

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.09 Генная инженерия

Направление подготовки (специальность) 06.03.01 «Биология»

Профиль образовательной программы «Биоэкология»

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций.....	3
1.1 Лекция № 1 Введение в генную инженерию.....	3
1.2 Лекция № 2 Векторы клонирования в бактериях.....	6
1.3 Лекция № 3 Векторы клонирования в бактериях.....	8
1.4 Лекция № 4 Методы конструирования гибридных молекул ДНК in vitro.....	12
1.5 Лекция № 5 Клонирование и синтез молекул ДНК.....	15
1.6 Лекция № 6 Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК	18
1.7 Лекция № 7 Создание геномных библиотек.....	22
1.8 Лекция № 8 Экспрессия чужеродных ДНК в бактериальных клетках.....	25
1.9 Лекция № 9 Генетическая инженерия белков.....	29
1.10 Лекция № 10 Генно-инженерные организмы в деятельности человека.....	32
1.11 Лекция № 11 Генетическая инженерия дрожжей.....	35
1.12 Лекция № 12 Контроль применения биотехнологических методов.....	37
2. Методические указания по проведению практических занятий.....	42
2.1 Практическое занятие № ПЗ-1 Ферменты генной инженерии.....	42
2.2 Практическое занятие № ПЗ-2 Ферменты генной инженерии.....	44
2.3 Практическое занятие № ПЗ-3 Итоговое занятие за 1 модуль.....	45
2.4 Практическое занятие № ПЗ-4 Методы отбора гибридных клонов.....	45
2.5 Практическое занятие № ПЗ-5 Полимеразная цепная реакция.....	49
2.6 Практическое занятие № ПЗ-6 Итоговое занятие за 2 модуль.....	55
2.7 Практическое занятие № ПЗ-7 Скрининг геномных библиотек.....	55
2.8 Практическое занятие № ПЗ-8 Экспрессия про- и эукариотических генов.....	57
2.9 Практическое занятие № ПЗ-9 Итоговое занятие за 3 модуль.....	58
2.10 Практическое занятие № ПЗ-10 Трансгенные животные.....	59
2.11 Практическое занятие № ПЗ-11 Трансгенные растения.....	63

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Введение в генную инженерию».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Генная инженерия как наука, методы.
2. История генетической инженерии.
3. Возможности генной инженерии.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Генная инженерия как наука, методы.

Генетическая инженерия – конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе – создание искусственных генетических программ (Баев А. А.).

Генетическую инженерию подразделяют на *генную*, *геномную* и *хромосомную*. Сущность генной инженерии состоит в целенаправленном использовании перестроек естественного генома, осуществляемых *in vitro*, для изменения генетических характеристик биообъектов.

Геномная инженерия заключается в целенаправленной перестройке генома вирусов, прокариот и эукариот, вплоть до создания новых видов. При этом типе возможно получение половых или соматических гибридов.

В случае переноса изолированных хромосом от клетки-донора одного организма в клетку-реципиент говорят о хромосомной инженерии.

Однако такое подразделение генетической инженерии достаточно условно, поскольку, в конечном счете, результаты манипуляций с рекомбинантными ДНК (рДНК) получают на клеточных культурах.

Цель генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека.

Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью полимеразной цепной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

Конечный продукт генетических манипуляций (рекомбинантные молекулы ДНК) состоит из двух компонентов: изучаемого полинуклеотидного фрагмента (обычно структурного гена) и вектора. В последовательности нуклеотидов гена закодирована последовательность аминокислот белка. Ген может быть выделен из природного источника с помощью рестриктаз, получен специальным методом посредством фермента обратной транскриптазы или же синтезирован химически. Однако структурные гены как таковые лишены регуляторных генетических элементов и сами по себе не могут

функционировать в клетке-хозяине, т.е. умножаться в числе и обеспечивать синтез белка. Функциональный компонент рекомбинантной ДНК – вектор, т.е. специально сконструированная молекула, содержащая регуляторные участки, а именно: начало репликации ДНК, генетические маркеры, необходимые для селекции, и другие элементы, нужные для сложного процесса реализации генетической информации. Большинство векторов получено на основе плазмид (небольших кольцевых молекул ДНК бактерий), фагов лямбда и M13, вирусов SV40 и полиомы (для животных клеток), плазмиды Ti из *Agrobacterium tumefaciens* (для клеток растений), двухмикронной плазмиды пекарских дрожжей. Самый распространенный бактериальный вектор – плаزمида pBR 322 (мол. м. $2,6 \cdot 10^6$, маркеры – резистентность к антибиотикам ампициллину и тетрациклину, единичные места расщепления для рестриктаз Eco RI, Bam HI, Hind III, Pst I, Sal I). Структурный ген, вырезанный из какой-либо ДНК с помощью определенной рестриктазы или комбинации рестриктаз, соединяют действием лигазы с выбранным вектором и получают кольцевидную рекомбинантную молекулу ДНК. Ее вводят в клетку-хозяина: это бактерии (кишечная, сенная палочка и др.), дрожжевые, животные или растительные клетки. Затем проводят селекцию – отбор клеток, содержащих рекомбинантные ДНК, и получают клон, т.е. клетки, однородные по своим генетическим и иным характеристикам. Размножением такого клона можно получить нужное количество однородного генетического материала и, при желании, конечного продукта-белка.

2. История генетической инженерии.

Генная инженерия появилась благодаря работам многих исследователей в разных отраслях биохимии и молекулярной генетики. На протяжении многих лет главным классом макромолекул считали белки. Существовало даже предположение, что гены имеют белковую природу. Лишь в 1944 году Эйвери, Маклеод и Маккарти показали, что носителем наследственной информации является ДНК. С этого времени начинается интенсивное изучение нуклеиновых кислот. Спустя десятилетие, в 1953 году Джеймс Уотсон и Френсис Крик создали двуспиральную модель ДНК. Именно этот год принято считать годом рождения молекулярной биологии.

На рубеже 50 - 60-х годов были выяснены свойства генетического кода, а к концу 60-х годов его универсальность была подтверждена экспериментально. Шло интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой стали *E. coli*, ее вирусы и плазмиды. Были разработаны методы выделения высокоочищенных препаратов неповрежденных молекул ДНК, плазмид и вирусов. ДНК вирусов и плазмид вводили в клетки в биологически активной форме, обеспечивая ее репликацию и экспрессию соответствующих генов. В 70-х годах был открыт ряд ферментов, катализирующих реакции превращения ДНК. Особая роль в развитии методов генной инженерии принадлежит рестриктазам и ДНК-лигазам.

1) рестриктирующие эндонуклеазы (рестриктазы) – они рассекают молекулы ДНК в пределах строго определенных нуклеотидных последовательностей; их описано ок. 400, наиболее употребительны рестриктазы Eco RI, Hind III, Bam HI, Pst I, Sal I и др.

2) ДНК-лигазы (прежде всего фермент кишечной палочки, индуцируемый бактериофагом T4), которые сшивают двухцепочечные фрагменты ДНК, восстанавливая межнуклеотидные связи в местах единичных разрывов. С помощью этих ферментов получают удобные для генетической операций фрагменты ДНК и соединяют их в единое целое. Для такого объединения безразлично происхождение ДНК (химически у всех существ она одинакова), между тем в природе объединению генетической информации неродственных существ препятствуют различные межвидовые барьеры.

Историю развития генетической инженерии можно условно разделить на три этапа.

1. Первый этап связан с доказательством принципиальной возможности получения рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Эти работы касаются получения гибридов между различными плазмидами. Была доказана возможность создания

рекомбинантных молекул с использованием исходных молекул ДНК из различных видов и штаммов бактерий, их жизнеспособность, стабильность и функционирование.

2. Второй этап связан с началом работ по получению рекомбинантных молекул ДНК между хромосомными генами прокариот и различными плазмидами, доказательством их стабильности и жизнеспособности.
3. Третий этап – начало работ по включению в векторные молекулы ДНК (ДНК, используемые для переноса генов и способные встраиваться в генетический аппарат клетки-реципиента) генов эукариот, главным образом, животных.

Формально датой рождения генетической инженерии следует считать 1972 год, когда в Стенфордском университете П. Берг, С. Коэн, Х. Бойер с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага и *E. coli*.

3. Возможности генной инженерии.

Родившись в начале 70-х годов, она добилась сегодня больших успехов. Генная инженерия стала основой развития молекулярной генетики. Благодаря возможности клонирования чужеродных генов в бактериях, животных и растительных клетках (выделены клоны многих генов: рРНК, гистонов, интерферона и гормонов человека и животных и т. п.), Генная инженерия имеет прикладное значение. Она составляет, наряду с клеточной инженерией, основу современной биотехнологии. С помощью методов генной инженерии получены многие новые, иногда неожиданные данные, открыто, например, мозаичное строение генов у высших организмов, изучены транспозоны бактерий и мобильные диспергированные элементы высших организмов, открыты онкогены и т.п. 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. В настоящее время кишечная палочка (*E. coli*) стала поставщиком таких важных гормонов как инсулин и соматотропин. Ранее инсулин получали из клеток поджелудочной железы животных, поэтому стоимость его была очень высока. Для получения 100 г кристаллического инсулина требуется 800-1000 кг поджелудочной железы, а одна железа коровы весит 200 - 250 грамм. Это делало инсулин дорогим и труднодоступным для широкого круга диабетиков. В 1978 году исследователи из компании "Генентек" впервые получили инсулин в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот. При соединении их дисульфидными связями образуется нативный двухцепочечный инсулин. Было показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и других примесей, не дает побочных эффектов, как инсулин животных, а по биологической активности от него не отличается. Впоследствии в клетках *E. coli* был осуществлен синтез проинсулина, для чего на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы синтезировали ее ДНК-копию. После очистки полученного проинсулина его расщепили и получили нативный инсулин, при этом этапы экстракции и выделения гормона были сведены к минимуму. Из 1000 литров культуральной жидкости можно получать до 200 граммов гормона, что эквивалентно количеству инсулина, выделяемого из 1600 кг поджелудочной железы свиньи или коровы.

Соматотропин – гормон роста человека, секретируемый гипофизом. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости. Если вводить соматотропин в дозах 10 мг на 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. Компания

"Genentec" в 1980 году разработала технологию производства соматотропина с помощью бактерий, который был лишен перечисленных недостатков. В 1982 году гормон роста человека был получен в культуре *E. coli* и животных клеток в институте Пастера во Франции, а с 1984 года начато промышленное производство инсулина и в СССР. При производстве интерферона используют как *E. coli*, *S. cerevisiae* (дрожжи), так и культуру фибробластов или трансформированных лейкоцитов. Аналогичными методами получают также безопасные и дешевые вакцины.

На технологии рекомбинантных ДНК основано получение высокоспецифичных ДНК-зондов, с помощью которых изучают экспрессию генов в тканях, локализацию генов в хромосомах, выявляют гены, обладающие родственными функциями (например, у человека и курицы). ДНК-зонды также используются в диагностике различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК сделала возможным нетрадиционный подход "белок-ген", получивший название "обратная генетика". При таком подходе из клетки выделяют белок, клонируют ген этого белка, модифицируют его, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Полученный ген вводят в клетку. Если он экспрессируется, несущая его клетка и ее потомки будут синтезировать измененный белок. Таким образом, можно исправлять дефектные гены и лечить наследственные заболевания.

Если гибридную ДНК ввести в оплодотворенную яйцеклетку, могут быть получены трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его потомкам. Генетическая трансформация животных позволяет установить роль отдельных генов и их белковых продуктов как в регуляции активности других генов, так и при различных патологических процессах. С помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками. Например, микроинъекция рекомбинантной ДНК, содержащей ген соматотропина быка в зиготу кролика позволила получить трансгенное животное с гиперпродукцией этого гормона. Полученные животные обладали ярко выраженной акромегалией.

1.2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Векторы клонирования в бактериях».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Понятие вектора. Требования, предъявляемые векторным молекулам.
2. Клонирование плазмидных векторов.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие вектора. Требования, предъявляемые векторным молекулам.

Вектором (от лат. *vector* – переносчик, носитель) в генетической инженерии называют молекулу ДНК, способную самостоятельно реплицироваться, включать чужеродную ДНК, переносить ее в реципиентные клетки и стабильно там поддерживать. Векторы используют для создания *in vitro* молекул рекДНК и для последующего введения их в клетки, в результате чего индивидуальные молекулы из исходной смеси рекДНК разделяются по отдельным клонам и в составе клонов умножают (клонировать) число чужеродных генов. В этом смысле любой вектор является *клонированием*. Векторы также значительно облегчают процедуры по выделению клонированной ДНК из клеток. Подлежащий переносу генетический материал вводится в состав вектора с помощью различных ферментов (рестриктазы, ДНК-лигазы). Первые векторы были созданы для работы с клетками кишечной палочки (Lobban, Kaiser, 1973; Cohen et al., 1973). Наиболее подходящие кандидаты на роль векторов – естественные репликоны небольших размеров:

ДНК плазмид и вирусов (в том числе и фагов), но непосредственно в этом качестве их используют редко. Обычно их предварительно модифицируют или комбинируют их части для того, чтобы они отвечали определенным требованиям.

Вектор должен обладать следующими основными свойствами:

- иметь ограниченное (предпочтительно одно) число мест расщепления определенной рестриктазой;
- содержать генетический маркер, который может быть использован для отбора клонов, несущих гибридные ДНК, после введения в чувствительные клетки смеси молекул ДНК, полученных в процессе рекомбинации *in vitro*;
- не должен терять репликативные функции при встройке экзогенного фрагмента ДНК

Частным случаем клонирующих векторов являются *экспрессирующие векторы*. Это молекулярные векторы, которые наряду с амплификацией обеспечивают правильную и эффективную экспрессию чужеродных генов в клетках-реципиентах.

В ряде случаев молекулярные векторы могут обеспечивать интеграцию чужеродной ДНК в геном клетки или вируса. Такие молекулы ДНК называют *интегративными векторами*.

Челночные векторы – векторы, способные реплицироваться в клетках разных видов бактерий.

Векторные молекулы играют важнейшую роль на этапе клонирования *in vivo* изучаемых последовательностей ДНК. Использование клонирующих векторов позволяет получать необходимый фрагмент ДНК в индивидуальном состоянии. Это подняло на качественно новый уровень исследования структурно-функциональной организации геномов как прокариотических, так и эукариотических организмов. Разработка и совершенствование экспрессирующих векторов позволяет все с большей определенностью создавать штаммы-суперпродуценты чужеродных белков.

2. Клонирование плазмидных векторов.

Плазмиды – это внехромосомные генетические элементы, выявляемые в бактериях различных семейств. Они представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК размером от 2 тпн до более чем 300 тпн. Плазмиды могут нести гены, которые обуславливают фенотипическое отличие содержащих их клеток от бесплазмидных клеток. Культура, несущая плазмиду, обозначается следующим образом: за наименованием бактериального штамма указывается в квадратных скобках название плазмиды, например, *E. coli* HB101[Co1E1].

Чтобы быть удобным клонирующим вектором, плаزمида должна обладать рядом свойств:

- нести селективируемый маркер (или несколько маркеров), что дает возможность легко идентифицировать клоны трансформантов и селективно поддерживать плазмиду в популяции бактериальных клеток;
- содержать предпочтительно единичные места расщепления одной или несколькими рестриктазами в районах плазмиды, несущественных для ее репликации;
- быть относительно небольшой и чаще всего иметь ослабленный контроль репликации, так как это упрощает процедуру выделения плазмидной ДНК и позволяет иметь в клетке высокую дозу клонированного гена;
- стабильно поддерживаться в клетках-реципиентах.

Плазмида pSC101 – первая векторная плазмиды; она была выделена в 1973 г. в лаборатории С. Коэна. Плазмиды имеет размер 9,1 тпн, находится под строгим контролем репликации, детерминирует устойчивость к тетрациклину (Tc^r) 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*.

Плазмида pSC101 как клонирующий вектор имеет ряд недостатков. Во-первых, не удается фенотипически отличить клоны трансформантов, содержащих исходную или гибридные плазмиды; во-вторых, при встройке по местам действия рестриктаз нарушается ген *tet*; в-третьих, pSC101 имеет строгий контроль репликации и находится в клетке в количестве примерно шесть копий на бактериальную хромосому. Из-за перечисленных недостатков векторная плазмида pSC101 активно использовалась для клонирования фрагментов ДНК лишь в начальный период развития генетической инженерии, до появления векторов на основе других плазмид.

Плазмида ColE1 оказалась более удобной для клонирования. С 1974 г. ее начали использовать в лаборатории Х. Бойера в качестве вектора. Она имеет ослабленный контроль репликации, и при обычных условиях роста в клетке находится 20-30 копий плазмиды. Относительно небольшие размеры (6,6 тпн) и наличие единственного места действия рестриктазы *EcoRI* обусловили широкое использование плазмиды ColE1 в качестве клонирующего вектора до появления более удобных векторов.

Плазмида pBR322 – удобный клонирующий вектор. Она имеет два селективных маркера Ap^r и Tc^r . Ни один из этих генов не является транспозоном и не может быть перенесен *in vivo* в другую плазмиду. pBR322 имеет уникальные участки расщепления рестриктазами *VspI*, *PstI*, *PvuI* и *ScaI*, расположенные в гене β-лактамазы, и *HindIII*, *BamHI* и *SalI*, локализованные в детерминанте устойчивости к тетрациклину. После встройки фрагментов ДНК в pBR322 по указанным местам расщепления рестриктазами отбор гибридных клонов осуществляется в результате надежной селекции на средах с антибиотиками.

Плазмида pBR322 оказалась настолько хорошим клонирующим вектором, что в течение ряда лет она использовалась в подавляющем большинстве генно-инженерных работ, в которых применялись плазмидные векторы. Кроме того, на основе плазмиды pBR322 получены другие векторные производные.

Векторы меньшего размера имеют много преимуществ. Однако уменьшение длины векторных молекул приводит к снижению числа сайтов, используемых для клонирования генов. С целью устранения этого дефекта в плазмиды вводят синтетические полилинкеры – фрагменты ДНК, содержащие тесно сцепленные сайты узнавания нескольких рестриктаз. Примером может служить вектор plink322, полученный путем делетирования в плазмиде pBR322 участка ДНК между сайтами *EcoRI* и *SalI* и введения в это место олигонуклеотида с 8 сайтами рестрикции.

1.3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Векторы клонирования в бактериях».

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Фаговые векторы.
2. Гибридные векторы.
3. Сравнительная характеристика векторов.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Фаговые векторы.

К моменту появления методологии генетической инженерии колифаг λ по сравнению с другими вирусами бактерий был наиболее полно изучен генетически и молекулярно-биологически. Это и обусловило то, что наряду с плазмидными векторами уже в 1974 г. появилась серия клонирующих векторов на основе фага λ. Другие фаговые векторы конструируют на базе ДНК фагов с таким расчетом, чтобы в них сохранилась информация, которая обеспечивает сборку *in vivo* фаговых частиц. Для клонирования в клетках *E. coli* также разработаны векторы на базе ДНК фагов X и M13.

Фаговые векторы подразделяются на *векторы внедрения* и *векторы замещения*. Первые несут один сайт узнавания для избранной рестриктазы, поэтому у них, как и у плазмидных векторов, длина рекДНК равна сумме длин вектора и клонируемого фрагмента. Векторы замещения имеют два сайта узнавания для используемой рестриктазы, поэтому в такие векторы клонируемые фрагменты ДНК вставляют вместо участков, ограниченных данными сайтами.

Емкость фагового вектора, т. е. теоретически наибольший размер чужДНК, вставляемой в него, вычисляется как разность между максимальной величиной молекулы ДНК, упаковываемой в головку фага, и минимальной величиной генома фага, необходимой для его развития. Реальная емкость вектора определяется не только его размером, но и минимальной величиной ДНК, которая может упаковаться в фаговую головку. Поэтому вводятся понятия *максимальной* и *минимальной емкости фаговых векторов*. Под этими понятиями подразумевается максимальное и минимальное количество ДНК, которое можно клонировать в векторе. Эти величины определяются как разность, соответственно, между максимальным или минимальным размером упаковываемой ДНК и суммарным размером вектора.

Векторы на основе фага λ . В зрелых вирионах фага λ ДНК находится в виде двухцепочечной линейной молекулы. На концах молекулы ДНК имеются взаимокomплементарные GC-обогащенные одноцепочечные концы длиной 12 нуклеотидов (обозначаются как *cosR* и *cosL*). Сразу после попадания в клетку фаговая ДНК циклизуется по этим концам и функционирует в клетке в кольцевой форме. Район ковалентно зашитых *cosR* и *cosL* называется *cos-сайтом*. Фаг λ является умеренным фагом, т. е. в зависимости от условий может развиваться в клетке либо по литическому, либо по лизогенному пути.

При литическом развитии происходит лизис клеток и образуются инфекционные фаговые частицы, при лизогенном молекула ДНК фага λ интегрируется в бактериальную хромосому преимущественно в одно место и находится в так называемом состоянии *профага*.

После того как фаговая ДНК попадает в *E. coli*, *cos*-концы соединяются с образованием кольцевой молекулы. На раннем этапе литического цикла в результате репликации кольцевой молекулы ДНК образуется линейная молекула, состоящая из нескольких сегментов длиной 50 тпн. Каждый из таких сегментов упаковывается в белковую головку, к последней присоединяется уже собранный хвостовой отросток и образуется новая фаговая частица. При упаковке молекулы ДНК длиной менее 38 тпн получается неинфекционная фаговая частица, а фрагменты длиной более 52 тпн не умещаются в головку. Сегменты длиной 50 тпн в линейной молекуле ДНК разделены *cos*-сайтами, и именно по этим сайтам разрезается молекула, когда очередной сегмент заполняет головку. Разрезание осуществляет фермент, находящийся у входа в головку.

В результате исследований по изучению сборки фага λ была разработана система упаковки молекул ДНК *in vitro* с образованием инфекционных фаговых частиц. Смешав в пробирке очищенные пустые головки, фаговую ДНК и собранные отростки, можно получить инфекционные фаговые частицы.

Фаговая ДНК имеет два *BamHI*-сайта. Клонируемую ДНК расщепляют с помощью *BamHI*, фракционируют полученные фрагменты по размеру и выделяют те из них, которые имеют размер от 15 до 20 тпн. Фаговую ДНК обрабатывают этим же ферментом. Оба препарата ДНК смешивают и обрабатывают ДНК-лигазой фага T4. Лигированная смесь содержит самые разные комбинации ДНК, в том числе 1) восстановленную ДНК фага и 2) рекомбинантные молекулы, содержащие R- и L-области фаговой ДНК и вставку клонируемой ДНК размером ~20 тпн. Рекомбинантные молекулы упаковывают в головки бактериофага *in vitro*, и после добавления хвостовых отростков получают инфекционные фаговые частицы. В инфицированных рекомбинантным фагом клетках *E. coli* могут реплицироваться и образовывать инфекционные частицы только молекулы ДНК,

составленные из R- и L-областей фаговой ДНК и клонированной вставки размером ~20 тпн.

Векторы, созданные на базе ДНК нитевидных фагов. Близкородственные нитевидные колифаги M13, f1 и fd обладают односторонней кольцевой ДНК, состоящей из 6,4 тпн, и имеют ряд свойств, позволяющих использовать их в качестве векторов. Во-первых, в их ДНК есть межгенный участок (*спейсер*), в который можно вставлять чужеродные гены. Во-вторых, размер капсида зависит от длины упаковываемой молекулы ДНК, что позволяет клонировать фрагменты ДНК размером до 15 тыс. нуклеотидов. В-третьих, они образуют фаголизаты с высокой концентрацией (до 10^{12} частиц в 1 мл) и, таким образом, позволяют получать большие количества векторной и клонируемой ДНК. Преимущества односторонних векторов являются следствием особенностей развития нитевидных фагов.

Создание подобных векторов сводится к введению в спейсеры единичных сайтов рестрикции, а также селективных маркеров. Основная особенность этих векторов – возможность работать с ними и как с плазмидами, и как с фагами. Главный недостаток односторонних векторов – нестабильность клонируемых в них чужДНК, обусловленная тем, что фаги с большими вставками развиваются медленнее. Поэтому уменьшение их длины является фактором селекции. Получение клонированных генов в односторонней форме необходимо для секвенирования генов по Сэнгеру, для сайт-специфического мутагенеза и для приготовления гибридизационных зондов. Широкое распространение получили векторы серии M13mp, созданные в 1977-1983 годах в лаборатории Мессинга.

2. 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 *ori*-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 односторонние копии плазмид. Образовавшиеся односторонние 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 двусторонней 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 линейаризованной форме они могут присоединяться к обоим концам фрагментов чужДНК 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 циркуляризируются через *cos*-сайты и автономно реплицируются.

Клонирование с помощью космидного вектора. Космида имеет точку начала репликации (*ori*), обеспечивающую ее существование в *E. coli* в виде плазмиды; два интактных *cos*-конца, разделенных уникальным сайтом для *SalI*; *BatHI*-сайт вблизи одного из *cos*-сайтов и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet^r*). ДНК, которую хотят

клонировать, расщепляют рестриктазой *Vam*HI и фракционируют по размеру, чтобы выделить молекулы длиной примерно 40 тпн. Плазмидную ДНК расщепляют с помощью *Sca*I и *Bat*HI. 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 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 чужДНК, 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 – фазмида λ рMYF131 (Янковский и 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 векстры 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.

3. 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 плазмидах 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 однокитевых фрагментов ДНК с целью их секвенирования или приготовления гибридизационных зондов.

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 (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонлирующий 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 *dvgal*. 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 сшивают в лигазной реакции.

Коннекторным методом удастся 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 взаимокomплементарные 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 удастся 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 выщипать 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 взаимокomплементарные 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:

- 1) по тупым или липким концам фрагмента ДНК, который предполагается рекомбинировать, с помощью лигазы фага Т4 пришивают короткие синтетические двухцепочечные сегменты, имеющие участки узнавания определенной рестриктазы;
- 2) полученный фрагмент обрабатывают выбранной рестриктазой, в результате чего образуются липкие концы;
- 3) 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 тесте 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, наблюдаемого 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 мембране остаются фрагменты клеточной стенки или сохраняется внешняя мембрана (что характерно для грамотрицательных бактерий), то такие клетки называют *сферопластами*. Как и протопласты, 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. 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, кДНК – 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). Poly(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 Т, С, G или А, комплементарные А, G, С 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 Н, 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. рН. Оптимальным для эффективного включения предшественников и получения полноразмерных транскриптов является рН 8,3. Отклонение на $\pm 0,5$ единицы рН 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 нуклеиновых 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 плазмиды, либо клонируют весь спектр молекул двухцепочечных ДНК для создания библиотеки кДНК.

3. Синтез олигонуклеотидов и генов.

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

1. Добавление к двухцепочечной к ДНК и к плазмидной 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 плазмид 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 плазмидную ДНК, также расщепленную соответствующим ферментом.

3. Синтетические линкеры. Другой метод присоединения двухцепочечной кДНК к плазмидным векторам основан на использовании синтетических линкеров, содержащих один или несколько сайтов рестрикции. Двухцепочечную кДНК, полученную, как описано ранее, обрабатывают ДНК-полимеразой бактериофага Т4 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 Т4-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 плазмидному 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 кольцо, увеличив тем самым число плазмид, не участвующих в рекомбинации. Эти трудности в значительной степени могут быть преодолены с помощью обработки линейной плазмиды фосфатазой и (или) присоединения различных линкеров к разным концам кДНК. к 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 плазмидную ДНК с помощью направленного

клонирования. На практике эта цифра оказывается даже выше, поскольку один из линкеров почти всегда присоединяется к кДНК быстрее, чем другой. Эту 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 плазмидный 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 применяя вместо линкеров синтетические адаптеры. Адаптеры – это короткие синтетические двухцепочечные кДНК, один конец которых тупой, а другой липкий. Молекулы адаптера после присоединения 5'-фосфатной 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: «Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК».

1.6.1 Вопросы лекции:

1. «Плюс-минус»-метод.
2. Метод Сэнгера.
3. Автоматическое секвенирование ДНК.
4. Геномные проекты.

1.6.2 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 терминирующих 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 PolII 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). PolII 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 встроеного фрагмента. Метод Максама-Гилберта. Наряду с ферментативным дидезоксиметодом 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 и 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 одновременно определить до 500 и более нуклеотидов.

3. Автоматическое секвенирование ДНК.

Необходимость получения информации о последовательности нуклеотидов в ДНК во всевозрастающих масштабах поставила вопрос об автоматизации процесса секвенирования ДНК, поскольку применявшиеся до этого ручные методы уже не позволяли справляться с такими большими объемами работы. Под автоматическим секвенированием ДНК понимается в первую очередь электрофоретическое разделение меченых продуктов терминирующих реакций с помощью специальных приборов – автоматических секвенаторов ДНК. Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан в 1987 г. фирмой Applied Biosystems (США).

Для мечения вновь синтезируемых цепей ДНК в условиях терминации при автоматическом секвенировании используют молекулу какого-либо флуоресцирующего соединения. К подобным соединениям предъявляется ряд требований. Во-первых, они должны иметь высокий квантовый выход при флуоресценции, обеспечивающий в приборах разного типа детекцию очень малых количеств ДНК. Во-вторых, у флуорофоров, используемых для мечения разных азотистых оснований с их последующей детекцией в одной дорожке секвенирующего геля или в одном капилляре, должны быть неперекрывающиеся или незначительно перекрывающиеся спектры эмиссии. В-третьих, желательно, чтобы флуоресцентные красители, используемые для разных нуклеотидов, не различались существенно по своему влиянию на электрофоретическую подвижность меченных ими фрагментов ДНК.

Принцип автоматического секвенирования ДНК заключается в электрофоретическом разделении флуоресцентно меченных продуктов специфически терминированных секвенирующих реакций и их детекции в режиме реального времени. Детекция осуществляется в нижней части геля, где в момент прохождения фрагментов ДНК происходит возбуждение молекул красителя лазерным лучом.

Существуют различные схемы проведения терминирующих реакций и последующего разделения продуктов в секвенирующем гель-электрофорезе. Так, довольно обычным, в том числе и для неавтоматического секвенирования, является вариант, когда проводят 4 типа терминирующих реакций и разделяют продукты в четырех дорожках геля. При другом варианте (4 реакции/1 дорожка) также проводят 4 типа реакций, используя флуоресцентные метки с различными спектрами эмиссии. Разделение в этом случае возможно в одной дорожке геля. В результате экономится гелевое пространство и в 4 раза повышается производительность метода.

Автоматические секвенаторы ДНК управляются специально созданными компьютерными программами. Так, например, приборы фирмы Applied Biosystems комплектуются программами сбора и анализа данных. После завершения электрофоретического разделения предварительные данные, собранные программой Data Collection, подвергаются анализу с помощью специальной программы. При этом определяется относительная высота пиков, соответствующих фрагментам ДНК, терминированным тем или иным типом нуклеотидного основания, и ликвидируются некоторые погрешности.

Серьезное значение в автоматическом секвенировании ДНК приобретает точность определения нуклеотидной последовательности, поскольку в большинстве случаев экспериментатор не участвует в процессе ее чтения и занесения в компьютер.

В автоматическом секвенировании ДНК для разделения флуоресцентно меченных продуктов терминирующих реакций, кроме электрофореза в стандартных пластинах полиакриламидного геля, широко используется капиллярный гель-электрофорез. Для него характерны высокая чувствительность и высокая скорость разделения, являющиеся следствием крайне малого внутреннего диаметра самого капилляра.

В ранних работах по секвенирующему капиллярному электрофорезу гелевым матриксом служил обычный полиакриламидный гель. Однако его нестабильность, формирование пузырьков воздуха, видимых при микроскопическом исследовании капилляров, заметно снижали производительность метода. Применение линейного полиакриламида позволило снять эти проблемы и способствовало развитию данного метода.

Современные автоматические секвенаторы несравнимо превосходят человека по производительности, более того, каждый год такие автоматы удается улучшать. Все это ведет к тому, что секвенирование фрагментов ДНК становится простой процедурой, доступной в любой молекулярно-биологической лаборатории.

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 0X174, 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, 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 – граммотрицательной 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 (ОРТ) для 736 не удалось выявить функции кодируемых ими белков. Около 78 % ОРТ *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 транскрибируемых 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 позволят 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 безвредных микроорганизмов. Секвенированных вирусных геномов уже насчитывается более 600. Накапливаемая информация позволяет выяснять 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.

1.7 Лекция №7 (2 часа).

Тема: «Создание геномных библиотек».

1.7.1 Вопросы лекции:

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

1.7.2 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 перекрытием генетической информации об этих полипептидах. В некоторых ситуациях можно говорить о гене, находящемся внутри другого гена. Белок-кодирующие части гена могут быть разъединены интронами 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 (Kurics 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 мелкощепящими рестриктазами (Maniatis, 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 AEMBL3, емкость которого составляет 7-20 т.п.н., приспособлен для клонирования рестриктов геномной ДНК. Буферный фрагмент вектора ограничен полилинкерами, содержащими сайты во взаимнообратном 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 встроены 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 редкощепящих 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 банк 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 ColEI (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 2001 (вектор AEMBL4 отличается от AEMB3 обратным расположением полилинкеров). Полный банк представлен всего 476 клонами, хранящимися в международных и национальных коллекциях, в том числе в России (ГНИИ Генетика, Москва). Он и сейчас применяется для поиска и изучения генов *E. coli*.

С помощью вектора pAdlOscBII 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 A-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 °С, не позволяя образующимся негативным колониям перекрываться. Далее фаги экстрагируют буфером и после центрифугирования хранят под хлороформом при 4 °С многие годы. По-видимому, "вечен" способ хранения фагового банка при -70°С 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 °С, 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 высевают сразу на гибридизационные фильтры.

1.8 Лекция №8 (2 часа).

Тема: «Экспрессия чужеродных ДНК в бактериальных клетках».

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Уровень ДНК.

2. Уровень РНК.
3. Уровень белка.

1.8.2 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 внутригенных 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 *lac*) – 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 (McClure et 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 TATATP или TATAATP, 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 промотор-конируемый 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 внутригенных 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 плазмиды, 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 *gun-away* мутации, которые при 42 °С увеличивают число копий

плазмиды 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 плазмиды определяется выбранным промотором. Например, в векторе *pBR322* при обычном числе его копий (20-60) хороший выход продукта обеспечивают промоторы *ApL* и *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 *Tc^R*.

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-полимераза: 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 иницирующий кодон (AUG гораздо более эффективен, чем GUG или UUG). Промежуток между SD и AUG насыщен нуклеотидами А или U, причем в положении -3 от иницирующего кодона преобладает А (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'UUAACUUUA3 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 отсутствует в лидерной части мРНК шпильчатых 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 °C. 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 Т4 обеспечивается благодаря специфическому сайту перед иницирующим 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 кодон нуклеотиды. 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 кодирующей 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 участь 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 аберрантных полипептидов вызывает индукцию белков теплового шока, включая АТР-зависимую сериновую протеазу (эндопептидазу) Lon. АТФазная активность этой протеазы индуцируется только в присутствии измененных белков, что свидетельствует о ее способности распознавать их. Каким 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 практичный 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). Проинсулин, 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 соматомедина-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 аберрантных 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.

1.9 Лекция №9 (2 часа).

Тема: «Генетическая инженерия белков».

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Повышение ферментативной активности.

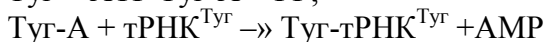
2. Изменение специфичности фермента.
3. Повышение стабильности и специфичности фермента.

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Повышение ферментативной активности.

С помощью направленного мутагенеза можно не только повышать стабильность ферментов, но и изменять их каталитическую 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 аминокислотирование тРНК, которая специфически связывает тирозин (тРНК^{Туг}), в ходе двухступенчатой реакции:



На стадии 1 АТР активирует тирозин (Туг), в результате чего образуется связанный с ферментом тирозиладенилат (Туг-А) и пирогосфат (РР_i). На стадии 2 тирозиладенилат гидролизуетсЯ при участии свободной 3'-гидроксильной группы молекулы тРНК, так что тирозин присоединяется к тРНК с высвобождением АМР. 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 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 А1а-51-фермента константа связывания (K_м) с АТР уменьшилась примерно в два раза без значительного изменения каталитической константы (k_{cat}), то для Рго-51-фермента – более чем в 100 раз. При этом каталитическая эффективность (k_{cat}/K_м) реакции аминокислотирования увеличилась в обоих случаях. Результат, полученный для Рго-51-фермента, был неожиданным, поскольку замена треонина на пролин должна была привести к нарушению (по крайней мере локальному) структуры α-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 сродство 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 приобретали 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 длиной 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, узнающих сайты длиной 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 Zn^{2+} , так называемые цинковые пальцы. Эти белки связываются со специфической нуклеотидной последовательностью, встраиваясь своим α -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 *FokI* 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 $(Gly_4Ser)_3$ для придания гибкости рекомбинантной молекуле, а также содержащий часть гена нуклеазы *FokI*. 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 *FokI*, 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 *FokI*. 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 неспецифическому 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 свойст-

вами 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 Ala-Ala-Ala-Ala, добились существенного повышения сродства фермента к фибрину. Заменив Asn-117 на Gin, получили фермент с такой же фибринолитической активностью, как у исходного фермента. Внося 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.

1.10 Лекция №10 (2 часа).

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

1.10.1 Вопросы лекции:

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

1.10.2 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, рестрицирующую 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, diaзотрофными, мезотрофными, термофильными, психрофильными, медленно- и быстрорастущими. Для культивирования каждого из них необходимо подобрать оптимальные условия ферментации – температуру, pH, 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.

2. Биodeградация 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 «биodeградация» 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.

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 биodeградации 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) биodeградация 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 попросту 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 суспензии 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.

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 встряхиваемой 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

1.11 Лекция №11 (2 часа).

Тема: «Генетическая инженерия дрожжей».

1.11.1 Вопросы лекции:

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

1.11.2 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 YEр (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 челночные 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 YEp на три порядка выше по сравнению с таковой векторами первого типа, но получаемые при этом трансформанты нестабильны.
- Векторы типа YRp (Yeast Replicating plasmid)
- Имеют хромосомные репликационные последовательности *ars* (autonomously replicating sequence). Однако они слабо обеспечивают самостоятельную репликацию векторов, поэтому полученные с их помощью трансформанты дрожжей нестабильны.
- Векторы типа YCp (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.
- YCp проявляют стабильность при митозе и мейозе.
- Другими словами, эти векторы фактически представляют собой кольцевые мини-хромосомы.
- Векторы типа YLp (Yeast Linear plasmid)
- Являются линейными мини-хромосомами.
- Получают путем введения в кольцевые плазмиды YCp 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 сорбитол 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 взаимозаменяемы. 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 секретлируемым, но это удастся не всегда, если белок в норме функционирует в цитоплазме. Часто белок гидролизуются 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 k-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.

1.12 Лекция №12 (2 часа).

Тема: «Контроль применения биотехнологических методов».

1.12.1 Вопросы лекции:

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

1.12.2 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 оказать 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 применениями 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 НИН 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 НИН за основу, разработали собственные ограничения для экспериментов с рекомбинантными ДНК.

К 1980 г. первоначальные директивы НИН были пересмотрены в сторону смягчения требований, в основном благодаря экспериментальным данным, полученным в ходе исследований, финансируемых 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 принимаются 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 НИН были добавлены специальные правила по обеспечению мер предосторожности, исключающих случайный выброс в окружающую среду генетически модифицированных организмов при их крупномасштабном культивировании.

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 развившегося 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 пересылались 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 УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

2.1 Практическое занятие №1 (2 часа).

Тема: «Ферменты генной инженерии».

2.1.1 Задание для работы:

1. Изучить ферменты, используемые в генетической инженерии.

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-метиلاзой. 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 гибридизоваться 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.

2. ДНК-лигазы

В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага *I* 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 нуклеиновой 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 дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага T4 – АТФ в присутствии Mg^{2+} . Лигаза фага T4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. Она используется чаще.

3. 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'-гидроксильной группой 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 репарации 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' экзонуклеазы. 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.

2.1.3 Результаты и выводы:

Студентами изучены ферменты, используемые в генетической инженерии.

2.2 Практическое занятие №2 (2 часа).

Тема: «Ферменты генной инженерии».

2.2.1 Задание для работы:

1. Изучить ферменты, используемые в генетической инженерии.

2.2.2 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. 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. 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 препарате 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 b (95 кДа), присутствующих в эквимольном 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 двухцепочечный участок (праймер). Праймером может служить одноцепочечный 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 одноцепочечных кДНК самокомплементарные шпильки, которые могут выполнять функции праймера.

Матрицей служит первая цепь кДНК. Данная реакция может катализироваться как ревертазой, так и ДНК-полимеразой I *E. coli*. Показано, что сочетание этих двух ферментов позволяет повысить выход полноценных двухцепочечных молекул кДНК. По окончании синтеза первая и вторая цепи кДНК остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей праймером при синтезе второй цепи. Эту петлю расщепляют эндонуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются тупыми, и для повышения эффективности последующего клонирования их репарируют до тупых с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Полученную двухцепочечную кДНК можно затем встраивать в клонирующие векторы, размножать в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований.

2. Терминальная трансфераза

Терминальная трансфераза (концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза) была обнаружена Боллумом в 1962 году в тимусе теленка. Субстратом терминальной трансферазы при использовании в качестве кофактора ионов Mg^{2+} является одноцепочечная ДНК с 3'-ОН концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одноцепочечным 3'-ОН концом. Если в качестве кофактора используются Co^{2+} , 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*.

2.2.3 Результаты и выводы:

Студентами изучены ферменты, используемые в генетической инженерии.

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 Результаты и выводы:

Проверено усвоение и систематизированы знания студентов, полученные при изучении раздела «Ферменты и векторы клонирования в генной инженерии».

2.4 Практическое занятие №4 (2 часа).

Тема: «Методы отбора гибридных клонов».

2.4.1 Задание для работы:

Рассмотреть методы отбора гибридных клонов.

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 плазида 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 плазида детерминирует устойчивость одновременно к тетрациклину и ампициллину ($Tc^r Ar^r$) и при встройке в нее чужеродного фрагмента нарушается ген устойчивости к ампициллину, то гибридная плазида будет обуславливать фенотип клетки-хозяина $Tc^r Ar^s$, т. е. устойчивость к тетрациклину и чувствительность к ампициллину. Плазмиды после встройки в них фрагментов ДНК вводят в клетки, культуру высевая 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 посева 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 нуклеиновых 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 одноцепочечный 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 одноцепочечные молекулы необратимо «пришивают» к твердой подложке (нитроцеллюлозному или нейлоновому 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.

Меченые 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 – меченый, 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 - ^{32}P , так что ^{32}P -меченным 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 нейлоновый фильтр); проводят лизис клеток, затем депротеинизацию и денатурацию ДНК; фиксируют ДНК на подложке. Наносят на фильтр меченый 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-кодона 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 λ , 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 иммуносорбция антигена. После промывания диска на него наносят ^{125}P -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.

2.4.3 Результаты и выводы:

Студентами рассмотрены методы отбора гибридных клонов.

2.5 Практическое занятие №5 (2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция».

2.5.1 Задание для работы:

Ознакомиться с методикой проведения полимеразной цепной реакции.

2.5.2 Краткое описание проводимого занятия:

1. Этапы ПЦР-диагностики

Полимеразная цепная реакция (Polymerase chain reaction) – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфического фрагмента ДНК, осуществляемый *in vitro*.

Открытие возможности избирательной наработки определённых участков ДНК с помощью ПЦР, произвело, по существу, революционный переворот во взглядах исследователей, и было взято на вооружение представителями различных дисциплин.

Схема ПЦР-диагностики включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение нуклеиновой кислоты).
2. Собственно ПЦР.
3. Детекция продуктов амплификации.

1 этап. Пробоподготовка или выделение ДНК (РНК). Проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК. В процессе выделения нуклеиновой кислоты необходимо предотвратить влияние ингибиторов ПЦР, сконцентрировать нуклеиновую кислоту в объеме, соответствующем

формату ПЦР, и предотвратить действие ДНКаз и РНКаз. В качестве исходной матрицы для ПЦР может быть использована ДНК, выделенная как из свежеполученных клеток и тканей, так и из замороженных, высушенных или фиксированных препаратов, имеющих частично деградированные нуклеиновые кислоты, т. е. объекты, ранее недоступные для анализа. Так, с помощью ПЦР была амплифицирована, клонирована и секвенирована ДНК египетской мумии, именно с помощью метода ПЦР были идентифицированы останки семьи Романовых.

2 этап. Собственно ПЦР или амплификация (amplification – англ. умножение, усиление). Для её проведения необходимы следующие компоненты:

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

Праймеры – это химически синтезированные олигонуклеотидной природы затравки для ПЦР, определяющие границы (фланкирующие) амплифицируемого участка ДНК-матрицы и комплементарные противоположным её цепям.

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

Фермент Taq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК). Taq-полимераза была выделена у микроорганизмов, обитающих в гейзерах - *Thermus aquaticus*. ПЦР стала технологична именно с началом использования термостойких ДНК-полимераз, выдерживающих многократный нагрев до 90 °С, а журнал «Science» даже назвал ДНК-полимеразу молекулой года в 1989 г. Применение этой полимеразы дало возможность проводить реакцию в автоматическом режиме – в специальном программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации. Однако мало кто знает, что в 1980 г. термостабильная ДНК-полимераза была выделена в России С. Городецким, и в своих статьях Мюллис ссылается на работу советских авторов.

Магний необходим для функционирования фермента Taq-ДНК-полимеразы.

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен трис-НСl-буфер, который удерживает pH во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит желатин или бычий сывороточный альбумин и неионные детергенты для стабилизации фермента.

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

Амплификация состоит из повторяющихся циклов, которые делятся на этапы. Каждый этап протекает при определённом температурном режиме, который разработчики подбирают опытным путём, поэтому значения температур для конкретного этапа могут варьировать в достаточно широком диапазоне.

I этап: Денатурация ДНК (плавление), когда рвутся водородные связи и получается две ниточки. Осуществляется при температуре 93⁰ - 95⁰С в течение 30-40 сек.

II этап: Отжиг праймеров, т.е. их присоединение. Осуществляется при температуре 50⁰ - 65⁰С. Праймеры комплементарны последовательности ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи протекает только между ними.

К подбору праймеров предъявляют определённые требования:

1. Они должны быть комплементарны определённому участку ДНК и не должны быть комплементарны друг другу.

2. Чтобы исключить отрицательный результат, в случае появления мутации, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативных участках их ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

3. Праймер должен иметь длину 20–30 нуклеотидов. Чем больше нуклеотидов в праймере, тем специфичнее ПЦР, поскольку короткие праймеры часто «ошибаются».

4. Используемые праймеры должны быть сбалансированы по температуре отжига.

III этап: Достраивание цепей ДНК или элонгация. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70–72°C. Время протекания синтеза – 20–40 сек.

Три вышеописанных фазы: 1) денатурация ДНК (плавление); 2) комплементарное связывание праймера с ДНК-матрицей (отжиг); 3) синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы (достройка праймера) и составляют суть каждого цикла ПЦР.

Далее этот стандартный цикл ПЦР – плавление, отжиг, синтез – воспроизводится многократно, количество амплификонов растет в геометрической прогрессии, поскольку образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей.

Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30–40 циклов в растворе накапливается около 10^8 молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле.

Однако кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20–25 циклов), после чего начинается выход на плато (после 40–45 циклов) в силу

1. истощения дезоксинуклеозидтрифосфатов,
2. истощения праймеров
2. нарастающего температурного повреждения Taq- полимеразы,
3. конкуренции за фермент амплификонов, когда их число начнет превышать число молекул Taq-ДНК-полимеразы.

Детекция продуктов амплификации осуществляется несколькими способами. Это детекция с помощью химических (иммунохимических) реакций, детекция с помощью флуоресценции (при этом могут использоваться различные модификации праймеров), однако до настоящего времени самым простым, доступным и недорогим методом является электрофорез. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси или в агарозный гель добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле. Под действием электрического поля молекулы ДНК движутся от отрицательного полюса к положительному. После просматривания геля в ультрафиолетовом свете можно говорить о результатах ПЦР (в случае успешного прохождения реакции на геле видны светящиеся полосы).

В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены гибридизационные схемы детекции. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК можно пометить флуоресцентным красителем, присоединяя его к 5'-концу каждого праймера. В качестве красителей часто используют флуоресцеин и родамин, которые испускают зеленый и красный свет, соответственно.

После ПЦР-амплификации ДНК-мишени проводят разделение флуоресцеин-меченного праймера и продуктов амплификации, затем регистрируют включение метки. Если ДНК-мишень в образце отсутствует, то не будет образовываться и флуоресциру-

ющий продукт. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

Таким образом, в процессе реакции происходит многократное избирательное копирование определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом идёт копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

2. Преимущества метода ПЦР

Метод ПЦР имеет ряд преимуществ перед другими методами клинической лабораторной диагностики:

1. Универсальность. Метод принципиально позволяет обнаруживать любые ДНК и РНК даже в тех случаях, когда другими способами это сделать не возможно.

2. Специфичность – в исследуемом материале определяется уникальный фрагмент НК, характерный только для данного возбудителя (устраняются проблемы, связанные с перекрёстно-реагирующими антигенами).

3. Высокая чувствительность – 99%, возможность выявления 10 – 1000 клеток в пробе.

4. Высокая скорость получения результата анализа – 4 – 4,5 часа.

5. Минимальный объём пробы – до нескольких микролитров.

6. Возможность одновременной диагностики нескольких возбудителей заболеваний или аномальных генов в одной пробе.

7. Возможность экспертизы – полученные результаты ПЦР можно вносить в компьютерные информационные носители или фотографии для оценки независимыми экспертами.

В ветеринарии, метод ПЦР все чаще используется наряду с такими традиционными методами, как бактериологический и иммунохимический, особенно в таких областях клинической диагностики, как:

- Ранняя диагностика вирусных и бактериальных инфекций (в т.ч. хламидиоза, лептоспироза, листериоза, бруцеллеза, лейкоза);
- Диагностика трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм патогенных микроорганизмов;
- Диагностика хронических и латентных инфекций;
- Идентификация возбудителей с высокой антигенной изменчивостью;
- Идентификация внутриклеточных паразитов (в т.ч. возбудителя токсоплазмоза).

Несмотря на серьезные возможности лабораторных методов диагностики, для одних инфекций результаты применения этих методов могут привести к окончательным выводам, а для других – лишь служить подтверждением при постановке диагноза. Надо помнить, что диагноз ставит не метод, а ветеринарный специалист, разбирающийся во всех тонкостях инфекционной патологии и животноводства в целом.

3. Применение метода ПЦР

Метод ПЦР вряд ли мог получить столь широкое распространение, если бы не его уникальная чувствительность, позволяющая найти всего одну определенную молекулу ДНК из миллионов других. На этой сверхчувствительности основаны главные диагностические технологии ПЦР. ПЦР позволяет амплифицировать любые интересующие участки генома (длиной до 4 тыс. пн) с использованием специфичных или произвольных (случайных) праймеров. ПЦР-маркеры различаются длиной амплифицированной последовательности. Для определения размера полученных ПЦР-фрагментов (ПЦР-продуктов) их разделяют с помощью гель-электрофореза. О полиморфизме ДНК организмов судят по присутствию или отсутствию полосы в каждом *паттерне* (рисунке расположения полос) при электрофоретическом разделении

фрагментов ДНК, их окраске и фотографировании в УФ свете. Такие различия в паттерне могут быть связаны с делециями или инсерциями в амплифицируемом фрагменте. Благодаря большой информативности и экономичности, возможности достаточно быстрого изучения многочисленных выборок и локусов (100–1000 локусов против 10–20 локусов аллозимов) метод ПЦР-анализа с применением различных молекулярных ДНК-маркеров в настоящее время широко используются в генетических исследованиях. Метод ПЦР лежит в основе картирования различных геномов, ДНК-идентификации личности, установления родства людей, в судебной медицине (поскольку позволяет проводить генетическую «дактилоскопию» по одной единственной клетке, диагностики наследственных (выявление мутантных генов), а также инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы (обнаружение генетического материала патогенных микроорганизмов в клинических образцах).

Например, данный метод используется для диагностики бессимптомного носительства возбудителей инфекционного заболевания – вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), которые в латентной стадии инфекции могут присутствовать в организме человека лишь в небольшом числе копий. Другой пример: С.А. Булатом (одним из первых применивших в нашей стране метод ПЦР для идентификации грибов и анализа их генетической изменчивости) были сконструированы геноспецифичные праймеры (обозначенные как Cs5), амплифицирующие только фрагменты ДНК, специфичные для патогенного гриба ячменя и пшеницы *Cochliobolus sativus*, что позволяет выявлять устойчивые к данному грибу растения.

В зависимости от природы праймера (специфичный, полуспецифичный, произвольный = случайный) и способа идентификации продуктов амплификации различают несколько методов и маркеров ПЦР-анализа. Остановимся на молекулярных маркерах, которые наиболее широко используются для выявления генетического полиморфизма и картирования генома животных, человека, растений и микроорганизмов. К числу таких маркеров, основанных на ПЦР, относятся RAPD-маркеры и микросателлиты.

RAPD-маркеры – random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR –случайно амплифицированная полиморфная ДНК). При необходимости амплификации гена или фрагмента ДНК с известной нуклеотидной последовательностью используют два геноспецифичных праймера, фланкирующих (ограничивающих) нужную последовательность.

Методика ПЦР позволяет амплифицировать ДНК из любого участка генома, в том числе фрагменты ДНК с неизвестной (анонимной) нуклеотидной последовательностью (при использовании RAPD-маркеров). При RAPD-методе используют стандартные наборы праймеров – случайные (произвольные) праймеры. Использование олигонуклеотидных праймеров произвольной структуры основано на том, что в больших геномах для них имеются множественные сайты посадки, а следовательно, и инициации ПЦР. В этом случае используется, как правило, только один праймер и амплифицируются участки между этим праймером и его обратной (инвертированной) последовательностью. Праймер связывается с геномной ДНК в двух различных участках – инвертированных повторах (ип). Инвертированные повторы – это участки молекулы ДНК, два сегмента которых имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, но противоположную ее ориентацию.

Обычно используются произвольные праймеры из 10 нуклеотидов, содержащие не менее 50 % GC. Так как пара G-C содержит три водородных связи, а пара A-T – только две, гибрид «ДНК-праймер», содержащий менее 50 % GC, плавится до того, как полимеразы начинают полимеризацию и продукты амплификации в этом случае не образуются. Продукты RAPD-ПЦР представляют собой анонимную последовательность ДНК, заключенную между двумя инвертированными повторами, разной длины. Их выявляют гель-электрофорезом (как присутствие или отсутствие отдельной RAPD-

полосы). RAPD-маркеры являются высокоинформативной характеристикой для оценки генетического разнообразия и родства.

Во всех живых организмах протекают сходные биохимические процессы, катализируемые ферментами, которые ускоряют идентичные химические реакции. Например, как у растений, так и у животных функционирует цикл трикарбоновых кислот, реакции которого катализируют ферменты. Структура этих ферментов у разных организмов может различаться, однако выполняемые ими функции сходны. Такие ферменты, играющие одинаковую роль в метаболизме разных организмов, называют гомологичными. Аналогичное название имеют гены, кодирующие эти ферменты. Несмотря на то, что структура гомологичных белков может варьироваться, они имеют высококонсервативные участки, входящие в состав каталитических центров. По аналогии с белками существуют консервативные последовательности и в генах. Если создать праймеры, комплементарные таким консервативным последовательностям, то с помощью ПЦР можно найти гомологичный ген в организме, в котором наличие этого гена неизвестно. В случае если гомологичный ген в исследуемом организме действительно существует, происходит отжиг праймеров на молекуле ДНК организма. Затем этот участок ДНК, фланкированный (ограниченный) праймерами, амплифицируется. Так, выделив какой-то ген, скажем, из мыши, можно узнать, есть ли подобный ген, а следовательно, фермент и биохимическая реакция у человека. Технология ПЦР используется также для определения нуклеотидных последовательностей исследуемых генов).

Идентификация маркерных генов. Каждый организм имеет уникальные, свойственные только ему гены или другие участки ДНК. Такие последовательности являются маркерными для организма. Если определить наличие маркерного участка, то можно однозначно диагностировать организм. ПЦР позволяет идентифицировать такие маркерные участки генома. В основе лежит все тот же принцип комплементарности праймеров маркерным фрагментам. Если ПЦР имеет положительный результат, значит, маркеры идентифицированы. Следовательно, определен и вид организма. Этот факт имеет огромное значение в медицинской диагностике. Именно поэтому только в США в 1996 году на ДНК-диагностику было потрачено 181,6 млн долларов. А к 2003 году рост спроса на этот метод прогнозируют до 1400,0 млн.

Применение ПЦР в медицинской диагностике. Полимеразная цепная реакция позволяет оперативно поставить диагноз многих заболеваний. По данным журнала LabMedica прогнозируется развитие пяти основных направлений генодиагностики:

- 1) диагностика инфекционных заболеваний;
- 2) диагностика онкологических заболеваний:
 - диагностика лейкозов и лимфом;
 - диагностика рака груди;
 - диагностика других злокачественных заболеваний;
- 3) диагностика генетических заболеваний;
- 4) идентификация личности:
 - судебная медицина, криминалистика;
 - трансплантация органов и тканей;
 - определение отцовства;
- 5) диагностика патогенов в пище.

Главным направлением развития рынка ДНК-диагностики является диагностика инфекционных заболеваний. Если человек страдает заболеванием бактериального или вирусного происхождения, то в его крови обязательно находятся возбудители – бактериальные или вирусные частицы. Любой возбудитель несет маркерные последовательности ДНК, для которых можно сконструировать праймеры. Таким образом, с помощью ПЦР можно определить присутствие того или иного микроорганизма в крови, т.е. поставить диагноз.

В отличие от иммуноферментного анализа, который широко используется для диагностики инфекционных заболеваний, ДНК-диагностика позволяет определять непосредственно возбудителя заболевания, причем в очень низкой концентрации.

Диагностика рака пока ограничивается небольшим количеством сведений о генах, ассоциированных с этим заболеванием. Для развития успешных методов определения рака необходимы дальнейшие исследования мутаций (в т.ч. в рамках программы «Геном человека»), связанных с канцерогенезом. Вообще название «рак» объединяет большое количество разных заболеваний. В каждом конкретном случае, как правило, неизвестна мутация, приведшая к новообразованию, что существенно затрудняет его диагностику.

Диагностика генетических заболеваний, также как и раковых, может развиваться только вслед за проведением широких научных исследований генома человека. Однако уже сейчас известны гены некоторых генетических заболеваний, например, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона. Гены подобных заболеваний обычно начинают работать в возрасте после 70 лет. Поэтому их ранняя диагностика позволит заранее начать лечение, которое в этом случае может быть более эффективным.

Идентификация личности – одно из самых перспективных направлений на рынке ДНК-диагностики. Это очень быстрый и точный метод. Ежегодный прирост в этом секторе ожидается на 21,3 %. Сектор рынка ДНК-диагностики патогенов в пище в настоящее время является самым скромным. В настоящее время на ДНК-диагностику микробного загрязнения производимых продуктов питания приходится менее 5 % от общего количества способов, применяемых для тестирования загрязненности продуктов.

2.5.3 Результаты и выводы:

Студенты ознакомлены с методикой проведения полимеразной цепной реакции.

2.6 Практическое занятие №6 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 2 модуль».

2.6.1 Задание для работы:

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

2.6.2 Результаты и выводы:

Проверено усвоение и систематизированы знания студентов, полученные при изучении раздела «Общие принципы и методы генетической инженерии».

2.7 Практическое занятие №7 (2 часа).

Тема: «Скрининг геномных библиотек».

2.7.1 Задание для работы:

Изучить методы скрининга геномных библиотек.

2.7.2 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 дрожжей 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 кДНК-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 (сДНА). 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 меченную кДНК интересующего гена. Меченный кДНК-зонд будет комплементарно гибридизоваться только с фрагментом геномной ДНК содержащим искомый ген. Если на нитроцеллюлозный фильтр положить рентгеновскую плёнку, 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. Иммунологический скрининг

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 (антигеном), все несвязавшиеся антитела удаляют, а фильтр помещают в раствор вторых антител, специфичных в отношении первых антител. Во многих тест-системах используют конъюгаты вторых антител с ферментом, например 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 иммунологического 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* высеивали 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 азотфиксирующих клубеньков на корнях некоторых растений.

2.7.3 Результаты и выводы:

Студентами изучены методы скрининга геномных библиотек.

2.8 Практическое занятие №8 (2 часа).

Тема: «Экспрессия про- и эукариотических генов».

2.8.1 Задание для работы:

Ознакомиться с процессом экспрессии прокариотических и эукариотических генов.

2.8.2 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 рибосом содержится, 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 рPL608 (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 "а-1". Авторы химически синтезировали ген гормона соматостатина, состоящий последовательно из *is*coRI-сайна, кодона для метионина, 14 кодонов соматостатина, двух стоп-кодонов. Ген был встроен в модифицированную плазмиду рBR322 через сайты EcoRI и BstI 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 К был заменен сайт-направленным мутагенозом на стоп-кодон TAG. Затем после него были последовательно вставлены последовательности, кодирующие *Sfil*-сайт, инициатор трансляции SD-ATG, пептидный линкер (Pro-Thr)₁₀ из десяти чередующихся остатков пролина и треонина, а также сайт поликлонирования *HindIII*-*BamHI*-*SacI*-*EcoRI*. Пептидный линкер предназначался для соединения гибкой связью двух доменов гибридного белка.

2.8.3 Результаты и выводы:

Студенты ознакомились с процессом экспрессии прокариотических и эукариотических генов.

2.9 Практическое занятие №9 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 3 модуль».

2.9.1 Задание для работы:

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

2.9.2 Результаты и выводы:

Проверено усвоение и систематизированы знания студентов, полученные при изучении раздела «Анализ и экспрессия генов».

2.10 Практическое занятие №10 (2 часа).

Тема: «Трансгенные животные».

2.10.1 Задание для работы:

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

2.10.2 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 CO₂ инкубаторе. Зиготы подсаживают в матку ложнобеременной (их получают скрещиванием с вазэктомизированными самцами) самке мыши. Она приносит потомство, которое может оказаться трансгенным, если микроинъекцированная 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 литически 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 плазмиды 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 челночные векторы, содержащие плазмиду pBR322 и фрагмент SV40 ДНК с областью ранних генов (*ori*-сайт и ген А), оказались неудачными.

Челночные 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, аденовирусы. Аденовирусы 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 плазмиды. Более того, рекомбинантные молекулы, в которых поздние гены вируса заменены на чужеродные гены, тоже поддерживаются в виде плазмиды. 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 гипер-овуляция 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 поли-меразной 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 удастся 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 мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты, 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 бластоцисты. 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 бластоцисты 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 бластоцисты, которые затем имплантируют в матку «суррогатных» матерей. Скрещивая животных-основателей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, можно получить линии трансгенных мышей.

Как правило, инъекцированная 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.

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 (Go), 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 Go. Осуществляют слияние клеток в Go-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 Go; 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

мышях. 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 мышинных 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 мышинные эмбрионы на ранних стадиях развития. Мышинные 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, секретируемых в молоко.

2.10.3 Результаты и выводы:

Студенты ознакомились с методами получения трансгенных животных, ими изучены области применения генно-инженерных животных.

2.11 Практическое занятие №11 (2 часа).

Тема: «Трансгенные растения».

2.11.1 Задание для работы:

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

2.11.2 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 плазмиды, 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 лигнины и флавоноиды. Ацетосирингон и гидроксиацетосирингон активируют гены вирулентности (*vir*), которые локализованы в участке *Ti*-плазмиды 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 amino- 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 опиона, 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. risogenes*. 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 плодовые 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 неомицинофосфотрансферазы, 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 терминирования-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 челночный 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-плазида 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* с «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-плазида-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 хозяйскую 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 плазмиды (Ti-плазмиды) 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-плазмиды. 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 челночный 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 челночного 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, предназначенном для экспрессии клонированных генов. В нем тандемом расположены начальная часть гена *nos* с промотором и 5'-нетранслируемой последовательностью, а также его 3'-концевая часть, содержащая сайт полиаденилирования мРНК. Обе части разделяются в плазмиде единственным сайтом *Bam*HI, который и был использован для внедрения в плазмиду чужеродных генов. Прежде всего в него внебрили ген *ocs* октопиновой плазмиды и перенесли в клетки *A. tumefaciens*, содержащую плазмиду pTiC58. Образовавшиеся коинтеграаты 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, расположенными 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).

2.11.3 Результаты и выводы:

Студенты ознакомились с методами получения трансгенных растений, ими изучены методы трансформации растительных клеток.