона и Бовери.

1915–1917 гг. — Фредерик Туорт и Феликс д'Эррель обнаружили вирусы бактерий — бактериофаги.

В 1928-м британский бактериолог Фредерик Гриффит в надежде получить вакцину от пневмококка впервые наблюдал бактериальную *трансформацию*: посредством какого-то трансформирующего фактора убитый вирулентный штамм бактерий передал свою вирулентность живому неопасному штамму.

1944 г. — Эвери, Маклауд и Маккарти показали, что трансформирующий фактор Гриффита представляет собой ДНК.

1940–1950-е гг. — Описаны конъюгация и трансдукция — процессы переноса генетического материала между бактериальными клетками с помощью плазмид и фагов. **1948 г.** — Барбара Макклинток обнаружила в ДНК кукурузы транспозоны.

1953 г. сотрудники Кембриджского университета Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик предложили двухспиральную модель ДНК, которая объясняла не только структуру самой ДНК, но и каким образом происходит удвоение (репликация) ДНК, один из самых важных для живых организмов процесс — процесс передачи генетической информации; а базисом для ее создания послужили работы рентгеноструктурщиков из Королевского колледжа Лондона — Мориса Уилкинса и Розалинд Франклин с ее аспирантом, Реймондом Гослингом.

1958 г. возникновение генетической энзимологии. А. Корнберг обнаружил фермент, осуществляющий репликацию ДНК, т.н. ДНК-полимеразу 1 (фермент Корнберга), за что был награжден Нобелевской премией. Его сын также получил Нобелевскую премию за работы в области молекулярной биологии, но в 2006 г;

1960 г. — Франсуа Жакоб и Жак Моно описали функциональную единицу прокариотического генома — оперон, — показав, что экспрессия генов регулируется на уровне транскрипции.

1961–1966 гг. расшифрован генетический код и выяснено строение элементов, управляющих действием генов и синтезом белков: промоторов, операторов и т.д.);

В начале 60-х годов Вернером Арбером было сделано ключевое для ГИ открытие таких ферментов, как рестрикционные эндонуклеазы, которые могли разрезать ДНК в строго определенных местах, что открыло путь к получению рекомбинантных ДНК;

В это же время в лаборатории Кораны был синтезирован химико-ферментативным путем один из генов кишечной палочки (ген аланиновой тРНК). Интересна реакция на это выдающееся событие некоторых ученых того времени. Один из них сказал: «Подобно проекту «Аполлон» (полет на Луну), все это сделано лишь для того, чтобы показать, что это можно сделать, и как и это проект, никогда не будет повторено». Однако более дальновидным оказался нобелевский лауреат, биохимик Артур Корнберг. «То что вы сделали - сказал он Коране – это атомная бомба 1980 г.» Кстати, до сих пор находятся ученые, которые считают, что дальнейшее развитие ГИ может привести к губительным последствиям для человечества и всей жизни на Земле;

1970 г. Открыт фермент обратная транскриптаза (синоним - ревертаза), который катализирует синтез ДНК, используя в качестве матрицы РНК. До этого полагали, что процесс может идти только в одном направлении ДНК – РНК – белок (т.н. центральная догма молекулярной биологии). Для ГИ это имело важное значение, поскольку матричная РНК содержит информацию, достаточную для синтеза одного или нескольких белков, т.е. эквивалентную одному или нескольким генам. Кроме того, в клетке может быть много копий мРНК одного типа и всего лишь одна молекула ДНК. Используя ревертазу и выделенную РНК можно синтезировать ДНК, содержащую всего один или несколько генов. В 1975 г. используя указанный выше подход, с помощью обратной транскриптазы был синтезирован ген глобина;

1972-73 гг. считают рубежом создания генетической инженерии, когда в лаборатории Берга была получена *invitro* и введена в бактерию *E. coli* первая рекомбинантная молекула ДНК;

1970 г. — Гамильтон Смит выделил первую эндонуклеазу рестрикции II типа.

1970 г. — Мортон Мандель и Акико Хига нашли способ делать клетки бактерий компетентными — способными лучше принимать ДНК из внешней среды.

1972 г. — Кес Ай и Пит Борст применили электрофорез ДНК в агарозном геле с этидиум бромидом в качестве визуализирующего вещества.

1970-е гг. — Разработаны способы введения генов в растительные клетки с помощью Ti-плазмид и микроинъекций.

1972 г. — Пол Берг получил первую рекомбинантную ДНК.

1974 г. — Герберт Бойер и Стэнли Норман Коэн получили первую бактерию, несущую эукариотический ген — ген рибосомной РНК лягушки.

1974 г. — Рудольф Йениш создал первое трансгенное млекопитающее

1980-е гг. — Разработаны способы введения генов в клетки с помощью электропорации и обстрела из генной пушки.

1983 г. — Кэри Мюллис разработал метод ПЦР.

1983 г. — Появилось первое трансгенное растение.

1995–1996 гг. — Секвенированы первые про- и эукариотические геномы. В 1995-м секвенировали первый геном свободноживущего прокариота. Как ни странно, пионером стала *Haemophilus influenzae*, а не классическая модель, *E. coli*. Хромосому последней досеквенировали спустя два года, уже после прочтения куда более крупной первой эукариотической ДНК (*Saccharomyces cerevisiae*, 16 хромосом, 1996 год).

2000 г. — Создан «золотой рис» — первое инженерное растение с повышенной пищевой ценностью.

2003 г. — Почти полностью прочитан геном человека.

2010 г. — Группа Крейга Вентера и Гамильтона Смита создала Синтию — первый организм с полностью синтетической хромосомой.

2011 г. — Зарегистрирован первый российский генно-терапевтический препарат, «Неоваскулген».

2012 г. — В Европе одобрено первое генно-терапевтическое лекарство, Glybera. **2012 г.** — Разработана технология геномного редактирования CRISPR-Cas9.

2014 г. — Получена бактерия с расширенным генетическим кодом. 2

014–2017 гг. — Первые попытки клинического редактирования ДНК человека инженерными нуклеазами.

2017 г. — В США одобрено первое генно-терапевтическое лекарство, Kymriah.

3. Этапы генной инженерии

Поскольку генная инженерия появилась с первыми **рекомбинантными** ДНК, начнем наше повествование именно с них. Это вообще основа основ генной инженерии. Но вначале разберемся с терминологией.

Понятие «рекомбинантная ДНК» тесно связано с понятием «клонирование». Если с первым термином всё понятно — это молекула, составленная из фрагментов ДНК разного происхождения, — то со вторым часто происходит путаница. Если речь, идет о **генной** инженерии, то под клонированием обычно подразумевается **молекулярное клонирование**, то есть введение интересующего фрагмента ДНК в молекулу-вектор, которая вместе с собой размножит этот фрагмент в какой-то клетке. Иногда ген нужно не копировать в составе вектора, а встроить в хромосому клетки, и тогда он будет размножаться только вместе с ней, при клеточном делении, а значит, далеко не как на ксероксе. Поэтому в реальной лабораторной жизни молекуляры говорят «*Лойду-ка я клонировать ген X*», если собираются смастерить рекомбинантную ДНК — ввести ген X в вектор Y. Клонирование овцы Долли, резуховидки Таля и прочих *организмов* — совсем другие, клеточные и тканевые истории [1], [2]. Даже из этого определения ясно, что генно-инженерные организмы, частью которых стала рекомбинантная ДНК, не получаются так, как это любят изобразить анти-ГМО-лоббисты (рис. 1). И вообще, генетически модифицированные организмы (ГМО) получают далеко не только генно-инженерными манипуляциями (рис. 2), а генно-инженерными манипуляциями получают не только *транс-*, но и *цисгенные* и *интрагенные* организмы [155] — сбывающуюся мечту селекционера: встраиваемые в них гены происходят исключительно из них самих или родственников, способных с ними скрещиваться. Согласно опросам, такие плоды почему-то реже отбивают аппетит, чем трансгенные, полученные с применением «неродственных» фрагментов ДНК [3].

1 этап – изоляция и выделение ДНК, содержащей необходимый ген или его часть.

В экспериментальных условиях невозможно работать с одной копией гена, поэтому необходимо получение большого числа идентичных копий гена или его частей. Для этого используется метод **молекулярного клонирования**.

2 этап – Рекомбинация ДНК. Фрагмент ДНК из какого-то организма вставляется в вектор (плазмида или фаг). Поскольку объединение молекул клонируемой ДНК и ДНК вектора является рекомбинацией, такие гибридные молекулы называют **рекомбинантными молекулами**. Полученный рекомбинантный вектор должен содержать ген, сообщающий бактерии устойчивость к определенному антибиотику;

3 этап – Трансформация. Рекомбинантная ДНК входит в клетку хозяина и пролиферирует, т.е. размножается. Этот процесс называется трансформацией, поскольку функция клетки хозяина может быть изменена за счет активности чужой ДНК. В обычных условиях плазмидная ДНК с трудом проникает в клетки бактерий. Если клетки обработать хлоридом кальция (CaCl_2), то эффективность трансформации резко увеличивается, но все равно только одна из 10 000 клеток может принять плазмидную молекулу ДНК;

4 этап - селективная амплификация (т.е. увеличение числа копий рекомбинантной ДНК). Специфичный антибиотик, добавленный в среду, убивает клетки, которые лишены защиты от него. В то же время, трансформированные клетки защищены, благодаря гену антибиотико-устойчивости, продукт которого нейтрализует антибиотик. На рисунке видно, что количество векторов в каждой клетке бактерии разное поскольку они могут копироваться независимо;

5 этап – Изоляция полученных клонов ДНК.

6 этап – получение специфического белкового продукта

В основе биотехнологий, разработанных в течение XX в., лежат микроорганизмы.

Созданы возможности для производства различной продукции — лекарств, продовольственных продуктов и других биологически активных веществ с использованием быстро размножающихся и хорошо изученных в генетическом отношении микроорганизмов. Например, путём введения в геном бактерии гена инсулина, выделенного из поджелудочной железы человека, можно получать биологически активный гормон инсулин в чистом виде или путём введения гена гормона роста вырабатывать большие количества гормона соматотропина, культивируя его бактерии в искусственных условиях. Ныне многие биотехнологические компании мира производят этим методом различные лекарства.

Прогресс молекулярной биологии к концу XX — началу XXI в. обусловил быстрые темпы развития генной и клеточной инженерии.

4. Достижения и перспективы

Генная инженерия

Самые большие успехи периода конца XX — начала XXI в. были достигнуты, с одной стороны, благодаря выяснению полной последовательности генома человека и, с другой, — открытию 25 тысяч генов, регулирующих все жизненные процессы, протекающие в растениях, начиная с прорастания семян и кончая плодоношением.

Создаваемые в настоящее время новые технологии осуществляются не только на основе микроорганизмов, но и более сложных животных и растений. В частности, продукция, получаемая в результате введения различных ценных генов в клетки растений и животных, начинает применяться в народном хозяйстве. Например, путём внедрения в геном банана генов, синтезирующих вакцину против инфекционных болезней, учёные добились получения трансгенных растений, в плодах которых вырабатывается готовая вакцина. При употреблении в пищу таких плодов банана у человека вырабатывается иммунитет против инфекционных заболеваний. Эта технология, несомненно, имеет большое экономическое значение. Кроме того, в результате введения в геном растений генов, выделенных из бактерий, которые усваивают токсическую ртуть, в настоящее время получены трансгенные растения, усваивающие ртуть из почвы. Высаживание таких растений в местах, заражённых ртутью, позволяет очистить от неё почву.

Клеточная инженерия

Большие успехи в биотехнологии достигнуты в направлении клеточной инженерии.

Выделяя одну здоровую клетку из органа больного и культивируя её в искусственной питательной среде, можно получить набор клеток, относящихся к определённой ткани, и даже восстановить этот набор клеток до целого органа. Затем этот новый орган пересаживают больному, и он выздоравливает. Это называется технологией создания «новых» органов. Данная технология, хотя и применима по отношению к коже, сухожилиям и хрящам, но не подходит для сердца, печени, почек и нервных тканей. Открытие в 1998 г. американским учёным Дж. Томсоном специальных «стволовых» клеток (англ. stem cells) намного облегчило эту трудность и открыло широкие возможности для развития технологии создания «новых» органов. «Стволовые» клетки — это клетки, которые ещё не полностью сформировались, но похожи на эмбриональные и обладают способностью расти в искусственной среде до образования любой ткани. Выращивая такие клетки в среде с витамином А, можно получить даже нервные ткани. К настоящему времени полностью разработаны технологии получения тканей, присущих различным органам животных. Теперь на очереди стоит задача создания с использованием полученных тканей «новых» органов тела, схожих по функциям и форме с нормальными органами. Эта работа осуществляется бурными темпами в лабораториях мира.

1. По заверениям ученых демографов, в ближайшие двадцать лет население земного шара удвоится. Пользуясь современными агрокультурами и агротехнологиями, прокормить такое количество людей будет просто невозможно. Следовательно, уже сейчас пора подумать о том, как с наименьшими потерями поднять урожайность сельхозугодий вдвое. Поскольку для обычной селекции срок в два десятилетия крайне мал, то остается механическая модификация генетического кода растений. Можно, например, добавить ген устойчивости к насекомым-вредителям или сделать растение более плодовитым. Это основной довод трансгенетиков.

2. С помощью генной инженерии можно увеличить в генетически измененной продукции содержание полезных веществ и витаминов по сравнению с «чистыми» сортами. Например, можно «вставить» витамин А в рис, с тем чтобы выращивать его в регионах, где люди испытывают его нехватку.

3. Можно существенно расширить ареалы посева сельхозпродуктов, приспособив их к экстремальным условиям, таким, как засуха и холод.

4. Путем генетической модификации растений можно существенно уменьшить интенсивность обработки полей пестицидами и гербицидами. Ярким примером здесь является уже состоявшееся внедрение в геном кукурузы гена земляной бактерии *Bacillus thuringiensis*, уже снабжающего растение собственной защитой, так называемым Вт-токсином, и делающего по замыслу генетиков дополнительную обработку бессмысленной.

5. Генетически измененным продуктам могут быть приданы лечебные свойства. Ученым уже удалось создать банан с содержанием анальгина и салат, вырабатывающий вакцину против гепатита В.

6. Еда из генетически измененных растений может быть дешевле и вкуснее.

7. Модифицированные виды помогут решить и некоторые экологические проблемы. Конструируются растения, эффективно поглощающие цинк, кобальт, кадмий, никель и прочие металлы из загрязненных промышленными отходами почв.

8. Генная инженерия позволит улучшить качество жизни, очень вероятно – существенно продлить её; есть надежда найти гены, ответственные за старение организма и реконструировать их.

Вакцины - одно из самых значительных достижений медицины. В последние годы разработке вакцин стали уделять особое внимание. Это обусловлено тем, что в настоящее время отсутствуют эффективные вакцины, способные предупредить развитие СПИДа, туберкулеза и малярии. Кроме того, увеличилась заболеваемость, обусловленная теми инфекциями, с которыми человечество ранее успешно боролось. При этом распространение микроорганизмов, устойчивых к воздействию антибактериальных препаратов, приобрело характер экологической катастрофы и поставило под угрозу эффективность лечения многих тяжелых заболеваний. Повышенный интерес к вакцинам возник после того, как была установлена роль патогенных микроорганизмов в развитии тех заболеваний, которые ранее не считали инфекционными.

Поэтому в последние 10–15 лет правительства многих стран стали принимать меры, направленные на интенсивную разработку и производство принципиально новых вакцин.

В 1990 г. в некоторых исследовательских лабораториях приступили к разработке новых вакцин, которые основаны на введении «голой» молекулы ДНК. Уже в 1992–1993 гг. несколько независимых групп исследователей в результате эксперимента доказали, что введение чужеродной ДНК в организм животного способствует формированию иммунитета.

Технологию рекомбинантной ДНК применяют также для создания живых ослабленных вакцин нового типа, достигая уменьшения болезнестворной способности бактерий и вирусов путем направленных мутаций генов, кодирующих вирулентные протеины возбудителя заболевания. Эту же технологию используют и для получения

живых рекомбинантных вакцин, встраивая гены, кодирующие иммуногенные протеины, в живые непатогенные вирусы или бактерии (векторы), которые и вводят человеку.

Принцип применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм пациента вводят молекулу ДНК, содержащую гены, кодирующие иммуногенные белки патогенного микроорганизма. Для получения ДНК-вакцин ген, кодирующий продукцию иммуногенного протеина какого-либо микроорганизма, встраивают в бактериальную плазмиду. Плазмида представляет собой небольшую стабильную молекулу кольцевой двухцепочечной ДНК, которая способна к репликации (воспроизведению) в бактериальной клетке. Кроме гена, кодирующего вакцинирующий протеин, в плазмиду встраивают генетические элементы, которые необходимы для экспрессии («включения») этого гена в клетках эукариотов, в том числе человека, для обеспечения синтеза белка. Такую плазмиду вводят в культуру бактериальных клеток, чтобы получить большое количество копий. Затем плазмидную ДНК выделяют из бактерий, очищают от других молекул ДНК и примесей. Очищенная молекула ДНК и служит вакциной. Введение ДНК-вакцины обеспечивает синтез чужеродных протеинов клетками вакцинируемого организма, что приводит к последующей выработке иммунитета против соответствующего возбудителя. При этом плазмиды, содержащие соответствующий ген, не встраиваются в ДНК хромосом человека.

ДНК-вакцины можно вводить в солевом растворе обычным парентеральным способом. При этом большая часть ДНК поступает в межклеточное пространство и только после этого включается в клетки.

Последующие эксперименты подтвердили способность ДНК-вакцин формировать иммунитет в отношении разнообразных возбудителей.

Генотерапия

Технологии генотерапии базируются на мировых достижениях в расшифровке генома человека.

Среди технологий генотерапии в настоящее время актуальны следующие: генотерапия соматических клеток, генотерапия репродуктивных (половых) клеток, генотерапия с использованием рибозимов и антисенс-ДНК.

В основе лежит контролируемое изменение генетического материала клеток, приводящее к "исправлению" не только наследственных, но и, как стало ясно в последнее время, приобретенных генетических дефектов живого организма.

Важнейшей технологической задачей генотерапии является разработка системы переноса или адресной доставки корректирующего генетического материала к клеткам-мишеням в организме больного, несущего в своем геноме дефектный ген.

Решающим условием успешной генотерапии является обеспечение эффективной доставки, то есть трансфекции (в широком смысле) или трансдукции (при использовании вирусных векторов) чужеродного гена в клетки мишени, обеспечение длительного функционирования его в этих клетках и создание условий для полноценной работы гена (его экспрессии). Трансфекция может проводиться с использованием чистой (голой) ДНК, встроенной соответствующей плазмиду, или комплексированной ДНК (плазменная ДНК, соединенная с солями, белками, органическими полимерами), или ДНК в составе вирусных частиц, предварительно лишенных к репликации.

Генотерапия может быть использована для лечения болезней, связанных с мутациями генома (в том числе серповидно-клеточной анемии, эмфиземы, гемофилии и других), инфекционных заболеваний; для коррекции дефектов центральной нервной системы и для стимуляции иммунного ответа организма при онкозаболеваниях).

Генотерапия может использоваться не только для лечения, но и для профилактики наследственных и приобретенных заболеваний. Таким образом, данная технология имеет большое социальное и народнохозяйственное значение.

За рубежом генодиагностика и генотерапия рассматриваются как один из приоритетов развития биомедицины. В Российской Федерации также освоены основные

технологии генотерапии - секвенирование, физическое и генетическое картирование генома человека и животных, осуществляется расшифровка молекулярных механизмов наследственных и онкозаболеваний, решаются проблемы генетической безопасности человека, сохранения его генофонда в условиях разрушающего антропогенного воздействия среды.

Производство лекарственных препаратов

Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в «фабрики» для масштабного производства любого белка.

Это дает возможность детально анализировать структуру и функции белков и использовать их в качестве лекарственных средств.

Микроорганизмы после введения соответствующих генов становятся продуцентами ценных для медицины белков. В биореакторах на специальных питательных средах выращивают бактерии, грибы, дрожжи, производящие антибиотики, ферменты, гормоны, витамины и другие биологически активные соединения.

Кишечная палочка также производит соматотропин - гормон роста человека, секретируемый гипофизом. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости. Если вводить соматотропин в дозах 10 мг на 1 кг веса три раза в неделю, то за год ребенок, страдающий от его недостатка, может подрасти на 6 см.

Ранее его получали из трупного материала, из одного трупа: 4 - 6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат. Таким образом, доступные количества гормона были ограничены, кроме того, гормон, получаемый этим способом, был неоднороден и мог содержать медленно развивающиеся вирусы.

Противовирусный препарат интерферон в организме человека вырабатывается в крайне незначительных количествах. После выявления аминокислотной последовательности интерферона ген был искусственно синтезирован и встроен в вектор, затем вектор ввели в клетки бактерий и получили штамм-продуцент интерферона.

1.2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Векторы для клонирования в бактериях».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Понятие вектора. Требования, предъявляемые векторным молекулам.
2. Плазмидные векторы.
3. Фаговые векторы.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие вектора. Требования, предъявляемые векторным молекулам.

Основным изобретением, применяемым для доставки чужеродных генов в различные организмы являются векторы.

Вектор (лат. *vector* – переносчик, носитель) – молекул ДНК, способная самостоятельно реплицироваться, включать чужеродную ДНК, переносить ее в реципиентные клетки и стабильно там поддерживать.

- Векторы используют для создания *in vitro* молекул рекомбинантных ДНК и для последующего введения их в клетки, в составе, которых они клонируют (умножают) число чужеродных генов.
- Первые векторы были созданы для работы с клетками кишечной палочки (Lobban, Kaiser, 1973). Были сконструированы первые плазмидный (Cohen, 1973) и фаговый (Murray, 1974) векторы, разработаны новые методы рекомбинации молекул ДНК *in vitro*, выявлены основные закономерности экспрессии генов в чужеродном окружении.

- В качестве прокариотических векторов используются плазмиды, бактериофаги; в качестве эукариотических векторов применяют вирусы животных и растений, векторы на основе 2 мкм дрожжей и митохондрий, и ряд искусственно сконструированных векторов, способных реплицироваться как в бактериальных, так и в эукариотических клетках (челночные векторы).

Векторы для клонирования и экспрессии генов

Идеальный вектор должен обладать:

- местами для удобного встраивания фрагментов ДНК;
- достаточной ёмкостью;
- селективными маркерами, позволяющими выявлять клетки с этим вектором — как «пустым», так и со «вставкой»;
- участками ДНК, обеспечивающими его поддержание в виде отдельного репликона либо интеграцию клонированного фрагмента в хозяйский геном;
- участками ДНК, обеспечивающими (если требуется) эффективную экспрессию встроенного гена в выбранном хозяине.

Классифицируют векторы в зависимости от хозяев, в которых им предстоит попасть (бактериальные, дрожжевые и т.п.), в зависимости от типа репликона (плазидные, вирусные, комбинированные, членочные, искусственные хромосомы) и в зависимости от функционального назначения (интегративные, экспрессионные, векторы для клонирования, секвенирования или транскрипции).

2. Плазидные векторы.

В большинстве случаев для работы с бактериями выбирают плазидные векторы — их разработано великое множество, для любых исследовательских и производственных капризов.

Существует несколько видов векторов, но среди исследователей самой большой (и заслуженной) популярностью пользуется один из них — плазмиды. Они решают проблемы доставки клонированного гена в нужные клетки, его стабильного/временного поддержания там и эффективной экспрессии.

Плазмиды не связаны с бактериальной хромосомой, они могут реплицироваться независимо от нее. С помощью плазмид бактерии обмениваются друг с другом генетической информацией, — например, передают соседям устойчивость к какому-нибудь антибиотику.

Плазмиды существуют внутри бактерий в естественных условиях, поэтому никто не может помешать исследователю искусственно синтезировать плазмиду, которая будет обладать нужными для него свойствами, вшить в нее вставку (или несколько) и запустить в клетку. Плазмиды стараются сделать как можно более универсальными и подходящими для всех случаев жизни.

Для того, чтобы из плазмиды получился рабочий вектор, она должна обладать некоторыми важными характеристиками.

1. Прежде всего, плазмода обязательно должна в клетке размножаться, реплицироваться, потому что иначе она быстро подвергнется деградации, а вместе с ней исчезнет и ген-вставка. Для этого в ней должна быть специальная последовательность под названием «точка начала репликации», с которой и начинается удвоение ДНК. У разных видов живых существ эти точки имеют разную нуклеотидную последовательность. Поэтому, если мы хотим создать плазмиду, которая бы реплицировалась сразу в двух видах клеток (например, и в дрожжевых, и в бактериальных), то нам надо вставить в нее две точки начала репликации.

2. Кроме того, в ДНК плазмиды должны быть участки, в которых ее можно будет разрезать, чтобы вшить туда вставку. В качестве «ножниц» используются особые ферменты — рестриктазы. Они прекрасны тем, что режут ДНК не где попало, а в строго определенных местах, которые называются сайтами рестрикции (каждая рестриктаза

распознает только свой сайт и только в нем (или возле него) разрезает ДНК). Обычно в плазмиду ставят множество разных сайтов рестрикции, расположенных в разных точках, — благодаря этому ее можно будет разрезать в нужном месте нужной рестриктазой. Участок ДНК, на котором собрано несколько сайтов рестрикции, называется полилинкером.

3. Процесс, при котором бактерия «поглащает» плазмиду, именуется *трансформацией*. В естественных условиях трансформироваться может в каждый момент времени не вся популяция бактерий, а только ее часть — **компетентные клетки**. Существуют лабораторные методы, с помощью которых можно искусственно увеличить количество компетентных клеток (некоторые из них описаны ниже в главе «Как засунуть вектор в клетки»), однако, все равно, стопроцентная компетентность для бактериальной культуры — вещь недостижимая.

Так что, добавляя плазмиду к бактериям, мы заранее должны смириться с тем, что большая часть бактериальных клеток так и останется бесплазмидной, нетрансформированной. Поэтому нам придется отделять зерна от плевел, — то есть, трансформированные клетки от всех остальных. Для этого используется простой, но остроумный прием.

Допустим, мы встроили в нашу плазмиду ген устойчивости к какому-нибудь антибиотику (такой ген называется *селективным маркером*). Теперь клетки, которые «поглатили» плазмиду, будут неуязвимы для этого антибиотика и смогут спокойно жить в его присутствии. В результате, чтобы выделить из всех бактерий, к которым мы добавили плазмиду, те, которые смогли эту плазмиду использовать по назначению, нам достаточно будет добавить к бактериальной культуре соответствующий антибиотик. Те клетки, которые нам нужны, смогут существовать и делиться в присутствии этого антибиотика, а остальные этого делать не смогут.

Это небольшие кольцевые молекулы ДНК (чаще до 10 т.п.н.), построенные на основе типичных для бактерий внекромосомных репликонов — плазмид, которые могут кодировать устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам, разные интересные метаболические пути и регуляторные белки. [14]. Правда, нередко на них лежит вина за поражение хозяина тем или иным фагом. Плазмиды могут независимо размножаться в каком-то определенном круге хозяев — узком или широком, — а многие из них умеют передавать свои копии другим бактериям или даже клеткам эукариот в процессе «спаривания», или *конъюгации*. В природном виде эти мобильные элементы для клонирования обычно не используют, а создают химеры, содержащие только самое необходимое:

Очень часто бывает нужно ввести один и тот же ген и в *E. coli*, и в другую бактерию или эукариота. В таких случаях очень удобно использовать **челночные** (маятниковые, двудомные, **шаттл-**) векторы. Они содержат элементы, обеспечивающие их поддержание и детекцию в клетках нескольких типов. Здесь важно помнить, что селективные маркеры для отбора рекомбинантных клонов *E. coli* часто не подходят даже для других бактерий, не то что эукариот. Поэтому может потребоваться коррекция дозы антибиотика для селекции или введение в стандартные векторы новых деталей (рис. 6). К счастью, сейчас несложно добить уже готовый членочный вектор с нужными свойствами.

Плазмида pSC101 — первая векторная плазмида.

- Выделена в 1973 г. в лаборатории С. Коэна.
- Плазмида имеет размер 9,1 тпн, находится под строгим контролем репликации, детерминирует устойчивость к тетрациклину (T_{cr}) и обладает единственным местом действия рестриктазы EcoRI. Кроме того, на ДНК pSC101 в гене tet имеется по одному участку узнавания рестриктаз HindIII, BamHI и SalI

Недостатки плазмиды pSC101:

- 1) не удается фенотипически отличить клоны трансформантов, содержащих исходную или гибридные плазмиды;

- 2) при встройке по местам действия рестриктаз нарушается ген*tet*;
- 3) pSC101 имеет строгий контроль репликации и находится в клетке в количестве примерно шесть копий на бактериальную хромосому.

- **Плазмида pBR 322**

Одна из наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования pBR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*.

Эта плазмида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции.

Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости к антибиотикам, то последний инактивируется.

Успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов можно определить по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику. Но при этом сохраняется устойчивость к другому антибиотику.

Таким образом вектор дает возможность выявлять только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную плазмиду.

Одним из вариантов плазмидного вектора считают **космиду**. От обычной плазмиды она отличается лишь тем, что содержит когезивные концы ДНК фага λ (*cos*-последовательности). **Космиды** – плазмидные вектора, в которые встроен **cos-участок (липкие концы) генома фага λ** , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу.

После проникновения фаговых частиц в клетку, происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.

Благодаря *cos*-сайтам эти векторы могут быть **введены в клетку** не с помощью трансформации, а путем **инфекции**, в результате возрастает эффективность получения рекомбинантных клеток в 100 и более раз.

3. Фаговые векторы.

Фаговые векторы более эффективны, чем плазмидные, при клонировании крупных вставок.

Самыми распространенными для кишечной палочки являются векторы, сконструированные на основе фагов λ и M13.

Это перекроенные ДНК бактериофагов двух типов. Их разнообразие невелико, и используют их гораздо реже плазмид, но чужеродные гены с их помощью проникают в бактериальные клетки эффективнее: в конце концов, у эволюции было время отшлифовать паразитарные таланты вирусов.

Векторы на основе фага λ . Вирус лямбда представляет собой двухцепочечную линейную ДНК, упакованную в классический фаговый костюм — с головкой, отростком и прочими марсианскими деталями. Однако при всей своей типичности этот фаг уже более полувека подогревает исследовательский интерес. Встретившись с подходящей *E. coli*, лямбда «раздевается» и в виде ДНК с «липкими», то есть одноцепочечными и комплементарными друг другу, концами (*cos*-сайтами) проникает в цитоплазму. Там «липкие» концы замыкают ДНК в кольцо, она реплицируется, экспрессируется — в общем, делает всё, чтобы наплодить около сотни потомков, которые «оденутся» и дружным выходом лизируют (разрушат) клетку. Но фаг λ не зря называют умеренным — так агрессивно он поступает не всегда и вместо **литического** сценария действует по **лизогенному**: его ДНК встраивается в хромосому клетки и мирно путешествует в ней по бактериальным поколениям. Когда хозяин испытывает стресс, фаг спешит вырезаться из хромосомы и вовремя покинуть клетку, запустив **литический** цикл. Генному инженеру выгоднее использовать агрессивное поведение фага: если вырезать из фаговой ДНК крупный центральный кусок, отвечающий за никому не нужную лизогению, то вместо него можно встроить любую последовательность размером от 8 до 23 т.п.н. А это уже не мало и для создания библиотек, и для экспрессии чужеродных генов. Помимо **векторов**

замещения существуют и *векторы внедрения* (инсерционные). В носителях первого типа до клонирования нужно держать «заплатку», позволяющую им нормально упаковываться в требовательную к размеру ДНК головку λ . Во втором типе из фага почти ничего не вырезается (кроме ненужных рестрикционных мест, конечно), а чужеродная ДНК помещается, например, в ген [репрессора CI](#). Этим заодно предупреждаются и попытки вектора зажить тихой жизнью умеренного фага. Но у такого клонирования есть огромный минус: к λ -ДНК можно добавить не более 11 т.п.н.

Каким бы ни был вектор на основе фага λ , он отличается от космиды тем, что распространяется по бактериальной культуре самостоятельно: биологи, единожды собственноручно упаковав векторную/рекомбинантную ДНК в фаговый «чехол», далее полагаются на природные процессы ее распространения. То есть фаговый вектор — это просто модифицированный вирус. Космид же не кодирует ничего фагового, кроме липких концов, а потому не может самостоятельно порождать фаговые частицы и заражать новые клетки. Такова цена повышенной векторной ёмкости.

Векторы на основе фага M13. Этот фаг совсем не похож на λ (рис. 8) и на образ фага вообще — он нитчатый, его ДНК кольцевая и одноцепочечная. Векторы на его основе не участвуют в ёмкостной гонке, а служат для других целей. Распознав подходящего хозяина по половым пилиям на клетке, M13 «раздевается», и по матрице его ДНК синтезируется копия — формируется двухцепочечная, *репликативная форма* (RF) фага. Но в состав вириона потом войдет лишь одноцепочечная ДНК, причем в отношении ее размера M13 не капризен. Другой вопрос, что ему нужно абсолютно всё, что он кодирует, поэтому только небольшие вставки не нарушают репликацию этого фага. M13-векторы содержат типичные для плазмид системы селекции — например, *lacZα* со всем необходимым. От лямбды M13 отличается деликатностью в отношении хозяина: фаг немного замедляет его развитие, но «одевается» тихонько и уходит по-английски. Одноцепочечную рекомбинантную ДНК выделяют из фагов, которых находят в слабо выраженных бляшках на газоне *E. coli*, а двухцепочечную — как обычную плазмиду из расположенных там же клеток.

Одноцепочечные векторы удобны для приготовления меченых зондов, олигонуклеотид-направляемого мутагенеза и секвенирования дидезоксиметодом. Последняя цель уходит в историю, потому что и секвенировать сейчас стараются иначе, и приспособленных для этого плазмид уже немало. [Сайт-специфический мутагенез](#) с помощью олигонуклеотидов, напротив, набирает обороты: его быстрота и прецизионность немыслимы для классического, случайного мутагенеза. Он активно применяется в фундаментальных исследованиях, производстве ГМО и [белковой инженерии](#). Другой вопрос, что олигонуклеотид-направляемый мутагенез сейчас реже опирается на M13-векторы и чаще сочетается с ПЦР и техниками редактирования генома *in vivo*.

1.3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Векторы для клонирования в бактериях».

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Гибридные векторы.
2. Сравнительная характеристика векторов.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Гибридные векторы

К гибридным векторам условно относят векторы, которые сочетают в себе все или отдельные свойства плазмидных и фаговых векторов.

Фагмиды. Фагмидами называют плазмидные векторы, содержащие оги-сайт нитевидных фагов. Из векторов этого типа наиболее часто используются плазмиды серии

pEMBL, pUC 118/119 и Bluescript M13. Они образованы внедрением в векторы pUC фрагмента ДНК фага f1 или M13, содержащего сайт, необходимый для морфогенеза фаговых частиц, и ori-сайт.

В присутствии фага-помощника f1 (или M13) фагмиды, используя ori-сайт, начинают реплицироваться как фаговые ДНК, образуя однонитевые копии плазмид. Образовавшиеся однонитевые ДНК могут упаковываться *in vivo* в капсулу и одновременно с фагом-помощником покидать естественным путем клетку.

Таким образом, с помощью фагмид клонируемый фрагмент может быть получен и использован в одно- или двунитевой форме. Их преимущество перед векторами M13mp – возможность клонирования в них относительно больших фрагментов ДНК (до 10 т.п.н.), не подвергающихся внутренним перестройкам.

Космиды. Векторы, называемые космидами, могут включать до 40 тпн чужеродной ДНК и при этом активно амплифицироваться в *E. coli* как плазмиды. Космиды объединяют в себе свойства плазмидных векторов и векторов на основе фага λ.

Космиды фактически представляют собой автономные cos-сайты. Использование их для клонирования генов основано на том, что в линеаризованной форме они могут присоединяться к обоим концам фрагментов чуждДНК и образовывать структуры типа конкатемерных молекул ДНК. Такие молекулы способны упаковываться *in vitro* в головки фага λ, если cos-сайты находятся в одинаковой ориентации и размер ДНК между ними не превышает 52 тпн. Инъецированные в клетки рекомбинантные молекулы ДНК циркуляризуются через cos-сайты и автономно реплицируются.

Клонирование с помощью космидного вектора. Космид имеет точку начала репликации (*ori*), обеспечивающую ее существование в *E. coli* в виде плазмиды; два интактных cos-конца, разделенных уникальным сайтом для *ScaI*; *BamHI*-сайт вблизи одного из cos-сайтов и ген устойчивости к тетрациклину (Tetr). ДНК, которую хотят клонировать, расщепляют рестриктазой *BamHI* и фракционируют по размеру, чтобы выделить молекулы длиной примерно 40 тпн. Плазмидную ДНК расщепляют с помощью *ScaI* и *BamHI*. Оба препарата ДНК смешивают и обрабатывают ДНК-лигазой фага T4. Некоторые из гибридных молекул, образовавшихся после лигирования, содержат вставку размером около 40 тпн, так что их суммарная длина составляет примерно 50 тпн. Эти молекулы упаковываются *in vitro* в головки бактериофага λ, затем к головкам прикрепляются отростки, и образуются инфекционные частицы. При инфицировании этим «фагом» *E. coli* в бактериальной клетке оказывается линейная молекула ДНК с cos-концами, которые спариваются друг с другом ДНК-лигаза клетки-хозяина зашивает одноцепочечные разрывы, и образовавшаяся кольцевая молекула существует в клетке-хозяине как автономно реплицирующаяся единица. Трансформированные клетки можно идентифицировать по признаку устойчивости к тетрациклину.

Главные преимущества космид: 1) передача рекДНК в клетки инфицированием гораздо эффективнее, чем трансформацией; 2) в инфицированные клетки проникают в основном рекомбинантные молекулы ДНК; 3) происходит селекция больших клонируемых фрагментов (30-45 т.п.н.), в то время как при трансформации отбираются главным образом плазмиды меньшего размера. Последнее особенно важно при создании банка генов и при необходимости клонировать и анализировать эукариотические гены больших размеров.

Однако космидам присущи и серьезные недостатки. Первый – возможность объединения в одной рекомбинантной космиде двух или более фрагментов чуждДНК, не располагающихся рядом в исходном геноме, что затрудняет правильную интерпретацию выводов о структуре генов. Другой недостаток – нестабильность рекомбинантных космид. Наконец, наблюдается сравнительно высокий фон мультимерных векторных молекул, который затрудняет поиск рекомбинантных клонов.

Фазмиды. В фазмидных векторах искусно сочетаются положительные свойства фаговых и плазмидных векторов. Один из первых таких векторов – фазмода λpMYF131

(Янковский др., 1987). Размер фазмиды (33,3 тпн) не допускает ее упаковки в головку фага λ , поэтому для наработки векторной ДНК используют плазмидный репликатор, а само это свойство применяют для отбора рекомбинантных фазмид в виде фаговых частиц, реконструированных *in vitro*.

Фазмидные векторы так же как и фаговые, используют для клонирования кДНК и геномной ДНК. Эффективность упаковки рекомбинантных фазмид в фаговую головку с последующим инфицированием клеток *E. coli* превосходит эффективность трансформации бактерий плазмидами в 100 раз. Это существенно облегчает конструирование банков генов, содержащих до миллиона независимых клонов, повышая тем самым вероятность изолирования редких клонов.

2. Сравнительная характеристика векторов

Для клонирования генов в клетках *E. coli* применяют векторы, сконструированные на базе ДНК плазмид и фагов, а также векторы, сочетающие в себе их свойства (фазмиды, фагмиды и космиды). В силу различных биологических и физических характеристик различные векторы используют для разных целей.

Плазмидные векторы наиболее универсальны. В мультикопийных плазмidaх клонируют, как правило, фрагменты ДНК небольших размеров (до 10 т.п.н.), в малокопийных – средних (до 30-40 т.п.н.) и больших (50-100 т.п.н. и выше) размеров. Ограничение по длине клонируемых фрагментов ДНК вызвано главным образом низкой эффективностью трансформации клеток образующимися рекДНК. Для введения больших фрагментов ДНК в бактериальные клетки используют метод их предварительной упаковки в фаговые головки (например, РАС-клонирование) или метод электротрансформации (ВАС-клонирование), а для переноса в клетки животных предложены другие способы.

Векторы, основанные на использовании ДНК фага λ или его cos-сайта, имеют емкость до 22 (фаговые векторы и фазмиды) и даже 45 т.п.н. (космиды). Они практичны в работе, и поэтому их используют для создания геномных библиотек. Клонирование и анализ небольших фрагментов ДНК в них менее эффективны.

Векторы, использующие репликаторы нитевидных фагов, применяют для получения однонитевых фрагментов ДНК с целью их секвенирования или приготовления гибридизационных зондов.

**Возможности использования разных типов векторов
при клонировании в клетках *E. coli***

Операция	Векторы на базе ДНК				Другие векторы				
	λ	P1	N15	M13	Пла- змиды	Фаз- миды	Фаг- миды	Кос- миды	YAC* BAC
Клонирование сегментов ДНК:									
а) небольших (до 10 т.п.н.)	–	–	–	+	+	–	+	–	–
б) средних (10–20 т.п.н.)	+	–	+	–	+	+	–	–	–
в) крупных (20–50 т.п.н.)	–	–	+	–	–	–	–	+	–
г) сверхкрупных (50–100 т.п.н.)	–	+	+	–	–	–	–	–	+
д) гигантских (> 100 т.п.н.)	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Конструирование библиотек:									
а) геномных	+	+	+	–	–	+	–	+	+
б) кДНК	+	–	+	–	+	+	–	–	–
Экспрессия чужеродных генов									
Секвенирование	–	–	–	+	+	–	+	–	–
Синтез гибридизационных зондов	+**	–	–	+	+**	+**	+	–	–
Секреция чужеродных белков	–	–	–	–	+	–	–	–	–

* Дрожжевой вектор.

** При наличии фагоспецифических промоторов.

1.4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Методы конструирования гибридных молекул ДНК *in vitro*».

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Коннекторный метод.
2. Рестриктазно-лигазный метод.
3. Введение молекул ДНК в клетки.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Коннекторный метод

Технология рекомбинантных ДНК (ее называют также молекулярным клонированием или генной инженерией) — это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (дезоксирибонуклеиновой кислоты, ДНК) из одного организма в другой. Никакого единого, универсального набора методик здесь не существует, но чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме:

Из организма — донора нужных генов — экстрагируют нативную ДНК (клонируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, шивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонирующий вектор—встроенная ДНК»).

Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией.

Идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).

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

Предпосылками к созданию технологии рекомбинантных ДНК послужили многие открытия в области молекулярной биологии, энзимологии нуклеиновых кислот и молекулярной генетики бактериальных вирусов и внехромосомных элементов бактерий (плазмид). Конструирование рекомбинантных молекул осуществляется с помощью целого арсенала ферментов — обязательного и незаменимого инструмента практически всех этапов этого сложнейшего процесса. Речь идет прежде всего о ферментах рестрикции (рестрицирующих эндонуклеазах, рестриктазах), которые узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двухцепочечной молекуле ДНК.

В 1972 г. П. Берг с сотрудниками впервые сообщили о получении *in vitro* гибридной молекулы, состоящей из ДНК вируса SV40 и ДНК фага λ *dgal*. При этом использовался метод, получивший название коннекторного. Принцип одного из вариантов этого метода заключается в следующем. К 3'-концам одного из рекомбинируемых *in vitro* фрагментов ДНК с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы достраивают одноцепочечные олиго(dA)-сегменты определенной длины, а к концам другого фрагмента — олиго(dT)-сегменты примерно такой же длины. При смешении полученных таким образом фрагментов формируются кольцевые структуры за счет водородных связей между олиго(dA)- и олиго(dT)-последовательностями. Одноцепочечные бреши гибридных молекул ДНК застраивают с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* и цепи ковалентно шивают в лигазной реакции.

Коннекторным методом удается рекомбинировать *in vitro* фрагменты ДНК, полученные любым из способов расщепления исходной ДНК (механическим, ферментативным). При этом используют синтетические комплементарные олиго(dA)*олиго(dT)- или олиго(dG)*олиго(dC)-концы. Поскольку можно формировать

достаточно длинные взаимокомplementарные одноцепочечные концы, гибридные молекулы образуются с высокой эффективностью. В частности, поэтому при клонировании ДНК-копий матричных РНК, которые доступны в ограниченных количествах, обычно используют коннекторный метод.

Однако этот метод имеет недостатки. Часто выделение встроенного фрагмента из гибридной молекулы ДНК затруднено. В ряде случаев удается подобрать условия для избирательной денатурации олиго(dA*dT)-последовательностей, по которым состыкованы фрагменты ДНК, и расщепить образовавшиеся одноцепочечные участки эндонуклеазой S1. При рекомбинации *in vitro* фрагментов ДНК, генерированных рестриктазой PstI, с использованием синтетических олиго(dG)*олиго(dC)-концов участок узнавания этой рестриктазы восстанавливается и встроенный фрагмент можно уже достаточно просто выщепить из гибридной молекулы с помощью рестриктазы PstI. Однако кроме целевой последовательности данный фрагмент имеет дополнительные концевые сегменты олиго(dG*dC).

2. Рестриктазно-лигазный метод

Более простой и самый популярный метод получения *in vitro* гибридных молекул ДНК — рестриктазно-лигазный. Первые гибридные молекулы ДНК получили этим методом С. Коэн с сотрудниками в 1973 г.

Данный метод состоит в следующем:

1) рестриктазой класса II специфически разрезают молекулы ДНК на фрагменты, имеющие идентичные взаимокомplementарные липкие концы;

2) препараты различных молекул ДНК, гидролизованных одной и той же рестриктазой, смешивают, и при определенных условиях липкие концы разных фрагментов ДНК реассоциируют за счет комплементарного взаимодействия;

3) с помощью ДНК-лигазы происходит ковалентное связывание ассоциированных фрагментов ДНК.

По такой схеме могут быть ковалентно соединены *in vitro* два и более любых фрагмента, полученных при гидролизе молекул ДНК одной и той же рестриктазой. Однако с помощью рестриктаз (особенно одного фермента) в каждом конкретном случае можно получить лишь специфический, строго определенный набор фрагментов изучаемой ДНК. Первоначально это в некоторой степени ограничивало применение рестриктазно-лигазного метода. Но затем получила распространение новая его модификация, основанная на использовании линкерных молекул — синтетических сегментов ДНК, содержащих в своем составе последовательности, узнаваемые рестриктазами. Метод предложили Р. Шеллер с сотрудниками в 1977 г. Он позволяет достаточно просто рекомбинировать *in vitro* практически любые фрагменты ДНК.

Разработанный подход включает следующие операции:

по тупым или липким концам фрагмента ДНК, который предполагается рекомбинировать, с помощью лигазы фага T4 пришивают короткие синтетические двухцепочечные сегменты, имеющие участки узнавания определенной рестриктазы;

полученный фрагмент обрабатывают выбранной рестриктазой, в результате чего образуются липкие концы;

полученный фрагмент рекомбинируют *in vitro* с другими молекулами ДНК по обычной схеме рестриктазно-лигазного метода.

Использование линкерных молекул делает рестриктазно-лигазный метод рекомбинации фрагментов ДНК *in vitro* универсальным, поскольку исходные фрагменты можно получать самыми различными способами.

Рестриктазно-лигазный метод, по сравнению с коннекторным методом, находит более широкое применение в генно-инженерных манипуляциях, поскольку он более прост биохимически и, кроме того, дает возможность легко выщепить встроенный фрагмент из гибридной молекулы ДНК, что часто бывает важно при переносе фрагмента в другое генетическое окружение.

3. Введение молекул ДНК в клетки

Необходимый этап генно-инженерного эксперимента — введение полученных *in vitro* гибридных молекул ДНК в пермиссивные клетки (обеспечивающие репликацию этих молекул) с целью размножения, селекции и выделения клонов гибридов.

Введение в клетку нуклеиновой кислоты вируса с последующим образованием вирусного потомства называется трансфекцией. Эффективность трансфекции выражается обычно количеством инфекционных центров (бляшек, негативных колоний), приходящихся на молекулу или на единицу массы нуклеиновой кислоты вируса. Вирусные клоны, полученные после трансфекции из отдельных бляшек, называют трансфектантами. Следует отметить, что нуклеиновые кислоты некоторых типов вирусов неинфекционны, т. е. неактивны в teste трансфекции. Это обусловлено тем, что для инициации экспрессии генома данных вирусов необходимы определенные вирусспецифические белки, содержащиеся в вирусных частицах, но отсутствующие в препарате очищенной нуклеиновой кислоты.

Процесс, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называют трансформацией. Трансформацию клеток могут осуществлять как молекулы ДНК, реплицирующиеся в клетках внехромосомно (плазмиды), так и молекулы ДНК, интегрирующиеся в геном клетки (линейные и кольцевые молекулы ДНК). Генетически трансформированные клетки принято называть трансформантами. Эффективность трансформации обычно выражают количеством клонов (колоний, образованных в результате делений исходно единичной клетки) трансформантов, приходящихся на молекулу или единицу массы донорной ДНК. Данную генетическую (биохимическую) трансформацию необходимо отличать от онкогенной трансформации эукариотических клеток.

Физиологическое состояние клетки, в котором она способна поглощать нуклеиновую кислоту из окружающей среды, называется компетентностью. Однако многие бактерии, а также дрожжи и культивируемые клетки животных и растений такой физиологической компетентностью не обладают. Поэтому восприимчивость к экзогенной ДНК у них индуцируют различными способами. Такую компетентность принято называть индуцированной. Наиболее просто она достигается путем определенного химического или физического воздействия на клетки. Разные типы клеток имеют свои особенности строения клеточных стенок и плазматических мембран, поэтому они могут различаться по способам индукции у них компетентного состояния.

Исторически первым подходом к получению компетентных для трансфекции (трансформации) клеток бактерий является ферментативный гидролиз клеточных стенок, приводящий к удалению физического барьера на пути проникновения молекул ДНК в клетку. Для этой цели можно использовать различные индивидуальные ферменты (например, лизоцим) или смеси ферментов (например, пищеварительный сок виноградной улитки). При ферментативной обработке клетки необходимо помещать в изотонический раствор, имеющий примерно такое же осмотическое давление, какое характерно для цитоплазмы клетки. В этих условиях клетки, лишенные клеточной стенки, приобретают шарообразную форму и не лопаются от осмотического шока, наблюдавшегося в гипотонической среде.

В том случае, когда после гидролиза полностью удаляется клеточная стенка и остается только плазматическая мембрана, ограничивающая содержимое клетки, возникает осмотически чувствительный протопласт. Если после ферментативного гидролиза на плазматической мемbrane остаются фрагменты клеточной стенки или сохраняется внешняя мембрана (что характерно для грамотрицательных бактерий), то такие клетки называют сферопластами. Как и протопласти, они являются осмотически чувствительными и в изотоническом растворе имеют форму шара.

При получении протопластов и сферопластов большое значение имеет подбор условий, обеспечивающих в последующем эффективную регенерацию клеточных стенок.

Процедуры получения протопластов и сферопластов, трансформации их молекулами ДНК, регенерации клеточной стенки и отбора колоний трансформантов многоэтапны, а результат зависит от многих параметров: состава растворов, способов обработки и др. Все это приводит к тому, что данные методики отличаются низкой воспроизводимостью, требуют высокой квалификации исполнителя и весьма трудоемки. Поэтому по мере разработки более простых способов данный подход постепенно утратил свое значение. На смену пришли методы обработки клеток растворами солей.

В 1982 г. Т. Вонг и Е. Нейман с сотрудниками для введения молекул ДНК в культивируемые клетки мыши применили метод, получивший название электропорация. В последующие годы метод был усовершенствован, что позволило использовать его эффективно как для эукариотических, так и для прокариотических клеток. Суть данного подхода состоит в том, что кратковременное воздействие (обычно 5-20 мс) электрического поля высокой напряженности (1-15 кВ/см) на клеточную мембрану приводит к образованию в ней пор (электропробой). Время существования и размер пор достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. Объем клетки при этом увеличивается. Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и клеток-реципиентов для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы добиться высокой частоты поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80 % выживших клеток.

Электропорация — физический, а не химический метод, и это, по-видимому, обуславливает его широкое применение. Электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений.

Электропорация — наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки. Однако до недавнего времени он использовался в ограниченном числе лабораторий в связи с отсутствием серийных приборов — электропораторов. Появление и совершенствование таких приборов привело к широкому применению данного метода в генетической инженерии самых разных типов клеток.

Разработка простых, эффективных и воспроизводимых методов введения экзогенных молекул ДНК в нативной форме в пермиссивные клетки является необходимым условием успешного развития работ по клонированию чужеродной генетической информации в клетках любого типа. Поэтому данному направлению исследований уделяется пристальное внимание и оно постоянно развивается.

1.5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Клонирование и синтез молекул ДНК».

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Подготовка фрагментов ДНК для клонирования.
2. Объединение фрагментов ДНК.
3. Синтез олигонуклеотидов и генов.

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Подготовка фрагментов ДНК для клонирования

Комплементарная ДНК, κ ДНК — молекула ДНК, синтезированная на РНК-матрице с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). мРНК нельзя встроить в ДНК-вектор, сначала на ней необходимо синтезировать двухцепочечную ДНК.

Для этого последовательно используют две разные полимеразы: обратную транскриптазу и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I. Вначале в реакционную смесь с очищенной мРНК добавляют короткие oligo(dT), обратную транскриптазу и четыре dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Ролу(A)-хвост мРНК спаривается с oligo(dT), несущим свободную 3'-ОН-группу, которая инициирует синтез комплементарной цепи. Матрицей в этом синтезе служит молекула мРНК, а катализирует его обратная транскриптаза, продуцируемая некоторыми РНК-вирусами. Она последовательно присоединяет к растущей цепи остатки T, C, G или A, комплементарные A, G, C или U мРНК. In vitro синтез ДНК идет не до конца, при этом обратная транскриптаза перед остановкой обычно «поворачивает вспять» и присоединяет несколько нуклеотидов в обратном направлении, так что в результате образуется «шпилька». В реакционную смесь добавляют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы 1 E. coli, который достраивает вторую цепь ДНК, используя первую цепь как матрицу. Он присоединяет дезоксирибонуклеотиды к растущей цепи, начиная с 3'-ОН-конца шпильки. По окончании синтеза препарат обрабатывают ферментом РНКазой H, которая разрушает молекулы мРНК, и нуклеазой S1, отщепляющей одноцепочечные концы ДНК. Полученный препарат представляет собой смесь частично и полностью двухцепочечных комплементарных ДНК-копий (кДНК) мРНК, преобладающей в исходном образце.

2. Объединение фрагментов ДНК

Синтез первой цепи кДНК. Поскольку различные мРНК имеют различную матричную активность, условия, оптимальные для транскрипции одного вида мРНК, могут оказаться неподходящими для другого вида. Обычно при работе с гетерогенными популяциями мРНК используют условия, обеспечивающие максимальный общий выход кДНК. Важное значение при этом имеют следующие параметры.

Обратная транскриптаза. Наиболее существенным фактором при синтезе длинных кДНК является качество обратной транскриптазы, используемой в реакции. Несмотря на то, что качество этих ферментов в целом хорошее, количество примеси РНКазы в них варьирует от партии к партии. Этот недостаток можно устранить с помощью дополнительной очистки фермента или использования в реакции обратной транскрипции сильных ингибиторов РНКазы, таких, как ванадилрибонуклеозидные комплексы или РНКазин. Другим фактором, важным для достижения наибольшего вывода полноразмерной кДНК, является соотношение количеств обратной транскриптазы и мРНК-матрицы. При данном количестве матрицы выход и размер кДНК-транскрипта увеличиваются с увеличением количества обратной транскриптазы. pH. Оптимальным для эффективного включения предшественников и получения полноразмерных транскриптов является pH 8,3. Отклонение на $\pm 0,5$ единицы pH приводит к 5-кратному уменьшению выхода полноразмерных транскриптов. Из множества опробованных буферных систем лучшей оказалась система с трис-буфером. Одновалентные катионы. На транскрипционную активность различных матриц существенно влияет ионный состав среды. При использовании ионов калия получают более длинные транскрипты, чем в случае ионов натрия. Двухвалентные катионы. Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Для эффективного синтеза кДНК особенно важно использовать высокие концентрации каждого из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Если концентрация хотя бы одного из них падает, выход полноразмерных транскриптов значительно уменьшается.

Синтез второй цепи кДНК

На 3'-концах одноцепочечных кДНК могут образовываться структуры типа шпилек, которые можно использовать в качестве затравки при синтезе второй цепи кДНК с помощью ДНК-полимеразы I E. coli или обратной транскриптазы. Условия, при которых с помощью ДНК-полимеразы I была впервые синтезирована полноразмерная двухцепочечная кДНК, широко используются и сейчас.

Коротко о методе: реакцию проводят при pH 6,9, чтобы свести к минимуму 5'-3'-экзонуклеазную активность ДНК-полимеразы I, и при 15°C для уменьшения вероятности

схлопывания синтезируемой ДНК. Для синтеза второй цепи кДНК успешно используется фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, у которого отсутствует 5'-3'-экзонуклеазная активность.

По окончании синтеза кДНК первая и вторая цепи остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей затравкой при синтезе второй цепи. Эта петля может быть расщеплена нуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нукleinовых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются полностью тупыми, и для повышения эффективности клонирования их достраивают с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I E. coli. Затем либо двухцепочечную ДНК фракционируют по размеру, и самые крупные молекулы встраивают в бактериальные плазиды, либо клонируют весь спектр молекул двухцепочечных ДНК для создания библиотеки кДНК.

3. Синтез олигонуклеотидов и генов

Существует множество методов связывания двухцепочечной кДНК с плазидными векторами. К наиболее распространенным относятся следующие методы:

1. Добавление к двухцепочечной кДНК и к плазидной ДНК комплементарных гомополимерных последовательностей. За счет образования водородных связей между комплементарными гомополимерными «хвостами» вектор и двухцепочечная кДНК соединяются, образуя открытые кольцевые гибридные молекулы способные трансформировать клетки E. coli. Для стабилизации рекомбинантных плазид в клетках E. coli формирование замкнутой кольцевой ДНК с помощью ферментативного сшивания необязательно.

2. Присоединение синтетических связывающих участков (линкеров) к концам двухцепочечной кДНК. После расщепления подходящей рестриктазой молекулы кДНК встраивают в плазидную ДНК, также расщепленную соответствующим ферментом.

5. Синтетические линкеры. Другой метод присоединения двухцепочечной кДНК к плазидным векторам основан на использовании синтетических линкеров, содержащих один или несколько сайтов рестрикции. Двухцепочечную кДНК, полученную, как описано ранее, обрабатывают ДНК-полимеразой бактериофага T4 или ДНК-полимеразой I E. coli - ферментами, расщепляющими выступающие одноцепочечные 3'-концы благодаря своей 3'→5'-экзонуклеазной активности и достраивающими укороченные таким образом 3'-концы благодаря полимеразной активности. Сочетание этих активностей приводит к образованию молекул кДНК с тупыми концами, которые далее инкубируют с большим избытком линкерных молекул в присутствии ДНК-лигазы бактериофага T4-фермента, способного катализировать сшивание молекул ДНК с тупыми концами. В результате этой реакции образуются молекулы кДНК, несущие на концах полимерные линкерные последовательности. Затем эти молекулы разрезают определенным ферментом рестрикции и пришивают к плазидному вектору, в который также был внесен разрыв соответствующим ферментом. Двухцепочечные молекулы кДНК с синтетическими липкими концами будут, конечно, взаимодействовать друг с другом столь же активно, как и с векторной ДНК. Кроме того, сам вектор может снова замкнуться к кольцу, увеличив тем самым число плазид, не участвующих в рекомбинации. Эти трудности в значительной степени могут быть преодолены с помощью обработки линейной плазиды фосфатазой и (или) присоединения различных линкеров к разным концам кДНК. кДНК одновременно присоединяли два разных линкера. Можно было ожидать, что в результате этого процесса 50% молекул кДНК будут иметь на обоих концах одинаковые линкеры; такие молекулы не могут быть встроены в плазидную ДНК с помощью направленного клонирования. На практике эта цифра оказывается даже выше, поскольку один из линкеров почти всегда присоединяется к кДНК быстрее, чем другой. Этую проблему можно разрешить, добавляя к кДНК один линкер до расщепления петли шпильки нуклеазой S1, а другой после расщепления. кДНК с двумя линкерами затем может быть обработана подходящим ферментом рестрикции и встроена в плазидный вектор с помощью

направленного клонирования. Этим методом можно встраивать в векторы кДНК в правильной ориентации, позволяющей осуществлять экспрессию встроенных последовательностей в бактериальной клетке. Он позволяет также идентифицировать интересующие исследователя клоны путем отбора бактериальных колоний по наличию материала, вступающего в реакцию со специфической антисывороткой к определенному продукту гена. Значение такой техники исследования особенно возрастает в случае клонирования мРНК представленных в геноме малым числом копий, для которых отсутствуют нуклеиновые кислоты – зонды. При описанном подходе возникает одно затруднение, связанное с тем, что двухцепочечные гибриды кДНК – линкерная ДНК должны быть обработаны подходящими ферментами рестрикции для образования липких концов. Если двухцепочечная кДНК содержит один или несколько сайтов рестрикции хотя бы для одной рестриктазы, она будет разрезана и затем клонирована как два или несколько фрагментов ДНК, что затруднит анализ структуры полноразмерной кДНК. Это препятствие можно преодолеть, либо используя синтетические линкеры с сайтами рестрикции для ферментов, как правило, не вносящих разрывы в ДНК млекопитающих, либо добавляя метилазу EcoRI для защиты ДНК от воздействия рестриктазы EcoRI, либо применения вместо линкеров синтетические адаптеры. Адаптеры – это короткие синтетические двухцепочечные кДНК, один конец которых тупой, а другой липкий. Молекулы адаптера после присоединения 5'-fosfatной группы к их тупому концу и 3'-гидроксильной группы к их липкому концу будут взаимодействовать с двухцепочечной кДНК с тупыми концами, но не друг с другом. В отличие от линкеров перед присоединением адаптеров к двухцепочечной кДНК их не надо расщеплять рестриктазами.

1.6 Лекция №6 (2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция (ПЦР). История открытия и сущность метода».

1.6.1 Вопросы лекции:

1. История открытия метода.
2. Принцип ПЦР- метода.

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия метода.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR) — метод молекулярной биологии, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков.

Изобретение ПЦР полностью и безвозвратно изменило медицину, науку и нашу жизнь в целом. Появилась возможность быстро и эффективно диагностировать наследственные заболевания и инфекции, определять личность преступников по одному волоску и свободно манипулировать генами. Не будь этого уникального метода, человечество вряд ли оказалось бы на пороге эпохи генной терапии.

1957 г. Американец Артур Корнберг впервые выделил из бактерий *Escherichia coli* фермент, который назвал ДНК-полимеразой [1]. Статья с описанием работы он отправил в *Journal of Biological Chemistry*, где их отвергли... из-за названия фермента: рецензенты считали, что нужно использовать более точный термин «полидезоксирибонуклеотидполимераза» и что вообще «ДНК» в названии указывает на «генетическую активность» (сущность, составляющую?) фермента, а раз ее нет, то и называть фермент так нельзя [2]. Однако в 1958 году в журнале сменился главный редактор, и статья наконец увидела свет [3]. А уже в 1959 году Артура Корнберга удостоили Нобелевской премии по физиологии и медицине.

1971 г. Норвежский биохимик Хельль Клеппе (рис. 2) опубликовал в *Journal of Molecular Biology* статью, в которой описал метод, очень похожий на ПЦР [4]. С 1968 по 1970 годы Клеппе работал постдоком в Университете Висконсина, в лаборатории Хара Гобинда Кораны — нобелевского лауреата 1968 года за расшифровку генетического кода. Именно в лаборатории знаменитого индийца чуть раньше разработали методики синтеза олигонуклеотидных праймеров — «затравок», необходимых для работы ДНК-полимеразы.

Статья, написанная Клеппе в соавторстве с Кораной и посвященная репарационной репликации с помощью ДНК-полимеразы, содержала такие строки: «Можно ожидать, что после охлаждения получатся две структуры, каждая из которых содержит полноразмерную матричную цепь, подобающим образом связанную с праймером. Для завершения процесса репартивной репликации нужно будет добавить ДНК-полимеразу. В результате получатся уже две молекулы исходного дуплекса. Цикл можно повторять, каждый раз добавляя свежую порцию фермента».

К сожалению, эта гипотеза так гипотезой и осталась. Может, Клеппе даже и проводил какие-то эксперименты, но результаты не публиковал.

1976 г. Ученые из США, Эллис Чиен, Дэвид Эдгар и Джон Трела, выделили термостабильную ДНК-полимеразу из бактерии *Thermus aquaticus* и назвали ее Тац-полимеразой [5]. Этот фермент сохранял активность даже при температурах выше 75 °С.

1977 г. Фредерик Сенгер, английский биохимик и лауреат Нобелевской премии 1958 года за работы по структуре белков [6], предложил метод секвенирования ДНК, сейчас известный как метод Сенгера [7], [8]. Этим он заработал еще одну нобелевскую медаль, в 1980-м, и стал единственным ученым в истории, получившим две «химических» премии [9].

1983 г. Руководитель лаборатории синтеза ДНК в Cetus Corporation (США) Кэри Мюллис (рис. 3) апрельской ночью ехал вдоль побережья из Сан-Франциско в Мендосино, в свой загородный дом. Долгой трехчасовой дорогой он обдумывал отнюдь не проведение выходных, а предстоящий эксперимент по секвенированию ДНК. И тут (по словам Мюллиса) его озарило: он ясно представил процесс амплификации (преумножения) генов, который позже получит название полимеразной цепной реакции.

В 1983 году Мюллис участвовал в проекте по изучению серповидноклеточной анемии. Чтобы проанализировать мутации, биологи проводили секвенирование по Сэнгеру, где используется один праймер для синтеза по одной из цепей ДНК. На серпантине по пути в Мендосино Мюллис предположил, что данные будут точнее, если использовать два праймера — для синтеза одновременно по двум цепям. Тогда можно будет сравнить получившиеся фрагменты и исключить неточности. И вот тут-то неожиданное прозрение заставило его вздрогнуть: если повторить цикл несколько раз, то можно получить множество копий нужного фрагмента строго определенной длины — она будет ограничена праймерами, от концов которых навстречу друг другу и будут строиться новые цепи ДНК.

Вернувшись в понедельник в Cetus, Кэри Мюллис сразу направился в библиотеку, где попросил одного из сотрудников найти всю литературу о ДНК-полимеразе. В результате он не обнаружил ничего, касающегося амплификации. Это утверждение — самое слабое место во всей истории, так как в собранной библиотекарем стопке статей просто не могло не быть работы Хельля Клеппе.

За следующие полгода Мюллис провел два эксперимента для проверки своей гипотезы, но безуспешно. Тогда он предположил, что отрицательный результат связан с большим размером ДНК-матрицы, используемой в опытах, и решил продолжить работу с маленьким вектором pBR322, в который вставил намножаемый ген. И 16 декабря 1983 года Мюллис впервые увидел вожделенные, хоть и слабые, полосы в геле для детекции. Однако другие сотрудники и руководство Cetus не разделили радости Мюллиса: их все это попросту не интересовало.

1984 г. На ежегодной конференции корпорации Cetus в калифорнийском Монтерее Кэри Мюллис представил плакат, рассказывающий об амплификации гена β-глобина. К удивлению автора, и на этот раз его работу обошли вниманием.

Чуть позже Мюллису удалось кое-как убедить корпоративных боссов в важности его экспериментов: Cetus, как и многие начинающие компании, вкладывала ресурсы только в те проекты, что сулили прибыль в краткосрочной перспективе. Его освободили от обязанностей главы лаборатории и дали год на исследования ПЦР. И эти эксперименты завершились успешно.

1985 г. Мюллис и его группа разработчиков подали заявку на патент, который утвердили 28 июля 1987 года. В том же 1985-м в Cetus начали использовать для ПЦР термостабильную Таq-полимеразу, что значительно упростило работу: раньше перед каждым новым синтетическим циклом в смесь надо было добавлять новую порцию фермента, потому что он быстро выходил из строя от высоких температур. В декабре 1985 года журнал *Science* опубликовал первую статью Кэри Мюллиса о ПЦР.

Тогда же открылось совместное предприятие PerkinElmer Cetus Instruments (PECI), которое выпустило первый прототип ПЦР-циклера — Mr. Cycle (рис. 4). И только в 1987 году в продажу поступил первый общедоступный прибор, PCR-1000 Thermal Cycler.

1986 г. Корпорация Cetus выплатила Кэри Мюллису премию \$10 000. Остальные члены его группы получили по символическому доллару. Это обострило и так напряженные отношения в коллективе. Осенью Мюллис покинул компанию.

После ухода из Cetus он два года возглавлял молекулярно-биологический отдел в Xytronux, а в 1992-м открыл компанию по продаже ювелирных изделий с амплифицированной ДНК знаменитостей — Элвиса Пресли, Мэрилин Монро и т.п.

В 1993 году Кэри Мюллис стал лауреатом Нобелевской премии по химии за изобретение ПЦР. Его награждение — до сих пор большой вопрос для норвежского научного сообщества, где первооткрывателем метода считают Хельля Клеппе.

Сейчас Мюллису 72 года, он работает научным сотрудником Научно-исследовательского института детской больницы Окленда и с 2011 года возглавляет предприятие Altermune LLC, занимающееся изучением иммунитета.

Кэри Мюллис нередко выступает на конференциях, рассказывает о своей жизни, работе и, конечно, своем открытии. Он — прекрасный рассказчик, его всегда интересно слушать.

Время от времени Мюллис принимает ЛСД. Однажды он рассказал о ночной встрече со светящимся зеленым енотом в лесу рядом со своим загородным домом. А Альберт Хоффман(«отец» ЛСД) утверждал, что, по словам Мюллиса, ЛСД помог ему развить идею ПЦР.

В 1998 году вышла книга Кэри Мюллиса «Танец обнаженного разума» (*Dancing naked in the mind field*), где в обрамлении автобиографических историй ученый высказывает свое мнение о глобальном потеплении, СПИДе и других волнующих общество вопросах. Мюллис верит в астрологию и считает, что значительного изменения климата не происходит, между ВИЧ и СПИДом нет никакой связи, а все исследования, говорящие об обратном, — плоды заговора ученых-карьеристов с правительствами их стран.

1987 г. Компания Cetus подала патентную заявку на метод ПЦР с Таq-полимеразой, и ее одобрили в октябре 1990 года.

1989 г. Журнал *Science* объявил Таq-полимеразу молекулой года, а статья сотрудников Cetus о ПЦР с ее использованием [15] несколько лет поддерживала статус самой цитируемой биологической публикации.

В августе химический гигант DuPont подал против Cetus иск, в котором утверждал, что патенты на ПЦР получены неправомерно, поскольку этот процесс еще в 1970-х описал Хельль Клеппе. В ответ на иск Ведомство по патентам и товарным знакам США (USPTO) решило переосвидетельствовать патенты. Но через год объявило, что они останутся

действительными: комиссия нашла метод, описанный в работе Клеппе, слишком «неопределенным и сомнительным». К тому же там не упоминалась возможность экспоненциальной репликации — отличительной черты ПЦР. В суде представители DuPont так и не смогли доказать вторичность изобретения Мюллиса. 28 февраля 1991 года, после двух дней работы, суд вынес решение в пользу Cetus.

1991 г. Выигранный суд не помог корпорации Cetus: к '91-му году ее убытки превысили \$60 млн, и в июле было объявлено о слиянии с биотехнологической компанией Chiron. А права на метод ПЦР и использование Таq-полимеразы в декабре продали компании Hoffman-La Roche за \$300 млн. С этой сделки Cetus выплатила Кэри Мюллису неоправданно малую сумму, фактически ограбив его.

С тех пор Hoffman-La Roche и ее «дочка» Roche Molecular Systems развивают метод полимеразной цепной реакции: у них уже более 1000 связанных с ПЦР патентов и заявок.

2. Принцип ПЦР- метода.

Все мы знаем, что ДНК — это двухцепочечная молекула, где каждая цепочка состоит из звеньев-нуклеотидов. Нуклеотиды составлены из трех молекул: остатка фосфорной кислоты, сахара и азотистого основания. Если сахар и фосфат одинаковы у всех нуклеотидов в ДНК (в РНК сахар другой), то азотистых оснований четыре (если не считать редкие модификации): аденин, тимин, цитозин и гуанин, обозначаемые А, Т, Ц и Г соответственно. В молекулах РНК тимин заменен урацилом. Нуклеотиды соединяются в цепочку, образуя связи между фосфатной группой одного нуклеотида и гидроксильной — другого. В результате на одном конце каждой цепи ДНК «висит» фосфатная группа (5'-конец), а на другом — гидроксильная (3'-конец). Две цепи нуклеотидов расположены в молекуле ДНК антипараллельно, то есть напротив 3'-конца одной находится 5'-конец другой. Чтобы молекула была стабильной, цепочки должны как-то взаимодействовать друг с другом. Это обеспечивают водородные связи, образующиеся между азотистыми основаниями противоположных цепей по принципу комплементарности: А соединяется только с Т (или У в РНК), а Г — с Ц. И поэтому, имея одну цепь ДНК, в соответствии с этим правилом легко построить ее пару. Собственно, на этом и основана ПЦР.

Типичная реакционная смесь

Анализируемая ДНК. Это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плазмида, хромосома или геном клетки полностью. Для грубой оценки сойдет даже суспензия клеток. ДНК служит матрицей для многократного копирования нужного участка.

Праймеры. Праймер — это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов (15–30 штук), комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи. У праймеров, как и у любого олиго- или полинуклеотида, есть 3'- и 5'-концы.

Нуклеотиды. А точнее, дезоксинуклеотидтрифосфаты — четыре вида «кирпичиков» для строительства цепей ДНК: дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ.

ДНК-полимераза. Фермент, строящий комплементарную матричной цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3'-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий и архей: *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза) и *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза). Первая — самая производительная, а две другие — более точные.

Буфер. Раствор, содержащий различные ионы для поддержания нужного pH, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и неионный детергент Tween-20 в сочетании с BSA (бычьим сывороточным альбумином) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки. В случае ГЦ-богатых матриц в смесь часто

добавляют энхансер — ДМСО(диметилсульфоксид), предотвращающий нежелательные взаимодействия между комплементарными участками матрицы.

Этапы реакции

Цель ПЦР — получить множество одинаковых двухцепочечных кусочков ДНК строго определенной длины (обычно не более 2–3 тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.). Для этого проводят 20–30 циклов реакции. Каждый цикл состоит из трех этапов.

1. Денатурация

Чтобы полимераза могла работать, две цепи ДНК-матрицы нужно разъединить. Для этого реакционную смесь нагревают до 94–98 °C. В таких условиях разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями параллельных цепей.

2. Отжиг праймеров

На этом этапе праймеры специфично присоединяются к освободившимся цепям ДНК-матрицы с разных сторон копируемого участка 3'-концами друг к другу (рис. 8, видео 4). Чтобы праймеры могли комплементарно связаться (отжечься) только с нужными участками, при их конструировании необходимо учитывать такую важную характеристику, как температура плавления (T_m). Это расчетная температура, при которой половина праймеров присоединяется к целевому участку ДНК. Отжиг проводят при температуре на 1–5 °C ниже T_m , но не выше оптимальной температуры работы полимеразы, то есть в пределах 40–72 °C.

В идеале праймеры должны соответствовать следующим критериям:

температуры плавления двух праймеров не должны различаться более чем на 5 °C;

ГЦ-состав их должен уложиться в интервал 40–60%;

в структуре олигонуклеотидов не должно быть шпилек (участков, комплементарных друг другу);

праймеры не должны образовывать дуплексы (спариваться) друг с другом.

Еще лучше, если на 3'-конце праймера будет гуанин или цитозин: они образуют с комплементарными основаниями три водородные связи (между А и Т образуются две), что делает комплекс праймер—матрица более стабильным.

В реальности редко получается соблюсти все условия из-за множества причин. Однако чем больше критериев соблюдено при создании праймеров, тем выше вероятность правильной их работы.

Чтобы разработать эффективные праймеры, необходимо знать последовательность ДНК у концов целевого участка, и, руководствуясь упомянутыми критериями, выбрать подходящие фрагменты, которым будут комплементарны будущие праймеры. Всё это удобно делать в специальных компьютерных программах — например, PrimerSelect: они и T_m рассчитывают, и всякие спаривания изобразят, и вообще вынесут вердикт, удачная это пара праймеров или нет.

3. Элонгация, или синтез ДНК

Однажды ведущий ПЦР-специалист одного ветеринарного диагностического центра, показывая студентам постановку реакции, объяснила, что она потому называется полимеразной, потому что ее результаты наблюдают в полимерном геле. Возможно, есть и другие приверженцы этой гипотезы, однако сразу отметим, что она не верна. Полимеразная эта реакция от того, что в ее ходе фермент ДНК-полимераза последовательно выстраивает цепь ДНК (полимер) из нуклеотидов (мономеров), то есть полимеризует их. И делает она это на третьем этапе ПЦР.

Этот этап чаще проводят при температуре 72 °C — оптимальной для работы *Taq*-полимеразы. Фермент присоединяется к комплексам праймер—матрица и, выхватывая из раствора нуклеотиды, начинает по принципу комплементарности прилаживать их к 3'-концу праймера (рис. 7). Удлинение, или элонгация, новой цепи ДНК идет с максимальной скоростью 50–60 нуклеотидов в секунду (то есть около 3000 в минуту). Однако при программировании ПЦР-циклера задают время с запасом: по минуте на каждую тысячу пар нуклеотидов.

Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле. Таким образом, количество нужного продукта в процессе реакции возрастает экспоненциально. После прохождения всех циклов в реакционной смеси образуется столько специфических двухцепочечных продуктов, что их «массив» можно увидеть невооруженным глазом — проводя гель-электрофорез, о котором расскажем ниже.

К сожалению, экспоненциальная амплификация не может длиться вечно. Через 25–30 циклов количество функциональных молекул полимеразы в реакционной смеси истощается. Но чтобы добиться еще большего выхода продукта, содержимое пробирки можно разбавить, например, в 1000 раз и снова использовать для амплификации с уже новыми рабочими компонентами.

Визуализация продуктов ПЦР

Чтобы увидеть, намножились ли нужные участки ДНК, после окончания ПЦР содержимое пробирок подвергают электрофорезу в агарозном или полиакриламидном геле с последующим окрашиванием — так молекулы ДНК разной длины разделяются пространственно и становятся видны невооруженным глазом [19]. Полиакриламидный гель намного плотнее, поэтому больше подходит для разделения очень коротких фрагментов (несколько десятков пар нуклеотидов), при этом можно увидеть разницу даже в один нуклеотид!

Расплавленный при 65 °C гель заливают в специальную форму (плашку) с установленной в ней гребенкой, формирующей лунки (рис. 9). Когда гель застывает, гребенку вынимают, ставят форму в камеру для электрофореза и заливают специальным буфером. Затем в лунки микропипеткой вносят раствор из ПЦР-пробирок, смешанный с краской — чаще бромфеноловым синим. Чтобы потом определять размеры амплифицированных фрагментов, в отдельную лунку вносят маркер молекулярных масс (ladder), содержащий набор кусочков ДНК известных размеров. Камеру подключают к источнику питания и наблюдают за бегущими от электродов волшебными пузырьками. Десятки минут или несколько часов, зависит от размера фрагментов ДНК, плотности геля и приложенного напряжения. Благодаря отрицательно заряженному сахарофосфатному оству ДНК, фрагменты движутся в геле под действием электрического поля от отрицательного катода к положительному аноду. Более короткие молекулы делают это быстрее, чем длинные. Бромфеноловый синий нужен для того, чтобы следить за продвижением фронта проб в геле и не допустить их выхода за его пределы.

После окончания электрофореза гель вынимают из плашки и, чтобы увидеть расположение фрагментов, вымачивают в растворе флюоресцентного красителя, прочно связывающегося с ДНК. Иногда его вводят в гель еще до залития плашки. Если красителем служит бромистый этидий, внедряющийся между нуклеотидами ДНК, визуализацию проводят под ультрафиолетом (рис. 10).

Если экспериментатор преследовал цель просто понять, есть ли нужная последовательность нуклеотидов в ДНК-матрице, то после визуализации гель выбрасывают. Но нужные фрагменты несложно из геля выделить для дальнейшей работы: чтобы резать их на кусочки для сравнения с другими фрагментами, вставлять в плазмиды для дальнейшего изучения, секвенировать и т.д.

1.7 Лекция №7 (2 часа).

Тема: «Модификации ПЦР. Применение метода».

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Основные виды ПЦР.
2. Способы детекции продуктов амплификации в режиме реального времени.

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Основные виды ПЦР.

В процессе развития работ с использованием ПЦР возникла идея амплифицировать в одной пробирке сразу несколько различных генетических локусов. В этом случае одновременно используют более одной пары олигонуклеотидных праймеров. Такая реакция получила название мультиплексная ПЦР (МПЦР). Данный подход позволяет существенно экономить время и усилия при выполнении анализов. Особенно широко его стали применять для экспресс-идентификации инфекционных агентов. Например, С.Н. Щелкунов с сотрудниками разработали метод МПЦР, позволяющий при использовании пяти пар праймеров проводить одновременно родо- и видоспецифическую идентификацию ортопоксвирусов. С помощью мультиплексной ПЦР можно также осуществлять одновременно детекцию множественных инфекционных агентов, обусловливающих схожие клинические проявления.

«Вложенная» ПЦР (Nested PCR (англ.)) – применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

«Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR (англ.)) – используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезаний ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR (англ.)) – проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR (англ.)) – с помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров на образование продукта. Первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают. При определённой температуре система пройдёт через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК.

ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR (англ.)) – модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч оснований и больше). Используют две полимеразы, одна из которых – Таф-полимераза с высокой процессивностью (то есть способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5'-эндонуклеазной активностью. Вторая полимераза необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой.

ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR (RAPD PCR) (англ.)) – используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (20 – 25 пар нуклеотидов (п.н.)). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру отжига и пр.), удается добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-Time PCR (англ.)) – современный, быстрый, качественный метод молекулярной диагностики. Данный метод принципиально не отличается от ПЦР по сфере своего применения и интерпретации результатов. У него повышена надежность и степень автоматизации. Поэтому он сочетает

в себе достоинства ПЦР (чувствительность) и ИФА (технологичность), что позволяет применять его так, как сегодня применяют ИФА – для массового анализа проб. Для постановки ПЦР в реальном времени необходим специальный амплификатор, отличительной особенностью которого является возможность возбуждать и детектировать флуоресценцию, отражающую накопление ампликонов, на каждом цикле амплификации.

2. Детекция продуктов амплификации. Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют следующие наиболее распространенные подходы:

1. Выщепление 5' концевой метки (Taq-Man Assay). Данная методика основана на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы.

2. Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons).

3. Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии (LightCycler assay). Данный способ детекции накопления продуктов амплификации отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК-зондов.

4. Использование интеркалирующих агентов. Этот способ детекции основан на том факте, что флуоресценция бромистого этидия и SYBR Green I значительно возрастает при их внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК.

Подводя итоги, стоит отметить следующее: использование ДНК-зондов в том или ином варианте является наиболее предпочтительным в свете повышения специфичности анализа. Однако к недостаткам зондов относится высокая стоимость, что делает работу по подбору зондов, праймеров и условий амплификации дорогостоящей. Вместе с тем, использование интеркалирующих агентов является очень простым и дешевым. Отпадает необходимость подбора специальных праймеров, зондов, так как можно пользоваться уже существующими праймерами, эффективность работы которых проверена. Эти обстоятельства делают применение интеркалирующих агентов весьма привлекательным.

Мишенью для NASBA служат молекулы РНК рибосом (рибосомальные РНК) микроорганизмов, что дает целый ряд преимуществ перед ПЦР. Во-первых, количество рибосом в одной клетке хламидии содержится от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч. Для сравнения: даже многокопийные участки ДНК, используемые в качестве мишени для ПЦР, не превышают двух десятков на бактериальную клетку. Тем самым с помощью NASBA можно выявлять возбудителей и в тех случаях, когда их количество слишком мало и недостаточно для выявления методом ПЦР.

Во-вторых, в то время как ДНК – достаточно стабильный материал, и обнаружение ДНК еще не означает наличие жизнеспособных микроорганизмов, РНК – наоборот, крайне нестабильный материал и достаточно быстро деградирует при гибели и разрушении клеток микроорганизмов. Это дает возможность не только верно судить о наличии текущей инфекции, но и более точно и надежно оценивать результаты проведенного лечения.

Детекция продуктов амплификации в режиме реального времени (NASBA-Real-time) с использованием флуоресцентных зондов дополнительно увеличивает специфичность теста и объективность результатов лабораторного исследования.

Основными недостатками метода NASBA-Real-time являются высокая стоимость и сложность исследования, что ограничивает распространение метода. Ввиду этого, метод рекомендован для подтверждения (или исключения) наличия возбудителя в спорных случаях при расхождении результатов исследований различными методами (ПЦР, ПИФ (прямая иммунофлюоресценция), посев).

1.8 Лекция №8 (2 часа).

Тема: «Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК».

1.8.1 Вопросы лекции:

1. «Плюс-минус»-метод.
2. Метод Сэнгера. Метод Максама-Гилберта
3. Геномные проекты.

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. «Плюс-минус»-метод

Расшифровку нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот принято называть секвенированием (от англ. sequencing – определение последовательности). Высокоэффективные методы секвенирования ДНК возникли в результате объединения ряда методических достижений. Решающую роль при этом сыграла разработка методов электрофореза, позволяющих с высокой точностью разделить олигомеры, отличающиеся друг от друга по длине только на 1 нуклеотид. Важное значение также имели методы специфической химической модификации азотистых оснований в составе молекул ДНК и последующего их выщепления, способы радиоактивного мечения концевых нуклеотидов цепей изотопами ^{32}P или ^{33}P , копирования последовательностей ДНК с помощью ДНК-полимераз и некоторые другие.

«Плюс-минус»-метод. Первый метод секвенирования ДНК, предложенный Ф. Сэнгером и А. Коулсоном в 1975 г., основан на ферментативных реакциях и носит название «плюс-минус»-метод. Данный подход предполагает выделение одноцепочечного фрагмента ДНК, соответствующего исследуемому участку генома. Этот фрагмент используют затем в реакции полимеразного копирования в качестве матрицы, а в качестве праймера — синтетические олигонуклеотиды или природные субфрагменты, получаемые после гидролиза определенными рестриктазами. На первом этапе осуществляют реакцию полимеризации с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* (Poll) и всех четырех типов дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), один из которых радиоактивно мечен по α -положению фосфата. Синтез ведут в ограниченных условиях, с тем, чтобы получить набор продуктов неполного копирования изучаемого одноцепочечного фрагмента. Затем полимерный материал отделяют от нуклеотидов, смесь делят на восемь частей и проводят дополнительные полимеразные реакции либо в отсутствие одного из нуклеотидов при наличии остальных трех («минус»-система), либо в присутствии только одного («плюс»-система). В присутствии трех типов dNTP («минус»-система) ДНК-полимераза будет достраивать все новосинтезированные комплементарные матрице цепи до положения ближайшего нуклеотида, который отсутствует в реакционной смеси, и в этом месте синтез будет прекращаться. Таким образом, в данном случае терминация реакции полимеризации происходит во всех точках копируемых цепей перед отсутствующим в смеси нуклеотидом. Полученные описанным способом 8 образцов одновременно подвергают электрофоретическому разделению высокого разрешения, гель радиоавтографируют и с радиоавтографа читают последовательность нуклеотидов. Исходная последовательность комплементарна читаемой с радиоавтографа.

2. Метод Сэнгера

Метод Сэнгера. Существенным недостатком «плюс-минус»-метода является то, что получить строго статистический набор продуктов ограниченного копирования на первой стадии очень трудно. Поэтому данный подход в 1977 г. сменился другим, разработанным в той же лаборатории, возглавляемой Ф. Сэнгером. Первоначально он получил название метода термирующих аналогов трифосфатов (метод дидезоксинуклеозидтрифосфатов), а в настоящее время называется дидезоксиметодом Сэнгера. Как и в случае «плюс-минус»-метода, в его основу положено ферментативное копирование при помощи Poll исходного одноцепочечного сегмента ДНК с точки, задаваемой положением 3'-конца

праймера. Специфическая терминация синтеза новых цепей ДНК обеспечивается добавлением в реакционную смесь кроме четырех типов dNTP (один из которых мечен ^{32}P по α -положению) синтетического аналога нуклеотида - 2' ,3' - дидезоксинуклеозидтрифосфата (ddNTP). PolI способна включать этот аналог в растущую цепь ДНК, однако, как только включение ddNTP произошло, дальнейшее наращивание цепи прекращается ввиду отсутствия в ddNTP 3'-ОН-группы. Метод Сэнгера значительно упростился и получил широкое распространение после появления векторной системы на основе нитевидного фага M13. Фаг M13 содержит в составе вирионов одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК. При репликации в инфицированных клетках *E. coli* молекула ДНК фага M13 проходит через стадию образования двухцепочечной репликативной формы, которую можно легко выделить и встроить в нее чужеродные фрагменты ДНК. Гибридные фаги в составе своих вирионов будут содержать одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК, в которой в строго определенном месте находится одна из цепей встроенного фрагмента. **Метод Максама-Гилберта.** Наряду с ферментативным дидезокси-методом широкое распространение получил метод секвенирования ДНК, разработанный А. Максамом и В. Гилбертом в 1976 г. Метод применим к одно- или двухцепочечным фрагментам ДНК. Изучаемый полинуклеотид подвергают специфической химической фрагментации. Для того чтобы иметь точку отсчета, фрагмент ДНК метят радиоактивным изотопом ^{32}P по 5'- или 3'-концу. Чаще всего метку включают в 5'-концы с помощью полинуклеотидкиназы фага T4, которая в реакции обмена переносит радиоактивный фосфат на ДНК. У двухцепочечного фрагмента ДНК в такой реакции метятся обе антипараллельные цепи. Субстраты, меченные только по одному концу, при этом могут быть получены или после денатурации разделения цепей фрагмента, или после гидролиза фрагмента какой-либо другой рестриктазой и последующего разделения субфрагментов электрофорезом. При увеличении длины пластины геля и силы тока можно достигнуть большей разрешающей способности электрофореза фрагментов ДНК. За один цикл методом Максама-Гилберта обычно прочитывают не более 250-300 нуклеотидов, но при отлаженных процедурах можно одномоментно определить до 500 и более нуклеотидов.

4. Геномные проекты

Разработка быстрых методов секвенирования сделала возможным определение нуклеотидных последовательностей крупных молекул ДНК, а не только их фрагментов. В 1978 г. Ф. Сэнгер с соавторами опубликовали первую полную последовательность геномной одноцепочечной ДНК бактериофага OX174, имеющей размер 5386 нуклеотидов. Следующий рубеж был преодолен при определении нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК человека (16 569 пн) в 1981 г. Серьезным успехом явилось определение полной нуклеотидной последовательности ДНК бактериофага Я, состоящей из 48 502 пн. В 1992 г. С. Н. Щелкунов с соавторами вручную методом Максама-Гилберта секвенировали геном вируса натуральной оспы (186 тпн). До 1995 г. наиболее крупными геномами с известной последовательностью нуклеотидов были ДНК цитомегаловируса (229 тпн) и ДНК вируса осповакцины (192 тпн).

Появление высокопроизводительных методов секвенирования ДНК позволило определять последовательности более крупных геномов. Значительная роль в этом принадлежит автоматизации всего процесса секвенирования, начиная от приготовления матриц и заканчивая занесением определенных последовательностей ДНК в компьютер без непосредственного участия оператора.

Расшифровка крупных геномов прокариотических и эукариотических клеток потребовала объединения усилий разных лабораторий и формирования геномных проектов.

В июле 1995 г. была опубликована первая нуклеотидная последовательность полного генома (1 830 137 пн) самостоятельно существующего организма — грамотрицательной бактерии *Haemophilus influenzae*. Геном этой бактерии характеризуется

относительно низким содержанием GC-пар (38 %), причем найдено 7 протяженных участков с более высоким (около 50 %) содержанием GC-пар. Анализ нуклеотидной последовательности позволил обнаружить предположительный ориджин репликации (область начала репликации), состоящий из 280 пн, 6 оперонов рРНК, 54 гена тРНК для всех 20 аминокислот. На основании полученных данных была составлена кольцевая карта хромосомы *H. influenzae*. Из 1743 вычисленных открытых рамок трансляции (OPT) для 736 не удалось выявить функции кодируемых ими белков. Около 78 % OPT *H. influenzae* обнаружили гомологию с представленными в базах данных последовательностями других организмов.

Огромные успехи в расшифровке последовательности молекул ДНК привели к тому, что в 1990 г. в США была принята официальная программа по расшифровке генома человека (Human Genome Project, HGP), в рамках которой планировалось при вложении 3 млрд долларов США завершить секвенирование полного генома человека в течение 15 лет. Основным исполнителем HGP стала компания Celera Genomics. Аналогичные проекты по геному человека также начали реализовываться в Западной Европе, Японии и России.

В 2001 г. участники американской программы HGP и Международного консорциума по секвенированию генома человека, объединяющего многочисленные научные организации США, Великобритании, Германии, Франции, Японии и Китая, независимо объявили о завершении секвенирования большей части (более 95 %) генома человека. На основании полученных данных стало возможным сделать ряд выводов об организации генома человека.

Компанией Celera Genomics в рамках проекта по секвенированию генома человека использовалось пять образцов человеческой ДНК от двух женщин и трех мужчин. Среди этих людей были один афроамериканец, один китаец, один испано-мексиканец и двое европейцев. На основании данных секвенирования пяти образцов ДНК была рассчитана консенсусная последовательность генома человека длиной 2,91 млрд пн. Компьютерный анализ позволил обнаружить 26 588 транскрибуемых и транслируемых в белки генов, а также еще около 12 тыс. предсказанных генов. Экзоны занимают лишь 1,1 % генома, в то время как интроны — 24 %. Остальная часть генома (75 %) представлена межгенными последовательностями. При сравнении данных секвенирования с консенсусной последовательностью генома человека было выявлено 2,1 млн позиций однонуклеотидного полиморфизма (single-nucleotide polymorphism, SNP), т. е. позиций, по которым имеются различия от человека к человеку. Менее 1 % этих SNP приводят к изменению последовательности белков. Интересно, что число обнаруженных генов в геноме у человека лишь в два раза больше, чем у нематоды *Caenorhabditis elegans*.

Полученные данные о структуре генома позволяют значительно продвинуть наше понимание генетики человека, природы различных наследственных заболеваний. С каждым годом обнаруживается все больше генов, мутации по которым приводят к определенным заболеваниям человека. В настоящее время их выявлено более 1,2 тыс. Такие исследования могут революционизировать медицинскую науку.

Широкое развитие получили также проекты по секвенированию и анализу полных геномов патогенных микроорганизмов. В ближайшие годы планируется расшифровать структуру геномов более чем 100 видов болезнетворных микроорганизмов. Секвенированных вирусных геномов уже насчитывается более 600. Накапливаемая информация позволяет выяснить молекулярные механизмы патогенного действия микроорганизмов на инфицируемый организм, глубоко изучать защитные механизмы, реализуемые человеком, животными, растениями в ответ на конкретную инфекцию. Это создает базу знаний, необходимых для эффективной разработки современных средств и методов лечения инфекционных заболеваний.

1.9 Лекция № 9 (2 часа).

Тема: «Методы секвенирования нового поколения».

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Появление и развитие технологий секвенирования
2. Секвенирование «нового поколения».
3. Использование секвенирования «нового поколения».

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Появление и развитие технологий секвенирования

С момента открытия нуклеиновых кислот прошло уже почти полторы сотни лет. В далеком 1869 году Иоганн Фридрих Мишер выделил из находившихся в гное клеток неизвестное доселе вещество, содержащее азот и фосфор, которое назвал нуклеином, а затем (из-за его свойств) — нуклеиновой кислотой. Первоначально считалось, что молекулы нуклеиновых кислот — резерв фосфора в клетках, однако уже в первой половине XX века ученые доказали их наследственную природу. Тогда же появилось понятие гена — наименьшей структурной и функциональной единицы наследственности, — и сформировалась новая наука — генетика.

Вплоть до середины прошлого века структура носителей генетической информации и способы ее передачи оставались неясными. Модель двойной спирали ДНК, которая входит во все современные учебники генетики и молекулярной биологии, предложили в 1953 году Френсис Крик и Джеймс Уотсон (за это в 1962 ученые получили Нобелевскую премию). Последовавшие следом открытие генетического кода и разработка центральной догмы молекулярной биологии дали мощный толчок к развитию естественных наук, в первую очередь — генетики. Основные исторические вехи этого процесса показаны на рисунке 1.

История геномных исследований и секвенирования нуклеиновых кислот. 8 марта 1865 г.— Грегор Мендель доложил результаты своих опытов, объясняющие механизм наследования. 1869 г.— Иоганн Фридрих Мишер выделил из клеток в гное неизвестное доселе вещество, содержащее азот и фосфор, которое назвал нуклеином. 1905–1909 гг. — появление терминов «ген» и «генетика». 1953 г.— Френсис Крик и Джеймс Уотсон предложили структуру двойной спирали ДНК. 1958 г.— Френсис Крик сформулировал центральную догму молекулярной биологии. 1975 г.— Сэнгер с коллегами разработал «плюс-минус» метод секвенирования ДНК. 1977 г.— группа Сэнгера разработала метод «терминаторов». 1977 г.— Максам и Гилберт предложили метод секвенирования ДНК путем химической деградации. 2001 г.— опубликован первый полный геном человека. 2005 г.— коммерциализация технологии пиросеквенирования. 2006 г.— коммерциализация технологии Solexa (Illumina). 2006 г.— коммерциализация технологии лигазного секвенирования. 2010 г.— коммерциализация технологии ионного полупроводникового секвенирования (технология PostLightTM). 2011 г.— первый коммерческий релиз секвенаторов PacBio, основанных на технологии одномолекулярного SMRT-секвенирования. 2015 г.— начало продаж первых приборов, основанных на секвенировании через нанопору.

Осознав основные принципы функционирования нуклеиновых кислот (НК), научное сообщество предприняло грандиозные усилия для того чтобы разработать быстрые и эффективные методы определения их первичной последовательности (рис. 2) — как это принято говорить сегодня, секвенирования. Спустя десятилетия после открытия Уотсона и Крика в биологической науке наступила новая эпоха — эра секвенирования нуклеиновых кислот и геномики...

Секвенирование нуклеиновых кислот (другими словами, определение их нуклеотидной последовательности) — это расшифровка первичной структуры линейных молекул ДНК или РНК, состоящих из последовательности «букв» —

нуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ и УТФ. Эти «буквы» зачастую именуют просто по азотистому основанию, входящему в их состав — аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц), тимин (Т), а также урацил (У) в случае РНК.

Словарик

АННОТАЦИЯ ГЕНОМА маркировка генов и других объектов внутри них.

ГЕНОМ наследственный материал, заключенный в клетке организма и необходимый для построения и поддержания его жизнедеятельности. Раздел молекулярной генетики, занимающийся геномом и генами организмов, принято называть геномикой.

ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота, макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы у многих организмов.

ДНК-БИБЛИОТЕКА (ГЕНОМНАЯ БИБЛИОТЕКА) набор ДНК-фрагментов всего генома организма. Эти ДНК-фрагменты фланкированы идентичными ДНК-адаптерами и содержат различные вставки генома.

ДНК-АДАПТЕРЫ небольшие фрагменты ДНК известной последовательности, фланкирующие ДНК-библиотеку. Используются как участки, с которых начинается амплификация или секвенирование ДНК-библиотеки.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК своеобразная модификация молекулы ДНК путем присоединении метильной группы (-CH₃) к цитозину в составе СрG-динуклеотида. Один из способов регуляции работы генома без изменения нуклеотидной последовательности ДНК.

НУКЛЕОТИДЫ (НУКЛЕОЗИДФОСФАТЫ) низкомолекулярные вещества (мономеры), составляющие сложные биологические полимеры: соответственно РНК или ДНК. Нуклеотиды, составляющие ДНК: аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г) и цитозин (С). В РНК вместо тимина присутствует урацил (У).

ПЦР (ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ) молекулярно-биологический метод, позволяющий добиться колossalного (до 10¹² раз) увеличения или амплификации числа копий определенного фрагмента ДНК *in vitro*.

РНК рибонуклеиновая кислота, макромолекула, образующаяся у многих организмов в результате считывания с ДНК (транскрипции), необходима в процессе синтеза белков, а также многочисленных регуляторных процессов в клетке. Также ответственна за хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы у некоторых вирусов.

РЕСЕКВЕНИРОВАНИЕ повторное определение последовательности ДНК организма с уже расшифрованным геномом (применяется, например, при поиске вариантов, связанных с наследственными заболеваниями у человека).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК ИЛИ РНК определение первичной последовательности нуклеотидов в составе макромолекул, несущих наследственную информацию.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ DE NOVO секвенирование нового для науки (ранее не прочитанного) генома.

ЧТЕНИЯ (РИДЫ, READS) фрагменты ДНК (длиной от 25 до 20 000 нуклеотидов), считываемые с генома при помощи специальной машины — секвенатора.

ЭМУЛЬСИОННАЯ ПЦР (ЭПЦР) ПЦР, проводимая в эмульсии, где в каждой капельке масла амплифицируется единичная молекула ДНК (фрагмент ДНК).

ЭПИГЕНОТИКА один из разделов геномики, посвященный изучению изменения экспрессии генов, вызванного механизмами, не затрагивающими последовательности ДНК, например, через метилирование ДНК.

2. Секвенирование «нового поколения».

Почти четверть века назад в Соединенных Штатах стартовал грандиозный по своему масштабу научный проект, посвященный определению последовательности генома человека. Основной его целью стала расшифровка генетической информации,

заключенной в хромосомах (компактизованная ДНК), которые мы наследуем от своих родителей. В течение тринадцати лет многочисленные исследовательские группы по всему миру работали над определением полной последовательности генома человека. Почти три миллиарда долларов, потраченные на этот проект, открыли перед исследователями замечательные перспективы. Используя полученные данные, появилась возможность искать и находить участки ДНК, связанные с генетически обусловленными заболеваниями. И если природа многих моногенных болезней (вызываемых отказом единственного гена нашего генома) стала понятна уже давно, то некоторые заболевания — сердечно-сосудистые, онкологические, болезни Альцгеймера и Паркинсона — являются многофакторными: вызвать их может широкий спектр изменений генома, многие из которых до сих пор неизвестны. Информация о генетических вариантах, связанных с человеческими недугами, позволяет формировать научно-обоснованный подход при их диагностике и лечении.

Расшифровка и аннотация (маркировка генов и других объектов в последовательности ДНК) генома человека поставили вопрос об использовании генетической информации как для диагностики заболеваний и их долговременного прогнозирования у человека, так и для исследования популяционной структуры сообществ, этногенеза и эволюционных процессов. Применение современных технологий секвенирования и генотипирования предлагает перспективные способы решения задач современной медицинской геномики и эпигеномики.

Такие результаты могут быть использованы при создании систем для проведения дифференциальной диагностики и выявления генетической природы заболеваний, для проведения персональной терапии и подбора методик лечения на основе анализа индивидуальных генетических характеристик. Решение таких задач тесно связано с разработкой эффективных алгоритмов и математических моделей для биоинформационной обработки данных геномного секвенирования и их использованием на базе суперкомпьютерных кластеров.

Геномные исследования позволяют решать массу задач как прикладного, так и фундаментального плана. Благодаря им разрабатываются новые лекарства и продукты, они же позволяют проникнуть в глубокую историю человечества или понять причину массового вымирания видов.

Сейчас разработано несколько способов секвенирования НК. Самый популярный и надежный из них — секвенирование по Сэнгеру — позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар оснований (п.о.) и используется для небольших фрагментов генома/генов или для валидации результатов более современного секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS), где размер одного прочитанного фрагмента варьирует от 25 до 500 п.о. В отличие от секвенирования по Сэнгеру, методы NGS используют для глубокого (многократного) прочтения генетического материала, которое необходимо, например, для ресеквенирования и сборки новых геномов (*de novo*), транскриптомных и эпигеномных исследований. Помимо этого, NGS-секвенирование значительно производительнее, позволяя одновременно считывать миллионы и даже миллиарды коротких фрагментов. Такой рост производительности привел к возможности определения последовательности сразу десятков геномов (в зависимости от их размера) за один запуск прибора.

Стремительно развивающиеся новые технологии секвенирования ДНК позволяют быстро и эффективно определять особенности организмов на уровне их геномов. Главным итогом развития геномных и постгеномных технологий стало существенное расширение возможностей изучения генетической природы целого спектра заболеваний человека. Масштабные ассоциативные исследования на больших клинических выборках позволяют получать данные о генетических характеристиках, присущих конкретным группам людей (семьям, популяциям), развивая методы персонализированной медицины. В связи с этим, изучение механизмов генетической предрасположенности к многофакторным

заболеваниям и выявление специфических генетических маркеров сегодня имеет особенную актуальность. Подобные методы широко применяются за рубежом и в России, где технологии современного секвенирования также постепенно внедряют в медицинские исследования и медицинскую практику с целью персонификации стратегии лечения.

Технологической основой для подобных исследовательских и сугубо прикладных проектов служат геномные секвенаторы (приборы, на которых проводят секвенирование), поставляемые различными коммерческими компаниями, такими как Illumina, Thermo Fisher Scientific, Oxford Nanopore Technologies, Pacific Biosciences и другие.

В 2017 году на рынке представлены сразу несколько перспективных разработок в области секвенирования НК. Эти подходы применены в секвенаторах нового поколения:

Ion Proton и Ion Personal Genome Machine (Thermo Fisher Scientific) — технология ионного полупроводникового секвенирования;

MiSeq и NovaSeq (Illumina) — технология секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов;

MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION (Oxford Nanopore Technologies) — нанопоровое секвенирование;

и некоторых других.

Современные технологии делают процесс секвенирования ДНК рутинной процедурой, особенно в том случае, когда речь идет об организмах с уже известной последовательностью генома — их последующая биоинформационическая обработка не представляет значительного труда, поскольку исследователь уже имеет референсный (ранее отсеквенированный) геном, который позволяет избежать ошибок при анализе полученных данных. При анализе нового, неопубликованного ранее, генома (*de novo* секвенирование и сборка) перед исследователем стоит ряд более сложных задач, в ходе решения которых он пытается сложить единичные фрагменты в цельную последовательность, задействуя многочисленные математические алгоритмы и суперкомпьютерные мощности.

Однако наибольший интерес представляет не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует: какие гены обеспечивают жизнедеятельность клетки, как происходит регуляция (включение или выключение генов) или какие генные пути начинают работать в ответ на стрессовые факторы.

Все современные секвенирующие платформы отличаются от метода секвенирования по Сэнгеру тем, что не требуют этапа клонирования фрагментов ДНК. Это экономит рабочее время и позволяет избежать ряда проблем с клонированием АТ-богатых участков. Общий принцип пробоподготовки для большинства современных (NGS) секвенаторов включает фрагментирование ДНК, привязку к субстрату, амплификацию фрагментов с помощью ПЦР (в одномолекулярном секвенировании от ПЦР удалось отказаться) и последующее считывание последовательности НК. В отличие от метода секвенирования по Сэнгеру, современные платформы обеспечивают параллельное проведение миллиардов реакций в малых объемах, что позволяет получить намного больший объем информации на выходе.

Рассмотрим основные технологии секвенирования нукleinовых кислот подробнее.

Секвенирование «нового поколения» применяется как для анализа геномов организмов, для которых уже доступен референсный геном (*ресеквенирование*), так и для того, чтобы впервые расшифровать геном организма (*секвенирование de novo*).

Для **ресеквенирования** успешно используют платформы, генерирующие большое количество коротких чтений (секвенируемых фрагментов ДНК), поскольку даже относительно короткие фрагменты ДНК успешно картируются (картирование, или выравнивание, — процесс биоинформационического поиска расположения конкретного короткого фрагмента в полной геномной последовательности) на референсный геном (последовательность ДНК в цифровом виде, составленную учеными как общий репрезентативный пример последовательности генома конкретного вида) при

биоинформационическом анализе данных. Такие выравненные чтения могут использоваться для поиска однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), малых делеций и инсерций или других структурных изменений в геноме.

Что касается **секвенирования *de novo*** и сборки новых, ранее не прочитанных, геномов, то использование коротких чтений сильно усложняет сборку, особенно в случае больших по размеру и сложно устроенных геномов эукариот (например, полиплоидных геномов). В этих случаях используют комбинированный подход — сочетание платформ, генерирующих как короткие, так и длинные чтения. При сборке генома *de novo* ученые уподобляются ребенку, пытаясь правильно сложить элементы геномного пазла (короткие фрагменты от секвенированной ДНК) в единую картину, созданную эволюцией за сотни миллионов лет.

В то же время наибольший интерес представляет отнюдь не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует. Новые методы секвенирования РНК позволяют оценивать уровень метилирования ДНК, проводить анализ дифференциальной экспрессии генов, в том числе и генов-регуляторов (например, микроРНК). Возможность анализа экспрессии генов в биологических системах открывает перед исследователем огромные возможности. Например, этот метод можно применять при исследовании функционирования центральной нервной системы человека (для понимания основных молекулярных аспектов работы головного мозга, при оценке защитного ответа клеток на атаки вирусов или ответной реакции на стресс). Не менее интересные данные может дать изучение регуляции экспрессии генов посредством анализа их метилирования или изучение экспрессии некодирующих РНК.

Оценка уровня метилирования генома, например, позволяет определить, какие генные пути и сети включаются в ответ на меняющиеся факторы окружающей среды; такие работы зачастую проводят для изучения эволюционных механизмов в живых системах. Изучение экспрессии кодирующих белки и некодирующих РНК в разных тканях и клетках также позволяет понять и описать гены, вовлеченные в жизнедеятельность клеток, органов и организмов.

Пиросеквенирование

Одним из первых методов глубокого секвенирования, предложенным на суд научного сообщества, было пиросеквенирование, подразумевающее «секвенирование путем синтеза». Основной смысл этого типа секвенирования заключается в последовательном синтезе ДНК на ДНК-фрагментах изучаемого организма в специальных пиколитровых «реакторах». В ходе синтеза дочерней цепочки ДНК детектируют пирофосфаты, высвобождающиеся при включении нуклеотида в синтезируемую на матрице (участке молекулы ДНК, служащим матрицей для синтеза) комплементарную цепь.

Технологию предложил в 1996 году Пол Нирен с коллегами из Королевского технологического института в Стокгольме. Затем ее коммерциализировали (2005 год) и воплотили в приборе GS FLX, 454 производства Roche (2008 год). Этим методом можно определять нуклеотидную последовательность фрагментов геномной ДНК размером 300–500 пар оснований (п.о.). Особо следует отметить тот факт, что подавляющее большинство NGS-методов требуют предварительной фрагментации ДНК для упрощения ферментативных реакций. К обоим концам фрагментированной ДНК «пришивают» ДНК-адаптеры (данная конструкция называется ДНК-библиотекой), необходимые для эмульсионной ПЦР (эПЦР) на магнитных сферах и последующего секвенирования.

Готовые ДНК-библиотеки иммобилизуют на магнитных сферах. Затем магнитные сферы с нанесенной на них клональной библиотекой доставляют на проточную ячейку, где в присутствии праймера, дезоксинуклеотидтрифосфатов и ферментов — ДНК-полимеразы, люциферазы, АТФ-сульфурилазы — происходит циклический синтез новой цепи.

Во время цикла пиросеквенирования при образовании фосфодиэфирной связи между матричной цепочкой ДНК и нуклеотидом синтезируемой цепи выделяется пирофосфат, который запускает каскад химических реакций, приводящих к выделению АТФ, необходимой для реакции окисления люциферина с выделением кванта света, который фиксируют аналоговой интегральной микросхемой (ПЗС-матрицей), состоящей из светочувствительных фотодиодов. Нуклеотиды, не вовлеченные в синтез новой цепи, удаляют из проточной ячейки, и начинается следующий реакционный цикл, в ходе которого добавляют дезоксинуклеотидтрифосфат другого типа.

Технология секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов

Технология секвенирования на молекулярных кластерах, так же как и пиросеквенирование, подразумевает синтез новой молекулы ДНК по матрице. Этот метод начали разрабатывать еще в середине 90-х годов прошлого века химики Шанкар Баласубраманиан и Дэвид Кленерман из Кембриджа, изучавшие работу ДНК-полимеразы на молекулярном уровне, используя флуоресцентно меченные нуклеотиды и ДНК-матрицу, иммобилизованную на поверхности. Творческие семинары в лаборатории и дружеские посиделки в баре привели к коммерциализации этой технологии в 2006 году под брендом Solexa, который спустя год был приобретен компанией Illumina. Сейчас платформа продолжает развиваться, и потребителям предлагают новые линейки приборов.

Суть метода заключается в следующем. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для ПЦР и последующего секвенирования на молекулярных кластерах. Полученные ДНК-библиотеки иммобилизуют на поверхности проточной ячейки, где и проводят циклический процесс секвенирования. Реакционная смесь для синтеза комплементарной ДНК подается на поверхность проточной ячейки и содержит ферменты, олигонуклеотиды, а также четыре типа флуоресцентно меченых дезоксинуклеозидтрифосфатов. После включения в синтезирующую цепь ДНК нуклеотида-терминатора идентифицируют с помощью ПЗС-матрицы как тип включенного нуклеотида, так и его положение. Затем термирующая группа и флуоресцентная краска отщепляются от нуклеотида, и цикл синтеза повторяется. Эта серия шагов продолжается определенное количество раз, число которых задает пользователь (рис. 8).

Размер чтений, получаемых с секвенатора, может достигать 300 п.о. (прибор Illumina MiSeq). Кроме того, серия секвенаторов 2017 года NovaSeq позволяет определять последовательность до 48 геномов человека за один запуск прибора.

Технология циклического лигазного секвенирования

Технология циклического лигазного секвенирования была разработана группой Джорджа Макдональда Черча и, в отличие от представленных выше, использует метод лигирования (формирование химических связей между нуклеотидами при помощи специального фермента — лигазы). Данный подход к секвенированию ДНК коммерциализировали в 2006 году, и приборы, известные под брендом SOLiD, уже длительное время представлены на рынке (первоначально развитием этой системы секвенирования занималась компания Applied Biosystems, а затем Life Technologies и Thermo Fisher Scientific).

Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером 25–75 п.о. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для эПЦР на магнитных сферах и последующего секвенирования на проточной ячейке.

Магнитные сферы с нанесенной на них клональной библиотекой помещают на проточную ячейку, где и происходит секвенирование с помощью лигирования восьминуклеотидных зондов, несущих четыре различных флуорофора на 5'-конце. Флуоресценция считывается с помощью специальной камеры после каждого цикла секвенирования и, затем переводится в последовательность нуклеотидов (рис. 9).

Технология лигазного секвенирования применялась в приборах, выпускаемых под брендом SOLiD. Спустя несколько поколений приборов пробоподготовку усовершенствовали, и на рынок вышла новая линейка приборов — 5500, 5500xl, а также 5500w, использующий изотермальную ПЦР (WildFire технология) для клонирования ДНК-библиотек.

Одномолекулярное секвенирование

SMRT-секвенирование (single molecule real time sequencing), предложенное сотрудниками компании Pacific Biosciences, не только позволило отказаться от проведения полимеразной цепной реакции при пробоподготовке, но и дало возможность наблюдать за работой ДНК-полимеразы, наращивающей синтезируемую цепь, в реальном времени.

Создание платформы Pacific Biosciences не только решило проблему ПЦР-дупликатов, но и значительно увеличило длину чтений, что крайне важно при сборке геномов *de novo*. Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером до 20 000 п.о. с лигированными к их концам специфическими ДНК-адаптерами, необходимыми для последующего секвенирования.

Сама реакция секвенирования молекул ДНК проходит в специальных ячейках (SMRT-ячейки) на прозрачной (кремниевой) подложке, с напыленным на нее слоем алюминия. В основе метода лежит использование технологии Zero-mode waveguide (ZMW). Сквозь дно в ячейку подается свет, однако благодаря особенностям ее строения, пучок фотонов не рассеивается, а освещает только конкретную часть (на подложке), где закреплена молекула [phi29 ДНК-полимеразы](#). Эта полимераза была выбрана в качестве «считывающего» фермента благодаря своей высокой точности, скорости синтезирования дочерней цепи и эффективной работе с нуклеотидами, несущими флуоресцентную метку.

Смысл SMRT-секвенирования схож с описанными ранее методами NGS — ДНК-полимераза достраивает вторую цепь исследуемой молекулы ДНК, используя нуклеотиды, меченные различными флуоресцентными метками, которые регистрируют при помощи конфокальной микроскопии. В 2016 году анонсировали покупку платформы Pacific Biosciences биотехнологическим гигантом Roche Diagnostics, однако сделка так и не состоялась.

Разработка другого способа одномолекулярного секвенирования (коммерциализированного к настоящему времени) началась в конце прошлого века, когда группа американских ученых наглядно продемонстрировала возможность побуждать молекулы ДНК и РНК проходить сквозь ионный канал диаметром 2,6 нм в двуслойной липидной мембране под воздействием электрического поля. Более того, уже тогда исследователи сумели различать ДНК и РНК, а также оценивать длину входящих в нанопору олигонуклеотидов. Спустя 13 лет впервые продемонстрировали возможность определения последовательности НК нанопоровым секвенированием, а затем данную технологию коммерциализировала и представила на рынок компания Oxford Nanopore Technologies.

Суть работы нанопоровых систем (MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION), предложенных британской компанией, достаточно проста. Реакционная камера, в которой проходит процесс считывания последовательности НК, разделена двухслойной мембраной с единичной порой. К камере прикладывается напряжение, вызывающее движение ионов и молекул ДНК или РНК через пору. При прохождении молекулы НК сечение поры (доступное для миграции ионов) уменьшается, в результате чего сила тока падает. Таким образом, считывая изменение силы тока, можно определять тип нуклеотида, проходящего через пору в конкретный отрезок времени.

Кроме описанных выше двух технологий компания Helicos Biosciences пыталась продвинуть на биотехнологический рынок свою технологию одномолекулярного

секвенирования — true Single Molecule Sequencing (tSMS). Данный подход во многом схож с технологией секвенирования на молекулярных кластерах (Illumina), однако позволяет обходиться без ПЦР при пробоподготовке.

Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером до 50 п.о. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры. Полученные ДНК-библиотеки иммобилизуют на поверхности проточной ячейки, где и проводят циклический процесс секвенирования. Один цикл состоит из удлинения синтезируемой на матрице цепочки за счет одного из четырех флуоресцентно меченых нуклеотидов, присоединение которого детектируется прибором.

Небольшая длина чтения (до 50 п.о., медиана — 30 п.о.) и большое количество ошибок (3–5%) данной платформы привели к оттоку потенциальных покупателей. Технология не получила широкого распространения, несмотря на потенциальную применимость в работе со сложными образцами, например, в палеогеномике, где отказ от ПЦР мог бы привести к сокращению процентного соотношение экзогенной (мусорной) ДНК в анализируемых образцах древней ДНК. В итоге, в конце 2012 года компания Helicos Biosciences была признана банкротом и прекратила свое существование.

Одномолекулярное секвенирование длинных фрагментов ДНК может найти свое применение в самых разнообразных областях, и, что самое интересное, при работе с единичными клетками позволяет описывать их молекулярный «портрет». Это особенно важно при анализе транскриптомов клеток, позволяя описывать все возможные изоформы активных генов — благодаря длине чтений, недоступных для технологии Solexa или PostLight.

3. Использование секвенирования «нового поколения».

Производительность и относительная доступность NGS-методов привели к настоящей революции в биологической и медицинской науке. Более того, благодаря новым подходам появилась реальная возможность проводить ранее технически недоступные исследования. Использование секвенирования нового поколения позволяет проводить такие проекты как:

Полногеномный анализ (в том числе, ресеквенирование и секвенирование *de novo*). Ресеквенирование полных геномов человека в интересах персонализированной медицины или секвенирование ранее не изученных геномов вирусов, бактерий, архей, растений, грибов и животных как с чисто фундаментальными, так и прикладными целями.

Секвенирование РНК (RNA-Seq), позволяющее оценивать экспрессию генов не только качественно, но и количественно. Существует возможность отдельно оценивать экспрессию кодирующих и регуляторных РНК. Данные методики направлены на изучение работы генома (активности его генов, в том числе генов-регуляторов) в разных клетках, тканях и органах.

Метагеномное секвенирование — оценка разнообразия микроорганизмов в различных образцах. Позволяет оценивать бактериальное разнообразие в различных средах, например, в кишечнике человека, донных отложениях озера Байкал или в горячих источниках Камчатки.

Анализ ДНК-белковых взаимодействий (ChIP-Seq) — изучение влияния транскрипционных факторов и других ДНК-связывающих белков на экспрессию генов, а через нее на фенотипические и физиологические особенности клеток, органов и тканей.

Бисульфитное секвенирование и его модификации (например, RRBS) — оценка метилирования в геноме или его участках. Влияние метилирования регуляторных участков генома на уровень экспрессии генов через подавление их транскрипционной активности.

Таргетное секвенирование (экзомное секвенирование, секвенирование митохондриальных генов, секвенирование ампликонов). Секвенирование отдельных (выбранных исследователем) участков генома, например, только генов митохондриальной

ДНК, кодирующих белки генов или генов, для которых уже описано участие в процессах онкогенеза. Таргетное секвенирование позволяет значительно снизить стоимость эксперимента (из расчета на один образец) и многократно увеличить количество анализируемых образцов.

1.10 Лекция № 10 (2 часа).

Тема: «Создание геномных библиотек».

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Проблемы создания геномной библиотеки.
2. Выделение и фрагментация ДНК.
3. Клонирование.
4. Составление и хранение коллекции клонов.

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Проблемы создания геномной библиотеки.

Информационным центром всего живого, определяющим индивидуальность каждого организма и вида, к которому он принадлежит, является геном. По определению он представляет собой совокупность всех генов организма с их регуляторными сайтами и включает также "молчащие" участки ДНК с неизвестными пока функциями. В простейшем случае ген содержит информацию о структуре одного полипептида. В более сложных случаях он может кодировать несколько полипептидов, считываемых в одной или разных рамках, с частичным или полным перекрыванием генетической информации об этих полипептидах. В некоторых ситуациях можно говорить о гене, находящемся внутри другого гена. Белок-кодирующие части гена могут быть разъединены инtronами или даже находиться на разных хромосомах. Определенная функция организма зависит от одного или нескольких генов. Отсюда понятен интерес к анализу структуры и функций генов и геномов.

Практически неизбежный первый шаг в проведении этого анализа – создание **геномной библиотеки (банка генов)**. Она представляет собой совокупность всех нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК организма в виде фрагментов ДНК, клонированных в векторах. Если фрагменты физически картированы, т. е. если установлено их расположение на хромосомах, то такую библиотеку называют **геномной энциклопедией**. Банки служат источником материала для изучения строения и регуляции индивидуальных генов, а также для исследования структуры и функции белков. С их помощью также можно решать проблему сохранения генофонда исчезающих видов.

Для создания банка генов осуществляют тотальное клонирование, используя для встраивания в вектор смесь фрагментов ДНК, полученную дроблением всей клеточной ДНК. Далее тем или иным способом отыскивают в банке клон с нужным геном. Индивидуальные гены составляют лишь незначительную часть банка, и отыскивать их довольно трудно. Для этого применяют метод гибридизации колоний и гораздо реже – иммунологические методы.

Серьезный прогресс в анализе геномов достигнут благодаря разработке новых методов и подходов. Это и введение физических геномных маркеров, появление быстрых способов картирования клонированных генов, возможность выяснения физической структуры геномов методом FIGE (гель-электрофорез с инверсией электрического поля). Например, генетически линейная хромосомная карта *Caulobacter crescentus* физически оказалась кольцевой.

Точнейшей из операций по анализу строения генов и способов их регулирования является секвенирование. Секвенирование клонированных генов зачастую проводят также в тех случаях, когда оптимизируют их экспрессию. Секвенирование геномов помогает не только изучать их структуру, но и понять пути их эволюции. В практическом плане

секвенирование важно для приготовления зондов с целью диагностики генетических заболеваний, идентификации микроорганизмов и т. д.

2. Выделение и фрагментация ДНК

При любом способе выделения геномной ДНК ее концы имеют случайную структуру. Конечно, после фрагментации ее рестриктазами концевые фрагменты неспособны встраиваться в вектор, поскольку связываются с ним лишь одним краем. Чтобы свести к минимуму их конкуренцию за вектор, средняя длина фрагментов выделенной ДНК должна превосходить длину вставки, как минимум, в четыре раза.

ДНК млекопитающих обычно выделяют обработкой клеток протеиназой К в присутствии ЭДТА и SDS с последующей экстракцией фенолом. Этот метод позволяет получать ДНК со средним размером 100—150 т.п.н., т. е. он приемлем для конструирования банка генов только с использованием Л векторов. Молекулы ДНК длиной более 200 т.п.н. получают формамидным методом (Kupiec et al., 1987), что достаточно для клонирования с помощью космид. Разработаны методы выделения-ДНК со средним размером несколько миллионов пар нуклеотидов. В этих случаях лизис клеток и выделение ДНК ведут в агарозном геле. Также в геле проводят и ее последующую обработку рестриктазами до получения фрагментов размером 200—500 т.п.н., необходимых для клонирования в YAC'ах. Для получения геномных библиотек млекопитающих требуется около 200 мкг ДНК.

Первый банк генов был создан для клеток *E. coli* (Clarke, Carbon, 1976). Бактериальную ДНК авторы фрагментировали гидродинамическим способом, а встраивание фрагментов осуществляли через АТ-коннектор. Этот метод фрагментации ДНК обеспечивает статистически равномерное распределение точек разрывов по молекулам ДНК и позволяет регулировать средний размер фрагментов. Необходимость случайного дробления ДНК понятна. При этом, во-первых, нет опасности, что какой-нибудь ген не будет представлен в банке из-за его систематического расщепления (например, рестриктазой при полном гидролизе). Во-вторых, обеспечивается перекрывание клонируемых фрагментов, что важно для проведения "прогулки" по хромосоме, т. е. для перехода от одного фрагмента к соседнему с ним. Однако эффективность клонирования фрагментов ДНК, полученных механическим дроблением, оказалась недостаточной для конструирования представительных библиотек из-за необходимости проведения дополнительных ферментативных обработок для их лигирования.

Для преодоления указанного недостатка было предложено для фрагментации выделенной ДНК проводить ее частичный перевар двумя мелкоцепящими рестриктазами (Maniatis et al., 1978). Авторы использовали рестриктазы, узнающие тетрануклеотиды и образующие при разрезе ровные концы. Клонирование проводилось с применением линкеров, а вектором служил Харон. При частичном гидролизе ДНК одной рестриктазой получается менее представительный банк, но существенно упрощается процедура его получения. С указанной целью широко используется рестриктаза, образующая совместимые липкие концы.

3. Клонирование

Для составления представительной геномной библиотеки необходимо собрать большое число клонов, достигающее для высших эукариот нескольких сотен тысяч и даже миллионов. Подчеркнем, что речь идет о клонах, содержащих рекДНК. Отсюда понятно, почему в системах клонирования, предназначенных для конструирования таких библиотек, серьезное внимание уделяется проблеме прямой селекции подобных клонов. Ни один из методов не абсолютен. По этой причине стараются поставить, как минимум, два барьера против клонов, не содержащих рекДНК. Одним из таких барьеров служит ограничение размера ДНК при ее упаковке в фаговые головки. Поэтому часто применяют векторы, сконструированные на базе ДНК фагов X и P1.

Вектор замещения АЕМБЛ3, емкость которого составляет 7-20 т.п.н.,

приспособлен для клонирования рестриктов геномной ДНК. Буферный фрагмент вектора ограничен полилинкерами, содержащими сайты во взаимообратном порядке.

Вектор pAdlOsacBII (вариант вектора pAd 10) также обладает двумя системами прямой селекции. Во-первых, благодаря сайтам *loxP*рекДНК может быть упакована в головку фага P1. Во-вторых, селективным маркером служит бациллярный ген *sacB*, находящийся под промотором *E. coli*. Продукт этого гена превращает сахарозу в леван, губительный для кишечной палочки на средах, содержащих сахарозу. Между промотором и геном встроен полилинкер, в сайт которого встраивают геномной ДНК. Процедура клонирования идет тем исключением, что инфицированные реконструированным фагом клетки высеваются на среду, содержащую кроме канамицина еще и сахарозу как единственный источник углерода. Отметим две особенности строения полилинкера. Во-первых, он ограничен сайтами для редкоцепящих рестриктаз *SfiI* и *NotI*, позволяющими "вырезать" длинные вставки без риска их фрагментации. Во-вторых, по обе стороны от сайта, а значит, и от клонированного фрагмента, находятся фагоспецифические промоторы. Они дают возможность синтезировать *in vitro*РНК, комплементарные концам вставки, и использовать их как зонды для "прогулки" по хромосоме.

4. Составление и хранение коллекции клонов

Отметим, прежде всего, что в зависимости от размера банка генов может состоять из индивидуальных клонов или из их смеси. Первое рационально для микроорганизмов, когда число клонов банка составляет несколько тысяч. Так был получен первый банк *E. coli* (Clarke, Carbon, 1976), состоящий из фрагментов ДНК в среднем по 14 т.п.н., клонированных в плазмиде ColE1 (строго говоря, это не банк, а клонотека, его полнота только 80 %). Получение банка в виде индивидуальных клонов необходимо, когда ставится задача составления геномной энциклопедии. В таких случаях число отбираемых клонов должно превышать числа в 7—10 раз, чтобы обеспечить необходимую точность при их физическом картировании.

Энциклопедией является геномная библиотека *E. coli* (Kohara et al., 1987), составленная в результате анализа 3400 клонов, которые были получены с помощью векторов AEMBL4 и L2001 (вектор AEMBL4 отличается от LEMB3 обратным расположением полилинкеров). Полный банк представлен всего 476 клонами, хранящимися в международных и национальных коллекциях, в том числе в России (ГНИИГенетика, Москва). Он и сейчас применяется для поиска и изучения генов *E. coli*.

С помощью вектора pAdlOsocBII получена геномная энциклопедия патогенного для человека микроба *Pneumocystis carinii* (Metcheva et al., 1996), размер генома которого 10000 т.п.н. Коллекция состоит из 4800 индивидуальных клонов. Авторы отмечают стабильность своей библиотеки.

Наиболее стабильно и длительно хранятся банки, полученные с помощью А-векторов. Реконструированные *in vitro* рекомбинантные фаги быстро инактивируются, поэтому их немедленно рассеивают с плотностью около 100 негативных колоний на 1 кв. см (5—10 тысяч на чашку Петри). Чашки инкубируют 8—10 часов при 37 °C, не позволяя образующимся негативным колониям перекрываться. Далее фаги экстрагируют буфером и после центрифугирования хранят под хлороформом при 4 °C многие годы. По-видимому, "вечен" способ хранения фагового банка при -70 °C в "мягком" агаре в 30%-ном глицерине (Klinman, Cohen, 1987). Амплификация банка необходима для хранения библиотеки или повторного скрининга. Однако при повторных пересевах представительность банка ухудшается из-за различий в скоростях размножения клонов, что обусловлено особенностями их нуклеотидных последовательностей и разницей в длине вставки. Поэтому некоторые исследователи предпочитают каждый раз получать геномную библиотеку в фагах заново.

Коллекция бактериальных клонов, содержащих рекомбинантные космиды, получается сходным образом. Выросшие на селективных чашках микроколонии (20—30 тысяч на чашку) объединяют и хранят в среде с глицерином при -70 °C, распределив

предварительно в несколько десятков пробирок. Каждая пробирка используется после оттаивания единожды для скрининга или для других процедур. Конечно, и в этом случае возможен немедленный скрининг банка без его амплификации, для чего инфицированные бактерии высеваются сразу на гибридизационные фильтры.

1.11 Лекция № 11 (2 часа).

Тема: «Экспрессия чужеродных ДНК в бактериальных клетках».

1.11.1 Вопросы лекции:

1. Уровень ДНК.
2. Уровень РНК.
3. Уровень белка.

1.11.2 Краткое содержание вопросов:

1. Уровень ДНК

Экспрессия генов является сложным многоэтапным процессом, зависящим от многих факторов, которые влияют на этот процесс на разных уровнях — на уровне ДНК, мРНК или белка.

На этом уровне эффективность экспрессии зависит: 1) от силы промотора; 2) наличия терминатора транскрипции; 3) отсутствия внутригеновых терминаторов транскрипции; 4) числа копий гена; 5) суперспирализации рекДНК; 6) от расположения чужеродного гена по ходу движения репликативной вилки.

1. Силу промоторов определяют по тому, с какой частотой они способны инициировать акты транскрипции. У сильнейших промоторов (например, в генах рРНК) это происходит каждые 5—10 с, у слабейших (например, промотор гена 1ac) — один раз за генерацию. Промотор относят к сильным, если контролируемый им ген обеспечивает синтез белка, составляющий не менее 10 % от суммарного белка. Сила промотора зависит от двух параметров — константы связывания РНК-полимеразы с промотором (этот процесс приводит к образованию закрытого комплекса) и от скорости раскрытия этого комплекса, т. е. скорости разрыва в нем водородных связей между комплементарными нитями ДНК (McClureet al., 1983). Чем выше эти параметры, тем промотор сильнее. У сильных промоторов структура боксов -10 и -35 оказалась слегка отличной от стандартной. Бокс -10 представлен последовательностями ТАТАТР или ТАТААТР, а бокс -35 — последовательностями (G/C)TT(G/C)A(G/C)A(A/T)TT(G/T) или TT(G/C)TTGACA(A/C), причем перед этим боксом обычно находится АТ-богатый участок (Артемьев и др., 1983). Эффективность транскрипции повышается также, если в зоне основного промоклонируемый ген присутствует во многих копиях. Эффективным и достаточно дешевым способом индукции является нагрев культуры до 42 °С. Однако приходится учитывать, что при этом индуцируется синтез белков теплового шока, один из которых, протеаза Lon, расщепляет чужеродные белки. Этой неприятности можно избежать, используя мутант по гену, который контролирует транскрипцию.

2. Наличие терминатора транскрипции в конце чужеродного гена — фактор скорее желательный, чем обязательный. Излишняя длина мРНК может способствовать образованию такой вторичной структуры, которая будет препятствовать ее успешной трансляции. Волна транскрипции чужеродного гена не должна также захватывать локусы вектора, отвечающие за его стабильность.

3. Присутствие в оперонах слабых внутригеновых терминаторов транскрипции способствует поддержанию в клетке необходимого числа транскриптов. При конструировании продуцентов этот фактор может стать лимитирующим для получения нужного уровня синтеза белка.

4. Число плазмидных копий может варьировать от 1 до 2000 на клетку. Однако количество белка, синтезируемого под контролем плазмида, увеличивается линейно с

повышением числа копий лишь до нескольких десятков или сотен молекул на клетку. Оптимальное число копий вектора в клетке определяется главным образом природой синтезируемого белка и особенностями используемого промотора. Кроме того, необходимо учитывать, что повышенное число копий гена и в связи с этим максимально возможный синтез чужеродного белка полезны только на конечной стадии культивирования продуцента, поскольку на ранних этапах и то, и другое серьезно увеличивает время культивирования и снижает выход продукта. Поэтому желательно предусмотреть в экспрессионном векторе возможность контроля копийности.

В случае токсичных для клетки синтезируемых продуктов удобно использовать термочувствительные run-away мутации, которые при 42 °C увеличивают число копий плазмида до 2000 и вызывают гибель клеток. Такие гены помещают под промотор ApL, регулируемый термочувствительным репрессором CI857, который при 28 °C надежно блокирует, а при 42 °C индуцирует экспрессию гена. В случае нетоксичных продуктов оптимальное число копий плазмида определяется выбранным промотором. Например, в векторе pBR322 при обычном числе его копий (20—60) хороший выход продукта обеспечивают промоторы ApLi trp. В то же время применение его копийных мутантов (до 300 копий) приводит к повышению выхода продукта только при использовании промотора UV5, поскольку при этом экспрессия гена не подавляется интенсивной репликацией.

Повышение числа копий вектора приводит, конечно, к увеличению выхода и плазмидоспецифических белков, некоторые из которых при высоких концентрациях могут дестабилизировать плазмиды. К таким относится, например, продукт гена TcR.

5. Эффект увеличения уровня транскрипции генов в суперспирализованной ДНК по сравнению с релаксированной отмечался во многих случаях (Gellert, 1981). По-видимому, это связано с дополнительным энергетическим вкладом суперспирализации в открытие комплекса РНК-полимеразы: промотор.

6. Расположение чужеродного гена по ходу движения репликативной вилки позволяет избегать негативных последствий столкновения волн транскрипции и репликации.

2. Уровень РНК

На этом уровне эффективность экспрессии зависит: 1) от структуры сайта связывания рибосом (RBS); 2) стабильности транскрипта; 3) наличия в мРНК оптимальных кодонов.

1. Эффективность трансляции мРНК прежде всего зависит от структуры RBS. Этот сайт включает в себя SD-последовательность (как минимум любые подряд четыре нуклеотида из последовательности AGGAGG) и инициирующий кодон (AUG гораздо более эффективен, чем GUG или UUG). Промежуток между SD и AUG насыщен нуклеотидами A или U, причем в положении -3 от инициирующего кодона преобладает A (Stormo, 1986). Некоторые гены обладают дополнительной к SD последовательностью, которая играет роль трансляционного энхансера. Так, в лидерной части мРНК гена фага T7 энхансером является 9-звенный сегмент 5'UUAAACUUUA3 предположительно взаимодействующий с участком 458-466 16S рРНК E. coli (Olins, Rangwala, 1989). Его внедрение перед геном lacL позволило увеличить синтез β-галактозидазы более чем на порядок. Реальное строение RBS индивидуально для каждого гена, существенно отсутствие в лидерной части мРНК шпилечных структур, затрудняющих посадку рибосом. Поэтому часто в RBS входит и несколько начальных кодонов гена. Статистически значимо, что вторым кодоном является GCU или AAA, а четвертый и пятый кодоны содержат последовательность UUAA (Stormo, 1986). Важно также и расстояние между 5'-концом мРНК и SD-последовательностью, которое не должно быть менее 15 нуклеотидных остатков.

2. Проблема стабилизации транскрипта вызвана тем, что нестабильность мРНК у прокариот — это эволюционно выработанный механизм их быстрой адаптации к

изменяющимся условиям. Их инактивация, измеренная по потере массы или функции, происходит по экспоненциальной кинетике. Каждая мРНК характеризуется собственным временем полураспада, в клетках *E. coli* эта величина лежит в пределах от 30 с до 8 мин при 37 ° С. Рибосомы защищают мРНК от деградации, поэтому наиболее частой мишенью для эндо- и экзонуклеаз являются нетранслируемые 5' -концы транскриптов (свободные транскрипты расщепляются экзонуклеазами и с 3'-конца). Именно от особенности их строения (расстояние от 5'-конца до SD-последовательности, наличие шпилек, частота посадки рибосом и т. п.) зависит главным образом скорость их распада. Однако какой-либо консервативной последовательности здесь не обнаружено. Есть только один пример успешной "пересадки" лидерной части стабильного транскрипта. Стабильность транскрипта гена 32 фага T4 обеспечивается благодаря специальному сайту перед инициирующим кодоном и его защите фаговым белком. Это свойство удалось придать в генно-инженерных конструкциях некоторым бактериальным мРНК, но эффект наблюдался только в присутствии указанного белка. Поэтому он не нашел широкого применения.

3. Большинство аминокислот кодируются более чем одним кодоном и что разные виды клеток имеют собственный набор предпочтительно используемых (оптимальных) кодонов, который коррелирует с количеством содержащихся в клетке изоакцепторных тРНК. Задержка рибосомы на каком-либо редко используемом кодоне из-за нехватки тРНК приводит к включению ошибочной аминокислоты, сдвигу рамки считывания или остановке трансляции.

Возможность влиять на эффективность экспрессии генов путем выбора оптимальных кодонов возникает в случае, когда планируется химический синтез гена или его части. Однако простое следование правилу оптимальности далеко не всегда дает желаемый результат, поскольку скорость трансляции мРНК и ее стабильность определяются всем ее эволюционно выработанным контекстом. Во-первых, присутствие в мРНК повторов и шпилек должно быть функционально оправдано. Во-вторых, следует учитывать, что на эффективность трансляции влияют также и окружающие кодоннуклеотиды. Так, у *E. coli* лизин предпочтительно кодируется кодоном AAA, если за ним следует G, или кодоном AAG, если за ним следует C или A. Из двух односмысловых кодонов NNA или NNG, предшествующих кодону AAA, чаще встречается NNG. У эукариот крайне редко встречается динуклеотид CG, а у прокариот ограниченно используется динуклеотид TA. Подобные ограничения предотвращают, возможно, нежелательные взаимодействия соседних тРНК в рибосоме, приводящие к сдвигу рамки считывания. В кодирующими части прокариотических генов почти не попадаются SD-последовательности GAGG и GGAG, по-видимому, для того, чтобы избежать внутригенной инициации трансляции. В третьих, замечено, что у генов, кодирующих полифункциональные белки, неоптимальные кодоны часто встречаются в спейсерных участках между областями, кодирующими разные домены белка. Задержка трансляции в таких участках, по-видимому, дает возможность сформироваться необходимой пространственной структуре домена. Отметим, наконец, в-четвертых, что из синонимических кодонов в генах реже встречаются те, которые содержат 100 % G, C, A, U, а также GC или AU. Цель этого ограничения — поддерживать силу взаимодействия кодон-антикодон на приблизительно одинаковом для всех кодонов уровне, что позволяет оптимизировать скорость трансляции.

3. Уровень белка

На этом уровне эффективность экспрессии зависит от 1) стабильности полипептида и 2) его внутриклеточной агрегации. В практическом плане важны также 3) возможность правильной модификации чужеродного белка (включая его процессинг) и 4) его способность к секреции.

1. Стабильность полипептидов в клетках зависит от протеаз, играющих важную регуляторную роль. Они осуществляют процессинг белков при их секреции, превращают

пребелки в белки, отщепляют N-концевой формилметионин и т. д. Кроме того они гидролизуют нефункциональные или денатурированные полипептиды, образующиеся в результате нонсенс-мутаций, делений, неудачной постсинтетической модификации или процессинга, подстановки аналогов природных аминокислот или даже просто других аминокислот. Эта часть постигает и избыточные количества функционально активных субъединиц мультимерных белковых комплексов, а также многие чужеродные белки — продукты экспрессии клонированных генов, что заставляет отдельно решать проблему стабильности белков.

Механизм избирательного протеолиза белков в деталях не выяснен. В *E. coli* появление aberrантных полипептидов вызывает индукцию белков теплового шока, включая АТР-зависимую сериновую протеазу (эндопептидазу) Lon. Активность этой протеазы индуцируется только в присутствии измененных белков, что свидетельствует о ее способности распознавать их. Таким образом она "чувствует" конформационные изменения в разнообразных белках, пока неизвестно. Выявив подобные изменения в белках, она расщепляет их до мелких фрагментов, а дальнейшее расщепление ведут другие эндо- и экзопептидазы.

Наиболее практический способ стабилизации чужеродных белков основан на наблюдении, что короткие полипептиды менее стабильны, чем длинные. Чужеродный белок удлиняют путем его слияния с белком, который кодируется векторным геном. Удлинения полипептида можно достичь с помощью олигомеризации полипептида. Так, четыре гена проинсулина были соединены олигонуклеотидами, в которых была закодирована мишень для разрезания олигопроинсулина бромцианом (Shen, 1984). Прогормонин, полученный после разрезания, был биологически активным. Время его полураспада в клетках *E. coli* равно 2 мин, а его тетрамера — 120 мин. Использование в качестве реципиентов клеток с мутациями в генах *lon* и *hptR* также позволяет увеличивать время жизни чужеродных белков. Например, время полураспада ростового фактора соматомедиана-С в клетках *E. coli* HB101 равно 2—5 мин, а в клетках — оно превышает 60 мин, что одновременно сопровождается повышением внутриклеточной концентрации фактора в четыре раза.

2. В системе *in vitro* денатурированные белки взаимодействуют друг с другом гидрофобными участками, агрегируют и выпадают в осадок. По-видимому, сходный процесс часто происходит и в клетках, когда они синтезируют большие количества aberrантных полипептидов. Такие полипептиды, а также нормальные по аминокислотной последовательности рекомбинантные белки, могут образовывать нерастворимые агрегаты. Внутриклеточная агрегация белков является одним из способов их сохранения в клетке.

Для практических целей явление внутриклеточной агрегации рекомбинантных белков носит двойственный характер. С одной стороны, оно полезно, ибо позволяет селективно отделять их от растворимых белков. С другой стороны, почти каждый из таких агрегатов требует разработки индивидуального метода растворения (подбора солюбилизирующего агента, условий ренатурации и т.д.). Такие методы обычно являются дорогостоящими.

3. Важность правильной модификации белков для их функциональной активности в эукариотах отмечалась выше. Это явление менее выражено в бактериях, а имеющиеся у них для этой цели собственные ферменты не узнают или модифицируют неправильно чужеродные белки. Поэтому, если получаемый в бактериях эукариотический белок необходим в активной форме, то клонируют ген, в котором сохранена только требуемая для этого нуклеотидная последовательность. В случае же дальнейшего использования белка в родственных для него клетках клонируемый ген может содержать информацию о белке-предшественнике в надежде на то, что при его последующем использовании он будет правильно модифицирован *in vivo*.

4. Способность бактерий секретировать белки является их ценным (но редким) качеством, позволяющим не проводить при получении белков трудоемкую операцию по

вскрытию клеток. Механизм секреции белков сходен как у про-, так и у эукариот.

1.12 Лекция № 12 (2 часа).

Тема: «Генетическая инженерия белков».

1.12.1 Вопросы лекции:

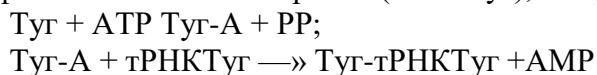
1. Повышение ферментативной активности.
2. Изменение специфичности фермента.
3. Повышение стабильности и специфичности фермента.

1.12.2 Краткое содержание вопросов:

1. Повышение ферментативной активности.

С помощью направленного мутагенеза можно не только повышать стабильность ферментов, но и изменять их катализическую активность. В настоящее время для существенного изменения ферментативной активности любого достаточно хорошо охарактеризованного фермента необходимо располагать детальной информацией о геометрии его активного центра. В этом случае можно предсказать, какие замены необходимо произвести для изменения специфичности фермента к данному субстрату.

Возможности данного подхода иллюстрируют результаты эксперимента по изменению специфичности связывания субстрата тирозил-тРНК—синтетазой из *B. stearothermophilus*. Этот фермент катализирует аминоацилирование тРНК, которая специфически связывает тирозин (тРНКТуг), в ходе двухступенчатой реакции:



На стадии 1 АТР активирует тирозин (Туг), в результате чего образуется связанный с ферментом тирозиладенилат (Туг-А) и пирофосфат (PP_i). На стадии 2 тирозиладенилат гидролизуется при участии свободной 3'-гидроксильной группы молекулы тРНК, так что тирозин присоединяется к тРНК с высвобождением AMP. В ходе обеих реакций субстраты остаются связанными с тирозил-тРНК—синтетазой.

Ко времени постановки эксперимента была определена пространственная структура тирозил-тРНК—синтетазы *B. stearothermophilus* и локализован ее активный центр, так что при помощи компьютерного моделирования можно было предсказать влияние замены в нем одного или нескольких аминокислотных остатков на взаимодействие фермента с субстратами. Чтобы проверить правильность прогнозов, с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза в ген тирозил-тРНК—синтетазы были внесены специфические мутации. Остаток треонина в положении 51 (Thr-51) был заменен на остаток аланина или пролина. В нативном ферменте гидроксильная группа Thr-51 образует водородную связь с атомом кислорода рибозного кольца тирозиладенилата. и предполагалось, что разрыв этой слабой связи увеличит сродство фермента к АТР.

Чтобы охарактеризовать получившиеся ферменты, определили их кинетические константы. В некоторых случаях изменения оказались более существенными, чем ожидалось. Так, если для A1a-51-фермента константа связывания (K_m) с АТР уменьшилась примерно в два раза без значительного изменения катализической константы (k_{cat}), то для Pro-51 -фермента — более чем в 100 раз. При этом катализическая эффективность (k_{cat}/K_m) реакции аминоацилирования увеличилась в обоих случаях. Результат, полученный для Pro-51-фермента, был неожиданным, поскольку замена треонина на пролин должна была привести к нарушению (по крайней мере локальному) структуры а-спирали в этой области, что предположительно должно отрицательно сказаться на связывании субстрата.

Эти данные показывают, что несмотря на всю сложность прогнозирования результата специфических аминокислотных замен, с помощью описанного подхода все же можно идентифицировать боковые группы, замена которых приведет к улучшению кинетических свойств фермента. Кроме того, стало очевидно, что средство данного фермента к субстрату, а также каталитическую эффективность реакции можно повысить *in vitro*, внося соответствующие изменения в клонированный ген.

2. Изменение специфичности фермента

Олигонуклеотид-направленный мутагенез используют в основном для улучшения уже существующих свойств ферментов, но, вероятно, с его помощью можно изменять ферменты таким образом, чтобы они преобретали другую специфичность. Например, таким способом на основе относительно неспецифичной эндонуклеазы FokI были получены новые сайтспецифичные эндонуклеазы.

К настоящему времени идентифицировано более 2500 ферментов рестрикции-модификации, происходящих из большого числа разных организмов. Многие из них узнают одну и ту же нуклеотидную последовательность, так что всего существует около 200 разных рестриктазных сайтов, при этом размер большинства из них составляет от 4 до 6 п. н. Эндонуклеазы рестрикции, узнающие такие сайты, расщепляют молекулу ДНК в очень многих местах и используются для получения больших фрагментов ДНК не столь широко, как эндонуклеазы рестрикции, узнающие нуклеотидные последовательности длинной в 8 п. н. или больше. Поиск новых эндонуклеаз рестрикции — весьма непростая задача, для ее решения требуется много времени. Вряд ли можно надеяться, что удастся найти достаточно много ферментов, узнавших сайты длинной 8 п. н. и больше, так что для получения новых рестриктаз необходимо использовать альтернативные генно-инженерные подходы.

Существует весьма интересный класс белков, в молекуле которых присутствуют уникальные структурные домены, связывающие атомы Zn²⁺, — так называемые цинковые пальцы. Эти белки связываются со специфической нуклеотидной последовательностью, встраиваясь своим а-спиральным участком в большую бороздку двойной спирали. Так, белок Zif268 из клеток мышей содержит три цинковых пальца, каждый из которых взаимодействует с определенным кодоном ДНК. Поскольку эти пальцы связываются с ДНК независимо друг от друга, их можно объединить в составе одного пептида таким образом, чтобы связывание происходило с определенным сайтом. Это позволяет создавать нуклеазы, расщепляющие ДНК в уникальных сайтах, объединив нуклеотидные последовательности, кодирующие цинковые пальцы, с частью гена неспецифичной нуклеазы Fok бактерии *Flavobacterium okeanokoites*. Чтобы проверить реальность этого предположения, был создан химерный ген, кодирующий участок из шести остатков гистидина на N-конце белковой молекулы для упрощения очистки рекомбинантного белка, три цинковых пальца, линкер (Gly4Ser)3 для придания гибкости рекомбинантной молекуле, а также содержащий часть гена нуклеазы Fok. После очистки рекомбинантного белка N-концевые остатки гистидина были удалены обработкой тромбином.

Бактерии, синтезирующие эндонуклеазы рестрикции, защищают собственную ДНК от расщепления с помощью ферментов, метилирующих те участки молекулы, с которыми связывается соответствующая эндонуклеаза рестрикции. Однако геном клетки-хозяина не защищен от рекомбинантной рестриктазы Fok, и чтобы предотвратить гибель растущих клеток, синтез гибридного фермента подавляли, поместив ее ген под контроль системы экспрессии бактериофага T7. В результате этих экспериментов были получены две рекомбинантные эндонуклеазы рестрикции Fok. Одна из них расщепляла ДНК фага X в том сайте, который и ожидался, а вторая — в ожидаемом сайте и — в меньшей степени — в двух других сайтах. Это не удивительно, поскольку цинковые пальцы распознают в основном два из трех оснований триплета. Хотя эти рекомбинантные ферменты пока

нельзя использовать в лаборатории, описанный подход создания уникальных эндонуклеаз рестрикции представляется весьма перспективным.

3. Повышение стабильности и специфичности фермента

Фермент, называемый активатором тканевого плазминогена (tPA), — это сериновая протеиназа, состоящая из нескольких доменов; ее используют в клинике для растворения сгустков крови. К сожалению, tPA быстро выводится из системы кровообращения, поэтому его приходится вводить путем инфузии. Чтобы добиться желаемого терапевтического эффекта, необходимо использовать высокие концентрации фермента, а это может приводить к неспециальному внутреннему кровотечению. Таким образом, было бы весьма желательно получить долгоживущий фермент tPA, обладающий высоким сродством к фибрину в тромбах и не вызывающий кровотечения. Белок с такими свойствами можно получить, внося специфические мутации в ген нативного tPA. Заменив Thr-103 на Asn, получили фермент, сохраняющийся в плазме кролика примерно в 10 раз дольше, чем нативный вариант. Заменив аминокислоты 296—299 с Lys-His-Arg-Arg на A1a-A1a-A1a-A1a, добились существенного повышения сродства фермента к фибрину. Заменив Asn-117 на Gin, получили фермент с такой же фибринолитической активностью, как у исходного фермента. Внеся эти три мутации в один белок, получили фермент, обладающий всеми тремя свойствами. Чтобы выяснить, можно ли использовать его вместо нативного tPA, нужно провести дополнительные исследования.

1.13 Лекция № 13 (2 часа).

Тема: «Генно-инженерные организмы в деятельности человека».

1.13.1 Вопросы лекции:

1. Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения коммерческих продуктов.
2. Биодеградация токсичных соединений и утилизация биомассы.
3. Промышленный синтез белков при участии рекомбинантных микроорганизмов.

1.13.2 Краткое содержание вопросов:

1. Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения коммерческих продуктов

До настоящего времени основной целью исследований в области молекулярной биотехнологии было получение различных белков. Однако технологию рекомбинантных ДНК можно использовать также для крупномасштабного производства многих ценных низкомолекулярных соединений — витаминов, аминокислот, антибиотиков и т. д.

При наличии эффективной системы экспрессии получение белка — продукта специфического гена — не составляет особого труда. Белок может представлять собой либо тот конечный продукт, который хотят получить (например, рестригирующую эндонуклеазу), либо фермент, катализирующий определенную химическую реакцию (например, одну из реакций биосинтеза антибиотиков). Иногда в результате генетических манипуляций микроорганизм приобретает способность к синтезу нового фермента и может использоваться для получения *in vivo* низкомолекулярных соединений - витаминов, аминокислот, красителей, антибиотиков, предшественников различных биополимеров и т. д. Такой микроорганизм становится «фабрикой» по производству полезных метаболитов.

Развитие технологии рекомбинантных ДНК было бы невозможно, если бы в распоряжении исследователей не было нужных эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз). В настоящее время в продаже имеется более 300 различных рестриктаз. Эти ферменты синтезируются самыми разными микроорганизмами: аэробными, анаэробными, фотосинтезирующими, diazотрофными, мезотрофными, термофильными, психрофильными, медленно- и быстрорастущими. Для культивирования каждого из них необходимо

подобрать оптимальные условия ферментации — температуру, рН, состав среды, концентрацию кислорода — с тем чтобы максимизировать выход необходимого фермента. Чтобы не пришлось выращивать большое число разных микроорганизмов, готовить многокомпонентные среды, разрабатывать разные ферментеры и тратить время на подбор оптимальных условий роста для многочисленных организмов, часто клонируют гены эндонуклеаз рестрикции в *Escherichia coli*. Это позволяет стандартизовать условия получения необходимых продуктов. Кроме того, культура клеток *E. coli* быстро достигает высокой плотности и может быть приспособлена для сверхпродукции необходимого фермента.

Технология выделения и экспрессии чужеродных генов в *E. coli* и в некоторых других микроорганизмах достаточно хорошо отработана, однако не стоит забывать, что синтез гетерологичного белка в организме-хозяине может оказывать на него негативное влияние. Например, сверхпродукция такого белка может привести к истощению метаболических ресурсов хозяйского организма и отрицательно повлиять на его рост. Присутствие гетерологичного белка может оказаться даже губительным для клетки-хозяина. Так, сайты рестрикции имеются во всех молекулах ДНК, и если продуктом клонированного гена является эндонуклеаза рестрикции, то в отсутствие специальных защитных механизмов хозяйская ДНК будет расщепляться ею.

Микроорганизмы, синтезирующие эндонуклеазы рестрикции, выработали систему самозащиты: они метилируют одно или несколько оснований рестриктазного сайта, и расщепление ДНК в этом сайте гомологичной эндонуклеазой рестрикции блокируется. Грамотрицательные микроорганизмы имеют еще один механизм защиты: эндонуклеазы рестрикции у них локализованы в периплазматическом пространстве. Благодаря такой компартментализации происходит физическое разделение рестриктаз и ДНК и при этом обеспечивается свободный доступ метилирующего (модифицирующего) фермента к хромосомной ДНК. Кроме того, это защищает клетку от проникновения в нее любой чужеродной ДНК, например вирусной.

Один из подходов к решению проблемы деградации хозяйской ДНК гетерологичными эндонуклеазами рестрикции состоит в клонировании и экспрессии в реципиентном организме как гена фермента рестрикции, так и гена соответствующего модифицирующего фермента. Однако клонирование обоих этих генов в одном микроорганизме технически затруднено, если они расположены на хромосоме донорного организма далеко друг от друга. Кроме того, чтобы не допустить расщепления хозяйской ДНК эндонуклеазами рестрикции, метилирующий фермент после трансформации должен синтезироваться еще до начала синтеза рестриктазы.

Стратегия выделения и клонирования в *E. coli* гена рестриктазы *PstI* грамотрицательной бактерии *Providencia stuartii*.

ДНК *P. stuartii* расщепляют с помощью *HindIII* и встраивают фрагменты в *HindIII*-сайт плазиды pBR322.

Рекомбинантными плазидами трансформируют клетки *E. coli* HB101 и выращивают их в жидкой среде, а затем инфицируют бактериофагом X. Если в хозяйской клетке экспрессируется ген фермента рестрикции, то она оказывается устойчивой к литическому действию фагов типа K, ДНК которых активно расщепляется синтезируемой рестриктазой.

Трансформированные клетки, устойчивые к фагу X, подвергают осмотическому шоку, чтобы высвободить периплазматические белки. Определяют активность рестриктазы *PstI* в белковом экстракте.

4. Положительные клоны тестируют на наличие АЛ-метилирующей активности.

Один положительный клон, выявленный в этом эксперименте, содержал встроенный фрагмент ДНК длиной 4 т. п. н. с интактным опероном рестриктазы и метилазы *PstI* и промотором *P. stuartii*. В клоне, несущем эту генетическую конструкцию, соблюдался естественный временной порядок синтеза: вначале синтезировался

метилирующий фермент, затем эндонуклеаза рестрикции. Уровень экспрессии гена рестриктазы *PstI* в *E. coli* был примерно в 10 раз выше, чем в *P. stuartii*. Как и предполагалось, рестриктаза находилась в периплазматическом пространстве, а метилаза — в цитоплазме. Метод получения *ft/I* клонированием соответствующего гена в *E. coli* гораздо более эффективен, чем выделение этого фермента из *P. stuartii*.

Для выделения генов, кодирующих ферменты рестрикции и модификации (метилирования), можно использовать также другой подход, который состоит в следующем.

Создают банк клонов ДНК организма-донора, продуцирующего известную эндонуклеазу рестрикции. Используемый при этом плазмидный вектор должен содержать по крайней мере один сайт узнавания для этой рестриктазы.

Трансформируют *E. coli* гибридными плазмидами.

Из трансформированных клеток, выросших в жидкой селективной среде (т. е. из клеток, содержащих плазмиду), выделяют плазмидную ДНК.

Обрабатывают ее интересующей исследователя эндонуклеазой рестрикции.

Трансформируют *E. coli* плазмидными ДНК, обработанными эндонуклеазой рестрикции.

Ключевым моментом этого метода является то, что плазмидная ДНК клонов, несущих и экспрессирующих ген фермента модификации, оказывается устойчивой к расщеплению соответствующей эндонуклеазой рестрикции, поскольку сайты узнавания в ней метилированы.

2. Биодеградация токсичных соединений и утилизация биомассы

Еще относительно недавно ни у кого не возникало сомнения в том, что окружающая среда — воздух, земля и вода — всегда будут эффективно «перерабатывать» бытовые, промышленные и сельскохозяйственные отходы. Теперь мы знаем, что это не так. Человечество столкнулось с двумя фундаментальными проблемами: переработкой отходов, постоянно образующихся в огромном количестве, и разрушением токсичных соединений, десятилетиями накапливавшихся на свалках, в воде и почве. Правительства разных стран пытались решить эти проблемы законодательным путем, однако к успеху это не привело.

В настоящее время проходит проверку целый ряд технологических, в том числе и биотехнологических, подходов, с помощью которых, возможно, удастся перерабатывать большие количества отходов (например, лигноцеллюлозы) и токсичные вещества. Предпринимаются попытки поощрять те предприятия, которые перерабатывают отходы производства и повторно используют содержащиеся в них полезные вещества.

Употребляемый нами здесь термин «биодеградация» относится к процессу разрушения отходов, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов, а термин «биомасса» — ко всей совокупности веществ и материалов — побочных продуктов пищевой и перерабатывающей промышленности, — которые раньше считались отходами, а теперь могут служить сырьем для производства многих экономически важных продуктов.

Деградация ксенобиотиков с помощью микроорганизмов

Проблема утилизации токсичных отходов сейчас стоит очень остро. В 1985 г. мировое производство лишь одного из загрязняющих окружающую среду химических веществ, пентахлорфенола, составило более 50 000 т. Раньше токсичные вещества разрушали, сжигая их или обрабатывая другими химикатами, однако это тоже приводило к загрязнению окружающей среды, а кроме того, обходилось очень дорого. В середине 1960-х гг. были обнаружены почвенные микроорганизмы, способные к деградации ксенобиотиков (неприродных, синтетических химических веществ; от греч. *xenos*, чужой) — гербицидов, пестицидов, хладагентов, растворителей и т. д. Это открытие подтвердило правильность предположения о том, что микроорганизмы можно использовать для экономичного и эффективного разрушения токсичных химических отходов.

Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*. Биохимические исследования показали, что разные штаммы *Pseudomonas* способны расщеплять более 100 органических соединений. Нередко один штамм использует в качестве источника углерода несколько родственных соединений.

В биодеградации сложной органической молекулы обычно участвуют несколько разных ферментов. Кодирующие их гены могут иметь хромосомную локализацию, но чаще входят в состав крупных (50—200 т. п. н.) плазмид, а иногда обнаруживаются как в хромосомной, так и в плазмидной ДНК.

Бактерии, разрушающие негалогенированные ароматические соединения, как правило, превращают их в катехол или протокатехоат, а затем, в ходе нескольких реакций окислительного расщепления, — в ацетил-СоА и сукцинат или пируват и ацетальдегид. Эти последние соединения метаболизируются практически всеми микроорганизмами. Галогенированные ароматические соединения, основные компоненты большинства пестицидов и гербицидов, с помощью тех же ферментов разрушаются до катехола, протокатехоата, гидрохинона или их галогенированных производных, причем скорость их деградации обратно пропорциональна числу атомов галогена в исходном соединении. Дегалогенирование (отщепление замещающего атома галогена от органической молекулы), необходимое для детоксикации соединения, часто осуществляется в ходе неспецифической диоксигеназной реакции, путем замещения галогена в бензольном кольце на гидроксильную группу. Эта реакция может происходить как в ходе биодеградации исходного галогенированного соединения, так и потом.

Некоторые микроорганизмы обладают природной способностью к деградации различных ксенобиотиков, однако следует иметь в виду, что: 1) ни один из них не может разрушать все органические соединения; 2) некоторые органические соединения в высокой концентрации подавляют функционирование или рост деградирующих их микроорганизмов; 3) большинство очагов загрязнения содержит смесь химикатов, и микроорганизм, способный разрушать один или несколько ее компонентов, может инактивироваться другими компонентами; 4) многие неполярные соединения адсорбируются частицами почвы и становятся менее доступными; 5) биодеградация органических соединений часто происходит довольно медленно. Часть этих проблем можно решить, осуществив конъюгационный перенос плазмид, которые кодируют ферменты разных катаболических путей, в один реципиентный штамм. Если две плазмиды содержат гомологичные участки, то между ними может произойти рекомбинация с образованием гибридной плазмиды, которая имеет больший размер и обладает свойствами исходных плазмид. Если же две плазмиды не содержат гомологичных участков и относятся к разным группам несовместимости, то они могут сосуществовать в одной бактерии.

3. Промышленный синтез белков при участии рекомбинантных микроорганизмов

Для получения коммерческих продуктов с помощью рекомбинантных микроорганизмов необходимо сотрудничество специалистов в двух областях: молекулярных биологов и биотехнологов. Задача молекулярных биологов заключается в идентификации, изучении свойств, модификации нужных генов и создании эффективных систем их экспрессии в клетках микроорганизмов, которые можно будет использовать для промышленного синтеза соответствующего продукта, а задача биотехнологов — в обеспечении условий оптимального роста нужного рекомбинантного микроорганизма с целью получения продукта с наибольшим выходом. На заре развития молекулярной биотехнологии ученые наивно полагали, что переход от лабораторного синтеза к промышленному — это вопрос простого увеличения масштаба, т. е. условия, оптимальные для малых объемов, будут оптимальными и для больших, так что достаточно просто взять больший реактор и соответственно больший объем культуральной среды.

Такое упрощенное представление не соответствует действительности. Например, аэробные микроорганизмы хорошо растут в обычной колбе на 200 мл при аэрации ее содержимого с помощью мешалки мощностью 300 Вт. Если просто увеличить объем «колбы» до 10 000 литров, то потребуется мешалка мощностью 15 МВт. Ее мотор будет размером с дом, а при перемешивании выделится столько тепла, что микроорганизмы по-просту сварятся. Этот простой пример может не во всем убедить биотехнологов, однако они точно знают, что проблема промышленного культивирования микроорганизмов не сводится к пропорциональному увеличению масштаба лабораторного эксперимента. Конечно, увеличить размер реактора (биореактора, ферментера) совершенно необходимо, поскольку для получения 10 000 л клеточной супензии не имеет смысла использовать 50 000 отдельных колб на 200 мл. Однако помимо этого для получения максимального выхода как в малых (от 1 до 10 л), так и в больших (>1000 л) биореакторах необходимо оптимизировать множество параметров: температуру, pH, интенсивность и способ перемешивания культуры и — в случае аэробных организмов — концентрацию кислорода. При этом надо иметь в виду, что как правило оптимальные условия изменяются при каждом десятикратном увеличении объема биореактора.

Есть и другие очень важные соображения. В реакторе должен поддерживаться достаточный уровень стерильности и, кроме того, необходимо создать условия, предотвращающие утечку генетически измененных микроорганизмов. Чтобы иметь возможность быстро и легко изменять условия в ходе ферментации, реактор должен быть снабжен контрольно-измерительной аппаратурой, позволяющей непрерывно отслеживать значения как можно большего числа параметров. Поскольку при стерилизации может изменяться состав среды (например, могут разрушаться витамины), важно убедиться в том, что он остался оптимальным для роста нужных микроорганизмов.

Как правило, промышленная ферментация и очистка продукта — процессы многоступенчатые. Обычно процедура начинается с приготовления и стерилизации культуральной среды и оборудования. Сначала выращивают исходную культуру (5—10 мл), затем инкубируют ее во встраиваемой колбе (200—1000 мл), после чего переносят в ферментер для посевного материала (10—100 л) и, наконец, в промышленный ферментер (1000—100 000 л). По завершении ферментации клетки выделяют из культуральной среды центрифугированием или фильтрацией. Если продукт локализован внутри клеток, последние разрушают, удаляют клеточные осколки и выделяют продукт из осветленной среды. Секретируемый продукт выделяют непосредственно из среды.

1.14.Лекция № 14 (2 часа).

Тема: «Генетическая инженерия дрожжей».

1.14.1 Вопросы лекции:

1. Векторы.
2. Трансформация дрожжей.
3. Экспрессия чужеродных генов в дрожжах.

1.14.2 Краткое содержание вопросов:

1. Векторы

Векторы типа YIp (Yeast Integrating plasmid)

Являются фактически бактериальными векторами, так как дрожжевая ДНК в них представлена только одним из генов.

Не способны реплицироваться в дрожжевых клетках, но осуществляют их трансформацию путем интеграции в хромосому через рекомбинацию дрожжевого гена с гомологичным участком хромосомы (в результате образуются гетерозиготы по этому гену) и путем замены хромосомного гена на векторный с помощью двойного кроссинговера (конверсия гена).

Векторы типа YE_p (Yeast Episomal plasmid)

Сконструированы на базе 2-микронной ДНК.

Первый такой вектор, предложенный Дж. Бэгсом в 1978 г., представлял собой плазмиду YIp с встроенной 2-микронной ДНК.

Современные векторы данного типа состоят из плазмиды pBR322, репликатора 2-микронной ДНК и селективного дрожжевого маркера.

Эти членочные векторы позволяют клонировать чужеродные гены в клетках *E. coli* и затем исследовать их экспрессию в дрожжевых клетках.

Трансформированные данными векторами дрожжи можно иногда отбирать по бактериальным маркерам устойчивости к хлорамфениколу, канамицину и гентамицину. Частота трансформации дрожжей векторами YE_p на три порядка выше по сравнению с таковыми векторами первого типа, но получаемые при этом трансформанты нестабильны.

Векторы типа YR_p (Yeast Replicating plasmid)

Имеют хромосомные репликаторные последовательности ars (autonomously replicating sequence). Однако они слабо обеспечивают самостоятельную репликацию векторов, поэтому полученные с их помощью трансформанты дрожжей нестабильны.

Векторы типа YC_p (Yeast Centromere plasmid)

Наиболее перспективны для клонирования генов.

Содержащие, кроме хромосомных репликаторов ars1 или ars2, центромеры дрожжевых хромосом.

В настоящее время для конструирования таких векторов применяют центромеры 3-й (CEN3) и 11-й (CEN11) хромосом.

YC_p проявляют стабильность при митозе и мейозе.

Другими словами, эти векторы фактически представляют собой кольцевые мини-хромосомы.

Векторы типа YL_p (Yeast Linear plasmid)

Являются линейными мини-хромосомами.

Получают путем введения в кольцевые плазмиды YC_p теломер и последующей линеаризации плазмид.

Однако стабильность их на два порядка ниже, чем у естественных хромосом, которые при митозе теряются с частотой 10-4-10-5. Это объясняется тем, что в искусственные хромосомы, вероятно, включаются не все элементы, необходимые для поддержания их стабильности.

Небольшие линейные плазмиды данного типа (7-15 тпн) поддерживаются в клетках дрожжей в нескольких десятках копий, но они менее митотически стабильны, чем кольцевые плазмиды того же генотипа. Длинные линейные плазмиды (около 50 тпн), полученные путем включения в небольшие плазмиды ДНК фага λ, содержат мало копий и высоко стабильны при митозе.

2. Трансформация дрожжей

Эффективным методом является введение плазмидной ДНК в протопласты. Их получают в результате удаления клеточной стенки с помощью β-глюканазы, причем в среде присутствует сorbitol для предотвращения осмотического шока протопластов. Далее протопласты инкубируют с трансформирующей ДНК в присутствии полиэтиленгликоля и хлористого кальция и высевают на твердые селективные среды, где происходит регенерация клеточных стенок и образование колоний трансформантов. Без полиэтиленгликоля, который способствует слиянию протопластов, трансформация не идет. Предполагается, что именно процесс слияния обеспечивает захват ДНК и его перенос внутрь клетки. Предварительное заключение ДНК в липосомы и их слияние с протопластами приводит к увеличению эффективности трансформации.

Возможна также трансформация целых клеток, обработанных 0,1 М ацетатом лития, в присутствии полиэтиленгликоля. Этот метод значительно проще, но

эффективность трансформации на порядок ниже, чем при использовании протопластов. Широко используют и метод электропорации дрожжевых клеток.

3. Экспрессия чужеродных генов в дрожжах

Дрожжевые промоторы существенно отличаются по строению от бактериальных промоторов. Различия в строении промоторов, а также сигналов сплайсинга высших и низших эукариот не являются принципиальными, но, тем не менее, они не взаимозаменимы. Этим объясняются неудачи большинства опытов по экспрессии чужеродных генов с собственными промоторами в дрожжах. Поэтому для успешной экспрессии чужеродных генов в дрожжевой клетке их сигнальные последовательности, ответственные за транскрипцию и трансляцию, необходимо заменять аналогичными участками дрожжевого происхождения.

Для оптимизации экспрессии чужеродных генов в дрожжах необходимо преодолевать те же препятствия, что и при их экспрессии в бактериях. Однако на практике это сделать затруднительно из-за недостаточности знаний о причинах анализируемых явлений. Например, время полураспада мРНК дрожжей варьирует в пределах от 1 до 100 мин, но причины разной их стабильности не известны. Столь же не ясна и ситуация со стабильностью белков: предсказать, насколько будет стабилен чужеродный белок, заранее невозможно. Можно попытаться предотвратить деградацию нестабильного белка, сделав его секрецируемым, но это удается не всегда, если белок в норме функционирует в цитоплазме. Часто белок гидролизуется в процессе его выделения из клеток благодаря действию протеаз, которые освобождаются из разрушенных везикул. Этот эффект можно предотвратить, используя беспротеазные штаммы дрожжей. Уже отмечалось, что эффективность трансляции зависит от структуры мРНК. В частности, удаление 5' и 3' нетранслируемых областей мРНК корового антигена вируса гепатита В позволило увеличить содержание этого белка в клетке почти на два порядка при неизменном содержании самой мРНК Но и здесь приходится действовать методом проб и ошибок. Также известно, что использование оптимальных кодонов должно привести к увеличению выхода чужеродного белка. Это было продемонстрировано на примере 50-кратного повышения содержания белка при клонировании синтетического гена легкой к-цепи иммуноглобулина мыши по сравнению с клонированием ее кДНК. Однако есть примеры и с другим результатом. У эукариот в узнавании промоторов РНК-полимеразой важную роль играют транскрипционные факторы. Сайты для них отсутствуют в бактериальных промоторах, поэтому они не функциональны в дрожжах В то же время дрожжевые промоторы зачастую функциональны в *E. coli*. Впервые это было показано в опытах по экспрессии в дрожжах гена β-галактозидазы.

1.15 Лекция № 15 (2 часа).

Тема: «Контроль применения биотехнологических методов».

1.15.1 Вопросы лекции:

1. Контроль экспериментов с рекомбинантными ДНК.
2. Генная терапия человека.

1.15.2 Краткое содержание вопросов:

1. Контроль экспериментов с рекомбинантными ДНК

Внедрение революционных технологий, в том числе и молекулярной биотехнологии, всегда сопровождается повышенным вниманием со стороны общественности. Для одних новые технологии — это предвестник неминуемых катастроф, подрывающих самые основы общества. Такие люди полагают, что любые новшества неизбежно таят в себе опасность, и избежать ее можно, только прекратив всякие разработки. Другие смотрят на новые технологии как на рог изобилия, из которого на человечество посыплются несказанные блага, и считают, что любые препятствия на пути

их развития лишают общество неоценимых преимуществ. Они полагают, что новая технология — слишком «хрупкая» вещь и нуждается в защите, чтобы она могла принести ожидаемые плоды. Третья группа людей придерживается промежуточной точки зрения. Ее представители считают, что ничего принципиально нового вообще не существует и любая «новая» технология — это развитие старой. Таких людей вполне устраивают существующие методы контроля, уменьшающие риск, а эффект от новой технологии неизбежно наступит, как только она встанет на ноги.

Поскольку молекулярная биотехнология может оказывать влияние на самые разные стороны жизни современного общества, в том числе на сельское хозяйство и медицину, необходимо учитывать все возникающие при этом проблемы — этические, правовые, экономические и социальные. Еще в 1973 г. были высказаны серьезные сомнения по поводу безопасности технологии рекомбинантных ДНК. Ученым пришлось даже 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. Правила разрабатывались в 1974—1975 гг. в ходе открытых дебатов и под пристальным вниманием прессы, так что общественность получила полное представление о последствиях — как негативных, так и позитивных — генетического манипулирования с живыми организмами. Тем не менее в конце 1970-х гг. все еще высказывались сомнения в безопасности работ с рекомбинантными ДНК. В частности, существовало мнение, что попадание генетически модифицированных организмов в окружающую среду может привести к неконтролируемому распространению их в экосистемах. Пришлось ввести дополнительные нормы, уменьшающие и без того небольшую вероятность событий такого рода.

Развернулась широкая дискуссия и по поводу этичности проведения генетических экспериментов на человеке. Цель ее заключалась в том, чтобы попытаться разграничить то, что совершенно недопустимо, и то, что вполне приемлемо. К сожалению, нельзя дать однозначного ответа на все этические, правовые и социальные вопросы, возникающие в связи с разнообразными применением молекулярной биотехнологии. Однако ставки в игре чрезвычайно высоки, поэтому детальный анализ проблем необходим.

В 1974 г., когда стало ясно, что с помощью технологии рекомбинантных ДНК можно создавать организмы, несущие чужеродные гены, ученые, общественность и официальные лица забили тревогу по поводу безопасности этого нового подхода и возможных этических последствий его применения. Такие выражения, как «заигрывание с Богом», «манипулирование жизнью», «самые опасные из проводившихся когда-либо научных исследований», «творимая человеком эволюция» без конца мелькали в прессе. Больше всего тревожило то, что случайно, а возможно, и намеренно, в военных целях, будут созданы уникальные, ранее не существовавшие в природе микроорганизмы, которые станут причиной эпидемий или экологических катастроф. В ответ на эти панические ожидания группа ведущих молекулярных биологов предложила наложить мораторий на некоторые эксперименты с рекомбинантными ДНК, особенно на те, в которых используются патогенные микроорганизмы.

В 1976 г. Национальные институты здравоохранения (NIH, от National Institutes of Health), ведущее исследовательское ведомство США, выделяющее денежные средства на работы в области медицины и здравоохранения, разработали директиву, регламентирующую проведение всех субсидируемых ими экспериментов с рекомбинантными ДНК. В ней жестко оговаривались условия работы с рекомбинантными ДНК в лаборатории и выдвигалось требование, чтобы в качестве хозяев для чужеродных ДНК использовались только микроорганизмы, неспособные размножаться вне стен лаборатории и передавать свою ДНК другим микроорганизмам. Для экспериментов с известными патогенными организмами, например, было рекомендовано использовать

специально сконструированные, находящиеся под постоянным контролем изолированные боксы, в которых поддерживается отрицательное давление, а работы с менее опасными организмами можно было проводить в помещениях, оборудованных высокоэффективными системами фильтрации. Несмотря на то что директивы NIH не имели правового статуса, большинство компаний, приступающих к работам с применением технологии рекомбинантных ДНК, добровольно выполняли все указанные требования. Более того, другие страны, принимая директивы NIH за основу, разработали собственные ограничения для экспериментов с рекомбинантными ДНК.

Исходные директивы NIH были очень жесткими, и многие ученые считали, что их требования избыточны. Например, стоимость необходимого оборудования, обеспечивающего соблюдения всех оговоренных мер биологической безопасности, была столь высока, что небольшие компании и исследовательские группы были вынуждены отказываться от работ с рекомбинантными ДНК. Для возможного пересмотра этих директив был создан Консультативный комитет NIH 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. В его обязанности входили также организация открытых дискуссий по обсуждению принимаемых решений, информирование о планируемых заседаниях, согласование времени их проведения. Необходимо было организовать работу так, чтобы любые лица, не члены Комитета, могли обращаться в него по всем входящим в его компетенцию вопросам. Большинство членов Комитета составляли ученые, но в него входили также специалисты по вопросам этики и представители общественности.

В соответствии с первоначальными директивами NIH, к категории экспериментов, «которые не могли проводиться в настоящее время» ни при каких условиях, относились такие, которые были связаны с «преднамеренным высвобождением в окружающую среду любых организмов, содержащих рекомбинантную ДНК». Однако само создание генетически модифицированных организмов (ГМО), способных выживать в природных экосистемах, было неизбежным.

К 1980 г. первоначальные директивы NIH были пересмотрены в сторону смягчения требований, в основном благодаря экспериментальным данным, полученным в ходе исследований, финансированных NIH-RAC и NIH. Например, было установлено, что микроорганизм *Escherichia coli* K-12, чаще других использовавшийся в работах с рекомбинантными ДНК, не способен размножаться и длительное время существовать вне стен лаборатории. Кроме того, микробиологи убедили молекулярных биологов и других заинтересованных лиц в том, что те меры безопасности, которые применяются при работе с патогенными организмами, соответствуют самым высоким стандартам и более жесткие нормы не требуются. И наконец, было признано чрезвычайно маловероятным появление патогенного организма, если используемый для клонирования ген не «отвечает» за патогенные свойства того организма, из которого он был выделен. По мнению большинства, при должном оснащении лабораторий можно обеспечить безопасность работающего персонала. Однако к директивам NIH были добавлены специальные правила по обеспечению мер предосторожности, исключающих случайный выброс в окружающую среду генетически модифицированных организмов при их крупномасштабном культивировании.

После того как требования к мерам безопасности для большинства рутинных экспериментов были смягчены, технология рекомбинантных ДНК стала быстро развиваться. Разработанные NIH-RAC и NIH правила частично сняли существовавшие ранее опасения. Однако остались две важных проблемы. Во-первых, как контролировать производство и потребление пищевых продуктов, содержащих генетически измененные организмы или полученных с их использованием? Во-вторых, как уследить за преднамеренным высвобождением ГМО в окружающую среду?

Третью возможную проблему удалось разрешить, когда контролирующие органы пришли к выводу, что лекарственные препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК, аналогичны препаратам, полученным традиционными методами. В большинстве стран существует четкая установка, что действующих норм, которые регламентируют коммерческое использование лекарственных препаратов, достаточно для того, чтобы обезопасить как производителей, так и потребителя, независимо от способа получения препарата (традиционная технология или технология рекомбинантных ДНК). Положение, согласно которому проверке на безопасность и эффективность должен подвергаться только сам продукт, привело к одобрению лекарственных средств, вакцин, диагностических систем и других продуктов, полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

2. Генная терапия человека

Генная терапия человека в широком смысле предусматривает введение в клетки функционально активного гена (генов) с целью исправления генетического дефекта. Существуют два возможных пути лечения наследственных болезней. В первом случае генетической трансформации подвергают соматические клетки (клетки, отличные от половых). При этом коррекция генетического дефекта ограничивается определенным органом или тканью. Во втором случае изменяют генотип клеток зародышевой линии (сперматозоидов или яйцеклеток) или оплодотворенных яйцеклеток (зигот), чтобы все клетки развивающегося из них индивидуума имели «исправленные» гены. В результате генной терапии с использованием клеток зародышевой линии генетические изменения передаются из поколения в поколение.

В 1980 г. представители католической, протестантской и иудейской общин США написали открытое письмо Президенту с изложением своих взглядов на использование генной инженерии применительно к человеку. Для оценки этических и социальных аспектов этой проблемы были созданы Президентская комиссия и комиссия Конгресса. Это были очень важные инициативы, поскольку в США введение в действие программ, затрагивающих интересы общества, часто осуществляется на основе рекомендаций подобных комиссий. В окончательных заключениях обеих комиссий проводилась четкая граница между генной терапией соматических клеток и генной терапией клеток зародышевой линии. Генная терапия соматических клеток была отнесена к стандартным методам медицинского вмешательства в организм, сходным с трансплантацией органов. В противоположность этому генная терапия клеток зародышевой линии была сочтена технологически очень сложной и проблематичной с точки зрения этики, чтобы безотлагательно начинать ее практическое применение. Был сделан вывод о необходимости выработки четких правил, регулирующих исследования в области генной терапии соматических клеток; разработка подобных документов применительно к генной терапии клеток зародышевой линии была сочтена преждевременной. Чтобы пресечь все незаконные действия, было решено прекратить все эксперименты в области генной терапии клеток зародышевой линии.

К 1985 г. NIH разработали документ, озаглавленный «Положения о составлении и подаче заявок на проведение экспериментов в области генной терапии соматических клеток». В нем содержалась вся информация о том, какие данные должны быть представлены в заявке на разрешение испытаний в области генной терапии соматических клеток на человеке. За основу были взяты правила, регулирующие лабораторные исследования с рекомбинантными ДНК; они были лишь адаптированы применительно к биомедицинским целям.

Когда эксперименты в области генной терапии только начинались, большая часть заявок на клинические испытания вначале рассматривалась Комитетом по этике того учреждения, где предполагалось осуществлять исследования, и только потом они пересыпались в Подкомитет по генной терапии человека NIH-RAC. Последний оценивал заявки с точки зрения их научной и медицинской значимости, соответствия действующим

правилам, убедительности доводов. Если заявка отклонялась, ее возвращали назад с необходимыми комментариями. Авторы заявки могли пересмотреть предложение и переработать его. Если заявка утверждалась, то NIH-RAC обсуждал ее в публичных дискуссиях, используя те же самые критерии. После одобрения заявки на таком уровне директор NIH утверждал ее и подписывал разрешение на клинические испытания, без которого они не могли быть начаты. Кроме того, поскольку тестирование методов генной терапии соматических клеток подразумевало использование новых генетических конструкций, заявка рассматривалась также FDA. В этом последнем случае особое внимание обращалось на способ получения продукта, методы качественного контроля его чистоты, а также на то, какие доклинические испытания были проведены, чтобы убедиться в безопасности продукта.

Но, поскольку число заявок со временем увеличивалось, а генная терапия становилась, по словам одного комментатора, «выигрышным билетом в медицине», принятая первоначально процедура утверждения заявок была признана неоправданно трудоемкой и избыточной. Соответственно после 1997 г. NIH уже не входил в число учреждений, контролирующих исследования в области генной терапии человека. Если NIH-RAC и будет существовать, то он скорее всего станет организатором форумов по обсуждению этических проблем, связанных с генной терапией человека. А пока требование, согласно которому все заявки в области генной терапии должны обсуждаться публично, снято. FDA, ответственная за контроль производства и использования биологических продуктов, проводит все необходимые оценки конфиденциально, чтобы гарантировать соблюдение права собственности разработчиков. В настоящее время генная терапия человека считается безопасной медицинской процедурой, хотя и не особенно эффективной. Высказывавшиеся ранее опасения рассеялись, и она стала одним из основных новых подходов к лечению заболеваний человека.

Большинство специалистов считают процедуру утверждения испытаний в области генной терапии соматических клеток человека в США вполне адекватной; она гарантирует беспристрастный отбор больных и их информированность, а также осуществление всех манипуляций должным образом, без причинения вреда как конкретным больным, так и человеческой популяции в целом. В настоящее время в других странах тоже разрабатываются правила проведения испытаний в области генной терапии. В США это было сделано в результате тщательного взвешивания каждого предложения. Как сказал один из участников слушаний, организованных NIH-RAC в январе 1989 г., доктор Лерой Уолтере, директор Центра по биоэтике при Джорджтаунском университете в Вашингтоне, округ Колумбия: «Я не знаю никакой другой биомедицинской науки или технологии, которая бы подвергалась столь всесторонней проверке, как генная терапия».

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

2.1 Практическое занятие № 1(2 часа).

Тема:«Ферменты генной инженерии»

2.1.1 Задание для работы:

Изучить ферменты, используемые в генетической инженерии.

1. Рестриктазы.
2. ДНК-лигазы.

2.1.2 Краткое описание проводимого занятия:

Ферменты, применяемые в генной инженерии, лишены видовой специфичности, поэтому экспериментатор может сочетать в единое целое фрагменты ДНК любого происхождения в избранной им последовательности. Это позволяет генной инженерии преодолевать установленные природой видовые барьеры и осуществлять межвидовое скрещивание.

Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

1. Рестриктазы

В основе методов генной инженерии лежит способность бактериальных ферментов рестрикции (рестриктаз) расщеплять ДНК на отдельные довольно короткие нуклеотидные последовательности. Естественной функцией рестриктаз является защита бактерии от инфекции вирусами. Эти ферменты рестрицируют (т.е. ограничивают) возможность размножения фаговой ДНК в бактерии путем разрезания ее на части. Фермент рестрикции не может расщеплять свою собственную (бактериальную) ДНК, т.к. в сайтах рестрикции бактериальная ДНК модифицирована метилированием, которое осуществляется особым ферментом – ДНК-метилазой. В бактериальной клетке существует система рестрикции-модификации. Определенные рестриктазы специфически узнают только свои «мишени», состоящие из 4–6 пн и разрезают ДНК в середине или несколько в стороне от этой последовательности, делая соответственно прямые или ступенчатые разрезы в обоих цепях ДНК. В последнем случае образуются «липкие» (выступающие одноцепочечные) концы, которые благодаря комплементарности оснований могут вновь замыкаться с образованием водородных связей. То есть концы, сформировавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут гибридизироваться между собой. Это обеспечивает возможность объединения различных молекул ДНК и создание рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Рестриктазы были названы биологическими ножами, которыми манипулируют генные инженеры или хирурги. Примером рестриктаз, образующих «липкие концы», являются широко используемые в генно-инженерных работах ферменты бактериального происхождения – EcoRI (присутствует у E.coli) и BamHI (обнаружена в клетках *Bacillus amyloliquefaciens*). Например, EcoRI распознает последовательность из 6 нуклеотидов (GAATTC), делая ступенчатые разрезы между нуклеотидами G и A, HaeIII – узнает 4 нуклеотида (GGCC), делая прямые разрезы и

образуя «тупые» концы. Для соединения «тупых» концов к ним ферментативным путем присоединяют «липкие» концы. Ферменты рестрикции обозначают по названию организмов, из которых они изолированы. Используют три буквы из названия вида бактерии, например, EcoRI из E.coli, HindIII – из Haemophilus influenzae, HaeIII – из Haemophilus aegyptius и т.д. После трех букв курсивом следуют определенный буквенный символ, обозначающий генетическую линию или штамм, и римская цифра. В настоящее время известно более 400 рестриктаз, способных расщеплять ДНК в различных сайтах.

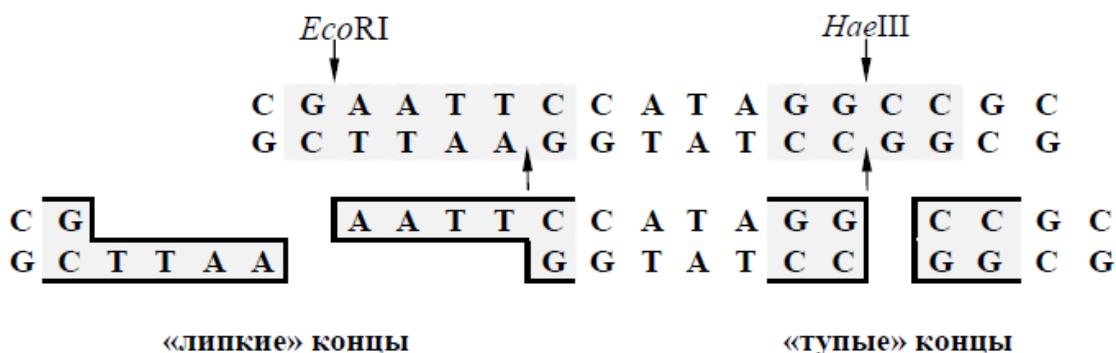


Рис. 1. Последовательность нуклеотидов, которая содержит сайты (сайты рестрикции), распознаваемые различными рестриктазами

2. ДНК-лигазы

В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага 1 показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 году такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нукleinовой кислоты.

Иными словами, ДНК-лигазы сшивают рядом расположенные нуклеотиды, образуя связь между остатками сахаров. ДНК-лигазы абсолютно необходимы в процессах репарации ДНК, в процессах репликации – при удвоении цепи ДНК.

В генной инженерии используются 2 типа ДНК-лигаз, отличающихся по потребностям в кофакторах и способу действия. ДНК-лигаза E. coli в качестве кофактора использует дифосфорилидиннуклеотид, а лигаза фага T4 – АТФ в присутствии Mg²⁺. Лигаза фага T4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. Она используется чаще.

2.2 Практическое занятие № 2 (2 часа).

Тема: «Ферменты генной инженерии»

2.2.1 Задание для работы:

Изучить ферменты, используемые в генетической инженерии.

1. ДНК-полимераза I E. coli.
2. Обратная транскриптаза.
3. Терминалная трансфераза.

2.2.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. ДНК-полимераза I E. coli

Впервые ДНК-полимераза была выделена Корнбергом с сотрудниками в 1958 году из E. coli.

ДНК-полимераза I E. coli (Pol I) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК. Однако, если такие молекулы денатурировать и получить одноцепочечные формы, то с последними полимераза связывается в количествах, пропорциональных длине этих участков — примерно одна молекула на 300 нуклеотидных остатков. Pol I связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов с 3'-гидроксилом и 5'-фосфатом, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК.

Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5' - 3' полимеразной, 3' - 5' экзонуклеазной, 5' - 3' экзонуклеазной.

1. 5'-3' полимеразная активность. Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента — праймера (затравки) с 3'-ОН концом.

2. 3'-5' экзонуклеазная активность. Гидролизует одноцепочечную или двухцепочечную ДНК с 3'-ОН конца. 3'—5' нуклеаза расщепляет диэфирную связь только в неспаренных участках ДНК. Известно, что при полимеразной реакции с определенной частотой возможно включение в растущую цепь некомплементарного нуклеотида. Однако полимераза не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при ее участии. На помощь приходит 3'—5' экзонуклеаза, убирающая ошибочный нуклеотид, на место которого затем присоединяется правильный нуклеотид-предшественник. 3'—5' экзонуклеолитическая активность проявляется в направлении, обратном синтезу ДНК. Таким образом, 3'—5' экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы играет важную роль в точности полимеризации, направляемой матрицей. Эффективность, или число оборотов, данной экзонуклеазы в оптимальных условиях составляет 2% от числа оборотов субъединицы с полимеразной активностью.

3. 5'-3' экзонуклеазная активность. Деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'-5' экзонуклеазы 5'-3' экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК. Более того, в то время как 3'—5' нуклеаза отщепляет одномоментно только один нуклеотид, 5'—3' нуклеаза может вырезать с 5'- конца олигонуклеотиды длиной до десяти остатков (около 20% продуктов гидролиза): Скорость нуклеазного отщепления увеличивается на порядок при одновременно протекающей реакции полимеризации. При этом увеличивается относительное количество олигонуклеотидов в продуктах гидролиза ДНК.

Такое сочетание ферментативных активностей позволяет ДНК-полимеразе I E. coli играть активную роль в reparации повреждений ДНК *in vivo*. N-концевой домен соединен с соседним петлей из аминокислотных остатков и легко отделяется с помощью протеолитических ферментов. Оставшаяся часть бифункциональна, так как состоит из полимеразы и 3' - 5' экзонуклазы. Она названа фрагментом Кленова (по фамилии одного из авторов, описавших ее). Фрагмент Кленова (Pol IK) обычно используют для достройки одноцепочечных 5'-концов на двухцепочечной ДНК, часто генерируемых рестриктазами, до тупых; для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК, а также для гидролиза одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК.

2. Обратная транскриптаза

Обратная транскриптаза используется для транскрипции м-РНК в комплементарную цепь ДНК. При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития ретровирус проходит стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Темин выдвинул гипотезу о существовании

вирусспецифичного фермента, способного синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. Усилия, направленные на выделение такого фермента, увенчались успехом, и в 1970 г. Темин с Мизутани, а также независимо от них Балтимор открыли искомый фермент в препарate внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название обратная транскриптаза, или ревертаза.

Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц. Каждый вирион содержит около 50 молекул этого фермента. Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц — а (65 кДа) и б (95 кДа), присутствующих в эквимолярном количестве. Обратная транскриптаза обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК - ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеаза, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах. Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий двухцепочный участок (праймер). Праймером может служить одноцепочный сегмент как РНК, так и 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 специально подобранных условиях с использованием 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 (dT), а для молекул РНК, не имеющих 3'-поли (А) концов, — химически синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концу изучаемой РНК. После синтеза на мРНК комплементарной цепи ДНК и разрушения РНК (обычно применяют обработку щелочью) осуществляют синтез второй цепи ДНК. При этом используют способность ревертазы образовывать на 3'-концах одноцепочных 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. Показано, что сочетание этих двух ферментов позволяет повысить выход полноценных двухцепочных 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 одноцепочные участки нукleinовых 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.

3. Терминальная трансфераза

Терминальная трансфераза (концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза) была обнаружена Боллумом в 1962 году в тимусе теленка.

Субстратом терминальной трансферазы при использовании в качестве кофактора ионов Mg²⁺ является одноцепочечная ДНК с 3'-ОН концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одноцепочечным 3'-ОН концом. Если в качестве кофактора используются Co²⁺, этот фермент может катализировать присоединение дезоксинуклеотидов к 3'-ОН концу двухцепочечной ДНК с тупыми концами.

При введении в реакцию, направляемую терминальной трансферазой, лишь одного типа дезоксинуклеотидов образуются молекулы ДНК, имеющие гомополимерные 1-цепочечные 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 дезоксинуклеотидилтрансферазы в 1972 г. был выполнен первый эксперимент по рекомбинации молекул ДНК *in vitro*.

2.3 Практическое занятие № 3 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 1 модуль».

2.3.1 Задание для работы:

Систематизировать и проверить знания, полученные при освоении раздела «Ферменты и векторы клонирования в генной инженерии».

2.3.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Какие ферменты являются инструментами генетической инженерии?
2. Какую роль выполняет система рестрикции-модификации у бактерий?
3. Как классифицируют рестриктазы?
4. Как используют рестриктазы при конструировании рекомбинантных молекул?
5. Какую функцию выполняют ДНК- и РНК-лигазы?
6. Какие ферменты являются инструментами генетической инженерии?
7. Для чего используют ДНК-полимеразы и обратные транскриптазы?
8. Как классифицируют ДНК-пилизеры?
9. Как используют обратную транскриптазу при конструировании рекомбинантных молекул?
10. Какую функцию выполняет терминальная трансфераза?
11. На чем основан принцип фенотипической селекции гибридных клонов?
12. Какими способами получают меченные ДНК-зонды?
13. По какой схеме проводят гибридологический скрининг трансформантов?
14. Для чего применяется функциональная комплементация мутаций генома клетки?
15. Принцип метода радиоиммунного анализа белков.

2.4 Практическое занятие №4(2 часа).

Тема: «Методы отбора гибридных клонов»

2.4.1 Задание для работы:

Изучить методы отбора гибридных клонов. 1. ДНК-полимераза I *E. coli*.

1. Фенотипическая селекция.
2. Гибридизация нукleinовых кислот.
3. Функциональная комплементация.
4. Радиоиммуноанализ белков.

2.4.2 Краткое описание проводимого занятия:

Смесь молекул, полученных после встройки в выбранный молекулярный вектор фрагментов экзогенной ДНК, вводят в компетентные клетки. Если при этом в вектор статистически встраивают большой набор разных фрагментов донорной ДНК, то вероятность встройки каждого конкретного фрагмента невелика. В этом случае необходимо иметь методы, позволяющие в большом многообразии получаемых гибридных клонов выявлять необходимые. В связи с этим в генно-инженерном эксперименте большое значение имеют методы скрининга (отбора) клонов, содержащих целевые гибридные ДНК.

1. Фенотипическая селекция

Первичный отбор гибридных клонов значительно упрощается, если в векторной молекуле предусмотрена специальная фенотипическая система селекции. При трансформации клеток чаще всего используют векторные молекулы ДНК, несущие гены устойчивости к антибиотикам и антиметаболитам. Поэтому на среде с определенным антибиотиком или антиметаболитом будут расти только клетки трансформантов. Особенно хорошо данная система селекции отработана для бактерий, так как получены векторные плазмиды, детерминирующие устойчивость трансформированных клеток сразу к нескольким антибиотикам. Если векторная плазмида определяет устойчивость к двум антибиотикам и при встройке в нее экзогенного фрагмента ДНК нарушается одна из генетических детерминант устойчивости к антибиотикам, то клоны клеток, содержащих такие гибридные ДНК, легко отличить от трансформантов, включающих исходный вектор, на средах с каждым антибиотиком в отдельности.

Например, если векторная плазмида детерминирует устойчивость одновременно к тетрациклину и ампициллину (*Tc*г*A*рг) и при встройке в нее чужеродного фрагмента нарушается ген устойчивости к ампициллину, то гибридная плазмида будет обуславливать фенотип клетки-хозяина *Tc*г*A*рс, т. е. устойчивость к тетрациклину и чувствительность к ампициллину. Плазмиды после встройки в них фрагментов ДНК вводят в клетки, культуру высевают на чашки с агаризованной питательной средой, в которую добавлен тетрациклин. При этом вырастают колонии клеток, содержащих или исходную векторную плазмиду, или гибридные плазмиды. Затем колонии перепечатывают на чашки с ампициллином и чашки с тетрациклином. Те колонии, которые после перепечатки будут расти на среде с тетрациклином и не дадут роста на среде с ампициллином, содержат гибридные плазмиды. Простота манипуляций обусловила широкое использование данного типа векторов для клонирования самых различных фрагментов ДНК. Однако такие плазмиды не позволяют осуществлять прямой отбор гибридных клонов — сразу после высева трансформантов на селективную среду и появления колоний.

В последние годы получен ряд векторных плазмид, предназначенных для прямой селекции трансформантов, содержащих гибридные плазмиды. Такие векторы обычно имеют гены, потенциально летальные для чувствительных клеток-реципиентов, и могут трансформировать эти клетки только после инактивации данных генов встраиванием в них фрагментов ДНК.

Внедрение экзогенных фрагментов в состав ДНК вирусов обычно приводит к повреждению определенных вирусных генов, а часто (в силу ограничений, налагаемых на размер вирусного генома) возможно лишь при выщеплении сегмента вирусной ДНК. Поэтому гибридные вирусы, как правило, являются мутантными. Обычно используют такие варианты клонирования, при которых формируемый мутантный вирус жизнеспособен (в противном случае приходится использовать вирус-помощник, что усложняет работу). Мутантные вирусы часто удается отличить от исходного векторного, и это позволяет достаточно просто выявлять гибридные вирусы.

2. Гибридизация нукleinовых кислот

Нужную нуклеотидную последовательность в образце ДНК можно обнаружить с помощью ДНК-зонда, спаривающегося только с искомой последовательностью. Для этого ДНК сначала переводят в одноцепочечную форму, подвергнув ее тепловой обработке или воздействию щелочью. В этих условиях водородные связи между основаниями разрываются и цепи расходятся (происходит денатурация). Если теперь медленно снизить температуру, то произойдет их воссоединение (ренатурация). При этом, если в растворе присутствует одноцепочный ДНК-зонд, он тоже будет ренатурировать с ДНК, специфически спариваясь с комплементарными участками. В результате образуется гибридная ДНК, т. е. двухцепочечная молекула, цепи которой принадлежат двум разным ДНК.

Процедура ДНК-гибридизации состоит в следующем. ДНК-мишень подвергают денатурации и одноцепочные молекулы необратимо «прилипают» к твердой подложке (нитроцеллюлозному или найлоновому фильтру). Эту процедуру обычно проводят при высокой температуре. Затем фильтр инкубируют с одноцепочечным ДНК-зондом, меченным радиоизотопом или другой меткой. Если нуклеотидные последовательности зонда и ДНК-мишени комплементарны, то происходит их спаривание (т. е. гибридизация) (слайд). Гибридные молекулы можно визуализировать радиоавтографическим или другим методом, зависящим от природы метки. Если комплементарность между зондом и ДНК-мишенью отсутствует, то гибридизации не происходит, и мы получаем отрицательный результат. Обычно размер зонда варьирует от 100 до 1000 п. н. и более, хотя можно использовать как более крупные зонды, так и зонды меньшего размера. Для гибридизации, т. е. для образования стабильного комплекса, необходимо, чтобы на участке длиной 50 нуклеотидов совпадало более 80% из них, но это зависит от условий реакции.

Меченные ДНК-зонды можно получить разными способами. Один из них, называемый методом случайных праймеров, основан на применении смеси синтетических олигонуклеотидов (олигомеров), содержащих все возможные комбинации из нуклеотидов. Некоторые из этих олигонуклеотидов оказываются комплементарными последовательностям ДНК-мишени и гибридизуются с ними, если ДНК предварительно денатурировать. После отжига олигонуклеотидов с денатурированной ДНК-матрицей в реакционную смесь добавляют четыре дезоксирибонуклеотида (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; dNTP), один из них — меченный, и фрагмент ДНК-полимеразы I E. coli (фрагмент Кленова). Фрагмент Кленова обладает ДНК-полимеразной и 3'-экзонуклеазной активностями, но не 5'-экзонуклеазной активностью, присущей ДНК-полимеразе I E. coli, которая могла бы расщепить новосинтезированные молекулы ДНК. Одиночные цепи ДНК-мишени служат матрицами для синтеза новых молекул ДНК, а связанные с ними случайным образом олигонуклеотиды — затравками. При радиоактивном мечении один из dNTP содержит α -32Р, так что 32Р-меченный оказывается и сам зонд. Радиоактивную метку выявляют с помощью радиоавтографии.

В качестве нерадиоизотопной метки часто используют биотин, который присоединяют к одному из четырех dNTP. Для выявления гибридизовавшегося биотинилированного зонда на фильтр наносят конъюгат стрептавидина с соответствующим ферментом (например, щелочной фосфатазой). Стрептавидин образует комплекс с биотином, который обнаруживается благодаря тому, что под действием фермента образуется окрашенное или люминесцирующее вещество — продукт превращения нанесенного на фильтр субстрата.

Зонды для скрининга гибридных клонов можно получить по крайней мере двумя способами. Во-первых, можно использовать клонированную ДНК близкородственного организма (гетерологичный зонд). В этом случае условия гибридизации нужно подбирать таким образом, чтобы она могла происходить при существенном расхождении между нуклеотидными последовательностями зонда и искомой ДНК; это позволяет решить проблемы, связанные с заведомым различием между ДНК — источником зонда и исследуемой ДНК. Во-вторых, зонд можно получить методом химического синтеза,

основываясь на известной аминокислотной последовательности белкового продукта искомого гена.

Скрининг обычно проводят по следующей схеме. После трансформации высевают клетки на чашки с питательной средой и переносят выросшие колонии на твердую подложку (например, на нитроцеллюлозный или найлоновый фильтр); проводят лизис клеток, затем депротеинизацию и денатурацию ДНК; фиксируют ДНК на подложке. Наносят на фильтр меченный зонд и проводят отжиг, а затем радиоавтографию. Колонии на исходной чашке, которые содержат гибридизовавшуюся ДНК, выделяют и культивируют (слайд). Поскольку большинство клонов получается в результате частичного гидролиза, положительный гибридизационный сигнал может быть получен для нескольких колоний (клонов). Теперь необходимо определить, какой именно клон (если таковой имеется) содержит искомый ген целиком. С помощью гель-электрофореза и картирования определяют размер каждого фрагмента (вставки) и идентифицируют аналогичные фрагменты или фрагменты с перекрывающимися последовательностями. Можно также провести дополнительное клонирование с тем, чтобы составить полный ген из перекрывающихся фрагментов. Или, если вставка в каком-либо из клонов достаточно велика и вполне может содержать весь ген, провести ее секвенирование и убедиться в наличии старт- и стоп-кодонов и полноразмерной нуклеотидной последовательности, кодирующей искомый белок.

3. Функциональная комплементация

Большой интерес для генетической инженерии представляет достижение правильной экспрессии клонированной генетической информации в клетках-реципиентах. Экспрессию легко выявить, если клонируемый ген при правильной транскрипции и трансляции обеспечивает функциональную комплементацию мутаций генома клетки. В этом случае нужный гибрид может быть обнаружен простым отбором трансформированных клонов на селективной среде. Например, в одной из первых работ такого типа, выполненной в 1976 г. в лаборатории Р. Дэвиса, выяснилось, что гибридная ДНК, полученная при встройке определенных фрагментов хромосомной ДНК дрожжей-сахаромицетов в ДНК векторного фага A, комплементирует мутацию *E. coli hisB*. Клоны, содержащие такие гибриды, отбирали по способности клеток расти на питательной среде без гистидина. В дальнейшем данный подход неоднократно использовался при попытке клонировать чужеродные гены.

4. Радиоиммуноанализ белков

Одним из приоритетных направлений генно-инженерных исследований является достижение правильной экспрессии генов высших эукариот и их вирусов в бактериальных клетках. Однако в данных случаях экспрессию многих клонированных генов уже нельзя выявить по функциональной комплементации в силу некоторых принципиальных различий в организации прокариотических и эукариотических клеток. Несомненно, такой подход неприменим и при клонировании большинства вирусных генов. Поэтому в данной ситуации для поиска требуемых клонов гибридов можно использовать метод радиоиммуноанализа белков *in situ*, первые варианты которого были описаны в 1978 г. В основу метода положена способность молекул иммуноглобулинов связываться с полистиролом или поливинилом. Кроме того, предполагается, что исследуемый белок имеет не менее двух антигенных детерминант и может связывать по крайней мере две разные молекулы иммуноглобулинов, присутствующих в препарате поликлональных антител, полученных на целевой белок.

Колонии трансформантов перепечатывают идентичным образом на две чашки с агаризованной питательной средой и чашки инкубируют до получения колоний необходимого размера. Затем на одной из чашек лизируют бактериальные клетки и прижимают к поверхности среды поливиниловый диск с адсорбированными на нем специфическими антителами. При этом на диске происходит иммunoсорбция антигена. После промывания диска на него наносят ¹²⁵P-меченные антитела (препарат

поликлональных иммуноглобулинов) к белку искомого гена. Колонии, в которых образовался комплекс антиген-антитело, выявляют радиоавтографически. Из соответствующих колоний с матричных чашек бактерии пересевают на питательные среды и проводят анализ содержащихся в них гибридных плазмид.

2.5 Практическое занятие №5(2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция. Техника выделения нуклеиновых кислот. Амплификация».

2.5.1 Задание для работы:

Ознакомиться с методикой проведения полимеразной цепной реакции

1. Устройство ПЦР-лаборатории
2. Постановка ПЦР

2.5.2 Краткое описание проводимого занятия:

ПЦР-лаборатория должна быть разделена на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР-диагностики. Следует иметь не менее двух комнат:

- пре-ПЦР- помещение, где проводится обработка клинических образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР; в этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами (микробиологический анализ, ИФА, другие диагностические тесты и т.д.), ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории.

- пост-ПЦР- помещение, где проводится детекция продуктов амплификации; в пост-ПЦР- помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций, диагностика которых проводится в данной лаборатории.

Выделяют два вида контаминации:

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов.

2. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

Для предотвращения контаминации используют различные физические и химические методы:

1. Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы.

2. Использованные наконечники для автоматических пипеток, пробирки и другие загрязненные ДНК материалы необходимо обрабатывать реагентами, вызывающими деградацию ДНК (1 н НСl, 10% гипохлоридом натрия или 10% хлорной известью).

При проведении ПЦР-анализа работать необходимо только в одноразовых перчатках; использовать одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Анализ продуктов ПЦР должен производиться в изолированной комнате сотрудником лаборатории, не производящим обработки клинических образцов и операций с реакционной смесью (МУ 1.3.2569-09).

1. Пробоподготовка или выделение ДНК (РНК).

Бактериальные лизаты для постановки ПЦР получают с помощью реагента «ДНК-Экспресс» (Литех, Россия). Для этого суточную агаровую культуру петлей вносят в пробирку с реагентом, перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 10 с,

помещают пробирку в твердотельный термостат и инкубируют при температуре 98 °С в течение 20 минут. После завершения инкубации пробирки центрифугируют при 12000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 секунд. Надосадок помещают в чистые пробирки. Полученный супернатант используют в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

2. Собственно ПЦР или амплификация. Для ее проведения необходимы следующие компоненты:

ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент).

Праймеры (синтетические олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента).

Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ) в реакционной смеси содержится в эквивалентных концентрациях, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Фермент Таq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК).

Магний необходим для функционирования фермента Таq-полимеразы.

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента.

Минеральное масло насливается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

ПЦР проводят в термоцикльере «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Реакционная смесь включает 1 мкл бактериального лизата, по 0,5-1 мкл специфических праймеров, 0,8 мкл дезоксирибонуклеозид-трифосфатов (10 mM, Thermo Scientific, США), 2,5 мкл 10xПЦР-буфера (Хеликон, Россия), 1,5 мкл хлорида магния (25 mM, Fermentas, Литва), 0,2-1 мкл фермента Таq-полимеразы (5 ед/мкл, Хеликон, Россия). Реакционную смесь доводят до 25 мкл водой без нуклеаз (Fermentas, Литва).

2.6 Практическое занятие № 6 (2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция. Учёт результатов».

2.6.1 Задание для работы:

1. Освоить детекцию результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле.

2.6.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Детекция продуктов амплификации.

Продукты амплификации генов анализируют путем электрофоретического разделения в 1-2%-ном горизонтальном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве маркеров применяют GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Плотность агарозного геля и маркеры молекулярного веса подбирают зависимости от молекулярной массы продуктов амплификации. Результаты визуализируют в ультрафиолетовом свете.

Положительное заключение о наличии гена делают при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определённой массы, которую устанавливают по линейке молекулярных масс.

Для документирования полученных результатов гелевые пластины фотографируют.

2.7 Практическое занятие № 7 (2 часа).

Тема: «Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК».

2.7.1 Задание для работы:

1. Ознакомиться с принципом метода секвенирования на платформе Illumina MiSeq

2.7.2 Краткое описание проводимого занятия:

Персональная система Illumina MiSeq – предназначена для осуществления высокопроизводительного секвенирования большого количества нуклеотидных последовательностей геномов живых организмов (секвенирования ДНК). Таким образом, отпадает необходимость в покупке дополнительного оборудования, что гарантирует значительную экономию в средствах и занимаемых площадях.

MiSeq – секвенатор нового поколения. В одном компактном инструменте все необходимое оборудование для осуществления анализа последовательности ДНК: модуль для генерации кластеров, модуль для парноконцевого секвенирования и модуль для анализа и хранения полученных данных.

Работа на системе MiSeq осуществляется при использовании реагентов TruSeq (Illumina), что делает данную платформу идеальным инструментом для осуществления быстрого и экономного генетического анализа до 96 образцов в мультиплексе для широкого круга различных применений. Анализ данных занимает всего 8 часов, а процесс характеризуется исключительной простотой и точностью. За один запуск генерируется и обрабатывается более 1 миллиарда нуклеотидов.

Области применения:

Система высокопроизводительного секвенирования Illumina MiSeq позволяет с легкостью осуществлять стандартные эксперименты, такие как ресиквенс ампликонов, перепроверка клонов, анализ небольших геномов и целевое секвенирование участков генома с гораздо большей производительностью и намного быстрее и дешевле, чем при использовании способа секвенирования методом капиллярного электрофореза и пиросеквенирования.

Вы получаете доступ к таким мощным методам секвенирования нового поколения (NSG Next-Generation Sequencing), как высоко-мультиплексное секвенирование ПЦР-ампликонов, узконаправленный ресиквенс, ChIP-Seq (хроматиниммунопреципитация), секвенирование малых РНК (small RNA), анализ рисунков метилирования и многое другое.

Появилась возможность анализа геномных локусов при трансплантации органов и тканей, HLA-типирование, анализа генетическиassoциированных болезней и предрасположенности, изучение мультифакторных заболеваний и причин возникновения рака, анализ полных геномов бактерий и вирусов, метагеномов.

Платформа MiSeq, созданная на основе проверенных технологий Illumina, уже сейчас позволяет секвенировать более 36 000 генов за один запуск с помощью Custom Amplicon панелей, конструируемых специалистами Illumina по заказу клиента. В наличии есть и уже готовые панели, например, для исследования онкомаркеров (400 онкогенов в одной пробе при возможном мультиплексе в 96 проб).

Принцип работы:

Система высокопроизводительного секвенирования Illumina MiSeq основана на инновационном методе параллельного секвенирования миллионов фрагментов ДНК с

использованием технологии секвенирования на молекулярных кластерах при помощи флуоресцентно меченых нуклеотидных зондов.

Мало того, система MiSeq оснащена революционной системой флюидики, которая позволяет сократить время самого процесса секвенирования в 5 раз. Сначала геномная ДНК фрагментируется до размеров 200–1000 п.н. Полученные фрагменты представляют собой основу для создания библиотек случайных фрагментов, что достигается путем последовательных ферментативных реакций, «пришивки» олигонуклеотидных адаптеров с последующей амплификацией.

Затем последовательности, кластеризованные на чипе в результате ПЦР, детектируются в проточной ячейке системы высокопроизводительного секвенирования Illumina MiSeq при добавлении флуоресцентно-меченых оснований.

Добавление оснований и детекция флюорисценции происходит автоматически, с использованием реагентных наборов (приобретаются отдельно).

Полученные данные флюорисценции, получаемые в течение нескольких часов (не дней) анализируются внешним контролирующим компьютером и управляющим программным обеспечением, и переводятся в представление коротких последовательностей ДНК.

2.8 Практическое занятие № 8 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 2 модуль».

2.8.1 Задание для работы:

1. Систематизировать и проверить знания, полученные при освоении раздела «Общие принципы и методы генетической инженерии».

2.8.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. На чем основан принцип фенотипической селекции гибридных клонов?
2. Какими способами получают меченые ДНК-зонды?
3. По какой схеме проводят гибридологический скрининг трансформантов?
4. Для чего применяется функциональная комплементация мутаций генома клетки?
5. Принцип метода радиоиммунного анализа белков.
6. Назовите принципы метода ПЦР.
7. Назовите основные этапы ПЦР.
8. Что такое праймер?
9. Как проводят визуализация и учет результатов ПЦР?
10. Назовите области применения ПЦР.

2.9 Практическое занятие № 9 (2 часа).

Тема: «Скрининг геномных библиотек».

2.9.1 Задание для работы:

Изучить методы скрининга геномных библиотек.

1. Скрининг с помощью гибридизации.
2. Иммунологический скрининг.
3. Скрининг по активности белка.

2.9.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Скрининг с помощью гибридизации

Ученые, раздробив с помощью определённой рестриктазы суммарную ДНК конкретного организма на фрагменты, добавляют к ним вектор, обработанный той же

рестриктазой, и всю эту смесь используют для трансформации бактерий. Обычно в каждую рекомбинантную клетку имеет шанс попасть одна молекула ДНК, представляющая собой гибрид вектора и какого-нибудь одного из многих фрагментов присутствовавших в смеси. Клетка, получившая гибридную ДНК, размножившись, образует клон. Набор клонов бактерий содержащих различные рекомбинантные молекулы, включившие все возможные фрагменты ДНК определённого организма и составляют геномную библиотеку (банк генов). Данная техника позволила получить набор клонов бактерий или гибридных фагов различающихся по включённым фрагментам ДНК. Уже в 1974 г. Д. Хогнес с сотрудниками создали геномную библиотеку дрозофилы в клетках *E. coli*. Через два года американцы Л. Кларк и Д. Карбон стали владельцами библиотеки всех генов самой бактерии *E. coli*. Вслед за этим были получены геномные библиотеки ряда других организмов, включая человека.

На следующем этапе возникает другой вопрос: в какую из тысяч трансформированных клеток *E. coli* попал интересующий нас ген? Для решения этой задачи в настоящее время применяются так называемые кДНКовые зонды, которые представляют собой радиоактивно меченную ДНК характерную для конкретного гена.

Но сначала учёные научились выделять в достаточных количествах мРНК отдельных генов. Практически все мРНК эукариот на своих 3'-концах содержат последовательность poly(A). Эта поли(A) последовательность предоставляет прекрасную возможность для синтеза ДНК комплементарной мРНК. Если смешать с мРНК короткие oligo(dT), они будут гибридизоваться с poly(A) и послужат затравками для работы фермента обратная транскриптаза. Этот фермент открытый Тёминым и Балтимором использует РНК как матрицу для синтеза комплементарной цепи ДНК или кДНК (cDNA). Необходимо отметить, что она соответствует только структурной части гена, которая кодирует его белковый продукт, а регуляторные части гена в кДНК не представлены.

Полученная с помощью обратной транскриптазы двухцепочечная молекула кДНК встраивается затем в плазмиду либо с помощью «хвостов» достроенных концевой трансферазой, либо путём пришивания к концам кДНК искусственных сайтов рестрикции. Эти сайты, так называемые линкеры представляют собой последовательности, состоящие из 8-10 нуклеотидных пар химически синтезированных олигонуклеотидов. Линкеры пришивают к двухцепочечной кДНК с помощью ДНК-лигазы, а затем расщепляют их рестриктазой, и кДНК, содержащую теперь липкие концы встраивают в плазмиду разрезанную той же рестриктазой. Затем, полученную рекомбинантную плазмиду, содержащую кДНК вводят в клетки соответствующего штамма *E. coli*, где она размножается.

В настоящее время разработаны специальные методы скрининга (поиска), позволяющие с помощью кДНК используемых в качестве зондов обнаруживать нужные гены, хранящиеся в геномных библиотеках. Чаще всего геномная библиотека хранится в *E. coli* в виде набора бактериальных колоний, каждая из которых содержит различный фрагмент геномной ДНК. Если в чашках Петри к поверхности плотной среды, на которой посеяны различные колонии *E. coli*, хранящие геномную библиотеку приложить фильтр из нитроцеллюлозы каждая колония разделится – часть останется на чашке, а часть отпечатается на фильтре. Под действием раствора щелочи бактерии на фильтре лизируются, а ДНК распадается на однонитчатые цепочки. После того как фильтр прогреют при высокой температуре в вакуумной печи, цепи ДНК прочно свяжутся с нитроцеллюлозой. Затем на фильтр наносят радиоактивно меченую кДНК интересующего гена. Меченный кДНК-зонд будет комплементарно гибридизоваться только с фрагментом геномной ДНК содержащим искомый ген. Если на нитроцеллюлозный фильтр положить рентгеновскую пленку, то местоположение метки можно определить по участкам затемнения. Этот метод называемый ДНК-ДНК гибридизацией даёт возможность узнать в какой колонии бактерий находится наш ген. Колонии отбирают, выделяют из неё ДНК и анализируют.

2. Иммунохроматография

В отсутствие ДНК-зонда для скрининга гибридных молекул ДНК можно использовать другие методы. Например, если клонированный ген экспрессируется, то его продукт – весь белок или его часть – можно обнаружить иммунологическими методами. Технически эта процедура имеет много общего с гибридизацией. Все клеточные линии (клоны) 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 (антителом), все несвязавшиеся антитела удаляют, а фильтр помещают в раствор вторых антител, специфичных в отношении первых антител. Во многих тест-системах используют коньюгаты вторых антител с ферментом, например с 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 (слайд).

Те клетки на чашке, которые соответствуют окрашенным пятнам на фильтре, содержат или полноразмерный ген, или достаточно протяженный его участок, обеспечивающий синтез белкового продукта, узнаваемого первыми антителами. По окончании иммунохроматографического скрининга необходимо определить, какой именно из отобранных клонов содержит полноразмерный ген.

3. Скрининг по активности белка

Метод гибридизации ДНК и иммунологические методы позволяют идентифицировать многие гены и их продукты. Если при этом искомый ген кодирует фермент, не синтезируемый клеткой-хозяином, то для обнаружения клонов, содержащих данный ген, можно использовать метод идентификации на чашках. Так были идентифицированы гены α -амилазы, эндоглюканазы и β -галактозидазы различных организмов. Для этого клоны *E. coli* высевали на чашках с питательной средой, содержащей специфический субстрат. После окрашивания селективным красителем клетки, способные утилизировать этот субстрат, приобретали характерную окраску.

Если искомый ген кодирует продукт, без которого мутантная клетка-хозяин не может расти на минимальной среде, то библиотеку можно создать методом трансформации мутантных клеток. Клетки, выросшие в отсутствие необходимого субстрата на минимальной среде, обязательно содержат функциональный искомый ген, попавший в клетку в составе плазмидного вектора. В разных вариантах этот подход использовали для выделения многих важных генов, в частности генов, ответственных за синтез антибиотиков и образование азотфикссирующих клубеньков на корнях некоторых растений.

2.10 Практическое занятие № 10 (2 часа).

Тема: «Скрининг геномных библиотек».

2.10.1 Задание для работы:

Ознакомиться с процессом экспрессии прокариотических и эукариотических генов.

2.10.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Экспрессия прокариотических генов

Эффективность экспрессии при клонировании в бактериальных клетках собственных генов или генов близкородственных организмов зависит главным образом от силы выбранного промотора, поскольку сайт связывания рибосомы содержит, как правило, в клонируемых генах. Отличия в системах транскрипции-трансляции начинают сказываться при клонировании бактериальных генов, взятых из клеток отдаленных видов.

Было выявлено, что эти системы не универсальны и что они в определенном смысле асимметричны. К примеру, многие гены клеток *B. subtilis* выражаются в клетках *E. coli* и комплементируют ее мутации, в то время как экспрессии генов *E. coli* в *B. subtilis* не происходит. Это объясняется, во-первых, тем, что РНК-полимераза *E. coli* "узнает" промоторы многих как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а РНК-полимераза *B. subtilis* — только промоторы грамположительных бактерий. Во-вторых, взаимодействие рибосом *B. subtilis* с сайтами связывания более специфично, чем рибосом *E. coli*. Поэтому при клонировании генов *B. subtilis* с собственными промоторами в стандартных бирепликонных векторах *B. subtilis* — *E. coli* можно наблюдать их экспрессию одновременно в обоих типах клеток. В то же время для экспрессии генов *E. coli* в клетках *B. subtilis* необходимо конструировать специальные векторы, где чужеродные гены были бы соединены с промоторами и с последовательностями Шайна—Далгарно бациллярного происхождения. Например, гены триптофанового оперона *E. coli* "заговорили" в клетках *B. subtilis* после их клонирования с помощью вектора pPL608 (см. 7.16,6) путем внедрения в ген *cat*, находящийся под контролем промотора субтилисного фага SP02.

2. Экспрессия эукариотических генов

Из-за мозаичности строения большинства эукариотических генов их экспрессию в бактериальных клетках осуществляют, используя их кДНК или химически синтезированную белок-кодирующую часть. Для этой цели применяют одну из описанных схем конструирования рекДНК, которые отличаются друг от друга разными принципами "стыковки" клонируемого гена с регуляторной частью вектора. Выбор нужной схемы зависит от строения гена и от экспериментальных возможностей.

Впервые экспрессию эукариотического гена в бактериях удалось осуществить с использованием схемы "a-1". Авторы химически синтезировали ген гормона соматостатина, состоящий последовательно из iscoRI-сайна, кодона для метионина, 14 кодонов соматостатина, двух стоп-кодонов. Ген был встроен в модифицированную плазмиду pBR322 через сайты EcoRI и ВатШ гена lacZ. В результате экспрессии гена образовался гибридный белок, содержащий из 246 аминокислот, из которых 70 на С-конце являются несущественными для жизнеспособности фага. Для конструирования подходящего вектора 177-й кодон GAG гена K был заменен сайт-направленным мутагенезом на стоп-кодон TAG. Затем после него были последовательно вставлены последовательности, кодирующие Sfil-сайт, инициатор трансляции SD-ATG, пептидный линкер (Рго-Тпг)10 из десяти чередующихся остатков пролина и треонина, а также сайт поликлонирования HindIU-BamHI-Sacl-EcoRI. Пептидный линкер предназначался для соединения гибкой связью двух доменов гибридного белка.

2.11 Практическое занятие № 11 (2 часа).

Тема: «Генетическая инженерия белков».

2.11.1 Задание для работы:

1. Ознакомиться с историей развития белковой инженерии
2. Изучить основные стратегии белковой инженерии

2.11.2 Краткое описание проводимого занятия:

Белковая инженерия (англ. Protein engineering) -- раздел биотехнологии, который занимается разработкой полезных или ценных белков. Это относительно новая дисциплина, которая направлена на исследование фолдинга белков и принципов модификации и создания белков.

Существуют две основные стратегии для белковой инженерии: направленная модификация белка и направленная эволюция. Эти методы не являются взаимоисключающими; исследователи часто применяют оба. В будущем, более детальное знание структуры и функции белков, а также достижения в области высоких технологий, может значительно расширить возможности белковой инженерии. В итоге, даже неприродные аминокислоты могут быть включены благодаря новому методу, который позволяет включать новые аминокислоты в генетический код.

Белковая инженерия зародилась на стыке физики и химии белка и генетической инженерии. Она решает задачу создания модифицированных или гибридных молекул белков с заданными характеристиками. Естественным путем реализации такой задачи является предсказание структуры гена, кодирующего измененный белок, осуществление его синтеза, клонирования и экспрессии в реципиентных клетках.

Первая контролируемая модификация белка была проведена в середине 60-х годов Кошландом и Бендером. Для замены гидроксильной группы на сульфогидрильную в активном центре протеазы -- субтилизина они применили метод химической модификации. Однако, как выяснилось, такой тиолсубтилизин не сохраняет протеазную активность.

Белок в химическом отношении представляет собой однотипную молекулу, которая является полiamинокислотной цепочкой или полимером. Составлен он из аминокислотных последовательностей 20 типов. Узнав строение белков, люди задались вопросом: можно ли спроектировать абсолютно новые аминокислотные последовательности, чтобы они выполняли нужные человеку функции гораздо лучше, чем обычные белки? Для данной идеи подошло название Белковая инженерия.

О такой инженерии стали задумываться ещё в 50-е годы XX столетия. Случилось это сразу же после расшифровки первых белковых аминокислотных последовательностей. Во многих лабораториях мира начали делать попытки дублировать природу и синтезировать химическим путём заданные абсолютно произвольно полiamинокислотные последовательности.

Больше всех в этом преуспел химик Б. Меррифилд. Этому американцу удалось разработать чрезвычайно эффективный метод синтеза полiamинокислотных цепей. За это Меррифилду в 1984 году присудили Нобелевскую премию по химии.



Рисунок 1. Схема функционирования белковой инженерии

Американец начал синтезировать короткие пептиды, включая гормоны. При этом построил автомат - «химического робота» - в задачу которого входило производить искусственные белки. Робот вызвал сенсацию в научных кругах. Однако скоро выяснилось, что его продукция не может конкурировать с тем, что производит природа.

Робот не мог в точности воспроизводить аминокислотные последовательности, то есть ошибался. Он синтезировал одну цепь с одной последовательностью, а другую уже с

немного изменённой. В клетке же все молекулы одного белка идеально похожи друг на друга, то есть их последовательности абсолютно одинаковые.

Была и другая проблема. Даже те молекулы, которые робот синтезировал правильно, не принимали ту пространственную форму, которая необходима для функционирования фермента. Таким образом, попытка подменить природу обычными методами органической химии привела к весьма скромному успеху.

Учёным оставалось учиться у природы, выискивая нужные модификации белков. Тут дело в том, что в природе постоянно идут мутации, ведущие к изменению аминокислотных последовательностей белков. Если отобрать мутантов с необходимыми свойствами, более эффективно перерабатывающих тот или иной субстрат, то можно выделить из такого мутанта измененный фермент, благодаря которому клетка приобретает новые свойства. Но данный процесс занимает очень большой период времени.

Все изменилось тогда, когда появилась генная инженерия. Благодаря ей, стали создавать искусственные гены с любой последовательностью нуклеотидов. Эти гены встраивали в подготовленные молекулы-векторы и внедряли эти ДНК в бактерии или дрожжи. Там с искусственного гена снималась копия РНК. В результате этого вырабатывался нужный белок. Ошибки в его синтезе исключались. Главное, надо было подобрать нужную последовательность ДНК, а дальше уже ферментная система клетки сама безупречно делала своё дело. Таким образом, можно заключить, что генная инженерия открыла путь белковой инженерии в самой радикальной форме.

Стратегии белковой инженерии

Направленная модификация белка. При направленной модификации белка ученый использует детальное знание структуры и функции белка, чтобы внести нужные изменения. Как правило, этот метод имеет то преимущество, что он недорогой и технически несложный, так как техника сайт-направленного мутагенеза хорошо развита. Однако, его основным недостатком является то, что сведения о подробной структуре белка часто отсутствуют, и даже когда структура известна, может быть очень трудно предсказать влияние различных мутаций.

Программные алгоритмы модификации белка стремятся к выявлению новых аминокислотных последовательностей, которые требуют мало энергии для формирования предопределенной целевой структуры. В то время как последовательность, которая должно быть найдена, велика, наиболее сложным требованием для модификации белка является быстрый, но точный, способ для выявления и определения оптимальной последовательности, в отличие ее от аналогичных субоптимальных последовательностей.

Направленная эволюция. В направленной эволюции случайный мутагенез применяется к белку и селекция идет так, чтобы выбрать варианты, которые имеют определенные качества. Далее применяются еще раунды мутации и селекции. Этот метод имитирует естественную эволюцию и в целом позволяет получить превосходные результаты для направленной модификации.

Дополнительный метод, известный как ДНК-перетасовки, смешивает и выявляет части удачных вариантов для получения лучших результатов. Этот процесс имитирует рекомбинации, которые происходят естественно во время полового размножения. Преимуществом направленной эволюции является то, что она не требует предварительных знаний о структуре белка, да и не нужно, чтобы иметь возможность прогнозировать, какое влияние данная мутация будет иметь. В самом деле, результаты экспериментов направленной эволюции удивляют, поскольку желаемые изменения часто бывают вызваны мутациями, которые не должны были иметь такой эффект. Недостатком является то, что этот метод требует высокой пропускной способности, который не представляется возможным для всех белков. Большое количество рекомбинантной ДНК должно быть мутированным и необходимо провести скрининг продуктов на выявление желаемого качества. Огромное количество вариантов часто требует покупки

робототехники для автоматизации процесса. Кроме того, не всегда легко провести скрининг на выявление всех интересующих качеств.

2.12 Практическое занятие № 12 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 3 модуль».

2.12.1 Задание для работы:

Систематизировать и проверить знания, полученные при освоении раздела «Анализ и экспрессия генов».

2.12.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Что такое банк генов, или клонотека (геномная библиотека)?
2. Назовите принципы создания банка генов?
3. Что такое банк кДНК?
4. Чем отличается банк кДНК от банка генов?
5. С помощью каких методов проводят скрининг банка генов?
6. Как убедиться, что экспрессия клонируемого гена идет не с собственного промотора, а с векторного?
7. Какова вероятность того, что при случайной интеграции кДНК в векторный ген оба гена окажутся в одной рамке считывания?
8. Какую роль в генно-инженерной практике играет явление внутриклеточной агрегации белков?
9. Опишите возможности современных экспрессионных векторов.
10. В чем отличие экспрессии про- и эукариотических генов?

2.13 Практическое занятие № 13 (2 часа).

Тема: «Трансгенные животные».

2.13.1 Задание для работы:

Ознакомиться с методами получения трансгенных животных, изучить области применения генно-инженерных животных.

1. Получение трансгенных животных.
2. Экспрессия генов в трансгенных мышах.
3. Биотехнологическое применение трансгенных животных.

2.13.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Получение трансгенных животных

Идея генетического изменения животных путем введения генов в оплодотворенные яйцеклетки была реализована на практике в 1980-х гг. Как и во многих других новых областях науки, для упрощения обмена информацией между учеными был введен ряд новых терминов. Так, животное, чей генотип был изменен путем введения чужеродной (экзогенной) ДНК, было названо трансгенным, вводимая ДНК — трансгеном, а весь процесс — трансгенной технологией, или трансгенозом.

Эксперименты по генетической модификации многоклеточных организмов путем введения в них трансгенов требуют много времени. Тем не менее трансгеноз стал мощным инструментом для исследования молекулярных основ экспрессии генов млекопитающих и их развития, для создания модельных систем, позволяющих изучать болезни человека, а

также для генетической модификации клеток молочных желез животных с целью получения с молоком важных для медицины белков.

Перед слиянием мужского и женского пронуклеусов в зиготу в мужской пронуклеус (он больше) путем микроинъекции вводят ДНК, которую хотят внедрить в геном. Обработанные таким образом зиготы инкубируют в СО₂ инкубаторе.

Зиготы подсаживают в матку ложнобеременной (их получают скрещиванием с вазэктомированными самцами) самке мыши. Она приносит потомство, которое может оказаться трансгенным, если микроинъецированная ДНК встроилась в геном путем рекомбинации. (Всегда необходимо доказать трансгенность, для этого существуют разные пути)

Трансгенных потомков (они гетерозиготны по введенному гену) скрещивают с гомозиготными мышами и получают генерацию F1, среди которой, как и положено, половина гетерозигот.

Скрещивают между собой гетерозигот поколения F1 и получают гомозиготных по введенному гену мышей.

Для того чтобы ген не только встроился, но еще и экспрессировался, его нужно снабдить подходящими регуляторными элементами промоторами, энхансерами и т.п. Сейчас важно, что мы ввели требуемую генетическую информацию в геном животного, и она наследуется.

Введение чужеродной ДНК мышам можно осуществить разными методами:

1) с помощью вирусных векторов, инфицирующих клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиента;

2) микроинъекцией в увеличенное ядро спермия (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки;

3) введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток в предимплантированный эмбрион на ранних стадиях развития.

Использование вирусных векторов

Преимущество метода, основанного на использовании, например ретровирусных векторов, перед другими методами трансгеноза состоит в его эффективности. Однако размер вставки в этом случае ограничивается 8 т. п. н., вследствие чего трансген может оказаться лишенным прилегающих регуляторных последовательностей, необходимых для его экспрессии.

Использование ретровирусных векторов имеет и еще один большой недостаток. Хотя эти векторы создаются так, чтобы они были дефектными по репликации, геном штамма ретровируса (вируса-помощника), который необходим для получения большого количества векторной ДНК, может попасть в то же ядро, что и трансген. Несмотря на все принимаемые меры, ретро-вирусы-помощники могут реплицироваться в организме трансгенного животного, что совершенно недопустимо, если этих животных предполагается использовать в пищу или как инструмент для получения коммерческого продукта. И поскольку существуют альтернативные методы трансгеноза, ретровирусные векторы редко используются для создания трансгенных животных, имеющих коммерческую ценность.

Используются так же и др. вирусные векторы, например созданные на базе SV40 ДНК. Плазмиды у высших эукариот пока не описаны, поэтому естественными кандидатами на роль векторов у животных являются вирусы. Однако они обладают рядом недостатков, сужающих область их применения. Во-первых, в геноме большинства изученных вирусов отсутствуют несущественные для их развития области, которые можно заменить на чужеродную ДНК. Векторы, сконструированные на базе таких вирусов, дефектны. Вследствие этого для работы с ними нужны вирусы-помощники или специальные клетки-хозяева, содержащие в геноме необходимую для вируса дополнительную информацию. Во-вторых, емкость вирусных векторов ограничена, так как в вирусную капсулу может упаковаться лишь определенное количество ДНК. Это

весьма серьезное препятствие для клонирования эукариотических генов, так как многие среди них состоят из нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов. При конструировании эукариотических векторов возникает еще одно осложнение – необходимость учета посттранскрипционных событий, происходящих на уровне ядерной мРНК. Как оказалось, стабильность последней зависит от наличия в ней нитронов, что существенно ограничивает возможность клонирования кДНК в клетках животных.

Наиболее удобны в работе векторы, сконструированные на базе ДНК опухолеродных вирусов, поскольку трансформированные ими клетки заметно отличаются от нормальных клеток. Обычно такие вирусы развиваются линтически в клетках одного типа, а трансформации подвергаются другие линии клеток. Широкое распространение получили вирусные векторы, сконструированные на базе SV40 ДНК. Они применяются в качестве векторов замещения (в вирусном геноме замещаются на чужеродную ДНК поздние или ранние гены), так как рекомбинантная ДНК способна к упаковке в капсиды, если только ее размер составляет 90-100 % от величины SV40 ДНК.

Плазмидные векторы, созданные на базе SV40 ДНК.

В 1980-1982 гг. П. Берг и Р. Муллиган создали векторы плазмидного типа, которые способны реплицироваться в животных и бактериальных клетках. Они включают: 1) ori-сайт и селективный маркер из плазмида pBR322, что дает возможность работать с вектором в клетках *E. coli*; 2) ori-сайт и ранние гены вируса SV40, позволяющие проводить клонирование в животных клетках; 3) ранний или поздний транскрипционный модуль вируса SV40, способствующий экспрессии внедренного в него чужеродного гена; 4) ген, обеспечивающий селекцию трансформированных животных клеток.

Полученные впервые членочные векторы, содержащие плазмиду pBR322 и фрагмент SV40 ДНК с областью ранних генов (ori-сайт и ген A), оказались неудачными.

Членочные векторы можно переносить в клетки животных путем не только трансформации, но и слияния бактериальных протопластов с реципиентными клетками с помощью полиэтиленгликоля. По эффективности этот метод уступает лишь методу микроинъекции генов в ядра клеток.

Векторами могут служить не только вирус SV40, но и некоторые другие. К примеру, адено вирусы. Адено вирусы имеют и технические преимущества перед вирусом SV40: они накапливаются в больших количествах при культивировании в клетках HeLa и ингибируют синтез клеточных белков, что значительно облегчает процесс очистки продукта клонируемого гена и получение его в желаемых количествах.

Вирусы папилломы относятся к тому же семейству паповавирусов, что и вирус SV40. Они трансформируют клетки, инфицированные *in vitro*, а заражение клеток *in vivo* вызывает опухоли. Наиболее изучен вирус папилломы быка. Его ДНК обладает замечательной особенностью — она реплицируется и поддерживается в клетках только в виде плазмида. Более того, рекомбинантные молекулы, в которых поздние гены вируса заменены на чужеродные гены, тоже поддерживаются в виде плазмида. А это означает, что вирусы папилломы позволяют создать клеточные линии, постоянно экспрессирующие чужеродные гены любых размеров.

Метод микроинъекций ДНК

В настоящее время для создания трансгенных мышей чаще всего используют метод микроинъекций ДНК. Он заключается в следующем:

Яйцеклетки выделяют из самок-доноров, у которых была индуцирована гиперовуляция и проведено спаривание с самцами. Трансгенную конструкцию инъецируют в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. Яйцеклетки имплантируют в «суррогатную» мать, которая производит на свет трансгенных мышат - основателей трансгенных линий.

Для идентификации трансгенных животных выделяют ДНК из маленького кусочка хвоста и тестируют ее на наличие трансгена с помощью блот-гибридизации по Саузерну методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Чтобы определить, находится ли трансген

в клетках зародышевой линии животного, трансгенную мышь скрещивают с другой мышью. Далее можно проводить скрещивание потомков для получения чистых (гомозиготных) трансгенных линий.

Описанный подход кажется на первый взгляд относительно простым, однако он требует четкой координации разных этапов. Даже высококвалифицированному специалисту удается получить жизнеспособных трансгенных животных в лучшем случае лишь из 5% инокулированных яйцеклеток. Ни один из этапов эксперимента не эффективен на все 100%, поэтому для микроинъекций необходимо использовать большое число оплодотворенных яйцеклеток. Например, при получении трансгенных мышей после инъекции ДНК выживают только 66% оплодотворенных яйцеклеток; мышата развиваются примерно из 25% имплантированных яйцеклеток, причем трансгенными из них оказываются лишь 25%. Таким образом, из 1000 имплантированных оплодотворенных яйцеклеток развивается от 30 до 50 трансгенных мышат. Кроме того, введенная ДНК может интегрировать в любое место в геноме, и зачастую множество ее копий включаются в один сайт. И, наконец, не все трансгенные мышата будут обладать нужными свойствами. В организме некоторых особей трансген может не экспрессироваться из-за неподходящего окружения сайта интеграции, а в организме других число копий чужеродного гена может оказаться слишком большим, что может привести к гиперпродукции белка и нарушению нормальных физиологических процессов. И все же, несмотря на все это, метод микроинъекций используют для получения линий мышей, несущих функциональные трансгены, довольно часто.

2. Экспрессия генов в трансгенных мышах

Клетки, выделенные из мышиных эмбрионов на стадии бластоциты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоциты. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES). ES-клетки в культуре легко модифицировать методами генной инженерии без нарушения их плюрипотентности.

В настоящее время получают трансгенных мышей с помощью генетической модификации эмбриональных стволовых (ES) клеток. ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоциты мыши. Их трансфицируют вектором, несущим трансген, культивируют и идентифицируют трансфицированные клетки методом позитивно-негативной селекции или ПЦР. Популяцию трансфицированных клеток вновь культивируют и вводят в бластоциты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей.

Как правило, инъецированная ДНК при встраивании в хромосому образует блок из множества tandemно расположенных копий, при этом число единиц повтора в блоке у разных особей может варьировать от единицы до нескольких сотен. После интеграции введенной ДНК в хромосому различные генетические конструкции устойчивы и стабильно передаются потомству в соответствии с законами Менделя. Встраивание введенной ДНК в функционально значимые области генома может приводить к их дестабилизации и сопровождаться появлением мутаций, спектр которых очень разнообразен.

Таким образом, животные, полученные при введении одного и того же гена, будут различаться как по сайтам интеграции, так и по количеству копий встроенной чужеродной ДНК, а в некоторых случаях, по уровню мутабильности и по типам индуцированных мутаций. Таким образом, каждое трансгенное животное в этом смысле уникально.

Клонирование с помощью переноса ядра

Плюрипотентность можно выявить, если перенести ядро тестируемой клетки в яйцеклетку с удаленным ядром и затем исследовать способность последней к развитию и образованию жизнеспособного потомства. В нескольких лабораториях с переменным

успехом исследовали плюрипотентность линий эмбриональных клеток, клеток плода и взрослой особи. Было показано, что ядра эмбриональных клеток способны - хотя и с низкой эффективностью - обеспечивать развитие. Например, с помощью переноса ядер эмбриональных клеток крупного рогатого скота, культивированных непродолжительное время, были получены жизнеспособные особи. Всем известная овца по имени Долли была клонирована с помощью переноса ядра клетки молочной железы (вымени) взрослого животного. Так впервые была доказана плюрипотентность ядра дифференцированной взрослой клетки

Клонирование Долли из ядра дифференцированной клетки и трех других овец из ядер эмбриональных клеток удалось осуществить благодаря переносу ядер из клеток, находящихся в стадии покоя (G₀), и, возможно, особенностям эмбриогенеза этого животного. Дело в том, что в течение первых трех делений зиготы овцы, занимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК, ни один из генов не экспрессируется. Предполагается, что за это время введенная ДНК освобождается от специфичных для клетки регуляторных белков, а соответствующие гены эмбрионального развития связываются с инициаторными эмбриональными белковыми факторами из цитоплазмы яйцеклетки.

Основная проблема, которую нужно решить для того, чтобы создание трансгенных животных с помощью метода переноса ядер стало реальным, - это сохранение плюрипотентности клеток в непрерывной культуре. Если это удастся, то генетическое изменение таких клеток и создание трансгенных организмов станет почти рутинной процедурой. Однако вследствие видовых различий во времени процесса деления клетки на ранних стадиях эмбриогенеза и инициации транскрипции в этот период пока не ясно, удастся ли осуществить перенос ядра в случае каких-либо других домашних животных, кроме овец, если донорское ядро будет находиться на той же стадии, что и яйцеклетка.

Клонирование методом переноса ядра. Ядро яйцеклетки удаляют с помощью микропипетки. Культивируют эпителиальные клетки молочной железы взрослой особи и индуцируют их переход в фазу G₀. Осуществляют слияние клеток в G₀-фазе и яйцеклеток, лишенных ядра, и выращивают восстановленные яйцеклетки в культуре или в яйцеводе с наложенной лигатурой до ранних стадий эмбриогенеза, а затем имплантируют их в матку «суррогатной» матери, где и происходит дальнейшее развитие. В эксперименте, описанном Уилмутом и др. (Wilmut et al., 1997), было проведено слияние 277 яйцеклеток с удаленными ядрами с клетками молочной железы в фазе G₀; из 29 эмбрионов только один развился до жизнеспособного плода.

3. Биотехнологическое применение трансгенных животных

Генетическая модификация животных при помощи технологии рекомбинантных ДНК (трансгеноза) основана на введении клонированного гена(ов) в геном клетки, которая могла бы дать начало клеткам зародышевой линии. Скрещивая трансгенных потомков, появившихся в результате такой операции, можно получить гомозиготные линии трансгенных животных. Большинство исследований в этой области проводилось на мышах. Обычно для этого вводили клонированный ген в оплодотворенную яйцеклетку мыши с помощью микроинъекции, имплантировали ее в реципиентную самку и проверяли потомство на наличие введенного гена. Чужеродный ген можно вводить в оплодотворенную яйцеклетку мыши и с помощью ретровирусного вектора. Альтернативный подход заключается в выделении мышиных эмбриональных стволовых клеток и трансфекции их клонированным геном. При этом вводимая конструкция должна интегрироваться в геном стволовых клеток. Клетки, несущие ген-мишень в определенном хромосомном сайте, отбирают и культивируют, а затем вводят их в мышиные эмбрионы на ранних стадиях развития. Мышиные эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны (то-типотентны), т. е. могут дать начало клеткам любого типа, в том числе и клеткам зародышевой линии. Для трансгеноза используют также искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), несущие множество генов. Таким образом, были получены мыши, синтезирующие только

человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических болезней человека (например, болезни Альцгеймера).

С помощью аналогичных экспериментальных подходов были получены трансгенные коровы, овцы, свиньи, птицы и рыбы. Есть надежда, что трансгеноз позволит улучшать генотип существующих пород домашнего скота и выводить породы животных с новыми признаками. Кроме того, возможно, таких домашних животных, как коровы, овцы и козы, удастся использовать в качестве своеобразных «биологических фабрик» для получения продуктов клонированных генов, секрецируемых в молоко.

2.14 Практическое занятие № 14 (2 часа).

Тема: «Трансгенные растения».

2.14.1 Задание для работы:

Ознакомиться с методами получения трансгенных растений, изучить методы трансформации растительных клеток.

1. Векторы.
2. Трансформация растительных клеток.
3. Экспрессия чужеродных генов.

2.14.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Векторы

Грамотрицательная почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens* – фитопатоген, который в процессе своего жизненного цикла трансформирует клетки растений. Эта трансформация приводит к образованию корончатого галла-опухоли, нарушающей нормальный рост растения. Этой болезни, имеющей серьезные агрономические последствия, подвержены только двудольные растения, в частности 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 плазмида, индуцирующей развитие опухоли (tumor-inducing plasmid, Ti-плазмиды); ее несут большинство штаммов *A. tumefaciens*. Длина Т-ДНК варьирует от 12 до 24 т. п. и. в зависимости от штамма. Штаммы *A. tumefaciens*, не содержащие Ti-плазмиды, не способны индуцировать развитие корончатого галла.

Инфекционный процесс начинается с прикрепления *A. tumefaciens* к клеткам растения в месте повреждения, часто у основания стебля (у корневой шейки). Ранее предполагалось, что *A. tumefaciens* заражает именно поврежденные растения вследствие разрушения клеточной стенки и устранения физического барьера, затрудняющего проникновение бактерий в клетку. Однако сейчас считается, что все дело в специфических фенольных соединениях, ацетосирингоне и гидроксиацетосирингоне, которые выделяет поврежденное растение. Эти соединения сходны с некоторыми продуктами основного пути синтеза у растений вторичных метаболитов, таких как лигнин и флавоноиды. Ацетосирингон и гидроксиацетосирингон активируют гены вирулентности (*vir*), которые локализованы в участке Ti-плазмида длиной 35 т. п. н., находящемся за пределами Т-ДНК. Продукты *vir*-генов необходимы для транспорта и интеграции Т-ДНК в геном растительной клетки. Существуют по меньшей мере семь разных *vir*-генов.

После присоединения *A. tumefaciens*, несущей Ti-плазмиду, к растительной клетке и активации *vir*-генов Т-ДНК транспортируется в клетку, по-видимому, с помощью механизма, аналогичного механизму переноса плазмидной ДНК из донорной клетки в

реципиентную в процессе конъюгации. При этом Т-ДНК находится в одноцепочечной форме, и именно в такой форме она встраивается в хромосомную ДНК растения.

Переход Т-ДНК в одноцепочечную форму начинается с внесения в нее разрывов по обеим фланкирующим ее последовательностям. При этом правая фланкирующая последовательность оказывается на 5'-конце одноцепочечной Т-ДНК, а левая - на 3'-конце. Предполагается, что интеграция Т-ДНК в геном растения зависит от специфических последовательностей, локализованных в правой фланкирующей последовательности, которая содержит повтор длиной 25 п. н. Аналогичный повтор присутствует и в левой последовательности, однако, как показывает делеционный мутагенез, она не принимает участия в интеграции.

Большинство генов Т-ДНК активируются только после ее встраивания в геном растения. Их продукты и вызывают образование корончатого галла. Гены *iaaM* и *iaaH*, известные также как *tms1* и *tms2* соответственно, кодируют ферменты, принимающие участие в синтезе растительного гормона ауксина (индолилуксусной кислоты). И ауксин, и цитокинины регулируют рост и развитие растительной клетки, но, присутствуя в избытке, могут вызывать у растений образование опухолей, таких как корончатый галл.

Кроме генов ауксина и цитокинина, Т-ДНК каждой специфической Ti-плазмиды содержит ген, детерминирующий синтез соединения из класса опинов. Опины - это уникальные продукты конденсации амино- и кетокислот или аминокислот и сахаров. Например, при конденсации аргинина и пировиноградной кислоты образуется октопин, аргинина и α -кетоглутаральдегида - нопалин, а бициклического производного глутаминовой кислоты и сахара - агропин. Опины синтезируются в корончатом галле, а затем секретируются. Они могут использоваться как источник углерода (а иногда и как источник азота) любой *A. tumefaciens*, которая несет в Ti-плазмиде ген(ы) катаболизма соответствующего опина, локализованные вне Т-ДНК. Большинство других исследованных почвенных микроорганизмов не способны использовать опины как источник углерода. Таким образом, в процессе эволюции выработался уникальный набор механизмов, посредством которых каждый штамм *A. tumefaciens* генетически трансформирует растительные клетки в «биологические фабрики» по производству соединений углерода, использовать которые могут только сами эти бактерии.

Способностью трансформировать клетки двудольных растений обладают также определенные плазмиды *A. rhizogenes*. У растений, зараженных этими бактериями, они вызывают усиленное образование корешков и поэтому называются Ri-плазмидами (*root-inducing*). Генетические карты Ri- плазмид схожи с таковыми Ti-плазмид. Оба типа плазмид физически гомологичны в области *vir*, т.е. эволюционная близость их несомненна. Инфекционной частью Ri-плазмид также является Т-ДНК, которая содержится в хромосомах клеток корешков в нескольких копиях. Эти клетки синтезируют опины, быстро растут в культуре и из них могут регенерироваться здоровые плодовитые растения. Поэтому Ri-плазмиды как потенциальные векторы более универсальны, чем Ti-плазмиды.

Векторные системы на основе Ti-плазмид

Самый простой способ использования природной способности Ti-плазмид к генетической трансформации растений предполагает встраивание интересующей исследователя нуклеотидной последовательности в Т-ДНК, а затем использование Ti-плазмид и *A. tumefaciens* для доставки и встраивания клонированного гена (генов) в геном компетентной растительной клетки. Однако, несмотря на то что Ti-плазмиды являются эффективными природными векторами, имеется ряд серьезных ограничений на их использование в качестве векторов для клонирования.

- Фитогормоны, синтезируемые трансформированными клетками в культуре, подавляют регенерацию из этих клеток зрелого растения, поэтому при конструировании векторов на основе Ti-плазмиды гены ауксина и цитокинина должны быть удалены.

- Ген опина несуществен для трансгенных растений, но при его наличии может снижаться конечный выход биомассы, поскольку часть ресурсов расходуется на синтез опина. Следовательно, при создании векторов ген опина также должен быть удален.
- Ti-плазмиды имеют очень большой размер (от 200 до 800 т. п. н.), а для экспериментов с рекомбинантными ДНК нужны векторы меньшего размера, поэтому участки ДНК, несущественные для клонирующего вектора, должны быть удалены.
- Ti-плазмиды не реплицируются в *Escherichia coli*, что исключает работу с рекомбинантными Ti-плазмидами в этих бактериях. Следовательно, при конструировании векторов на основе Ti-плазмид необходимо ввести в них сайт инициации репликации, обеспечивающий их поддержание в *E. coli*.

Несмотря на все эти сложности, было сконструировано несколько векторов для растительных клеток. Все векторы на основе Ti-плазмид организованы сходным образом и имеют следующие элементы.

- Селективный маркерный ген, например ген неомицинфосфотрансферазы, который обеспечивает устойчивость трансформированных растительных клеток к канамицину. Поскольку этот ген (как и многие другие маркерные гены, используемые при трансформации растений) по своей природе прокариотический, необходимо поставить его под контроль растительных (эукариотических) сигналов регуляции транскрипции, в том числе промотора и сигнала терминации-полиаденилирования. Это обеспечит эффективную экспрессию гена в трансформированных растительных клетках.
- Сайт инициации репликации, который позволяет плазмиде реплицироваться в *E. coli*. Некоторые векторы содержат также и сайт инициации репликации *A. tumefaciens*.
- Правая фланкирующая последовательность Т-ДНК. Этот элемент абсолютно необходим для интеграции Т-ДНК в клеточную ДНК растений. Большинство же векторов содержат как правую, так и левую фланкирующие последовательности.
- Полилинкер (множественный сайт клонирования) для встраивания гена в участок между границами Т-ДНК.

Поскольку клонирующие векторы не содержат генов *vir*, они сами не способны обеспечивать транспорт и интеграцию Т-ДНК в клетки растения-хозяина. Чтобы решить эту проблему, было разработано два подхода. В первом случае используют бинарную векторную систему. Бинарный клонирующий вектор содержит сайты инициации репликации и для *E. coli*, и для *A. tumefaciens*, но не несет генов *vir*, т. е. это практически членочный вектор *E. coli* - *A. tumefaciens*. Все стадии клонирования проводят в *E. coli*, а затем вектор вводят в *A. tumefaciens*. Штамм-реципиент *A. tumefaciens* несет модифицированную неонкогенную («разоруженную») Ti-плазмиду; она содержит полный набор *vir*-генов, но из нее удалена часть (или вся) Т-ДНК (так что Т-ДНК не может быть транспортирована). В этой системе на неонкогенной Ti-плазмиде синтезируются продукты *vir*-генов, которые мобилизуют участок Т-ДНК бинарного клонирующего вектора. Продуцируя белки, кодируемые *vir*-генами, неонкогенная Ti-плазмода выступает в роли помощника, способствуя встраиванию Т-ДНК из бинарного клонирующего вектора в хромосомную ДНК растения. Во втором случае используют коинтегративную векторную систему. Векторная ДНК рекомбинирует в *A. tumefaciens* «разоруженной» Ti-плазмидой, Т-ДНК которой не несет опухолеродных генов, таким образом, что весь клонирующий вектор встраивается в неонкогенную Ti-плазмиду. Коинтегративный вектор и неонкогенная Ti-плазмода-помощник содержат гомологичные последовательности, которые образуют сайт для гомологичной рекомбинации *in vivo*. Обычно эти последовательности расположены в Т-ДНК. После рекомбинации клонирующий вектор становится частью неонкогенной Ti-плазмиды, которая содержит *vir*-гены, необходимые для переноса Т-ДНК в растительную хозяйственную клетку. Единственный способ поддержания клонирующего вектора в *A. tumefaciens* — это использование такой коинтегративной структуры. В данной

конфигурации генетически сконструированный участок Т-ДНК может быть перенесен в растительные клетки.

2. Трансформация растительных клеток

С помощью генной инженерии можно вводить чужеродные гены в растительные клетки в культуре с последующей регенерацией целых фертильных растений из отобранных трансформированных клеток. Естественным путем трансформация растений осуществляется с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. При поражении растения в нем начинает синтезироваться специфическое вещество. В ответ на этот химический сигнал *A. tumefaciens* прикрепляется к мембране растительной клетки, после чего происходит перенос части (Т-ДНК) бактериальной плазмида (Ti-плазмида) в ядро растительной клетки. Т-ДНК встраивается в растительный геном и экспрессируется. Т-ДНК содержит гены, кодирующие ферменты синтеза фитогормонов, которые вызывают увеличение размеров растительных клеток и их пролиферацию. Кроме того, растительные клетки начинают синтезировать опин, кодируемый Т-ДНК, который может использоваться только *A. tumefaciens*. Таким образом, в процессе эволюции сформировался механизм превращения растительной клетки в «фабрику» по производству вещества — источника углерода и азота (опина) исключительно для нужд *A. tumefaciens*.

Чтобы использовать природную способность *A. tumefaciens* проникать в растительные клетки для доставки в них клонированных генов, были созданы модифицированные Ti-плазмида. Из Т-ДНК удаляли гены фитогормонов и гены метаболизма опина и 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. В случае бинарной системы членочный вектор с клонированным в Т-ДНК геном вводят в штамм *A. tumefaciens*, несущий модифицированную плазмиду с генами, необходимыми для переноса Т-ДНК в клетку растения (*vir*-генами). Кроме того, разработана коинтегративная система, которая предполагает введение членочного вектора в *A. tumefaciens*, где он рекомбинирует с неонкогенной Ti-плазмидой, несущей *vir*-гены, с образованием одной плазмиды, в которой есть и функционирующие *vir*-гены, и Т-ДНК с клонированным геном. Участок Т-ДНК *A. tumefaciens* использовали для введения генов в различные растения. К сожалению, эта система применима не для всех видов растений. Эффективным методом доставки ДНК в различные растительные клетки является также бомбардировка микрочастицами (биолистика). Для обеспечения экспрессии чужеродных генов, введенных в растительные клетки, использовали растительные промоторы. Различные промоторы, функционирующие только в определенных растительных тканях или на определенной стадии развития растения, идентифицировали по экспрессии репортерного гена без промотора после его интеграции в хромосомную ДНК растения. Были разработаны методы встраивания чужеродных генов непосредственно в хлоропластную или митохондриальную ДНК так, чтобы кодируемый белок синтезировался прямо в этих органеллах. И, наконец, для того чтобы успокоить общественность, были разработаны методы удаления маркерных генов из трансгенных растений.

3. Экспрессия чужеродных генов

Растительные гены, как правило, точно транскрибируются и сплайсируются при гетерологичных переносах, но существуют достаточно серьезные барьеры между однодольными и двудольными растениями. Например, промотор гена *rbcS* пшеницы не функционирует в трансгенном табаке. Замена его вирусным промотором CaMV 35S обеспечила транскрипцию этого гена, но сплайсинг и полиаденилирование были некорректными. Использование кДНК вместо геномных генов устраняет только проблему сплайсинга.

Элементы гена *nos* в качестве экспрессионной кассеты были использованы уже в первом коинтегративном векторе pLGV238I, предназначенному для экспрессии клонированных генов. В нем tandemом расположены начальная часть гена *nos*

промотором и 5'-нетранслируемой последовательностью, а также его 3'-концевая часть, содержащая сайт полиаденилирования мРНК. Обе части разделяются в плазмиде единственным сайтом *BamH*I, который и был использован для внедрения в плазмиду чужеродных генов. Прежде всего в него внедрили ген *ocs*октотиновой плазмиды и перенесли в клетки *A. tumefaciens*, содержащую плазмиду pTiC58. Образовавшиеся коинтеграты индуцировали в инфицированных растениях формирование корончатых галлов, которые синтезировали нопалин и октопин. На следующем этапе с помощью того же вектора впервые удалось осуществить экспрессию чужеродного гена (*cat*) в растениях. В дальнейшем он же был использован для создания селективных маркеров для растений.

В зависимости от цели экспериментов экспрессия чужеродных генов может изучаться на уровне клеток или целого растения. Исследования на клеточном уровне часто проводят только для тестирования создаваемых векторных конструкций, когда необходимо просто определить, есть ли экспрессия клонируемого гена и какова ее эффективность. В таких случаях после трансформации клеток ограничиваются детектированием кратковременной (*transient*) экспрессии гена, не добиваясь получения стабильных трансформантов, у которых рекДНК интегрирована в клеточный геном.

На уровне целого организма при получении трансгенных растений возникает проблема тканеспецифической регуляции экспрессии клонированных генов. Известно, что тканеспецифичность экспрессии определяется набором регуляторных сайтов в предпромоторной области гена, с которыми взаимодействуют транскрипционные факторы, а также энхансерами и сайленсерами, расположеными по обе стороны гена. Такие сигналы сохраняют свою функциональность при межвидовых переносах. К примеру, ген фазеолина (запасной белок) фасоли со своим 5'-концевым участком размером около 1 т.п.н. был перенесен с помощью Ti-плазмиды в табак. В трансгенном растении этот ген экспрессировался только в семенах и только в стадии молочной спелости, т. е. точно там и тогда, где этот ген транскрибируется в самой фасоли (Sengupta-Gopalan *et al.*, 1985).