

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

М. А. Наквасина, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов

БИОИНЖИНИРИНГ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ,
АНАЛИТИЧЕСКИЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Учебное пособие

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2021

УДК 577.21(075.8)

ББК 28.040.4я73

Н21

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор, декан факультета биотехнологии и биологии Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева, заведующий кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии *В. В. Ревин*; доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биотехнологии Воронежского государственного университета *В. Н. Калаев*

Наквасина М. А.

Н21 Биоинжиниринг : молекулярно-генетические основы, аналитические и синтетические методы : учеб. пособие / М. А. Наквасина, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов ; Воронежский государственный университет. – Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2021. – 164 с.

ISBN 978-5-9273-3240-3

В учебном пособии изложены современные представления о молекулярно-генетических основах биоинжиниринга, аналитических и синтетических методах, позволяющих конструировать биологические системы с заданными свойствами. Издание предназначено для студентов, магистров, аспирантов и преподавателей биологических и медико-биологических факультетов университетов, а также может быть использовано студентами медицинских, фармацевтических и сельскохозяйственных вузов.

УДК 577.21(075.8)

ББК 28.040.4я73

ISBN 978-5-9273-3240-3

- © Наквасина М. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., 2021
- © Воронежский государственный университет, 2021
- © Оформление, оригинал-макет. Издательский дом ВГУ, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК НАУКА	7
Контрольные вопросы	9
2. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРОЕКТОВ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА	10
2.1. Основные этапы генно-инженерных проектов	10
2.2. Ферменты, применяемые в генетической инженерии	11
2.3. Методы получения генов.....	17
2.3.1. Использование рестриктаз II класса для получения генов.....	17
2.3.2. Методы химико-ферментативного синтеза двухцепочечных фрагментов ДНК.....	18
2.3.3. Получение структурных генов эукариот.....	22
2.3.4. Амплификация последовательностей ДНК <i>in vitro</i> : полимеразная цепная реакция и ее применение.....	24
2.4. Векторные молекулы ДНК и их конструирование.....	28
2.5. Методы получения рекомбинантных молекул ДНК	33
2.6. Введение рекомбинантных молекул ДНК в клетки реципиента	36
2.7. Создание библиотек генов.....	37
2.8. Идентификация и отбор клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК. Скрининг библиотек генов	38
2.9. Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах.....	40
2.10. Эукариотические системы экспрессии	44
2.11. Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК	46
2.12. Базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Геномные проекты	50
2.13. Новые методы клонирования генов.....	52
2.14. Методы изменения геномов	53
Контрольные вопросы	56
3. СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	58
3.1. Конструирование и использование рекомбинантных штаммов бактерий.....	58
3.2. Генно-инженерное получение медицинских препаратов.....	61
Контрольные вопросы	65

4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ	67
4.1. Получение трансгенных растений.....	67
4.2. Синтез в растениях чужеродных белков медицинского назначения.....	72
4.3. Трансгенные растения в сельском хозяйстве.....	76
4.4. Генетически модифицированные растения и риски их использования	78
Контрольные вопросы	81
5. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЖИВОТНЫХ	82
5.1. Перенос генов в клетки млекопитающих	82
5.2. Получение и применение трансгенных животных	84
5.3. Клонирование животных.....	88
Контрольные вопросы	93
6. ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ И ИХ ПОЛУЧЕНИЕ	94
Контрольные вопросы	95
7. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ	96
7.1. Определение, подходы и методы	96
7.2. Вирусные и невирусные системы доставки генов.....	98
7.3. Применение генной терапии.....	101
7.4. Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов	102
Контрольные вопросы	105
8. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ	106
8.1. Определение, основные подходы и методы.....	106
8.2. Применение белковой инженерии	109
Контрольные вопросы	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ЗАДАНИЯ И ЗАДАЧИ	119
ОТВЕТЫ К ЗАДАЧАМ	140
СЛОВАРЬ ОСНОВНЫХ ТЕРМИНОВ	153
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	161

ПРЕДИСЛОВИЕ



«Введение в биотехнологию» является дисциплиной базовой (общепрофессиональной) части профессионального цикла подготовки студентов-бакалавров медико-биологического факультета Воронежского государственного университета, реализуемой в 7-м семестре 4-го курса. В ходе изучения этой дисциплины студенты знакомятся с основными направлениями современной биотехнологии – науки о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов: микробной биотехнологией, инженерной энзимологией, генетической инженерией и клеточной биотехнологией. На лекционную часть всей дисциплины отводится 16 часов, а на освоение каждого раздела – около 4 недель.

Генетическая инженерия – ключевой раздел биотехнологии, целью которого является создание и использование искусственных генетических программ (систем). Это наиболее сложный для студентов раздел дисциплины, освоение которого требует тщательной самостоятельной подготовки и самоконтроля. Кроме того, генетическая инженерия представляет собой наиболее междисциплинарное направление биотехнологии и является платформой для проектирования и создания (биоинжиниринга) управляемых биологических систем с заданными свойствами. Изучение таких трудоемких и информационно насыщенных учебных дисциплин осложняется отсутствием адаптированных учебников и учебных пособий, в которых в достаточно сжатой форме отражалось бы основное содержание того или иного раздела биотехнологии. Учебное пособие «Биоинжиниринг: молекулярно-генетические основы, аналитические и синтетические методы» должно в определенной степени устранить проблемы, связанные с изучением молекулярно-генетических основ биоинжиниринга, аналитических и синтетических методов, позволяющих конструировать биологические системы с новыми свойствами, которые могут быть использованы в биологии, медицине, промышленности, сельском хозяйстве, экологии.

В издании изложены современные представления об основных этапах генно-инженерных проектов, методах создания генетически трансформированных биологических объектов и направлениях их использования, достижениях и проблемах генетической инженерии растений и животных, генной терапии, белковой инженерии. Описаны традиционные и современные подходы и методы, позволяющие реализовывать генно-инженерные проекты. В конце каждого

раздела приведены контрольные вопросы для самостоятельной работы студентов. В пособии есть отдельный раздел, содержащий тестовые задания и задачи, которые студенты могут выполнять как во время самостоятельной работы, так и на лабораторных занятиях. Для самоконтроля решения задач приведены ответы. Имеется словарь основных терминов, необходимых для освоения данной дисциплины.

Учебное пособие предназначено для изучения студентами 4-го курса медико-биологического факультета, обучающимися по направлению 06.03.01 «Биология», в рамках дисциплин Б1.Б.31 «Введение в биотехнологию» и Б1.В.04 «Основы бионанотехнологии», а также может быть полезно для студентов и аспирантов биотехнологических и фармацевтических факультетов университетов, медицинских и сельскохозяйственных вузов.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК НАУКА



Генетическая инженерия представляет собой важнейшее направление современной биотехнологии – науки о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения (В. С. Шевелуха). С развитием генетической инженерии (с 1972 г.) начался четвертый этап развития биотехнологии – генотехнический, который продолжается по настоящее время.

Универсального определения термина «генетическая инженерия» к настоящему времени не существует. Приведем несколько определений этого термина.

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

Генетическую инженерию составляет система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем искусственные генетические структуры в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК (Э. С. Пирюзян).

Генная (генетическая) инженерия – комплекс молекулярно-генетических методов, с помощью которых можно осуществлять целенаправленное конструирование организмов путем различных операций над информационными молекулами (В. Н. Рыбчин).

Генетическая инженерия базируется на технологии рекомбинантных молекул ДНК, главным экспериментальным подходом которой является клонирование генов.

В настоящее время термины «генетическая инженерия» и «генная инженерия» употребляются как синонимы. Однако их смысловое содержание несколько различается. Под «генной инженерией» следует понимать работу с генами, под «генетической инженерией» – не только создание, но и использование новых генетических программ.

Возникновению и развитию генетической инженерии способствовал целый ряд научных открытий XX в. в области биохимии, молекулярной биологии и молекулярной генетики. Перечислим ключевые из них.

В 1944 г. О. Эйвери, К. Маклеод и М. Маккарти доказали роль ДНК как носителя генетической информации.

В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик расшифровали структуру ДНК.

В 1955 г. Ф. Сэнгер, Э. Томпсон и Х. Таппи разработали метод секвенирования белков.

В 1956 г. А. Корнберг описал фермент ДНК-полимеразу.

В 1957 г. А. Тодд разработал способ синтеза нуклеотидов.

В 1961–1965 гг. М. Ниренберг, Х. Корана и Р. Холли расшифровали генетический код.

В 1961 г. А. Мармур и П. Доти открыли явление ренатурации ДНК и установили точность и специфичность реакции гибридизации нуклеиновых кислот.

В 1961–1969 гг. В. Арбер, Д. Натанс и Х. Смит обнаружили рестрикционные ферменты.

В 1968 г. М. Мезельсон и Р. Юань выделили первую рестриктазу из штамма *Escherichia coli* K12.

В 1967 г. М. Геллертом открыта ДНК-лигаза.

В 1970 г. Х. Темин и Д. Балтимор открыли процесс обратной транскрипции.

«Рождение» генетической инженерии произошло в 1972–1973 гг. В 1972 г. в США в лаборатории П. Берга была получена первая рекомбинантная молекула ДНК с искусственно созданными «липкими» концами.

В 1973 г. С. Коэн и Х. Бойер показали, что фрагменты ДНК можно получить путем обработки ее молекул рестрицирующими эндонуклеазами.

В 1975–1977 гг. Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам и У. Гилберт разработали методы определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) ДНК.

В 1978 г. М. Смит описал метод сайт-специфического мутагенеза.

В 1981 г. создано первое трансгенное животное – мышь.

В 1981 г. в США зарегистрировано первое лекарство – рекомбинантный человеческий инсулин, вырабатываемый бактериальными клетками.

В 1981 г. проведена первая генетическая трансформация растительной клетки петунии.

В 1982 г. разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных молекул ДНК.

В 1983 г. получено первое генетически модифицированное растение табака.

В 1985 г. К. Муллис использовал метод полимеразной цепной реакции для амплификации ДНК.

В 1986 г. впервые с помощью генной инженерии создана вакцина против гепатита В.

В 1990 г. в США утвержден план мероприятий по испытанию генной терапии с использованием соматических клеток человека.

В 1996 г. осуществлена коммерциализация первых генетически модифицированных сельскохозяйственных культур (кукурузы, сои, хлопчатника) в США, Мексике, Канаде, Аргентине, Австралии, Китае.

В 1996 г. определена нуклеотидная последовательность всех хромосом эукариотического организма (*Saccharomyces cerevisiae*).

В 1997 г. проведено клонирование овцы Долли с помощью переноса ядра в соматическую клетку.

В 1998 г. впервые создана генетическая карта животного организма (дождевого червя).

В 2000 г. проведено полное картирование генома растения (*Arabidopsis thaliana*).

В 2001 г. создана первая полная генетическая карта сельскохозяйственного растения (риса).

В 2002 г. создана практически полная генетическая карта человека.

С 2008 г. стартовали различные геномные проекты, направленные на секвенирование геномов растений, животных, грибов, пищевых патогенов, пациентов, страдающих от рака, редких генетических заболеваний и др.

На стыке технологии рекомбинантных ДНК и биотехнологии возникла молекулярная биотехнология. Молекулярная биотехнология использует достижения молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, биофизики, генетики, химической инженерии, клеточной биологии для создания технологий получения новых медицинских препаратов (диагностических, лекарственных средств, вакцин), устойчивых высокоурожайных культурных растений и высокопродуктивных сельскохозяйственных животных.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение термина «генетическая инженерия».
2. Какие научные открытия способствовали развитию генетической инженерии?
3. Какова роль генетической инженерии в развитии биотехнологии?

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРОЕКТОВ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА



2.1. Основные этапы генно-инженерных проектов

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

Работы в области генетической инженерии (генно-инженерные проекты) включают следующие основные этапы:

- 1) получение нужного гена (целевого гена, гена-мишени);
- 2) встраивание гена-мишени в генетический элемент (генетический вектор), способный к репликации, с образованием рекомбинантной ДНК (далее – рДНК);
- 3) введение рДНК (гена, входящего в состав вектора) в клетку хозяина (целевую клетку, организм-реципиент);
- 4) идентификация (скрининг и селекция) целевых клеток, несущих рДНК (ген-мишень).

Ген-мишень (целевой ген) можно получить несколькими способами: путем его выделения из изолированной ДНК с помощью рестрицирующих эндонуклеаз; путем химико-ферментативного синтеза олигонуклеотидов с их последующей сшивкой; созданием гена на основе изолированной матричной РНК (далее – мРНК) с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы); а также методом полимеразной цепной реакции.

Генетические векторы – это, как правило, кольцевые молекулы ДНК, способные к самостоятельной репликации. В качестве векторов используют плазмиды и вирусы. Более широкое применение нашли бактериальные плазмиды, особенно плазмиды *Escherichia coli* (далее – *E. coli*). Векторы для клонирования (клонирование векторы) конструируют специально, вводя в них участки (сайты) узнавания рестриктаз, разрезающих полинуклеотидные цепи кольцевых молекул векторов. Линеаризованная молекула вектора содержит «липкие» (комплементарные) концы, взаимодействующие с «липкими» концами гена-мишени. Комплементарные концы вектора и гена сшивают ДНК-лигазой, и полученная рДНК замыкается с образованием единой кольцевой молекулы.

При конструировании векторов в них вводят гены-маркеры, кодирующие легко распознаваемые признаки, по которым на четвертом этапе генно-инженерного проекта можно отобрать клетки-носители вектора.

Рекомбинантную ДНК вводят в хозяйскую (бактериальную) клетку по механизму трансформации. Искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК называют трансфекцией.

Идентификацию реципиентных клеток, которые приобрели целевой ген, проводят в две стадии. На первой стадии по генам-маркерам отбирают клетки, несущие вектор, а на второй – клетки, несущие и вектор, и нужный ген. Для этого используют методы, основанные на непосредственном анализе ДНК целевых клеток, а также методы идентификации признака (белкового продукта), кодируемого геном-мишенью.

На рис. 1 показана схема основных (описанных выше) этапов клонирования рДНК.

В следующих разделах учебного пособия этапы генно-инженерных проектов рассматриваются более подробно.

2.2. Ферменты, применяемые в генетической инженерии

Важнейшими инструментами генно-инженерных проектов, позволяющими создавать новые молекулы ДНК, являются очищенные, как правило, рекомбинантные ферменты. Их получают из штаммов *E. coli*, несущих клонированные гены, отвечающие за синтез молекул этих ферментов. К ним относят рестриктазы, полимеразы, лигазы, нуклеазы, фосфатазы и др. Рассмотрим наиболее широко применяемые в генетической инженерии ферменты.

Рестриктаза

Для бактериальных клеток характерно наличие R–M системы (системы рестрикции – модификации) – ферментов рестриктаз и ДНК-метиляз (ДНК-метилтрансфераз), препятствующих гидролизу собственной нуклеиновой кислоты. Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции, сайт-специфические эндонуклеазы) – ферменты, узнающие определенные последовательности нуклеотидов ДНК и разрезающие ее на фрагменты. Клеточная ДНК защищена от деградаци (рестрикции) штаммоспецифичной модификацией – метилированием определенных нуклеотидов в последовательности, узнаваемой сопряженной рестриктазой. Продуктами метилирования чаще всего являются 6-метиладенин и 5-метилцитозин. Чужеродная ДНК, проникая в клетку, подвергается воздействию и рестриктаз, и метилаз. R–M система бактерий защищает их от инфицирования фагами, а также, вероятно, обеспечивает относительную генетическую изоляцию (ограничение скрещивания между видами и штаммами) с возможностью генетической рекомбинации.

Первая рестриктаза была выделена М. Мезельсоном и Р. Юанем из штамма *E. coli* K12 в 1968 г.

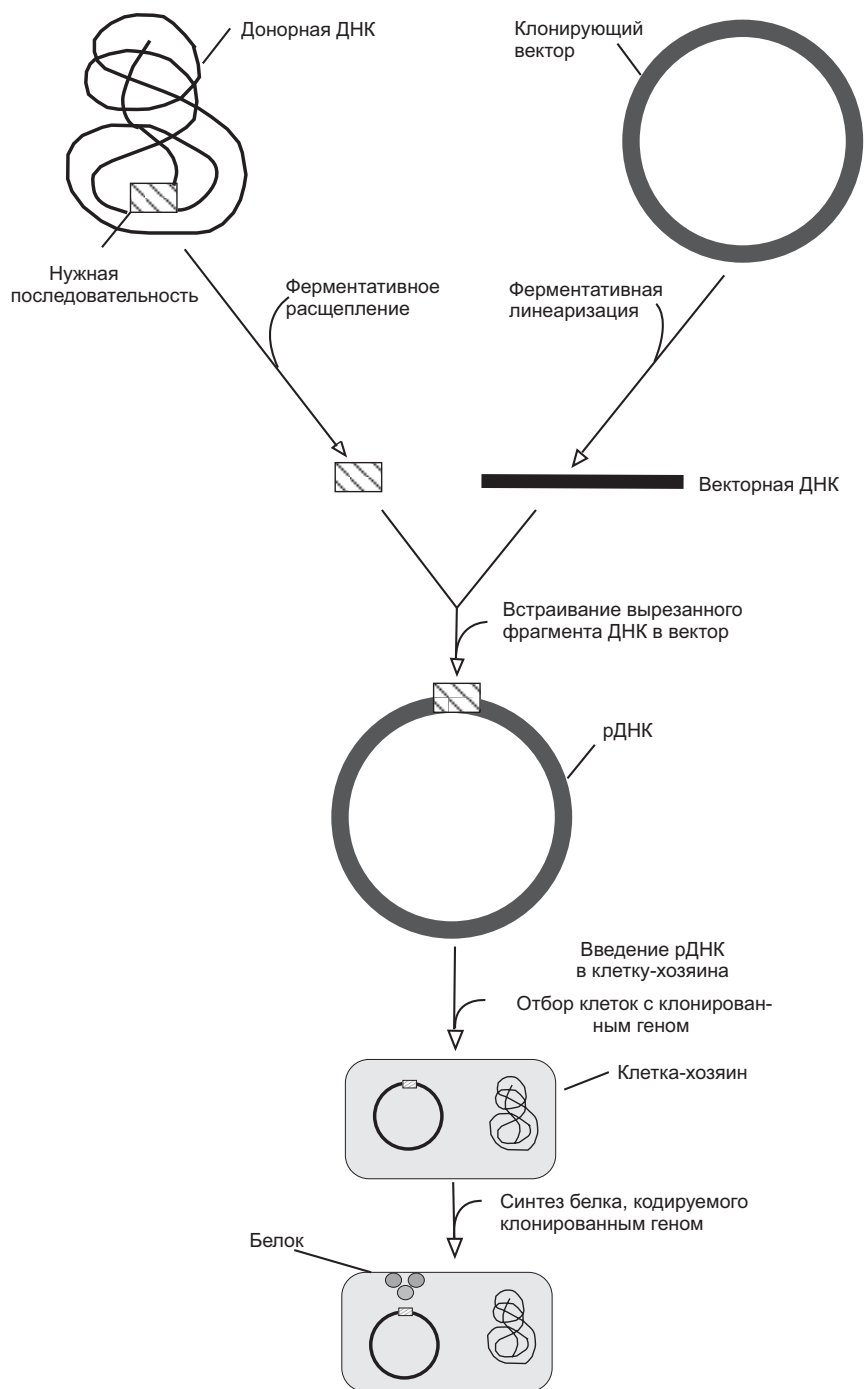


Рис. 1. Клонирование рДНК

Применение рестриктаз в генетической инженерии связано с их высокой специфичностью и возможностью получения строго определенных наборов фрагментов ДНК с комплементарными («липкими») концами.

Номенклатура рестриктаз (Д. Натанс, Г. Смит, 1973) происходит от бинарно-го родо-видового обозначения микроорганизма-хозяина, содержащего соответствующую R–M систему. Далее добавляется обозначение штамма или серотипа и порядковый номер (римские цифры) фермента, выделенного из этой клетки: EcoB, HindI, HindII, HindIII. В общем виде рестриктазы обозначаются буквой R, а метилазы – M. Если R–M система локализована в геноме плазмиды, то после родо-видового названия указывается символ плазмиды (EcoRI).

В табл. 1 представлены обозначения некоторых рестриктаз, их источники и узнаваемые последовательности нуклеотидов в ДНК-мишенях; стрелки обозначают участки расщепления (рестрикции).

Таблица 1

Примеры некоторых рестриктаз II класса

Фермент	Узнаваемая и гидролизуемая последовательность	Микроорганизм – источник фермента
VamHI	G↓GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
BglII	A↓GATCT	<i>Bacillus globigii</i>
EcoRI	G↓AATTC	<i>Escherichia coli</i> RY13
EcoRII	↓CC(A/T)GG	<i>Escherichia coli</i> R245
HindIII	A↓AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
Sau3AI	↓GATC	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A

Рестриктазы классифицируют на три класса по характеру расщепления ДНК и потребности в кофакторах.

Рестриктазы I класса узнают строго специфичные последовательности нуклеотидов, но осуществляют расщепление ДНК случайным образом на расстоянии 400–7000 п. н. от сайта узнавания. Молекулы рестриктаз I класса (M_r 400–600 кДа) – олигомеры, состоящие из трех типов субъединиц с активностями эндонуклеазы, метилазы и узнавания специфической последовательности нуклеотидов. В качестве кофакторов они используют АТФ, S-аденозилметионин, ионы магния. Расщепление ДНК сопряжено с гидролизом АТФ.

Рестриктазы II класса (табл. 1) выделяются в индивидуальном состоянии (свободны от метилазной активности). Они узнают последовательности ДНК длиной 4–8 п. н. – палиндромы (последовательности-перевертыши, идентичные в обеих цепях при прочтении в направлении 5' → 3') и расщепляют нуклеиновую кислоту внутри сайта узнавания. Одни рестриктазы II класса вносят разрывы в цепи ДНК наискось друг от друга (несимметрично), при этом образуются фрагменты ДНК с взаимокплементарными одноцепочечными «липкими» концами (рис. 2). Рестриктаза EcoRI узнает гексануклеотид и вносит разрыв в сахаро-фосфатную связь между остатками гуанина и аденина в каждой цепи. Другие ре-

стриктазы расщепляют ДНК по оси симметрии сайта узнавания (сайта рестрикции), что приводит к образованию фрагментов ДНК с «тупыми» концами (рис. 3).

Молекулы рестриктаз II класса (M_r 50–100 кДа) представляют собой гомодимеры, кофакторами которых являются ионы магния.

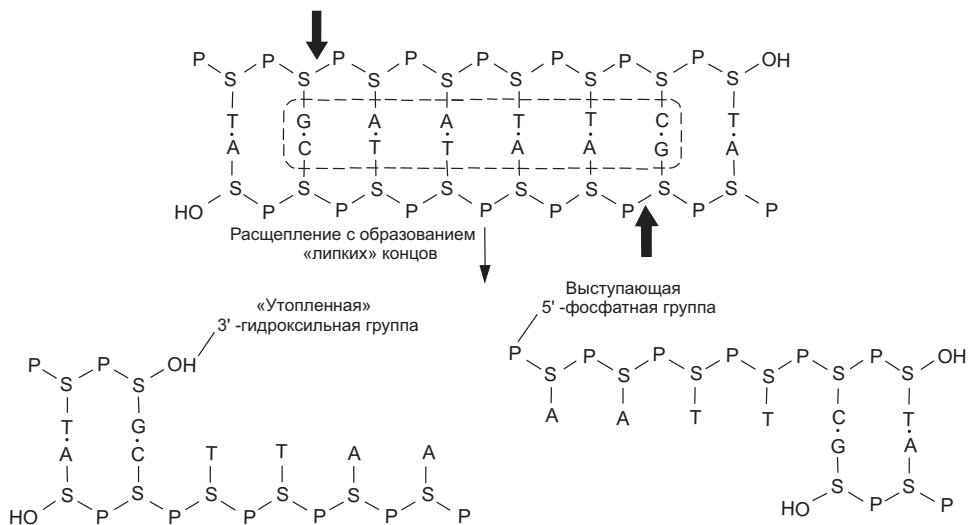


Рис. 2. Расщепление фрагмента ДНК рестриктазой EcoRI с образованием «липких» концов: S – дезоксирибоза; P – фосфатная группа; OH – гидроксильная группа; стрелками показаны связи, по которым происходит расщепление в сахаро-фосфатном остове ДНК; штриховой линией показан сайт рестрикции (узнавания)

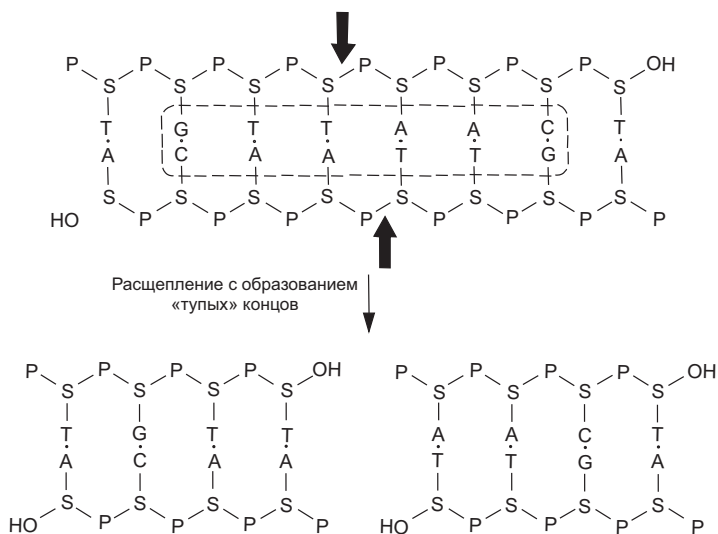


Рис. 3. Расщепление фрагмента ДНК рестриктазой HindIII с образованием «тупых» концов: S – дезоксирибоза; P – фосфатная группа; OH – гидроксильная группа; стрелками показаны связи, по которым происходит расщепление в сахаро-фосфатном остове ДНК; штриховой линией показан сайт рестрикции (узнавания)

После обработки различных молекул ДНК одной рестриктазой образуется строго определенный специфический набор ДНК с идентичными «липкими» концами. Если смешать фрагменты ДНК разного происхождения, то за счет комплементарного взаимодействия «липких» концов образуются новые комбинации молекул нуклеиновых кислот – рДНК. В связи с этим рестриктазы II класса являются наиболее часто используемыми ферментами генетической инженерии (см. разд. 2.3.1, 2.5).

Рестриктазы III класса обладают и эндонуклеазной, и метилазной активностями. Они, как и рестриктазы I класса, узнают непалиндромные последовательности ДНК и расщепляют ее в стороне от сайта узнавания на расстоянии 24–27 п. н. Их молекулы (200–300 кДа) состоят из двух различных субъединиц и используют в качестве кофакторов АТФ и ионы магния.

ДНК-лигаза

ДНК-лигаза – фермент, катализирующий синтез фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК. Он был открыт в 1967 г. ДНК-лигаза, синтезируемая в *E. coli*, использует в качестве кофактора дифосфопиридиннуклеотид. Для функционирования лигазы, синтезируемой в *E. coli* после инфицирования бактериофагом Т4, необходим АТФ. Особенностью ДНК-лигазы фага Т4 является ее способность сшивать двухцепочечные фрагменты ДНК с «тупыми» концами, поэтому она наиболее часто используется в генно-инженерных проектах (см. разд. 2.4, 2.5). Для реакции лигирования и «липких», и «тупых» концов необходимы ионы магния.

ДНК-полимераза I *E. coli*

Молекула ДНК-полимеразы I *E. coli* (103 кДа) – полипептидная цепь с тремя доменами: N-концевым с 5'–3'-эксонуклеазной активностью, С-концевым с 5'–3'-полимеразной активностью, средним с 3'–5'-эксонуклеазной активностью. Фермент был обнаружен в 1958 г. А. Корнбергом и его сотрудниками. ДНК-полимераза I *E. coli* связывается с одноцепочечными участками двойной цепи ДНК, в местах одноцепочечных разрывов, с концами двухцепочечных ДНК.

Для проявления 5'–3'-полимеразной активности необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и праймера (затравки) с 3'-ОН концом, комплементарного участку этой матрицы (см. разд. 2.3.3).

3'–5'-эксонуклеазная активность ДНК-полимеразы обеспечивает расщепление фосфодиэфирной связи в неспаренных участках ДНК (гидролиз с 3'-ОН конца). Она играет важную роль в обеспечении точности полимеризации ДНК, так как удаляет некомплемментарный (ошибочный) нуклеотид.

5'–3'-эксонуклеазная активность ДНК-полимеразы необходима для расщепления одной цепи (начиная со свободного 5'-конца) в спаренных участках ДНК с вырезанием до десяти нуклеотидных остатков.

Наличие полимеразной и экзонуклеазных активностей ДНК-полимеразы I *E. coli* обеспечивает процессы репарации поврежденной ДНК *in vivo*.

Ограниченный протеолиз молекулы ДНК-полимеразы I в присутствии субтилизина и трипсина приводит к ее разделению на фрагмент (35 кДа) с 5'–3'-экзонуклеазной активностью и фрагмент (68 кДа) с 5'–3'-полимеразной и 3'–5'-экзонуклеазной активностями. Последний называют фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Его используют для синтеза второй цепи на матрице одноцепочечной ДНК; для достраивания одноцепочечных 5'-концов двухцепочечной ДНК до «тупых»; для гидролиза одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК (см. разд. 2.3.3).

Обратная транскриптаза

Обратная транскриптаза (ревертаза) – это РНК-зависимая ДНК-полимераза, обнаруженная у ретровирусов в 1970 г. Х. Темином и С. Мизутани, а также Д. Балтимором. Обратная транскриптаза обладает ДНК-полимеразной, ДНК-эндонуклеазной активностями и активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК–ДНК. Молекула ревертазы ретровирусов птиц состоит из α -субъединицы (65 кДа с полимеразной и РНКазной активностями) и β -субъединицы (95 кДа с тремя видами активности). ДНК-полимеразная активность и активность РНКазы необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеазная – для встраивания ДНК вируса в геном хозяйской клетки.

Обратная транскриптаза осуществляет синтез ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрице в присутствии праймера (одноцепочечного фрагмента ДНК или РНК). В генетической инженерии ревертаза в основном применяется для синтеза комплементарной ДНК (далее – кДНК) на матрице мРНК при получении структурных генов эукариотических клеток (разд. 2.3.3).

Концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза

Концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (терминальная трансфераза), обнаруженная в 1962 г. Ф. Боллумом в тимусе телят, катализирует последовательное присоединение дезоксирибонуклеотидов к 3'-ОН-концу ДНК в присутствии ионов магния. С помощью этого фермента возможно получение молекул ДНК с гомополимерными одноцепочечными 3'-концами и образование гибридных молекул.

Поли(А)-полимераза *E. coli*

Поли(А)-полимераза *E. coli*, открытая в 1973 г. А. Сиппелом, катализирует присоединение к свободному 3'-ОН концу одноцепочечных молекул РНК поли(А)-последовательностей. Она используется для получения кДНК с помощью РНК-матрицы.

2.3. Методы получения генов

2.3.1. Использование рестриктаз II класса для получения генов

С помощью рестриктаз II класса осуществляют фрагментацию изолированной ДНК по специфическим сайтам рестрикции, что приводит к образованию фрагментов ДНК с «липкими» или «тупыми» концами (см. разд. 2.2, рис. 2 и 3).

Рестриктазы, узнающие последовательности из четырех пар нуклеотидов, называют мелкощепящими, а рестриктазы, узнающие сайты из шести и более пар нуклеотидов, – крупнощепящими. Частота встречаемости в ДНК определенного тетра- или пентануклеотида выше, чем гексануклеотида. Поэтому мелкощепящие рестриктазы вносят в молекулы ДНК больше разрывов, чем крупнощепящие.

Рестриктазы, выделенные из различных источников, которые узнают одну и ту же нуклеотидную последовательность и при гидролизе дают одинаковый набор фрагментов определенной ДНК, называют изошизомерами.

Для того, чтобы фрагментация ДНК происходила по всем сайтам узнавания, используют небольшой избыток рестриктазы. Нарушение специфичности действия рестриктаз наблюдается в присутствии высоких концентраций фермента, ионов марганца и органических растворителей, а также при снижении уровня ионной силы и повышении рН раствора.

Фрагменты ДНК после рестрикции можно разделить методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле, окрасить (обычно используют этидиум бромид) и определить их размеры с помощью наборов фрагментов ДНК с известной молекулярной массой (маркеров). Крупные фрагменты ДНК, соответствующие по размерам хромосомам прокариот и низших эукариот (10–10 000 килобаз, кб, kb), разделяют методом пульс-электрофореза (электрофореза в пульсирующем поле).

Для идентификации определенного фрагмента ДНК после электрофореза его из геля переносят на мембрану (нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр) и анализируют путем гибридизации с меченым зондом. Перенос ДНК из геля на фильтр называют Саузерн-блоттинг, а перенос РНК – Нозерн-блоттинг.

После получения коллекции фрагментов ДНК их вводят в соответствующие векторы, получают рДНК и трансформируют ими клетки *E. coli*. Коллекция клонированных фрагментов геномной ДНК, размноженных в бактериях, называется геномной библиотекой (банком генов). После создания геномной библиотеки проводят скрининг всех колоний для выявления клеток, несущих целевой ген, обеспечивающий синтез нужного белка.

Следовательно, метод получения генов с помощью рестриктаз типа II имеет ряд недостатков, связанных с трудностью подбора рестриктазы, позволяющей вырезать из ДНК нужный ген, необходимостью анализа большого банка клонов и высокой трудоемкостью.

Рестриктазы применяют не только для выделения фрагментов ДНК, но и для построения физических карт ДНК – порядка следования сайтов рестрикции вдоль молекулы. Для этого используют частичную рестрикцию, т. е. проводят неполный гидролиз ДНК путем уменьшения количества фермента и (или) времени реакции. Положение рестрикционных сайтов находят после определения размеров полученных фрагментов ДНК методом электрофореза. Другим подходом для построения физических карт ДНК является совместное и раздельное использование двух рестриктаз. Анализируют соответствие между положением сайтов рестрикции и размерами фрагментов при всех вариантах гидролиза ДНК.

2.3.2. Методы химико-ферментативного синтеза двухцепочечных фрагментов ДНК

Наиболее распространенным методом химического синтеза ДНК является фосфорамидитный. Синтез олигонуклеотидов длиной около 50 звеньев осуществляют в твердой фазе: растущая цепь ДНК фиксируется на твердом носителе. В реакционную смесь ДНК-синтезатора в строго заданной последовательности вводят модифицированные дезоксирибонуклеозиды и реагенты для присоединения мономеров к растущей цепи ДНК. Модификация нуклеозидов необходима для защиты их от нежелательных побочных реакций. К аминогруппам дезоксиаденозина и дезоксицитидина присоединяют бензольную группу, к аминогруппе дезоксигуанозина – изобутирильную. Тимидин не модифицируют, так как у него отсутствует аминогруппа.

Первый нуклеозид фиксируют на инертном твердом носителе (пористые стеклянные шарики с порами одного размера). К стеклянному шартику путем ковалентного связывания присоединена спейсерная молекула. За счет 3'-гидроксильной группы первый нуклеозид связывается со спейсером (рис. 4). 5'-гидроксильная группа нуклеозида защищена от нежелательных химических взаимодействий с помощью диметокситритильной (далее – ДМТ) группы.

Каждый следующий присоединяемый к комплексу нуклеозид (начиная со второго) имеет ДМТ-группу и диизопропиламинную группу, присоединенную к 3'-фосфитной группе, защищенной метильным остатком (Me). Такая структура называется фосфорамидитом (рис. 5).

Первым этапом цикла является присоединение первого нуклеозида к стеклянному шартику. Затем колонку промывают ацетонитрилом для удаления воды и продувают аргоном для вытеснения ацетонитрила. Далее проводят отщепление ДМТ-группы с помощью трихлоруксусной кислоты (далее – ТХУ) для высвобождения реакционноспособной 5'-ОН-группы нуклеозида (рис. 6).

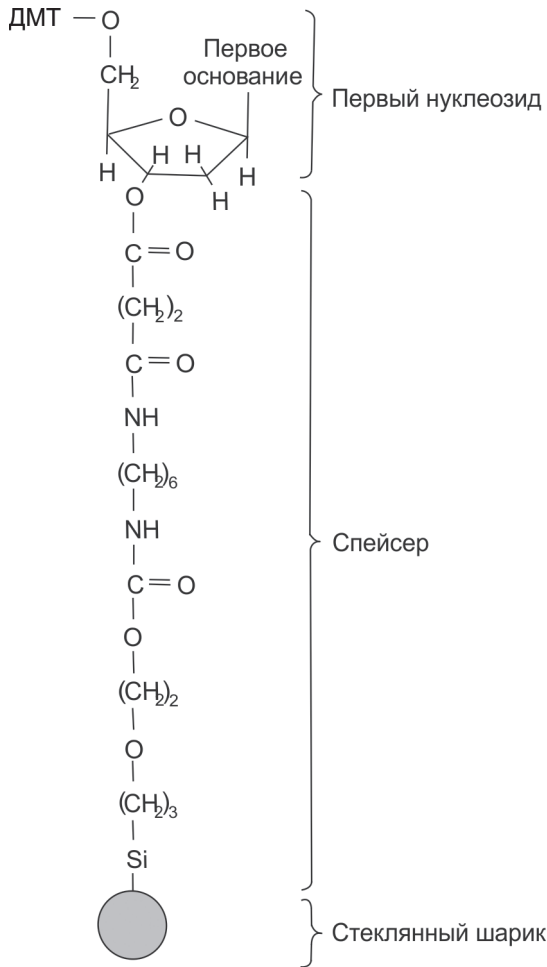


Рис. 4. Комплекс, с которого начинается химический синтез цепи ДНК

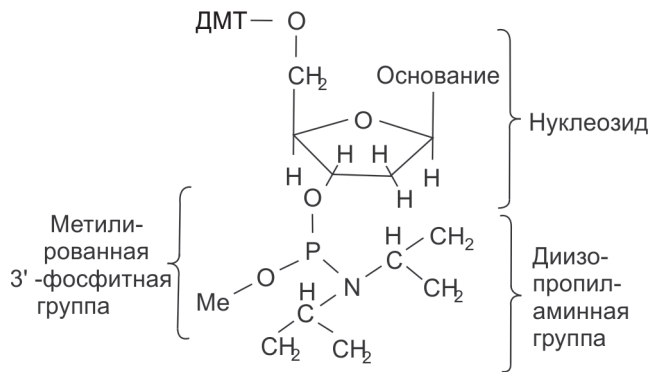


Рис. 5. Структурная формула фосфорамидита

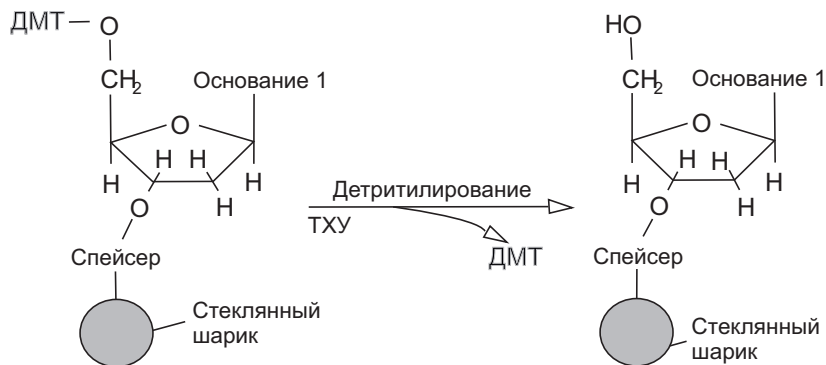


Рис. 6. Детритилирование – отщепление 5'-диметокситритильной группы с помощью ТХУ

Колонку промывают ацетонитрилом и продувают через нее аргон.

Следующим этапом цикла является активация фосфорамидита тетразолом и присоединение 3'-фосфитной группы за счет ковалентной связи к 5'-гидроксильной группе первого нуклеозида (рис. 7).

Далее вновь проводят отмывание. Для предотвращения участия в химических реакциях непрореагировавших в первом цикле детритилированных нуклеозидов их свободные 5'-гидроксильные группы ацетируют с помощью уксусного ангидрида и кэпируют с помощью диметиламинопиридина.

Следующий этап цикла – окисление фосфиттриэфира с помощью йодной смеси до фосфаттриэфира с целью стабилизации фосфодиэфирной связи между нуклеозидами. Затем колонку промывают и повторяют цикл.

После присоединения последнего нуклеозида метильные группы удаляют, отсоединяют олигонуклеотиды от спейсерной молекулы и элюируют. Удаляют бензоильные, изобутирильные и ДМТ-группы. 5'-конец цепи фосфорилируют с помощью полинуклеотидкиназы Т4 в присутствии АТФ или химическим способом.

Обычно эффективность присоединения нуклеотидов на каждом этапе – 95 %. Необходимо использовать реактивы очень высокой степени чистоты и контролировать синтез олигонуклеотидов заданной длины (очищать их методом высокоэффективной хроматографии или электрофореза в полиакриламидном геле).

Синтезированные олигонуклеотиды применяют в качестве зондов при ДНК-гибридизации (длина зонда 20–40 нуклеотидов), линкеров и адапторов (6–12 нуклеотидов) для соединения различных молекул ДНК при клонировании, праймеров (17–24 нуклеотида) при секвенировании ДНК и осуществлении полимеразной цепной реакции, а также сайт-специфического мутагенеза.

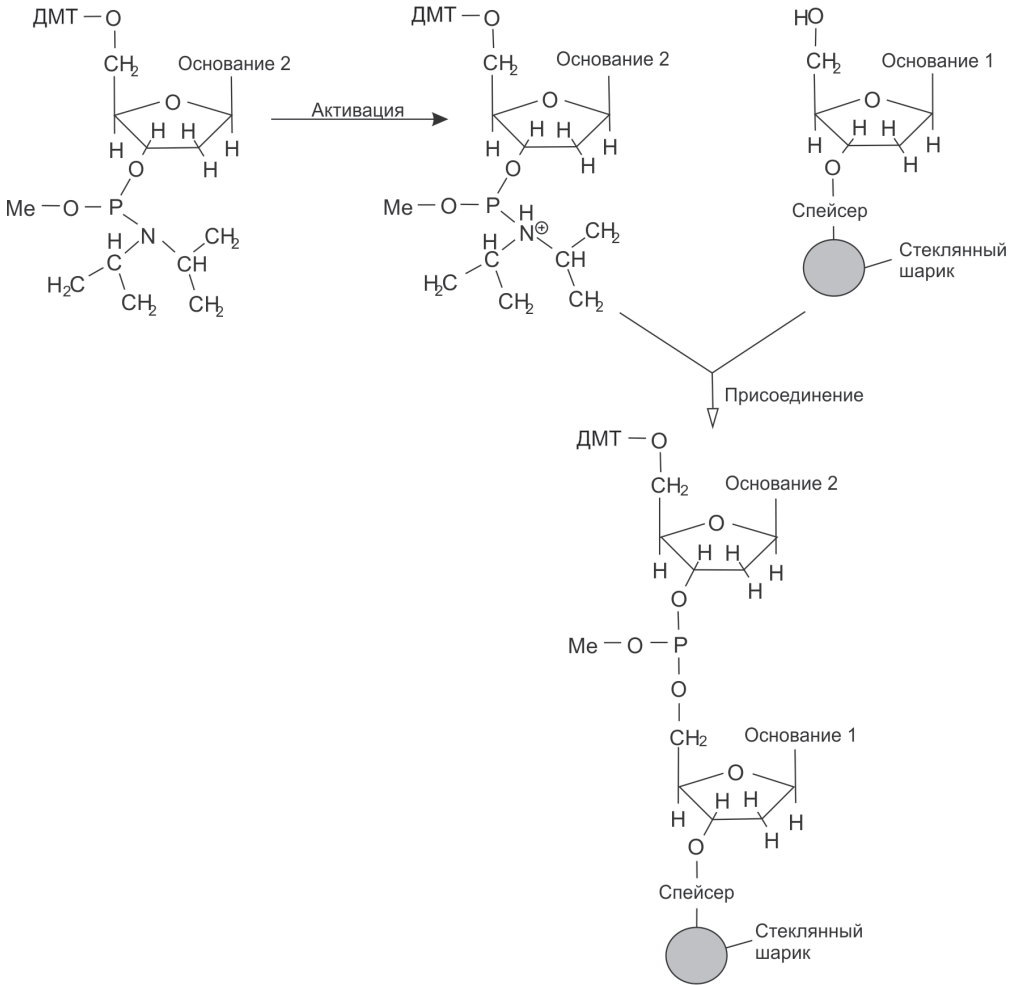


Рис. 7. Активация фосфорамидита и присоединение 3'-фосфитной группы

Олигонуклеотиды, полученные химическим методом, используют для конструирования синтетических генов. Для этого синтезируют олигонуклеотиды длиной 20–60 звеньев с перекрывающимися концами и проводят реакцию отжига – образование двухцепочечных молекул из одиночных комплементарных цепей. Одноцепочечные разрывы сшивают ДНК-лигазой Т4. При получении полноразмерных генов после проведения отжига возможно образование брешей, которые заполняют с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* и сшивают одноцепочечные разрывы ДНК-лигазой Т4 (рис. 8).

Для того чтобы получить ген путем химико-ферментативного синтеза, необходимо знать нуклеотидную последовательность этого гена.

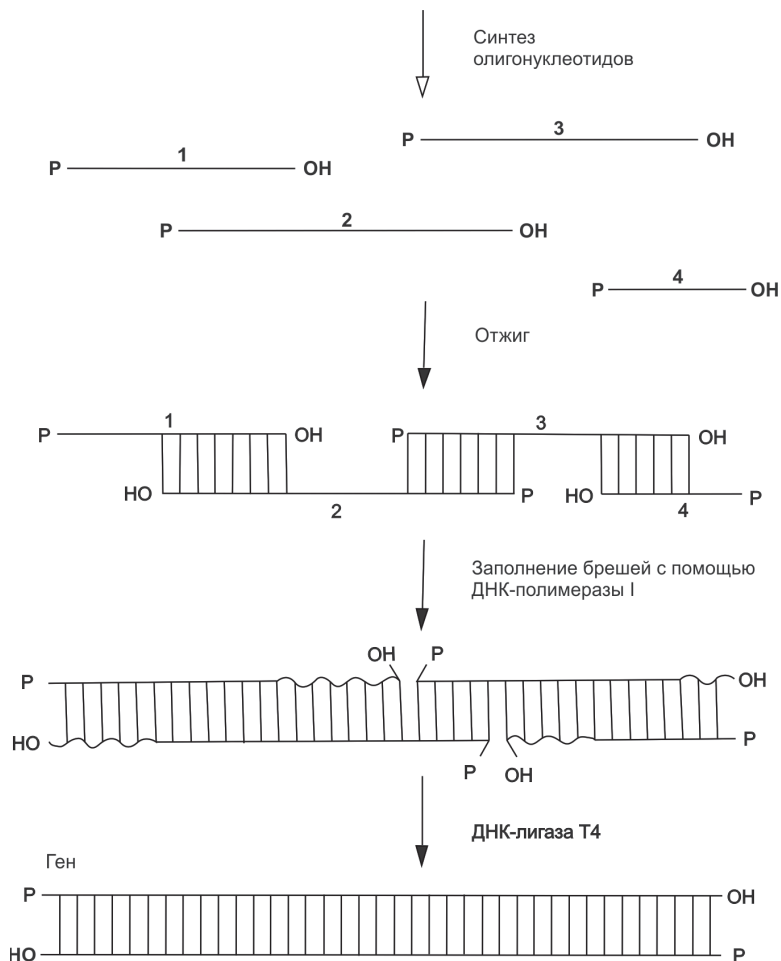


Рис. 8. Сборка протяженного гена *in vitro* с участием ферментов

2.3.3. Получение структурных генов эукариот

Для получения генов из ДНК эукариотических клеток и последующего клонирования в бактериальных клетках нельзя использовать рестриктазы, так как прокариоты не способны удалять интроны из первичных РНК-транскриптов. Синтез нужного белка будет невозможен. Поэтому целевой ген получают на основе изолированной мРНК.

Молекулы эукариотических мРНК имеют особенности: на их 3'-конце находится полиадениловый «хвост» (poly(A)-«хвост») из ~ 200 остатков аденозина, а на 5'-конце – «кэп» («шапочка») из остатка гуанозина (часто метилированного). Наличие полиаденилового «хвоста» позволяет выделить мРНК из смеси с рибо-

сомальной РНК (далее – рРНК) и транспортной РНК (далее – тРНК) на колонке, заполненной носителем (целлюлозой) с ковалентно присоединенными олигонуклеотидными цепочками из ~ 15 остатков тимидина (oligo(dT)). Полиадениловые «хвосты» мРНК взаимодействуют с олиготимидиловыми цепочками и задерживаются на колонке. Затем колонку промывают буфером, при этом водородные связи между аденином и тимином разрываются, и мРНК элюируется с колонки.

Матричную РНК (рис. 9) используют для синтеза кДНК. Сначала в реакционную смесь к мРНК добавляют праймер – oligo(dT). Полиадениловый «хвост» мРНК взаимодействует с oligo(dT), на 3'-конце которого находится гидроксильная группа, инициирующая синтез кДНК. Для образования кДНК нужны вирусная обратная транскриптаза (ревертаза) и четыре типа дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP). В условиях *in vitro* синтез кДНК идет не до конца, обратная транскриптаза «поворачивает вспять» и образует «шпильку» из нескольких нуклеотидов с 3'-ОН-концом.

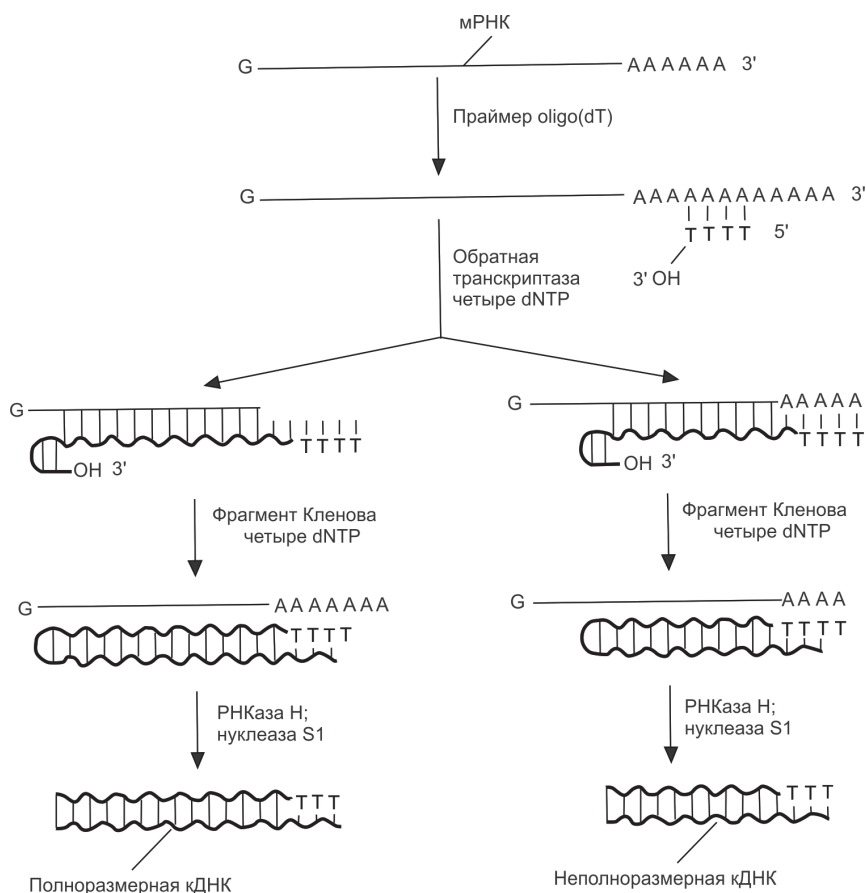


Рис. 9. Синтез кДНК на матрице мРНК

Далее в реакционную смесь добавляют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*, встраивающий вторую цепь ДНК из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по принципу комплементарности. После образования двухцепочечной ДНК мРНК гидролизуют РНКазой H, а одноцепочечные концы ДНК отщепляют с помощью нуклеазы S1. Получаются линейные молекулы ДНК с «тупыми» концами без «шпилек» (рис. 9).

Разные молекулы кДНК можно встраивать в плазмидные векторы и получать библиотеку кДНК с дальнейшим выявлением клонов, несущих полноразмерные гены, обеспечивающие синтез целевого белка.

2.3.4. Амплификация последовательностей ДНК *in vitro*: полимеразная цепная реакция и ее применение

Полимеразная цепная реакция (далее – ПЦР), разработанная в середине 80-х гг. XX в., – метод амплификации фрагментов нуклеиновых кислот *in vitro*, который позволяет получать в течение нескольких часов миллионы копий нуклеотидных последовательностей. В 1993 г. К. Муллису была присуждена Нобелевская премия за разработку этого метода. ПЦР иногда называют бесклеточным молекулярным клонированием.

Для ПЦР ДНК-мишени длиной 100–35 000 п. н. (рис. 10) необходимы два синтетических олигонуклеотидных праймера P1 и P2 (длиной ~ 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК (1' и 2') из противоположных цепей, фланкирующим (ограничивающим) целевую последовательность нуклеотидов. Праймеры обычно получают путем химического синтеза. Если неизвестны пограничные участки генов, используют случайные праймеры, которые могут связываться с ДНК.

В ходе проведения ПЦР происходит многократное повторение трех реакций: денатурации, ренатурации и синтеза (рис. 10). ПЦР автоматизирована с помощью термоциклеров с термоблоками, в которых возможно изменение времени, температуры и числа циклов. Процедура ПЦР, состоящая из 30 и более циклов, занимает 3–4 ч.

Денатурация – первый этап ПЦР, в ходе которого осуществляется тепловая денатурация ДНК (при 95 °С в течение минуты). В результате противоположные цепи ДНК разъединяются (рис. 10). В реакционной смеси в избытке находятся два праймера (P1 и P2), термостабильная ДНК-полимераза Taq (сохраняет активность при 95 °С и выше) из термофильных бактерий *Thermus aquaticus* и четыре типа дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP).

Ренатурация (отжиг или гибридизация праймеров) – второй этап ПЦР, при котором температуру реакционной смеси снижают до ~ 55 °С (50–60 °С). Праймеры P1 и P2 комплементарно спариваются с фланкирующими последовательностями 1' и 2' (P1 – с 1' и P2 – с 2') двух противоположных цепей ДНК (рис. 10).

Синтез – третий этап ПЦР, при осуществлении которого температуру повышают до 72–75 °С (температура оптимума активности *Taq*-полимеразы). Происходит синтез комплементарных цепей ДНК, начинающийся с 3'-гидроксильных концов праймеров. В результате образуются «длинные матрицы» – новосинтезированные цепи с длиной, превышающей расстояние от 3'-гидроксильной группы ее праймера до конечного нуклеотида последовательности, комплементарной второму праймеру (рис. 10). На «длинных матрицах» осуществляется дальнейший синтез фрагментов ДНК.

Во время второго раунда (рис. 11) проводят тепловую денатурацию ДНК, состоящей из исходной и новосинтезированной («длинная матрица») цепей. Далее осуществляется отжиг праймеров и синтез. При этом образуются «длинные матрицы» и определенное количество цепей с праймером на одном конце и с последовательностью, комплементарной второму праймеру, на другом («короткие матрицы»).

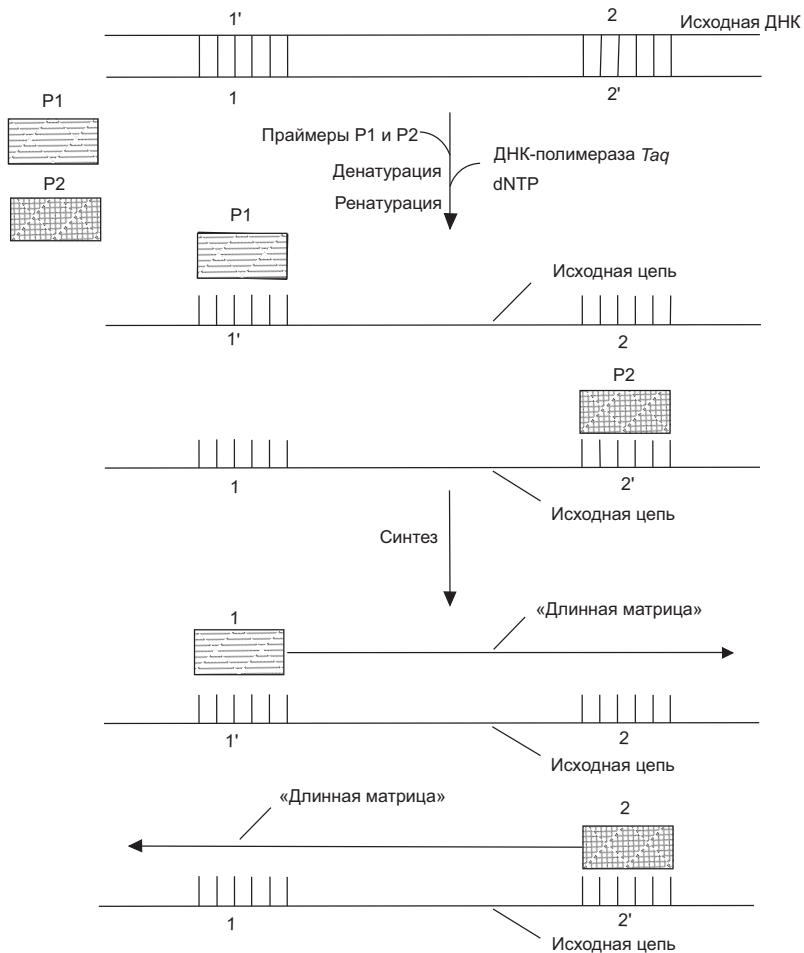


Рис. 10. Первый раунд ПЦР

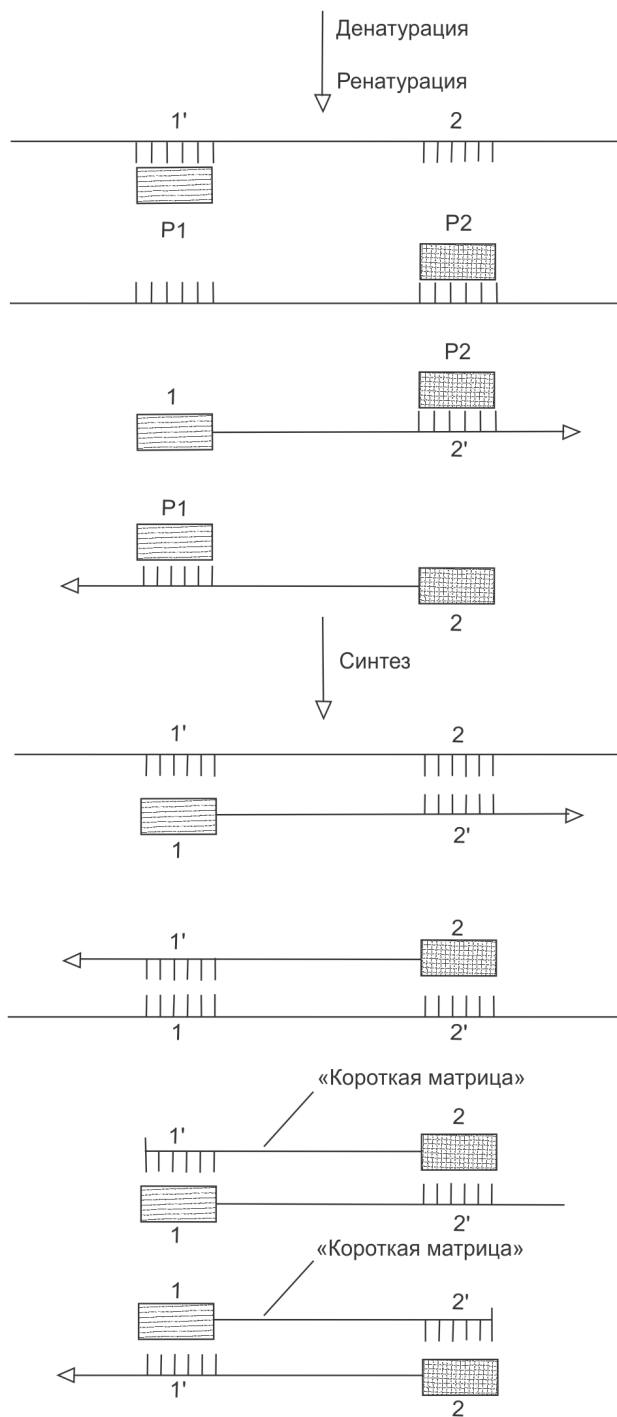


Рис. 11. Второй раунд ПЦР

Далее следуют другие раунды. На тридцатом раунде в реакционной смеси содержатся практически только «короткие матрицы» (рис. 12).

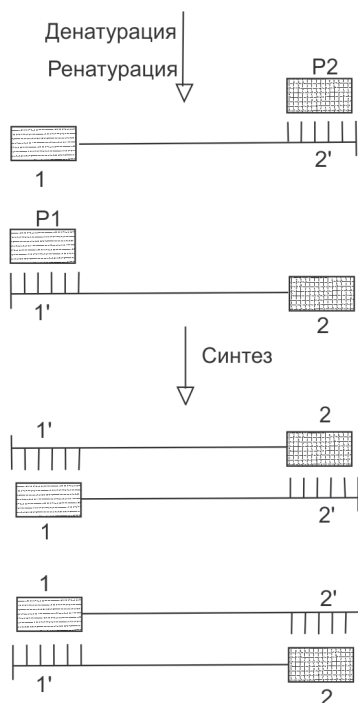


Рис. 12. Тридцатый раунд ПЦР

Для анализа продуктов ПЦР применяют метод электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле.

ПЦР используют для получения больших количеств фрагментов ДНК, амплификации 5'- и 3'-концов мРНК, синтеза генов, секвенирования ДНК, выявления мутаций и патогенных микроорганизмов в биологическом материале и диагностики инфекционных заболеваний. Ее преимуществом является возможность амплификации фрагментов ДНК из сложных смесей, что позволяет быстро осуществлять клонирование генов.

В случае дальнейшего применения ПЦР-продуктов для клонирования нужно учитывать особенность Таq-полимеразы: она синтезирует фрагменты ДНК с остатками аденозина на 3'-концах. Поэтому вектор для клонирования должен нести остатки тимина на своих 3'-концах. Недостатком Таq-полимеразы является отсутствие 3'-5'-экзонуклеазной активности и высокая частота ошибок (1 на 9000 нуклеотидов). Поэтому для высокоточного синтеза используют другие полимеразы.

С помощью ПЦР получают кДНК, соответствующие 3'- или 5'-концевым участкам специфических мРНК, которые могут быть использованы в качестве зондов для скрининга кДНК- и геномных библиотек.

Успех при проведении ПЦР во многом зависит от подбора праймеров, фланкирующих последовательность-мишень, их оптимальных размеров (18–30 нуклеотидов), температуры отжига. Также необходимо поддерживать высокую степень чистоты реактивов, посуды, воздуха.

ПЦР не заменяет методы молекулярного клонирования фрагментов ДНК, так как для ее осуществления нужно знать нуклеотидную последовательность гена или его фрагмента.

2.4. Векторные молекулы ДНК и их конструирование

Вектор – это самореплицирующаяся молекула ДНК, которая используется для переноса генов от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей. В качестве векторов в генетической инженерии применяют плазмидные и вирусные ДНК.

Вектор, который обеспечивает репликацию целевого гена в клетке-реципиенте, называют клонирующим или вектором для клонирования. К векторам для клонирования предъявляют требования:

- 1) наличие уникального сайта рестрикции для расщепления определенной рестриктазой, в который может быть осуществлена вставка (инсерция) гена-мишени;
- 2) наличие одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рДНК;
- 3) способность вектора к репликации, т. е. наличие сайта инициации репликации ориджин (ori).

Частным случаем векторов для клонирования являются экспрессирующие векторы, или векторы для экспрессии. Они обеспечивают эффективную экспрессию целевых генов в клетках-реципиентах. Экспрессирующие векторы содержат сильные промоторы для связывания с РНК-полимеразами хозяйских клеток, а также сигналы, обеспечивающие процессы трансляции в этих клетках.

Векторы, которые обеспечивают интеграцию целевого гена в геном клетки-реципиента, называют векторами для интеграции или интегративными (интегрирующими).

Челночные или шатл-векторы – это векторы, способные реплицироваться в клетках различных организмов.

Векторы специально конструируют с помощью методов генетической инженерии.

Плазмидные векторы

Плазмиды – внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. В генетической инженерии используются бактериальные плазмиды. Размеры плазмид варьируют от менее 1 до более 500 т. п. н.

На долю плазмид приходится 0,1–5 % суммарной ДНК клетки. Низкокопийные плазмиды представлены в клетке 1–4 копиями, высококопийные – 10–100 копиями. Большинство плазмид имеет узкий спектр (круг) хозяев (близкородственных видов) и соответственно специфичный сайт репликации. Плазмиды с менее специфичным сайтом инициации репликации могут реплицироваться в разных бактериальных клетках. Это плазмиды с широким спектром хозяев.

Часто плазмиды содержат гены, обеспечивающие селективное преимущество хозяйской клетке. К ним относятся гены устойчивости к антибиотикам, деградации сложных органических соединений, продукции бактериальных токсинов (энтеротоксинов, колицинов), ферментов рестрикции и метилирования. Эти гены могут быть использованы для идентификации клеток, содержащих рДНК.

История создания плазмидных векторов ведет свое начало с 1973 г. Первые векторы были несовершенными. В 1977 г. Ф. Боливар и Р. Родригес сконструировали широко используемый популярный вектор рBR322, на основе которого был создан целый ряд плазмид. Поэтому сейчас рBR322 называют «бабушкой» современных плазмид. Обозначение этого вектора соответствует стандартным требованиям к плазмидным векторам и включает буквы: «р» – плазмидный вектор; «BR» – первые буквы фамилий авторов вектора; число «322» – цифровое обозначение вектора из исследовательских протоколов его авторов. Длина рBR322 – 4361 п. н. Это высококопийный вектор. Он несет два маркерных гена устойчивости к антибиотикам – ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r), уникальные сайты рестрикции: для *Bam*HI, *Hind*III, *Sal*I в гене Tet^r , *Pst*I-сайт в гене Amp^r , один сайт для *Eco*RI, а также сайт инициации репликации (рис. 13).

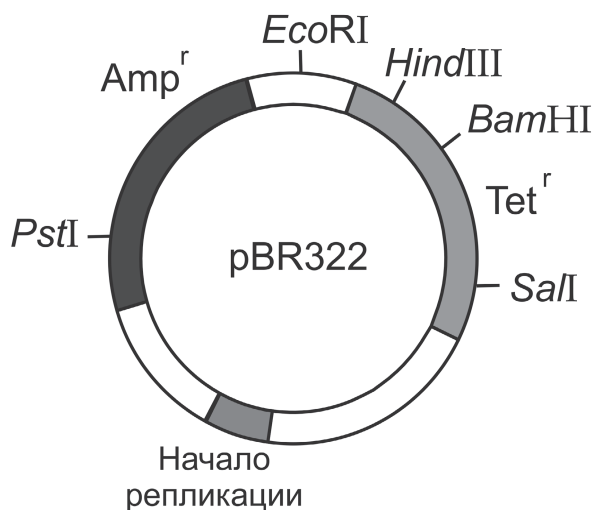


Рис. 13. Генетическая карта плазмидного вектора рBR322

Если разрезать рBR322 в сайте PstI и ввести туда целевой ген, то ген устойчивости к ампициллину будет инактивирован. Поэтому хозяйские клетки с целевым геном после клонирования будут чувствительны к ампициллину и устойчивы к тетрациклину. Если произвести вставку нужного гена в Tet^r, то это приведет к потере устойчивости к тетрациклину. Следовательно, на средах с антибиотиками легко выявить клетки, несущие целевой ген в составе плазмиды рBR322.

Впоследствии стали создавать векторы меньшего размера, так как с увеличением размера плазмиды эффективность переноса экзогенной ДНК в клетку-реципиент, а также стабильность и копияность векторов снижаются. Более современные векторы содержат полилинкеры (множественные сайты клонирования). Это векторы серии рUC. Полилинкер вектора рUC19 (длина вектора – 2686 п. н.) содержит последовательно расположенные сайты для 13 рестриктаз. Полилинкер векторов рUC находится внутри фрагмента гена *lacZ E. coli* (*lacZα*), кодирующего активную β-галактозидазу. Вставка нужного гена в полилинкер приводит к нарушению трансляции гена *lacZ* в плазмиде. Поэтому на средах с субстратом (производное галактозы) по изменению цвета колоний можно идентифицировать клетки, несущие интактные и модифицированные (т. е. содержащие целевой ген) плазмиды.

Итак, плазмидные векторы должны отвечать целому ряду требований: иметь уникальные сайты рестрикции (клонирования), селективные маркерные гены; обеспечивать репликацию в клетках хозяина (в частности, *E. coli*); сохранять стабильность после вставки чужеродного гена и в целевых клетках; легко передаваться в хозяйскую клетку путем трансформации.

Векторы на основе бактериофагов

Векторы на основе бактериофагов в отличие от плазмидных векторов предназначены для клонирования крупных фрагментов ДНК длиной более 10 т. п. н. Одними из таких векторов являются векторы на основе бактериофага λ *E. coli*.

При инфицировании *E. coli* бактериофагом λ могут реализоваться литический цикл (литическое развитие) и состояние лизогении (лизогенное развитие). При литическом развитии происходят интенсивное размножение фага и лизис клеток с высвобождением новых фаговых частиц. При лизогенном развитии молекула ДНК фага λ интегрирует в бактериальную хромосому и находится в ней в состоянии профага, реплицируется вместе с бактериальными генами. При неблагоприятных условиях интегрированная фаговая ДНК высвобождается и реализуется литический цикл развития.

В головке инфекционной фаговой частицы находится плотно упакованная ДНК длиной ~ 50 т. п. н. ДНК фага λ – линейная двухцепочечная молекула с одноцепочечными 5'-«хвостами» из 12 нуклеотидов («липкие» *cos*-концы). Эти *cos*-концы (сайты) комплементарны и могут соединяться друг с другом. После инфицирования *E. coli* *cos*-сайты соединяются с образованием кольцевой моле-

кулы. На ранних стадиях литического цикла осуществляется репликация кольцевой ДНК фага с образованием линейной молекулы, состоящей из нескольких сегментов длиной 50 т. п. н., соединенных *cos*-сайтами. Линейная молекула ДНК разрезается по *cos*-сайтам с образованием отдельных сегментов, попадающих в головку бактериофага. ДНК фага длиной ~ 20 т. п. н. отвечает за ее встраивание в ДНК клетки-хозяина *E. coli*. Поэтому этот участок может быть замещен на фрагмент чужеродной ДНК (целевой ген).

На основе бактериофага λ были созданы системы для клонирования генов (рис. 14).

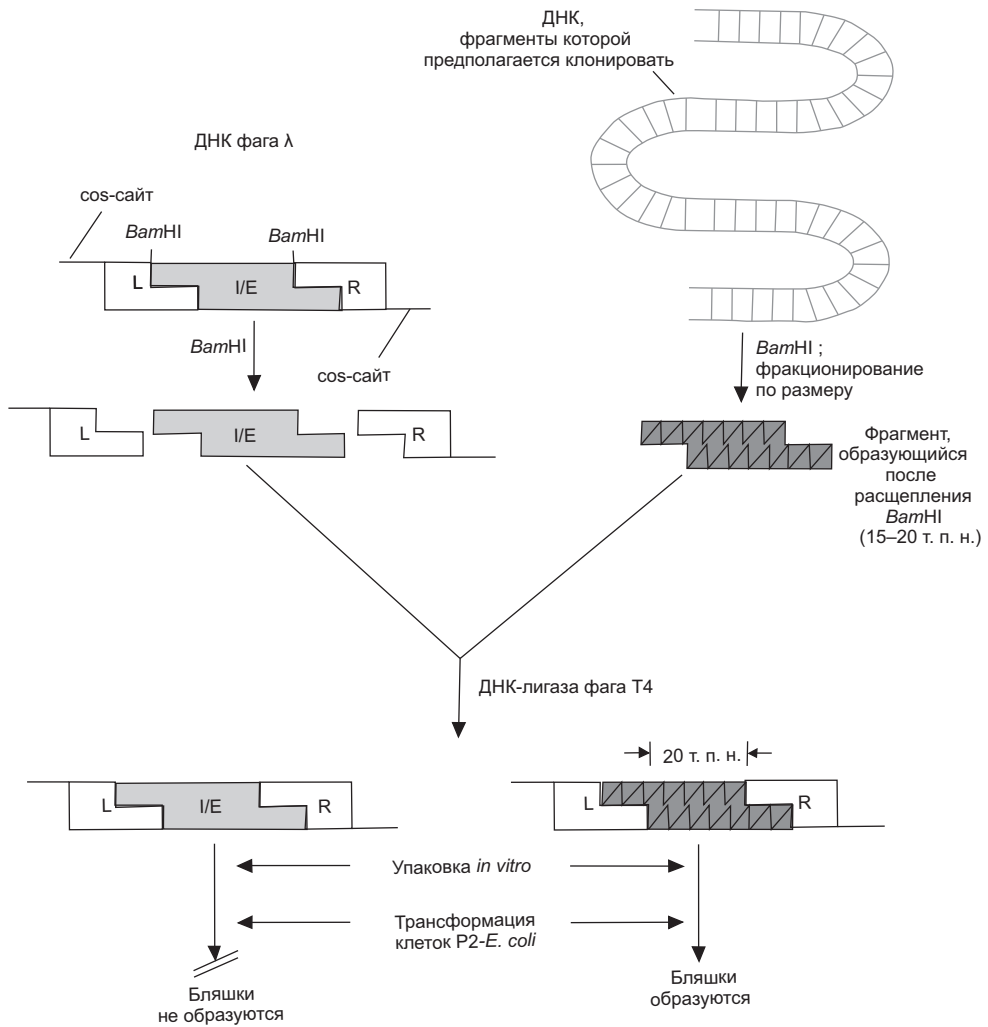


Рис. 14. Клонированная система на основе бактериофага λ

При этом ДНК бактериофага разрезают рестриктазой BamHI по сайтам рестрикции, фланкирующим участок длиной ~ 20 т. п. н. Этот участок I/E в дальнейшем заменяют целевым геном. Образуются три типа фрагментов: «левое плечо» L (содержит информацию о головке и отростке фага), «правое плечо» R (отвечает за репликацию ДНК и лизис клеток) и сегмент I/E (контролирует процессы интеграции и исключения при лизогении). Плечи очищают. Клонированную геномную ДНК также расщепляют BamHI и выделяют фрагменты длиной ~ 20 т. п. н. Препараты фаговой и клонируемой ДНК объединяют, обрабатывают ДНК-лигазой T4 и получают рекомбинантные молекулы (рис. 14). Затем добавляют пустые головки фага и собранные отростки. Рекомбинантные молекулы ДНК упаковываются в головки бактериофага и получают инфекционные фаговые частицы. В инфицированных клетках *E. coli* после интеграции в хромосому реплицируются и образуются инфекционные частицы, содержащие R- и L-области и клонированную вставку.

Космиды

Космиды – векторы, объединяющие свойства плазмидных векторов и векторов на основе фага λ. Они амплифицируются в *E. coli* как плазмиды. Примером является космида pLFR (~ 6 т. п. н.). Она имеет два *cos*-сайта фага λ, разделенных сайтом рестрикции для ScaI; полилинкер с сайтами рестрикции для HindIII, PstI, SalI, BamHI, SmaI, EcoRI; сайт инициации репликации (*ori*) и ген устойчивости к тетрациклину Tet^r.

Космида pLFR-5 интегрирует чужеродный ген длиной до 40 т. п. н. Геномную ДНК, предназначенную для клонирования, расщепляют рестриктазой BamHI. Выделяют фрагменты ДНК длиной ~ 40 т. п. н. Плазмидную ДНК pLFR-5 сначала расщепляют ScaI, а затем – BamHI (для образования концов, совместимых с концами фрагментов геномной ДНК). Полученные препараты клонируемой и векторной ДНК смешивают и лигируют. Продукты лигирования длиной ~ 50 т. п. н. могут упаковываться *in vitro* в головки фага λ с образованием инфекционных частиц. При инфицировании *E. coli* этими частицами в ее клетках окажется линейная молекула ДНК с *cos*-сайтами, которые спариваются друг с другом. Одноцепочечные разрывы в молекуле ДНК устраняются ДНК-лигазой *E. coli*. Образовавшаяся кольцевая молекула ДНК функционирует в *E. coli* как автономно реплицирующаяся единица. Трансформированные клетки отбирают по маркерному признаку – устойчивости к тетрациклину. Далее космиды выделяют как обычные плазмиды.

Преимущество космид по сравнению с плазмидами состоит в том, что в них можно встроить более протяженные фрагменты ДНК.

Фазмиды – гибриды между фагами и плазмидами, которые могут развиваться и как фаги, и как плазмиды. Они обладают меньшей емкостью по сравнению с космидами и создаются на основе фага P1.

Для клонирования очень крупных фрагментов ДНК длиной 100–300 т. п. н. используют искусственные бактериальные, фаговые или дрожжевые хромосомы. Примерами являются низкокопийный плазмидный вектор на основе бактериофага P1, бактериальная искусственная хромосома (далее – ВАС) на основе конъюгативной F-плазмиды (F-фактора или фактора фертильности) *E. coli* с системой *lacZ'* векторов pUC и дрожжевая искусственная хромосома. Исследователи ведут работы по созданию искусственных хромосом человека.

2.5. Методы получения рекомбинантных молекул ДНК

Коннекторный метод

Суть коннекторного метода получения рДНК состоит в достраивании с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы к двум рекомбинируемым фрагментам ДНК одноцепочечных oligo(dA)- и oligo(dT)-сегментов. При смешивании полученных фрагментов ДНК между комплементарными oligo(dA)- и oligo(dT)-сегментами образуются водородные связи и формируются кольцевые молекулы ДНК. Одноцепочечные бреши в рДНК достраивают с участием ДНК-полимеразы I *E. coli*, а две цепи сшивают ДНК-лигазой. Этот метод был впервые применен в 1972 г. П. Бергом, Д. Джексоном и Р. Саймонсом при получении рДНК, состоящей из ДНК вируса SV40 и ДНК фага λ.

Рестриктазно-лигазный метод

Рестриктазно-лигазный метод является наиболее распространенным методом получения рДНК. Он был впервые использован в 1973 г. группой ученых во главе с С. Коэном. Сначала с помощью рестриктазы специфически разрезают молекулы ДНК на фрагменты с комплементарными «липкими» концами. Их смешивают и осуществляют отжиг – образование двухцепочечных молекул из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей (рис. 15).

Цепи ДНК удерживаются вместе водородными связями, но в каждой полинуклеотидной цепи остаются одноцепочечные разрывы. Эти разрывы устраняются ДНК-лигазой T4 в присутствии АТФ. ДНК-лигаза T4 образует фосфодиэфирные связи между 5'-фосфатными и 3'-гидроксильными группами в местах разрывов в остове двухцепочечной ДНК (рис. 16). ДНК-лигаза сшивает и «липкие» (рис. 16, а), и «тупые» (рис. 16, б) концы.

Для уменьшения количества нежелательных продуктов лигирования (объединившихся между собой фрагментов исходной векторной ДНК) рестрицированную плазмидную ДНК обрабатывают щелочной фосфатазой (рис. 17). Последняя отщепляет от линеаризованной плазмидной ДНК 5'-фосфатные группы. В образовавшейся после отжига и лигирования рДНК имеются одноцепочечные разрывы, которые устраняются системой лигирования клетки-хозяина после трансформации (рис. 17).

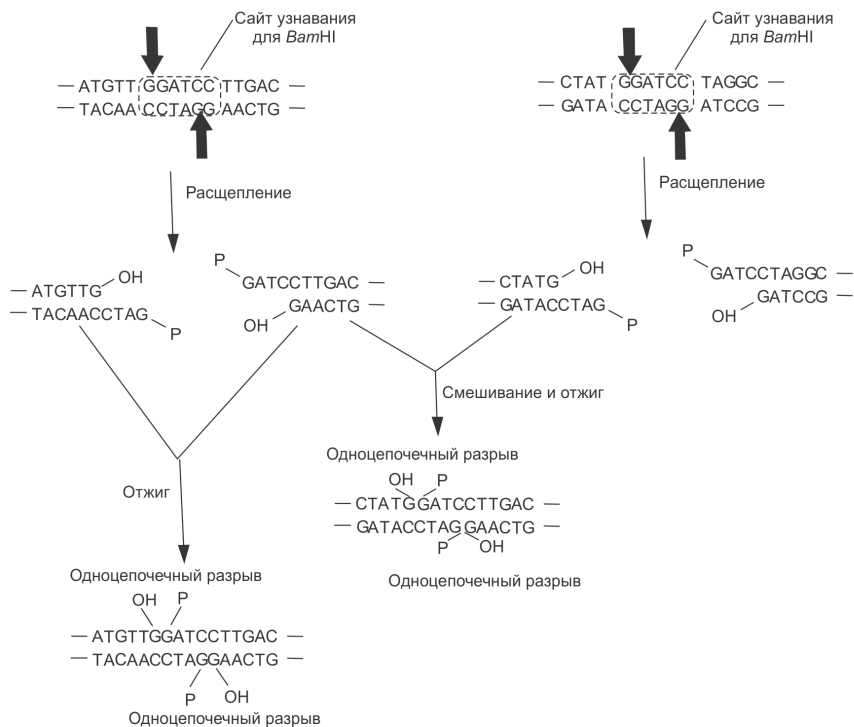


Рис. 15. Отжиг комплементарных «липких» концов фрагментов, образующихся при расщеплении двух образцов ДНК рестриктазой BamHI

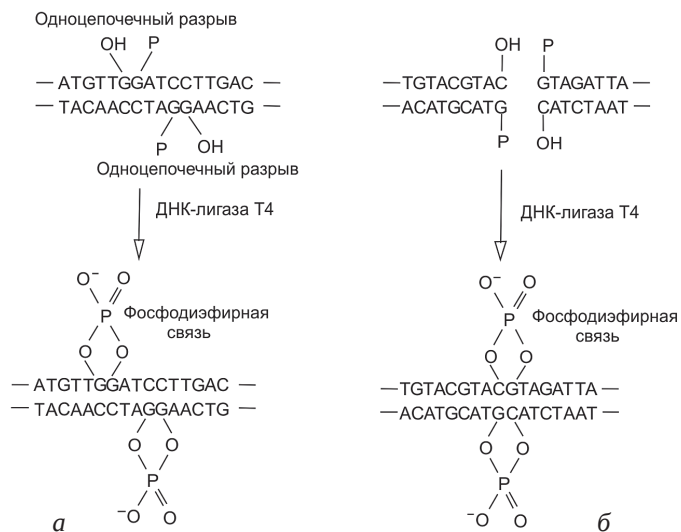


Рис. 16. Устранение одноцепочечных разрывов молекулы ДНК с помощью ДНК-лигазы T4 с «липкими» (а) и «тупыми» (б) концами

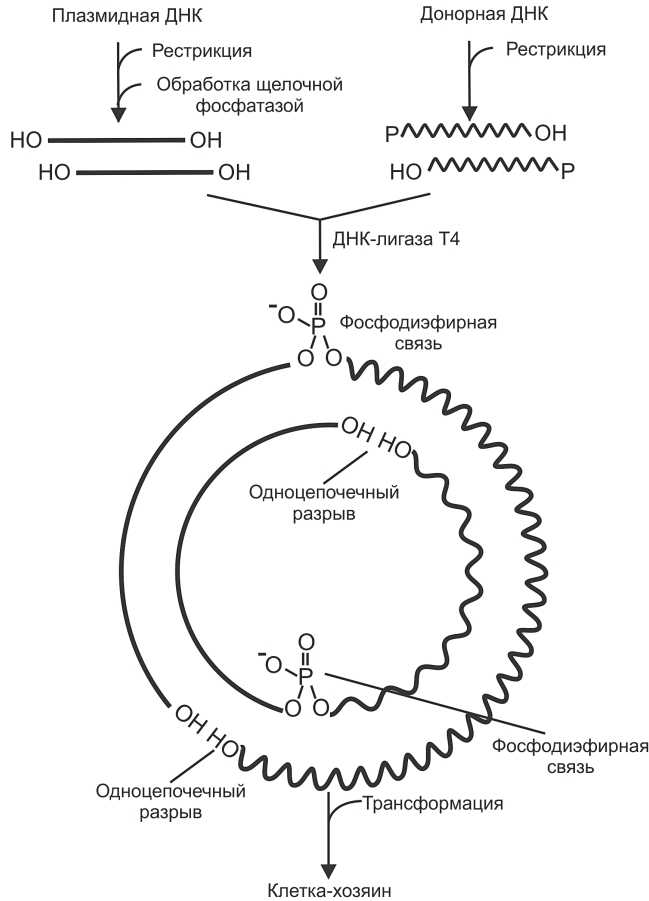


Рис. 17. Встраивание чужеродной ДНК в плазмидный вектор

Модификацией рестриктазно-лигазного метода является использование линкеров – синтетических двухцепочечных сегментов ДНК (олигонуклеотидов), содержащих последовательности, узнаваемые рестриктазами. Этот подход был предложен Р. Шеллером и его сотрудниками в 1977 г. Он позволяет соединять *in vitro* любые фрагменты ДНК. К фрагменту ДНК по «тупым» или «липким» концам с помощью ДНК-лигазы Т4 пришивают линкеры с участками узнавания определенных рестриктаз. Далее молекулу обрабатывают рестриктазой и образуются «липкие» концы. Полученный фрагмент ДНК рекомбинируют *in vitro* с другими фрагментами ДНК по схеме рестриктазно-лигазного метода.

Преимущество рестриктазно-лигазного метода перед коннекторным состоит в его простоте и возможности легкого выделения при необходимости встроеного фрагмента ДНК из рекомбинантной молекулы.

2.6. Введение рекомбинантных молекул ДНК в клетки реципиента

Трансформация – перенос генетической информации в бактериальную клетку с участием плазмид или без них. Клетки бактерий, способные поглощать чужеродную ДНК, называют компетентными. Одни бактерии обладают природной компетентностью, а компетентность других клеток (в частности, *E. coli*) индуцируют с помощью химических индукторов. Для внедрения в бактериальные клетки плазмидной ДНК за счет локального разрушения клеточной стенки их обрабатывают ледяным раствором хлорида кальция и выдерживают при 42 °С в течение 1,5 мин. (тепловой шок). Частота трансформации составляет 10^{-3} (на тысячу клеток приходится одна трансформированная). Эффективность трансформации (число трансформантов на 1 мкг добавленной ДНК) варьирует в пределах 10^5 – 10^8 (в зависимости от природы соли и ионов металлов среды).

Векторы – производные бактериофага λ – упаковываются *in vitro* в инфекционные частицы и попадают в бактериальные клетки путем инфицирования.

Для трансформации дрожжевых клеток используют хлорид лития.

Трансфекция – искусственное введение изолированных молекул ДНК в эукариотические клетки. Для трансфекции клеток млекопитающих применяют фосфат кальция.

Электропорация – прямой способ введения в целевые клетки чужеродной ДНК через временные поры в клеточных мембранах, образующиеся в условиях воздействия коротких электрических импульсов (5–20 мс). Этот метод эффективен для бактериальных клеток (эффективность трансформации повышается до 10^6 – 10^9) и некоторых клеток млекопитающих (например, суспензий лимфоцитов).

Липофекция (упаковка в липосомы) – прямой перенос в целевую клетку чужеродной ДНК, включенной в искусственные липосомы (липидные везикулы). Мембрана липосомы сливается с мембраной клетки, а ее содержимое (ДНК) освобождается в цитоплазму. Метод применяется для протопластов бактерий, дрожжей, растений, животных клеток.

Генное ружье (генная пушка, бомбардирование или бомбардировка микрочастицами, биологическая баллистика, или биолистика) – прямой метод переноса чужеродной ДНК в клетку-реципиент, особенно в растительные клетки. На золотые или вольфрамовые сферические частицы диаметром 0,4–1,3 мкм (микропули) наносят ДНК после ее осаждения хлоридом кальция, спермидином, полиэтиленгликолем. Растительные клетки подвергают «обстрелу» микрочастицами с помощью специального прибора – биолистической пушки. Микрочастицы, разгоняясь до скорости 300–600 м/с, пробивают клеточные стенки и мембраны клеток и попадают в цитоплазму. Для эффективной экспрессии целевого гена ДНК должна встроиться в геном растения. Метод биолистики (биологической баллистики) показал свою эффективность в процессах трансформации различных растительных клеток.

Микроинъекция – прямое введение ДНК в цитоплазму или ядро зафиксированных специальным устройством эукариотических клеток с помощью микроиглы.

2.7. Создание библиотек генов

Библиотека (банк генов) – коллекция клонированных фрагментов ДНК, которая содержит полный набор генов данного организма. При создании библиотеки генов в зависимости от задачи исследования выбирают источник ДНК для клонирования – кДНК или хромосомную ДНК. Поэтому в первом случае говорят о получении библиотеки кДНК, а во втором – о создании геномной библиотеки.

При конструировании библиотеки кДНК используют выделенную из клеток мРНК, на основе которой с помощью обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы получают двухцепочечную комплементарную ДНК (см. разд. 2.3.3).

Для создания геномной библиотеки необходимо выделить геномную ДНК и подвергнуть ее фрагментации. В этом случае исследователь получает возможность анализа регуляторных последовательностей, контролирующих экспрессию гена, и интронов, отсутствующих в зрелой мРНК.

Далее при конструировании библиотеки кДНК и геномной библиотеки коллекции фрагментов ДНК встраивают в векторы и вводят в целевые клетки, обычно *E. coli* (см. разд. 2.4–2.6). Двунитевые кДНК встраивают в плазмидные или фаговые векторы после присоединения к концам кДНК искусственных рестрикционных сайтов. Для клонирования геномной ДНК применяют векторы на основе бактериофага λ , космиды, искусственные бактериальные, фаговые и дрожжевые хромосомы.

Коллекция клонированных фрагментов ДНК, размноженных в бактериях, представляет собой библиотеку генов. Далее проводят скрининг всех колоний с целью идентификации интересующей исследователя нуклеотидной последовательности.

Библиотека кДНК является более простой по сравнению с геномной библиотекой; содержит последовательности, транскрибируемые РНК-полимеразой II, зависит от источника (ткани) выделения мРНК. Геномная библиотека содержит полную последовательность генома (в том числе и гены, транскрибируемые РНК-полимеразами I, II, III), состоит из перекрывающихся фрагментов, не зависит от источника ДНК. Геномные библиотеки можно хранить в течение десятков лет и амплифицировать.

При расчете количества клонов, необходимого для полного скрининга генома и обнаружения гена-мишени, с учетом размера генома и вставки, например, для геномной библиотеки человека, получают минимальные числа порядка 10^5 – 10^6 и увеличивают их в 5–10 раз в связи с перекрыванием вставок. В случае анализа библиотеки кДНК репрезентативная библиотека должна содержать не менее 200 000 клонов.

2.8. Идентификация и отбор клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК. Скрининг библиотек генов

После процедуры введения в целевые клетки рекомбинантных молекул ДНК в исследуемой системе находятся три типа клеток:

- 1) интактные клетки, не содержащие вектор и рДНК;
- 2) клетки, несущие только исходный вектор (без гена-мишени);
- 3) трансформированные клетки с рДНК.

Поэтому целью четвертого этапа генно-инженерного проекта является скрининг (отбор) клеток-мишеней с нужным геном. Для этого используют фенотипическую селекцию – отбор клеток по признакам, обусловленным маркерными генами вектора. Примерами маркерных генов являются гены устойчивости к антибиотикам. На питательной среде с антибиотиком будут расти клетки, содержащие соответствующий ген в составе плазмиды. Если вектор имеет два гена устойчивости к антибиотикам (ампициллину и тетрациклину), то вставка целевого гена в ген устойчивости к одному из антибиотиков (например, ампициллину) позволяет отобрать нужные клетки. Эти клетки растут на среде с тетрациклином, но чувствительны к ампициллину. Клетки, содержащие исходную плазмиду без целевого гена, устойчивы и к ампициллину, и к тетрациклину. Интактные клетки, не содержащие плазмиды, не могут расти на средах с антибиотиками.

Более удобным методом для отбора клеток, несущих специфические последовательности ДНК, является гибридизация нуклеиновых кислот. Нужную исследователю нуклеотидную последовательность (мишень) в образце ДНК можно обнаружить с помощью ДНК-зонда, комплементарно взаимодействующего с последовательностью-мишенью (рис. 18). Длина зонда в среднем составляет 100–1000 п. н. Для анализа после трансформации клетки высевают на чашки с питательной средой и переносят (перепечатаывают) выросшие колонии на твердую подложку (нитроцеллюлозный фильтр или нейлоновая мембрана). Расположение колоний на фильтре соответствует их расположению на матричных чашках. Проводят лизис клеток, депротеинизацию и денатурацию. Образец ДНК путем тепловой денатурации переводят в одноцепочечную форму. Цепь ДНК «пришивают» к подложке. После добавления меченого ДНК-зонда и медленного снижения температуры происходит ренатурация ДНК и образование гибридной молекулы за счет специфических комплементарных взаимодействий зонда и мишени. Гибридные молекулы ДНК обнаруживают методом, зависящим от природы метки (например, радиоавтографическим методом, если ДНК-зонд мечен радиоизотопом). Колонии клеток на исходной чашке, которые содержат гибридизовавшуюся ДНК, выделяют и культивируют. Положительный гибридационный сигнал может быть получен для нескольких клонов. Далее определяют, какой клон клеток содержит полноразмерную нуклеотидную последовательность, кодирующую целевой белок, а также старт- и стоп-кодоны, необходимые для синтеза белка. Для этого проводят секвенирование ДНК (см. разд. 2.11).

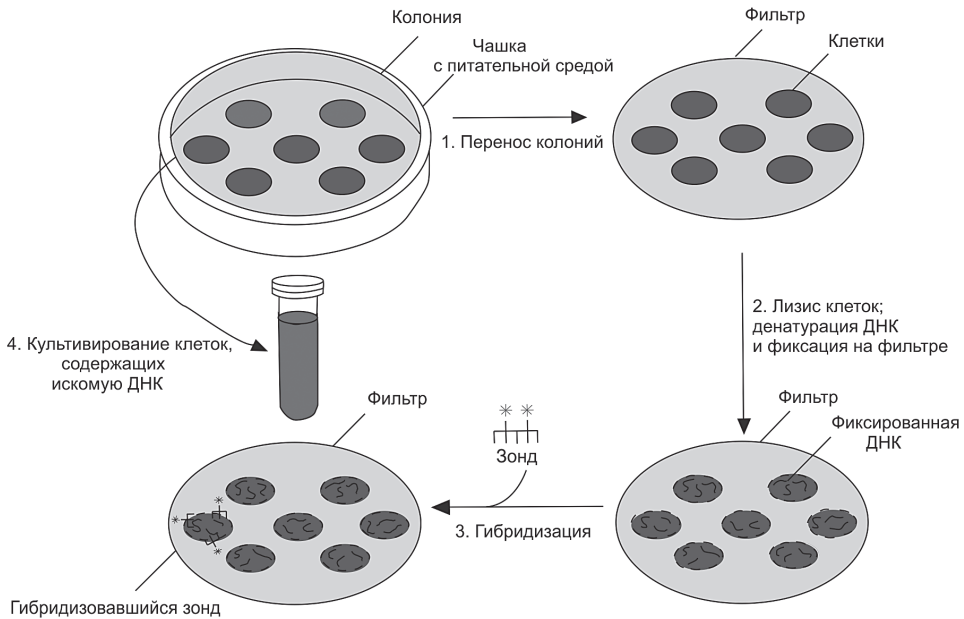


Рис. 18. Скрининг библиотеки геномной ДНК с применением меченого зонда

Для выявления процесса гибридизации используют также биотинилированные ДНК-зонды: присоединяют биотин к одному из дезоксирибонуклеотидов. На фильтр наносят конъюгат стрептавидина с ферментом (щелочной фосфатазой). Стрептавидин образует комплекс с биотином, который обнаруживают по окрашенному или люминесцирующему продукту реакции с участием этого фермента.

Если клонированный ген экспрессируется, то его белковый продукт можно обнаружить иммунологическими методами (методом иммуноферментного анализа с использованием специфических антител). Для этого клоны высевают на чашки с питательной средой. Выросшие колонии переносят на фильтр. Клетки лизируют, высвободившиеся белки фиксируют на фильтре. Затем используют систему иммуноферментного анализа (рис. 19). Клетки на чашке, соответствующие окрашенным пятнам на фильтре, содержат полноразмерный ген или его протяженный участок, обеспечивающий синтез белкового продукта.

Выявление клеток с целевым геном проводят и по активности синтезируемого белка. В качестве примера можно рассмотреть клетки, получившие ген, кодирующий фермент, не синтезируемый клеткой-хозяином. Используют метод идентификации на чашках. Клетки высевают на среду со специфическим субстратом. После окрашивания селективным красителем клетки, утилизирующие субстрат, приобретают характерную окраску.

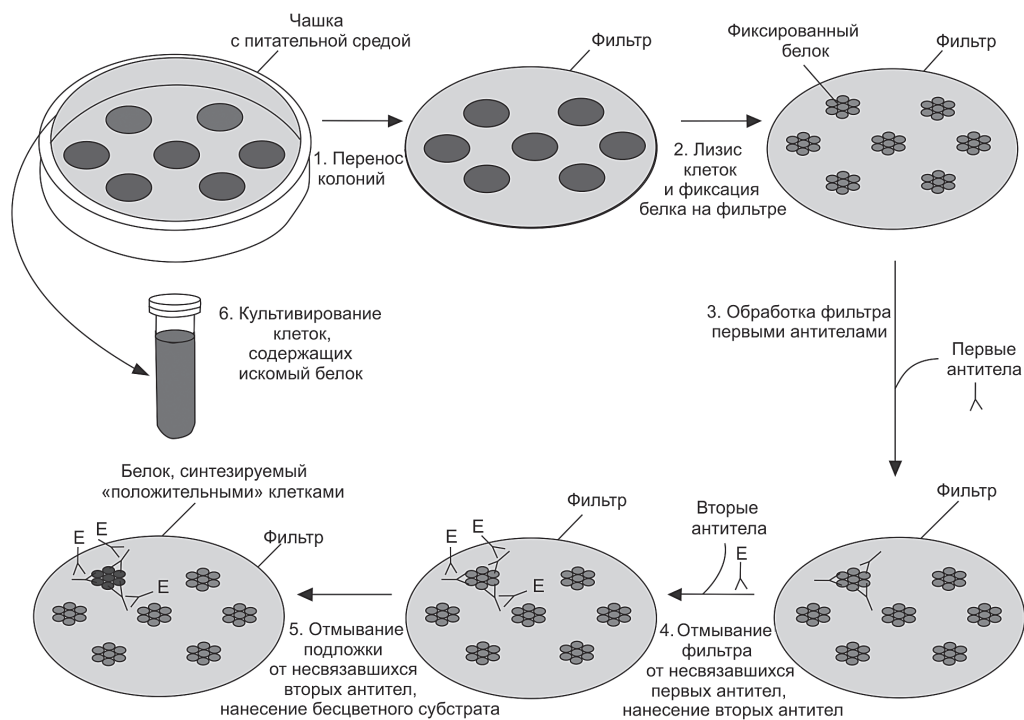


Рис. 19. Иммунологический скрининг геномной библиотеки

2.9. Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах

Прокариотические (в частности, бактериальные) клетки широко используются в качестве продуцентов рекомбинантных белков. Это хорошо исследованные объекты. К преимуществам бактерий при применении в промышленных биотехнологических процессах относятся высокая скорость роста и интенсивность метаболизма, способность к росту на дешевых субстратах и возможность адаптации к новым условиям культивирования. Созданы различные генетические векторы бактерий. Трансформированные бактериальные клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии чужеродного гена (трангена). Но у них есть и недостатки: отсутствие посттрансляционных модификаций (фосфорилирования, гликозилирования), низкая стабильность рекомбинантных белков вследствие нарушений упаковки их молекул, денатурации, протеолиза.

Наиболее распространенным продуцентом рекомбинантных белков является *E. coli*. Это грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. При ее культивировании на обогащенных жидких питательных средах время генерации в логарифмической фазе роста при 37 °С составляет ~ 22 мин. *E. coli* растет на дешевых питательных средах, имеет много штаммов. Трансформированные клетки *E. coli* способны продуцировать как про-, так и эукариотические белки (в том числе мембранные белки человека). Разработаны стратегии оптимизации экспрессии чужеродных белков в клетках *E. coli* и других бактерий, что позволило существенно повысить выход целевых белков.

Для оптимизации экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах, необходимо учитывать факторы: тип промотора и терминатора транскрипции, прочность связывания мРНК с рибосомой, эффективность трансляции в хозяйской клетке, число копий клонированного гена и его локализацию (в плазмиде или хромосоме хозяина), стабильность белка в целевых клетках, конечную локализацию синтезируемого продукта.

Для эффективной экспрессии любого гена необходим сильный промотор, имеющий высокое сродство к РНК-полимеразе. Использование сильного промотора позволяет получить уровень синтеза белка до 10–30 % от суммарного белка клетки. Для идентификации сильного промотора перед геном-репортером (кодирует легко распознаваемый продукт), лишенным промотора, в плазмиду встраивают случайные фрагменты хромосомной ДНК, полученные с помощью рестриктазы. Если в результате вставки ген-репортер эффективно экспрессируется, то клонированный фрагмент содержит функционально активный промотор. Примером относительно слабого промотора является промотор лактозного (*lac*) оперона *E. coli*. Более сильным промотором является специально сконструированный (гибридный) *tac*-промотор, включающий -10-область *lac*-промотора и -35-область *trp*-промотора (участки, находящиеся на расстоянии 10 и 35 п. н. до сайта инициации транскрипции). В то же время непрерывная экспрессия чужеродного гена приведет к быстрому истощению энергетических ресурсов клетки и нарушению ее метаболизма. Плазмиды, несущие постоянно экспрессирующийся ген, утрачиваются после нескольких клеточных циклов. Клетки, не содержащие плазмид, растут быстрее и становятся преобладающими в культуре. Для решения проблемы, связанной с нестабильностью плазмид, необходимо инициировать экспрессию клонированного гена только в определенной фазе клеточного цикла в течение определенного времени. Поэтому конструируют векторы для экспрессии, несущие сильные регулируемые промоторы. К регулируемым промоторам относят промоторы лактозного (*lac*) и триптофанового (*trp*) оперонов *E. coli*; *tac*-промотор; термочувствительный p^L (левый) промотор бактериофага λ ; промотор гена 10 бактериофага Т7. С ними связываются репрессоры, опосредующие включение и выключение транскрипции генов. Так, белок-репрессор, блокирующий термочувствительный p^L (левый) промо-

тор бактериофага λ , активен при 31 °С и неактивен при 38 °С. Следовательно, повышение температуры до 38 °С вызывает инактивацию репрессора, и гены, находящиеся под контролем этого промотора, экспрессируются.

Эффективность трансляции связана с последовательностью 3–9 нуклеотидов, расположенной на определенном расстоянии перед иницирующим кодоном (АУГ). Эта последовательность, идентифицированная в 1975 г. и названная последовательностью Шайна – Дальгарно по фамилиям ученых, представляет собой сайт (участок) связывания мРНК с рибосомой. Эту последовательность включают в состав вектора вместе с иницирующим кодоном. Терминирующий кодон – УАА.

Количество белкового продукта целевого гена можно повысить путем увеличения количества копий рДНК в клетке. Однако увеличится и продукция белков, гены которых локализованы в самой плазмиде. Увеличение копийности плазмид приведет к быстрому истощению энергетических ресурсов и снижению уровня метаболизма хозяйской клетки. Перспективным представляется путь повышения количества рекомбинантного белка, связанный с встраиванием в малокопийную плазмиду нескольких копий гена. При этом гены должны находиться в плазмиде в правильной ориентации для реализации процессов транскрипции и трансляции. Однонаправленное тандемное расположение генов может быть достигнуто путем применения синтетических адапторов – олигодезоксинуклеотидов, присоединенных к концам линеаризованной плазмидной ДНК и к концам фрагментов ДНК с клонируемым геном. При лигировании эти фрагменты располагаются только в правильной ориентации.

Для решения проблемы нестабильности плазмид можно использовать подход, связанный с выращиванием клеток в присутствии антибиотиков или метаболитов, которые обеспечивают рост клеток, содержащих плазмиду. Однако этот способ считают дорогим при использовании в промышленных масштабах. Поэтому целесообразным представляется включение (интеграция) целевого гена в хромосому реципиентной клетки. Такой подход позволяет обойтись без плазмид, но необходимо создать вектор для интеграции клонируемого гена в хромосому клетки-хозяина. Для этого в хромосоме хозяйской клетки идентифицируют сайт интеграции, нуклеотидная последовательность которого может быть прервана без ущерба для жизнедеятельности клетки. Вводимый ген должен содержать нуклеотидную последовательность длиной не менее 50 нуклеотидов, сходную с таковой в хромосомной ДНК. Далее выделяют и клонируют хромосомный сайт интеграции. Целевой ген вместе с регулируемым промотором вводят в хромосомный сайт интеграции или вблизи него. Полученную генетическую конструкцию встраивают в плазмиду, не способную к самостоятельной репликации в хозяйской клетке. Плазмиду вместе с хромосомным сайтом интеграции и целевым геном вводят в клетку. В клетке может произойти спаривание между гомологичными последовательностями плазмиды и хозяйской ДНК и интеграция в результате двойного кроссинговера. Возможна интеграция всей плазмид-

ной ДНК в хромосому в результате одиночного кроссинговера. Экспрессия клонированного гена возможна только в случае его интеграции в хозяйскую хромосому. Отбирают клетки, экспрессирующие клонированный ген.

Следующей задачей при оптимизации экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах, является повышение стабильности чужеродного белка. Для ее решения можно использовать ряд подходов. Один из них заключается в создании «химерного белка». Эта конструкция представляет собой рекомбинантный белок, ковалентно присоединенный к стабильному белку хозяйской клетки. В составе конструкции чужеродный белок защищен от действия протеаз бактериальной клетки. В молекуле «химерного белка» нужный белок соединен со стабильным хозяйским белком за счет короткого пептида, распознаваемого протеазой небактериального происхождения. Поэтому из «химерного белка» легко получить целевой белок. Но «химерный белок» создается на генетическом уровне путем лигирования кодирующих нуклеотидных последовательностей, контролирующих синтез двух белков.

Вспомогательные домены, используемые для получения рекомбинантных белков в биотехнологии, называют «таги». Их используют для упрощения процедуры выделения белка, увеличения уровня экспрессии и растворимости целевого белка, упрощения процедуры рефолдинга и повышения его эффективности, предотвращения протеолиза. Примерами вспомогательных доменов являются полигистидиновый и полиаргининовый домены, стрептавидинсвязывающий домен, хитинсвязывающий домен, мальтозосвязывающий белок для повышения уровня экспрессии и растворимости. Тандемные таги (слитные белки) используют для повышения растворимости и очистки белка.

Стабилизация рекомбинантного белка в прокариотической клетке может быть достигнута и путем увеличения времени полужизни белков. Время полужизни белков варьирует от нескольких минут до нескольких часов и зависит от наличия в их молекулах дисульфидных связей и определенных аминокислотных остатков на N-конце полипептидной цепи. С помощью генно-инженерных методов возможно включение в состав полипептидных цепей белков остатков метионина, серина, аланина, триптофана, валина, изолейцина, глицина, глутаминовой кислоты. Для повышения стабильности белка достаточно включения одного аминокислотного остатка на N-конце полипептидной цепи. Долгоживущие белки накапливаются в клетке, и их конечный выход увеличивается. Напротив, включение остатков пролина, глутаминовой кислоты, серина, треонина во внутреннюю часть полипептидной цепи повышает чувствительность белковой молекулы к протеолитическому расщеплению.

Для предотвращения протеолиза целевого белка в некоторых случаях используют безпротеазные штаммы кишечной палочки, а также ингибиторы протеаз.

Стабильность рекомбинантных белков связана и с их клеточной локализацией. Уровень стабильности белка можно увеличить путем повышения эффективности секреции, в частности, из цитоплазмы в периплазму (пространство

между плазматической и наружной мембранами). Для этого к кодирующей последовательности нуклеотидов присоединяют последовательность, ответственную за синтез сигнального пептида, необходимого для транспорта белков через мембрану. Возможно генно-инженерное введение в клетки бактериоцина – белка некоторых грамотрицательных бактерий, активирующего мембранную фосфолипазу А, увеличивающую проницаемость мембран клеток. В результате возможен выход цито- и периплазматических белков в культуральную среду.

Метаболическая перегрузка целевых клеток – это нарушения метаболизма в трансформированных бактериальных клетках, вызванные экспрессией чужеродных генов. В результате запускаются процессы снижения скорости роста клеток, изменения их размера и формы, синтеза белков, фиксации азота, активации стрессорных механизмов. Для снижения метаболической перегрузки используют различные подходы: применение малокопийных плазмидных векторов и сильных регулируемых промоторов с включением и выключением генов; интеграцию целевого гена в хромосому хозяина; поддержание экспрессии гена на среднем уровне, но в максимальном увеличении плотности культуры.

Универсальной стратегии оптимизации клонированных генов в прокариотических клетках не существует. Условия успешной экспрессии генов в целевых клетках подбирают индивидуально.

2.10. Эукариотические системы экспрессии

Рекомбинантные белки, полученные на основе эукариотической кДНК и синтезированные в бактериальных целевых клетках, могут быть нестабильными, неактивными и загрязненными токсичными веществами бактериального происхождения. В бактериальных клетках отсутствуют механизмы посттрансляционных модификаций, специфичных для эукариотических клеток (образование дисульфидных связей, протеолитическое расщепление предшественника, гликозилирование, модификации аминокислот). В этой связи необходимо использовать эукариотические системы экспрессии рекомбинантных белков.

Дрожжи

Дрожжи – эффективные продуценты чужеродных белков. Их генетические и физиолого-биохимические особенности хорошо изучены. Это непатогенные быстрорастущие организмы, которые могут быть легко выращены на относительно дешевых питательных средах. В клетках дрожжей осуществляются посттрансляционные модификации белков: протеолитический процессинг, укладка, образование S-S-связей, гликозилирование. Исследованы сильные промоторы дрожжей. Возможна легкая очистка гетерологичного белка, секретирующегося в среду, в связи с выделением в среду лишь немногих собственных дрожжевых белков.

У дрожжей как продуцентов рекомбинантных белков есть и недостатки, в том числе различия в процессах гликозилирования белков в них и в клетках млекопитающих, потеря плазмид, низкая продуктивность, необходимость использования кДНК в связи с редким удалением интронов, гипергликозилирование, наличие протеаз и др. Поэтому в дрожжах не синтезируются некоторые чужеродные белки.

Наиболее часто для получения гетерологичных белков применяют *Saccharomyces cerevisiae* (почкующиеся или пекарские дрожжи) и *Pichia pastoris* (метилотрофные дрожжи). Для синтеза используют сильные регулируемые (индуцируемые) промоторы дрожжей.

Векторы *S. cerevisiae* относят к челночным или шатл-векторам, способным реплицироваться в дрожжевых клетках и клетках *E. coli*. Такие векторы должны содержать регуляторные элементы, обеспечивающие их функционирование в двух типах хозяйских клеток: сайты клонирования; дрожжевые и бактериальные селективные маркеры, сайты инициации репликации, промоторы, сигналы транскрипции и трансляции. Используют интегрирующие векторы, не способные к автономной репликации и интегрирующие в хромосому дрожжевых клеток, а также векторы для репликации. Дрожжевые клетки трансформируют в присутствии солей лития.

С помощью систем экспрессии *S. cerevisiae* получены вакцины (поверхностный антиген вируса гепатита В, белок малярийного плазмодия, белок оболочки ВИЧ-1), диагностикумы (белок вируса гепатита С, антигены ВИЧ-1), лекарственные препараты (инсулин, проинсулин, α_1 -антитрипсин, интерфероны, фактор роста эпидермиса, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов, колониестимулирующие факторы гранулоцитов и макрофагов), белки человека (липаза поджелудочной железы, сывороточный альбумин, антитромбин III, цитохром С), рестриктаза EcoRI, запасной белок кукурузы зеин и другие белки.

Бакуловирусы

Бакуловирусы – вирусы, поражающие членистоногих, в основном, насекомых (чешуекрылых, перепончатокрылых, жесткокрылых). Они не способны инфицировать человека.

Эти вирусы имеют две формы. На ранней стадии инфекции образуются почкующиеся вирионы, освобождающиеся из инфицированной клетки (клетки кишки) и инфицирующие другие клетки хозяина. На поздних стадиях развития инфекции формируются вирионы, заключенные в белковый матрикс, – полиэдры. Белковый матрикс состоит из белка полиэдрина. Через 7–14 дней после заражения гусеница погибает, а полиэдры высвобождаются в среду, где могут сохранять свои свойства более 20 лет. Затем они попадают в организм нового хозяина, в котором высвобождаются вирионы.

Бакуловирусы используют для создания биоинсектицидов с целью уничтожения насекомых – вредителей сельского хозяйства. Разработаны коммерческие вирусные препараты для уничтожения хлопковой совки, капустной совки, непарного шелкопряда, яблонной плодовой гнили в США, Бразилии, Бельгии, России, странах Юго-Восточной Азии.

Для получения рекомбинантных белков с помощью бакуловирусов используют культуры клеток насекомых. Промотор гена полиэдрина является сильным, а цикл развития вируса не зависит от наличия этого гена. Поэтому ген полиэдрина может быть заменен на чужеродный ген.

На основе бакуловирусов разработаны векторы для экспрессии генов, ответственных за синтез белков млекопитающих и вирусов животных в культурах клеток насекомых. Преимуществом последних в отношении синтеза гетерологичных белковых продуктов является сходство систем посттрансляционных модификаций белков насекомых и млекопитающих. С помощью экспрессирующих векторов на основе бакуловирусов получен целый ряд рекомбинантных белков: эритропоэтин, интерфероны- α и - β , интерлейкины, активатор тканевого плазминогена, аденозиндезаминаза, щелочная фосфатаза человека, ДНК-полимераза- α человека, липаза поджелудочной железы человека, рецепторы, сопряженные с ГТФ-связывающими белками, гемагглютинин вируса гриппа, моноклональные антитела мыши, антиген вируса сибирской язвы, белки полиовируса, антиген респираторно-синцитиального вируса и др.

На основе бакуловирусов созданы челночные векторы для *E. coli* и клеток насекомых, названные бакмидами. Для получения рекомбинантного белка, продуцирующегося в клетках насекомых, используют подход, основанный на введении в состав генетической конструкции нуклеотидных последовательностей, ответственных за синтез аминокислотной последовательности – аффинной метки – и сайта расщепления протеиназы. За счет последовательности, представляющей собой аффинную метку, гибридный белок можно выделить методом аффинной хроматографии. Затем метку отщепляют с помощью протеиназы.

2.11. Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК

Расшифровку нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот называют секвенированием.

Ф. Сэнгер, С. Никлен и А. Колсон в 1977 г. предложили ферментативный дидезоксинуклеотидный метод определения нуклеотидной последовательности ДНК (дидезокси-метод Сэнгера). Это секвенирование с помощью терминирующих нуклеотидов.

Дидезоксинуклеотид – полученный искусственным путем нуклеотид, у которого отсутствуют 2'- и 3'-гидроксильные группы при атомах углерода сахарного остатка. У дезоксирибонуклеотида – мономера ДНК – отсутствует лишь 2'-гидроксильная группа сахара. В процессе репликации ДНК с 3'-гидроксиль-

ной группой сахара одного нуклеотида взаимодействует 5'-гидроксильная группа фосфатного остатка другого нуклеотида и между нуклеотидами формируется сахаро-фосфатная связь (3', 5'-связь). Если в процессе удлинения полинуклеотидной цепи очередным нуклеотидом будет дидезоксинуклеотид без 3'-гидроксильной группы сахарного остатка, то синтез ДНК остановится.

Для секвенирования ДНК (рис. 20, а) необходимы: одноцепочечная ДНК-матрица (искомая молекула); синтетический олигонуклеотид (17–20 звеньев) – праймер с 3'-гидроксильной группой для инициации синтеза комплементарной цепи; ДНК-полимераза I *E. coli* (PolI); четыре типа дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP); четыре типа дидезоксинуклеотидов (ddNTP). Раствор с праймером распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре типа дезоксинуклеозидтрифосфатов: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (один из них – меченный изотопом ^{32}P), а также один из четырех типов дидезоксинуклеотидов: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP. Концентрацию каждого дидезоксинуклеотида подбирают специально так, чтобы он включался в растущую полинуклеотидную цепь по всем позициям, а не по одной. В процессе синтеза в каждой из четырех пробирок образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. Рост каждой новой цепи ДНК прекращается после присоединения дидезоксинуклеотида. Но образуется и какое-то количество полноразмерных молекул ДНК (рис. 20, а).

Далее в пробирки добавляют формамид для расхождения цепей и проводят электрофорез в полиакриламидном геле для разделения одноцепочечных фрагментов ДНК. На радиоавтографе обнаруживается набор полос (250–350), соответствующих меченым фрагментам ДНК (рис. 20, б). Анализ (сопоставление) полос позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого участка ДНК. Самая «быстрая» полоса (радиоактивно меченный фрагмент в самом низу геля) соответствует самому короткому фрагменту ДНК. Искомая последовательность ДНК комплементарна последовательности нуклеотидов, «считываемой» при анализе полос на электрофореграмме.

Ферментативный метод определения нуклеотидной последовательности ДНК Ф. Сэнгера был автоматизирован. Принцип автоматического секвенирования ДНК основан на использовании четырех флуоресцентных меток (по числу нуклеотидов), что позволяет объединять продукты четырех независимых реакций и разделять их методом капиллярного электрофореза. Автоматическая регистрация данных производится с помощью компьютера. Первый автоматический ДНК-секвенатор был разработан в 1987 г. в США компанией *Applied Biosystems*.

Разработаны различные усовершенствованные варианты ферментативного метода секвенирования ДНК, предназначенные для решения определенных практических задач. Например, вместо ДНК-полимеразы I, не способной синтезировать достаточно протяженные участки ДНК из-за диссоциации фермента с матрицы, используют секвеназу – модифицированную ДНК-полимеразу фага T7, обладающую большей процессивностью.

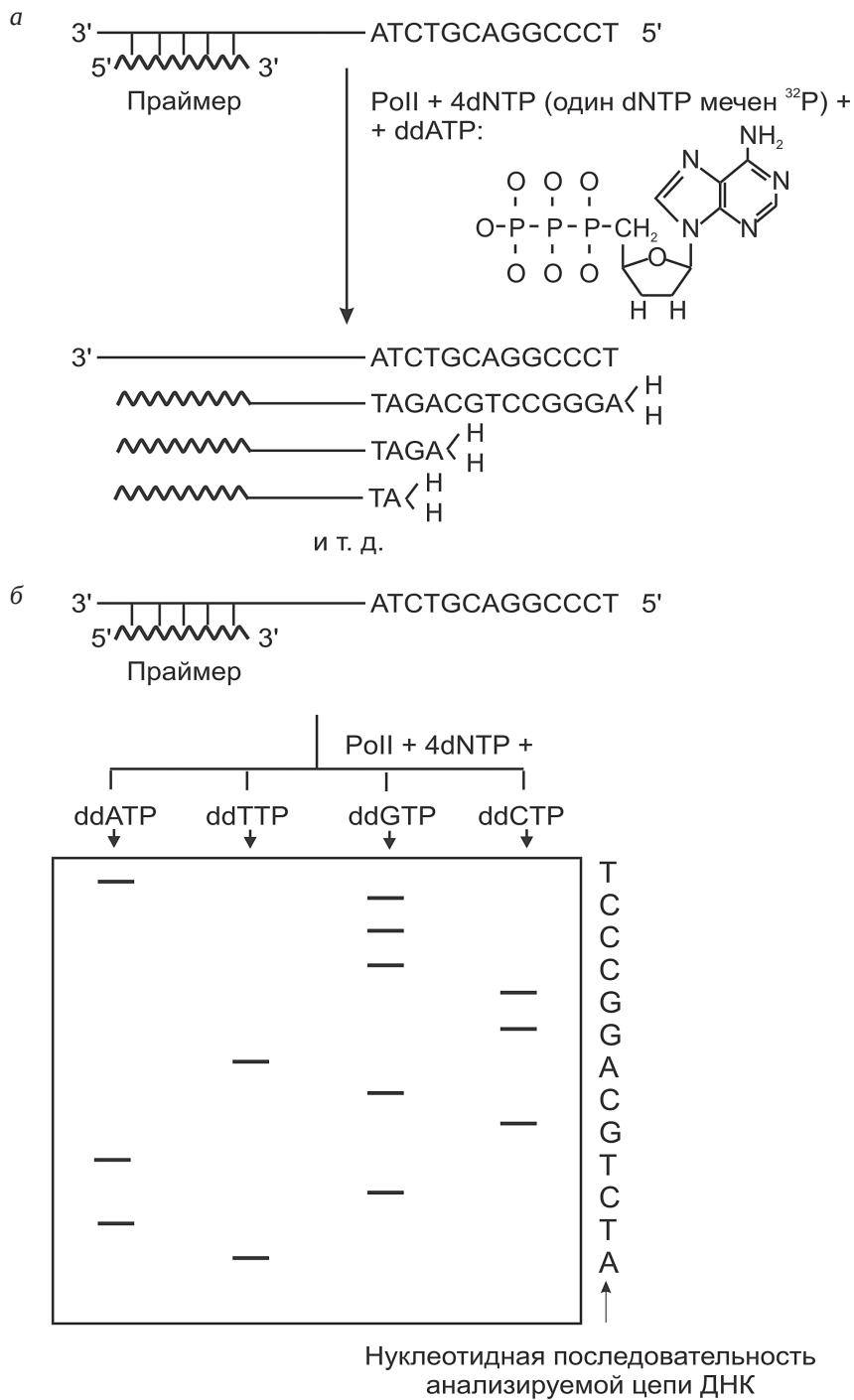


Рис. 20. Схема дидезоксинуклеотидного метода секвенирования ДНК

Для получения одонитевых молекул ДНК, необходимых для секвенирования, используют векторы на основе фага М13, фагмиды, термостабильную ДНК-полимеразу («циклическое секвенирование»).

Методы секвенирования постоянно совершенствуются, методы нового поколения позволяют секвенировать за один день очень протяженные фрагменты ДНК. Многие из них базируются на использовании метода Сэнгера, в том числе метод пиросеквенирования, позволяющий проводить параллельное секвенирование многих тысяч образцов. Метод пиросеквенирования не требует разделения фрагментов ДНК путем электрофореза и основан на принципе «секвенирование путем синтеза». В системе находятся одноцепочечная ДНК-матрица, праймер, ДНК-полимераза. Дезоксинуклеотиды вносят последовательно. Включение нуклеотида в растущую полинуклеотидную цепь с помощью ДНК-полимеразы сопровождается освобождением молекулы пирофосфата, который ферментативно переводится в АТФ и используется люциферазой для окисления люциферина, что регистрируется методом хемилюминесценции. Если добавленный нуклеотид не комплементарен следующему нуклеотиду матрицы, то он деградирует с помощью апиразы и хемилюминесцентный сигнал отсутствует.

Метод пиросеквенирования позволяет определить нуклеотидную последовательность, состоящую из 200–500 нуклеотидов, что меньше по сравнению с методом Сэнгера (800–1000 нуклеотидов). Но на основе пиросеквенирования возможно проведение массивного параллельного секвенирования геномной ДНК, которую последовательно фрагментируют путем ультразвуковой обработки, денатурируют, осуществляют ПЦР и пиросеквенирование.

С помощью пиросеквенатора 454 фирмы *Roche* осуществлено секвенирование индивидуального генома Дж. Уотсона за 1 млн долларов.

В 1976 г. А. Максам и В. Гилберт разработали химический метод определения нуклеотидной последовательности ДНК, который основан на ее специфической химической фрагментации.

Для химического секвенирования ДНК одноцепочечный и двухцепочечный полинуклеотид метят радиоактивным изотопом ^{32}P с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4. Двухцепочечные молекулы должны быть разделены на отдельные цепи. Препараты фрагмента ДНК делят на четыре порции и каждую подвергают специфической химической модификации. Пуриновые азотистые основания модифицируют диметилсульфатом, а пиримидиновые – гидразином. Затем цепи ДНК расщепляются по точкам модификации и образуются наборы субфрагментов ДНК. Последние разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей радиоавтографией. Проводят анализ полос на электрофореграмме и «считывают» искомую нуклеотидную последовательность («считывание» в этом случае в отличие от метода Сэнгера является прямым).

Метод Максама – Гилберта позволяет определять нуклеотидную последовательность длиной от 250–300 до ~ 500 нуклеотидов. При секвенировании про-

тяженных фрагментов ДНК их расщепляют с помощью рестриктаз и расшифровывают нуклеотидные последовательности перекрывающихся участков.

В настоящее время в зависимости от методов секвенирования и фракционирования геномной ДНК выделяют различные стратегии секвенирования: секвенирование по Сэнгеру, высокопроизводительное пиросеквенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов, циклическое лигазное секвенирование и др. Каждая стратегия имеет свои преимущества и недостатки.

К методу фракционирования геномной ДНК можно отнести предварительное клонирование геномов в ВАС-векторах с последующим секвенированием ВАС-клонов.

Метод дробовика относится к стратегии, заключающейся в отказе от предварительного деления геномной ДНК на фракции и секвенировании суммарной геномной ДНК. Его суть состоит в случайной фрагментации геномной ДНК с помощью сайт-неспецифических нуклеаз с созданием библиотек для секвенирования. Этот метод основан на секвенировании по Сэнгеру.

Развивается целевое (таргетное) секвенирование – выделение и секвенирование определенной области генома или подмножества генов.

Ключевая проблема секвенирования – полногеномное секвенирование и построение «золотого стандарта», т. е. референсной последовательности. Референсная последовательность – полная хромосомная последовательность, являющаяся основой для изучения других геномов того же вида организмов.

2.12. Базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Геномные проекты

С развитием методов определения нуклеотидных последовательностей началась эра секвенирования.

Информация о секвенированных нуклеотидных последовательностях различных организмов хранится в виде электронных баз данных. Первая электронная база данных – *Los Alamos DNA Database* – была создана У. Гоадом и его коллегами в США, а в 1982 г. на ее основе организован новый банк данных генетических последовательностей *GenBank* ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)), финансируемый национальным институтом здравоохранения США (*National Institutes of Health, NIH*). В Европе в 1982 г. создана аналогичная база данных *EMBL Data Library* как первая международная база данных нуклеотидных последовательностей. В 1994 г. она трансформировалась в *EMBL Nucleotide Sequence Database* ([http:// www.ebi.ac.uk/embl](http://www.ebi.ac.uk/embl)), которую курирует Европейский институт биоинформатики (*European Bioinformatics Institute, EBI*). В Японии в 1986 г. создан банк данных *DDBJ (DNA Data Bank of Japan)*. В результате со-

трудничества между *Genbank*, *EMBL* и *DDBJ* действует единая международная база *International Nucleotide Sequence Database (INSD)*.

Для большого количества генов расшифрована их нуклеотидная последовательность, однако не исследованы их функции. В 1986 г. создана база данных аминокислотных последовательностей *SWISS-PROT*. Использование информации баз данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и методов компьютерного моделирования позволит предсказывать функции различных белков. Определение набора генов – отправная точка для детальной характеристики функций генов, биохимических и регуляторных путей организмов.

Расшифровка крупных геномов организмов потребовала объединения усилий многих лабораторий и инициации научно-исследовательских геномных проектов. В 1995 г. была расшифрована нуклеотидная последовательность полного генома грамотрицательной бактерии *Haemophilus influenza* (содержит 1 830 138 п. н., 1789 генов), в 1996 г. – первого эукариотического организма – *Sacharomyces cerevisiae*. Затем были секвенированы полные геномы ряда бактерий, в том числе патогенных, растений, круглых червей, дрозофилы, простейших.

В 1989 г. стартовал Международный проект по расшифровке генома человека, который был завершен в начале XXI в. Его стоимость составила более 3 млрд долларов. Позже корпорацией *Celera* был иницирован аналогичный частный проект со стоимостью 300 млн долларов, в котором частично были использованы результаты Международного проекта. Официально Международный проект завершился после опубликования структуры последней секвенированной хромосомы в 2006 г. В ходе реализации геномных проектов были созданы и отработаны технологии экспериментального секвенирования полных эукариотических геномов. Разработаны новые биоинформационные алгоритмы и программы, позволяющие оперировать огромными объемами данных и проводить сборку протяженных последовательностей из относительно коротких секвенированных фрагментов. Массовая расшифровка генома человека позволит выявить молекулярные механизмы развития различных патологических состояний (в частности, наследственных заболеваний) организма.

Не менее актуальны исследования, направленные на изучение геномов патогенных микроорганизмов: бактерий, вирусов, простейших, грибов. Реализуются геномные проекты по секвенированию растений, грибов, беспозвоночных, пищевых патогенов, геномов пациентов, страдающих опухолевыми, генетическими и нейродегенеративными заболеваниями.

Важной проблемой является завершение геномных проектов с получением полноценной геномной последовательности. Скорость развития методов теоретического анализа последовательностей ДНК уступает скорости совершенствования технологий секвенирования.

Есть несколько типов геномных проектов. Секвенирование *de novo* – это определение всего набора нуклеотидных последовательностей ранее неизвест-

ного генома. Ресеквенирование генома проводится при выявлении различий между исследуемым геномом и референсной последовательностью. Примером ресеквенирования генома является секвенирование генома русского мужчины. Ресеквенирование экзона – секвенирование совокупности всех экзонов. Обязательной частью полноценного проекта по секвенированию генома является секвенирование транскриптома (совокупности всех РНК) различных тканей на разных стадиях развития организма. Так, например, в 2012 г. создана международная инициатива для секвенирования транскриптома тысячи различных видов растений (цветковых, голосеменных, папоротников, мхов, зеленых водорослей).

В начале XXI в. ко времени завершения проекта «Геном человека» сформировалось научное направление – геномика, которая занимается исследованием структуры и функций всей совокупности генов организма или значительной их части.

Продолжением геномных проектов стали метагеномные проекты. Метагеном – это генетический материал, полученный из образцов среды. Основная цель метагеномного проекта – определение видового разнообразия и относительной представленности различных микроорганизмов. Метагеномный проект «Микробиом человека» – полная характеристика микрофлоры человека и выявление ее роли в поддержании здоровья человека. Реализуются проекты «Метагеном Саргассова моря», «Метагеном неандертальца» и др.

2.13. Новые методы клонирования генов

Традиционное клонирование генов основано на лигировании фрагментов ДНК, полученных при обработке эндонуклеазами. В настоящее время разрабатываются новые технологии клонирования генов. Так, система клонирования *Gateway*, основанная на сайт-специфичной рекомбинации, может служить платформой для модульной сборки сложных конструкций (объединения нескольких фрагментов ДНК в заданном порядке) и их последующей экспрессии. В этой системе используют ферменты сайт-специфичной рекомбинации фага λ , обеспечивающие его встраивание в бактериальную хромосому и вырезание из нее. Множественная система *Gateway* включает векторы, позволяющие собирать транскрипционные единицы одновременно из двух или трех фрагментов ДНК. Эта система может быть использована для получения химерных и меченых белков в исследованиях процессов экспрессии генов, рекомбинации фрагментов генома, сборки оперонов, белок-белковых взаимодействий.

Метод *Golden Gate* обеспечивает точную «бесшовную» сборку ДНК из множества фрагментов и получение комбинаторных библиотек. В нем используются ферменты рестрикции *BsaI*, *BsmBI*, *BbsI*. Сборка транскрипционных единиц из отдельных модулей происходит одновременно, т. е. одновременно осуществля-

ются реакции расщепления ДНК и лигирования. На концах клонируемых фрагментов ДНК должны быть короткие четырехчленные последовательности – сайты слияния. Эта технология позволяет проводить множественный сайт-направленный мутагенез и сборку различных ДНК-фрагментов. Примером является получение сайт-специфичных эндонуклеаз для редактирования геномов *in vivo*.

Безлигазное клонирование (SLIC) – метод клонирования на основе RecA-независимого пути гомологичной рекомбинации *in vitro*. Он базируется на свойстве ДНК-полимеразы T4 в отсутствие нуклеозидтрифосфатов за счет 3′–5′-экзонуклеазной активности образовывать выступающие одноцепочечные концы на линейных фрагментах ДНК. Эту реакцию останавливают путем добавления одного из нуклеозидтрифосфатов. Линейные фрагменты смешивают и отжигают по выступающим концам. Образуется кольцевая плазида с односторонними разрывами.

Современные методы клонирования, относящиеся к методам синтетической биологии, отличаются высокой эффективностью и менее трудоемки по сравнению с традиционным клонированием. Они используются для получения рекомбинантных белков, вакцин, генетически трансформированных растений, в генной терапии.

2.14. Методы изменения геномов

К манипуляциям с геномом относят инактивацию гена (нокаут), внедрение чужеродного гена (нокин) либо изменение (редактирование) гена. Внедрение гена, как правило, происходит неспецифично, в произвольный участок генома. К методам ненаправленного внедрения гена относят микроинъекцию, использование вирусных векторов и транспозонов.

Транспозоны – это мобильные элементы, способные перемещаться по геному. ДНК-транспозон состоит из гена, кодирующего транспозазу (фермент, необходимый для транспозиции), фланкированного двумя инвертированными повторами. Транспозоны перемещаются по геному за счет механизма разрезания и вставки или копирования и вставки. Интеграция в геном происходит случайным образом. Транспозаза взаимодействует со специфической последовательностью инвертированных повторов, вырезает и осуществляет интеграцию ДНК, заключенной между этими инвертированными повторами. Любой ген может быть встроен в геном клетки с использованием вектора с клонированным геном между двумя инвертированными повторами и транспозазы. Недостатком этого метода является случайная вставка гена, которая может инактивировать его или привести к избыточной экспрессии гена, локализованного рядом.

В случае инактивации гена и его редактирования изменения должны осуществляться в определенном месте генома. Для редактирования генома исполь-

зуются методы: гомологической и сайт-специфической рекомбинаций, действие мегануклеаз, транспозонов, встраивание вирусных векторов, а в последнее время – действие направленных нуклеаз нового поколения.

Направленное изменение последовательности генома возможно с помощью гомологической рекомбинации, которая применяется для изменения генома дрожжей *S. cerevisiae*.

Гомологическая рекомбинация – это путь восстановления двухцепочечных разрывов с помощью гомологичной ДНК-матрицы. При этом происходит образование дуплекса поврежденной ДНК и комплементарной последовательности ДНК-донора. Это взаимодействие катализируют белки: RecA (рекомбиназа А) – у бактерий и Rad51 – у эукариот.

В настоящее время для внесения двухцепочечных разрывов в последовательность ДНК используются программируемые ДНК-связывающие белки – «цинковые пальцы» (*zink finger, ZF*) и TALE (*transcription activator-like effector*), а также CRISPR-система, состоящая из прокариотического белка Cas9, гидовой РНК (крРНК) и тракрРНК, которая помогает нуклеазе распознавать и разрезать определенную последовательность ДНК.

«Цинковые пальцы» – небольшой природный ДНК-связывающий домен, часто встречающийся среди транскрипционных факторов. Созданы искусственные ДНК-связывающие модули на основе «цинковых пальцев», способные узнавать непрерывную последовательность ДНК. На их основе сконструированы системы нуклеаз направленного действия для расщепления ДНК. Для внесения одноцепочечного разрыва в ДНК необходимы два белка, каждый из которых содержит ДНК-узнающую и нуклеазную части (эндонуклеазы рестрикции II класса).

В 1996 г. впервые показана активность первой генно-инженерной конструкции набора «цинковых пальцев», соединенных разрезающим доменом. Создана база данных «цинковых пальцев». Нуклеаза, сконструированная на основе «цинковых пальцев», была применена для редактирования геномов модельных организмов: плодовой мухи, нематоды, шелкопряда, крысы, мыши, рыбы *Danio rerio*; клеточных линий человека, мыши, хомяка.

TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) – новое поколение модульных ДНК-связывающих белков, для которых возможен направленный дизайн. Эти белки, подобно белкам на основе «цинковых пальцев», содержат составной модуль ДНК-связывающих доменов (на основе белков TALE) и неспецифического эндонуклеазного домена FokI. Белок TALEN используется как фактор вирулентности бактериями *Xanthomonas*, поражающими растения. TALEN имеют преимущества по сравнению с нуклеазами на основе «цинковых пальцев»: более высокую специфичность действия по отношению к мишени, меньшую цитотоксичность, более удобны для осуществления дизайна. TALEN применяют для редактирования геномов модельных организмов: коровы, свиньи, рыбы *Danio rerio*, нематоды, дрожжей, плодовой мухи, сверчка, крысы, обезьян, клеточных линий человека.

В целом создание генетических конструкций, кодирующих нуклеазы на основе «цинковых пальцев» и TALEN, для модификации генома представляет собой долгий и трудоемкий процесс. Более простой и эффективной системой для редактирования генома является CRISPR-Cas9-система. CRISPR-Cas9-системы адаптивного иммунитета прокариот состоят из CRISPR-кассет (участков генома с идентичными повторами и разделяющими их уникальными спейсерами) и генов *cas*. Эти системы обеспечивают устойчивость клеток к бактериофагам и плазмидам, содержащим протоспейсеры – последовательности, комплементарные спейсерам CRISPR-кассеты. Механизм действия CRISPR-Cas-систем обеспечивает CRISPR-адаптацию – изменение генома клетки за счет встраивания новых спейсеров – и CRISPR-интерференцию. CRISPR-интерференция – высокоспецифичное узнавание протоспейсера мишени и внесение в него разрыва, т. е. защита клетки от чужеродной ДНК. За уничтожение мишени отвечает РНК-белковый комплекс, состоящий из продуктов генов *cas* и коротких крРНК, образующихся при процессинге транскрипта CRISPR-кассеты.

Интерес к CRISPR-Cas-системам основан на их способности специфически узнавать любые уникальные локусы за счет комплементарных взаимодействий между спейсером крРНК и протоспейсером молекулы-мишени. Это свойство используется в Cas9-опосредованных технологиях редактирования геномов.

Для искусственного редактирования геномов используется CRISPR-Cas-система II типа. В ней в процесс разрезания ДНК вовлечена CRISPR-РНК (крРНК), которая получается из спейсера; транскрибирующая CRISPR-РНК (тракрРНК), необходимая для формирования зрелой CRISPR-РНК; CRISPR-ассоциированный белок Cas9 (эндонуклеаза). Обе РНК, находящиеся в комплексе с Cas9, формируют активную ДНК-эндонуклеазную систему, разрезающую ДНК-протоспейсер, последовательность которого соответствует спейсеру, удлинённому на небольшой трехнуклеотидный участок – PAM (*protospacer adjacent motif*). Используют химерную (гибридную) гидовую РНК, объединяющую крРНК и траРНК. Специфичность системы определяется гидовой РНК. В отличие от других систем возможно разрезание метилированной ДНК.

Важным преимуществом CRISPR-Cas-систем является простота создания без применения сложных генно-инженерных конструкций. Достаточно клонирования короткого участка, соответствующего гидовой РНК. Стало возможным получение огромного набора векторов для различных мишеней, включая геномные библиотеки. Также возможно внесение множественных изменений в геном организма путем клонирования в одном векторе нескольких гидовых РНК.

CRISPR-Cas-система была применена для редактирования геномов модельных организмов: лягушки, кролика, рыбы *Danio rerio*, шелкопряда, дрожжей, плодовой мухи, риса, крысы, табака, мышцы, клеточных линий человека, мыши.

Основным недостатком CRISPR-Cas-системы является сравнительно высокая частота нежелательных разрывов ДНК в участках, частично комплементарных гидовой РНК. Разработаны подходы для решения этой проблемы, направленные

ные на уменьшение активности Cas9 и увеличение ее специфичности. Еще один недостаток CRISPR-Cas-системы – ограничения при выборе сайта разрезания.

Важным фактором для осуществления редактирования генома является эффективность доставки нуклеаз в клетки. Нуклеазы могут быть доставлены в клетку в форме вектора, кодирующего белок, транскрибированной *in vitro* мРНК или белка. Для доставки ДНК в культивируемые клетки используют методы электропорации и липофекции, для доставки транскрибированных мРНК – микроинъекцию. Возможно использование неинтегрирующих вирусных векторов на основе аденовирусов и аденоассоциированных вирусов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ _____

1. Опишите схему работы специалиста в области генетической инженерии.
2. Какие ферменты используют в генно-инженерных проектах? Дайте их характеристику.
3. Охарактеризуйте способы получения генов, укажите преимущества и недостатки каждого из них.
4. Что представляют собой эндонуклеазы рестрикции типа II и почему они важны для технологии рДНК?
5. Каковы особенности получения генов эукариотических организмов?
6. Что понимают под термином «генетический вектор»? Какие требования предъявляют к векторам?
7. Какие типы векторов вам известны? Чем они отличаются друг от друга?
8. Как создают генетические векторы?
9. Каковы способы создания рекомбинантных молекул ДНК?
10. Что понимают под терминами «отжиг» и «лигирование»?
11. С какой целью рестрицированную плазмидную ДНК перед лигированием обрабатывают щелочной фосфатазой?
12. Опишите способы введения генов в чужеродные клетки.
13. Охарактеризуйте способы введения рДНК в клетки *E. coli*.
14. Как идентифицируют клетки-мишени, получившие нужный ген?
15. Дайте определение термина «геномная библиотека». Каковы этапы создания геномной библиотеки?
16. Дайте определение термина «библиотека κДНК». Каковы этапы создания библиотеки κДНК?
17. В каких случаях ген «нуждается» в замене одного промотора на другой?
18. Почему плазмидный вектор с максимально сильным промотором не всегда является наилучшим экспрессирующим вектором?
19. Как встроить в плазмиду несколько копий гена?
20. В чем преимущество локализации чужеродных белков на поверхности клеток? Как сделать рекомбинантные белки секретруемыми?

21. Какие преимущества и недостатки имеет интеграция плазмидного вектора в хозяйскую ДНК?

22. Какими способами можно влиять на экспрессию генов, клонированных в прокариотических организмах?

23. Стратегия синтеза белка-мишени может включать получение этого белка в составе химерного продукта. В чем преимущество такого подхода? Как создают химерный белок?

24. Каковы способы снижения метаболической перегрузки клеток *E. coli*, синтезирующих в большом количестве рекомбинантный белок?

25. Почему для получения многих рекомбинантных белков лучше применять эукариотические, а не прокариотические системы? Какие эукариотические системы экспрессии используются для получения рекомбинантных белков?

26. Охарактеризуйте методы секвенирования ДНК.

27. Что такое дидезоксинуклеотиды? Как с их помощью определяют нуклеотидную последовательность ДНК?

28. Какое значение в настоящее время имеет секвенирование ДНК?

29. Что понимают под терминами «геномный проект», «базы данных нуклеотидных последовательностей»?

30. Каковы цели геномных проектов?

31. В чем заключается суть новых методов клонирования генов?

32. Какие технологии используют для редактирования геномов?

СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ



3.1. Конструирование и использование рекомбинантных штаммов бактерий

В биотехнологии для получения коммерческих продуктов используются различные генетически модифицированные микроорганизмы: *Escherichia coli*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Erwinia herbicola*, *Acremonium chrysogenum*, *Zygomonas mobilis*, *Trichoderma reesei*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces* и др.

Метаболическая инженерия – использование технологии рекомбинантных молекул ДНК для улучшения свойств природных штаммов микроорганизмов путем модификации биохимических реакций. Этот подход позволяет оптимизировать метаболические потоки, создавать новые пути метаболизма для достижения максимально возможной конверсии источников углерода в целевой продукт, направленно улучшать биотехнологические характеристики штаммов-производителей.

Популярным объектом биотехнологии и генетической инженерии является *E. coli*. Это наиболее изученная подвижная грамотрицательная бактерия, время генерации которой в логарифмической фазе роста на обогащенных жидких питательных средах составляет при 37 °С примерно 22 мин. Поэтому клетки кишечной палочки широко используют для получения важных в коммерческом отношении продуктов с помощью технологии рДНК.

В качестве молекулярных векторов для *E. coli* применяют клонирующие плазмидные векторы, векторы на основе ДНК фага λ , космиды, искусственные бактериальные хромосомы ВАС (сконструированы на основе полового фактора *F E. coli*), фазмиды, клонирующие векторы на основе нитевидных фагов (M13, fd, f1), фагмиды.

E. coli не обладает физиологической компетентностью для поглощения молекул ДНК из среды. Поэтому бактериальные клетки обрабатывают этилендиаминтетраацетатом (далее – ЭДТА), связывающим двухвалентные катионы кальция, и лизоцимом и получают сферопласты. Сферопласты формируются после ферментативного гидролиза, если на плазматической мембране остаются фрагменты клеточной стенки или сохраняется внешняя мембрана (что характерно для грамотрицательных бактерий). Если после ферментативной обработки клеток остается только плазматическая мембрана, то формируется протопласт. Сферопласты кишечной палочки способны поглощать ДНК в нативной двухцепочечной форме.

Более высокой эффективностью для проникновения ДНК в клетки *E. coli* обладает метод CaCl_2 -зависимой трансфекции. Суть его состоит в том, что куль-

туру *E. coli* обрабатывают раствором на холоде (0 °С) с последующим тепловым шоком (при 37 и 42 °С). Индукция компетентного состояния клеток *E. coli* в присутствии ионов кальция в условиях теплового шока связана с фазовым переходом липидов внешней мембраны и изменением конформации их молекул.

Для трансформации бактериальных клеток активно применяют метод электропорации – кратковременного (5–20 мс) воздействия на клетки электрического поля высокой напряженности (1–15 кВ/см), при котором происходит образование пор в клеточной мембране. При этом примерно 80 % выживших клеток могут поглощать молекулы ДНК.

Если в качестве вектора для *E. coli* используют фаг λ , то применяют метод упаковки ДНК фага в капсиды *in vitro*. Для этого необходимо наличие концентрированных экстрактов клеток, индуцированных из лизогенного состояния, и мутантные формы фага, имеющие дефекты по разным генам белков головки капсида. Мутанты не способны образовывать полноценные фаговые частицы и упаковывать свою ДНК. При смешивании фаговой ДНК и белковых экстрактов клеток, в которых развивались мутанты, собираются инфекционные частицы. Сформированными *in vitro* частицами заражают клетки *E. coli* и получают фаговое потомство.

В связи с тем, что кишечная палочка представляет собой условный патоген, для создания штаммов микроорганизмов, продуцирующих фармацевтические препараты, более перспективна бактерия *Bacillus subtilis*.

К роду *Bacillus* относятся аэробные спорообразующие грамположительные палочковидные бактерии, обитающие в почве, воде, воздухе, на растениях, продуктах питания и в желудочно-кишечном тракте животных. Это непатогенные хорошо изученные микроорганизмы с более простой организацией клеточной стенки по сравнению с грамтрицательными бактериями. Они активно секретируют белки в культуральную среду и синтезируют различные метаболиты. С высокой скоростью растут на простых и комплексных питательных средах, устойчивы к неблагоприятным внешним факторам. Эти бактерии активно используются для получения ферментов (преимущественно амилаз и протеиназ), рекомбинантных белков, антимикробных соединений, инсектицидов, адсорбентов, поверхностно-активных веществ, D-рибозы, витаминов, пуриновых нуклеозидов. Их можно использовать в качестве пробиотиков для человека и сельскохозяйственных животных (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, непатогенные штаммы *Bacillus cereus*). Некоторые бактерии этого рода применяют в качестве биоудобрений.

В качестве векторов для *Bacillus* используют автономно реплицирующиеся плазмидные векторы, интегрирующие векторы, векторы на основе бактериофагов и транспозонов.

Bacillus subtilis обладает физиологической компетентностью для поглощения ДНК. У бактерий рода *Bacillus*, как и у большинства других бактерий, компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры. Для стимуляции клеток к захвату ДНК их выращивают на богатой среде, затем переносят на бедную среду без аминокислот, необходимых ауксотрофным мутантам. Максимальная компетентность обычно достигается на поздней стадии ло-

гарифмического роста культуры. Такая культура может храниться при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ с сохранением компетентности в течение шести месяцев. Компетентные клетки составляют 5–10 % от всей популяции бактериальных клеток. Они отличаются от некомпетентных клеток по составу клеточной стенки, имеют сниженный поверхностный заряд, повышенную чувствительность к осмотическому шоку, пониженную метаболическую активность и меньшие размеры. Состояние компетентности связано с активностью определенных генов. Созданы модели трансформации клеток *Bacillus subtilis* разными типами молекул ДНК.

Однако не все грамположительные бактерии обладают физиологической компетентностью для генетической трансформации. Поэтому плазмиды и фрагменты ДНК вводят в клетки *Bacillus* не только путем трансформации компетентных клеток, но и другими методами: путем получения протопластов и их трансформации в присутствии полиэтиленгликоля с последующей регенерацией, электропорации, конъюгации и трансдукции.

Большинство методов конструирования промышленно значимых бактерий основано на использовании двойного кроссинговера. Для внесения генетических модификаций (замены нуклеотидов, вставок, делеций) в определенный локус «хромосомы» получают генетическую конструкцию (ДНК-кассету), которая вводится в хозяйскую клетку в составе нереплицирующейся плазмиды или в виде линейного фрагмента ДНК. Помимо традиционных методов объединения фрагментов ДНК, основанных на лигировании рестрикционных фрагментов, можно использовать наборы для клонирования, содержащие специальные рекомбиназы (компании *Invitrogen Gateway Cloning Technology*, *Clontech In-Fusion* и др.). В центре ДНК-кассеты должен находиться фрагмент ДНК с нужной генетической модификацией, а на флангах – последовательности, обеспечивающие гомологичную рекомбинацию с участками «хромосомной» ДНК. Интеграция ДНК-кассеты в «хромосому» *Bacillus* происходит в результате двойного кроссинговера. Селекция рекомбинантных клонов осуществляется за счет маркерного гена устойчивости к антибиотикам.

В мире сконструированы рекомбинантные микроорганизмы с новыми видами ферментативной активности, которые используются для синтеза аминокислот (*Corynebacterium glutamicum*, *E. coli*, *Brevibacterium*), антибиотиков (*Streptomyces*).

В России в 1979–1982 гг. В. Г. Дебабовым и его коллегами были созданы штаммы-продуценты L-треонина на основе лабораторного штамма *E. coli*. В 1981 г. получены штаммы-сверхпродуценты лизина, а в 1987 г. – штаммы *E. coli* с высоким уровнем синтеза фенилаланина.

В США получены препараты рекомбинантных ферментов: ДНКазы I, расщепляющей высокомолекулярную ДНК слизи в дыхательной системе больных муковисцидозом, и альгинат-лиазы, деполимеризующей альгинат.

Для биodeградации токсичных соединений (салицилата, ксилола, толуола, нафталина и др.) созданы рекомбинантные штаммы *Pseudomonas*.

Для промышленного производства фруктозы и этанола гены бактериальных ферментов α -амилазы, β -амилазы, глюкоамилазы перенесли в клетки *Bacillus*

subtilis. Ген глюкоамилазы гриба *Aspergillus awamori* встроили в *Saccharomyces cerevisiae*, а ген термофильной бактерии *Thermus thermophilus* экспрессировали в *E. coli* и *Bacillus brevis*.

Для утилизации целлюлозы получены гены бактериальных и грибных ферментов – целлюлаз из *Streptomyces*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, которые вводили в *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Генно-инженерное получение медицинских препаратов

В табл. 2 приведены примеры рекомбинантных белков медицинского назначения, полученных с помощью генно-инженерных методов.

Таблица 2

Некоторые белки человека, полученные генно-инженерными методами, и их применение для лечения заболеваний

Заболевание	Белок
Анемия	Гемоглобин Эритропоэтин
Задержка роста	Соматотропин Соматолиберин Соматомедин С
Злокачественные новообразования	Интерлейкины Интерфероны Фактор некроза опухоли Фактор, активирующий макрофаги Колонистимулирующие факторы
Сахарный диабет	Инсулин Инсулиноподобный фактор роста
Тромбообразование	Тканевой активатор плазминогена
Гемофилия	Факторы свертывания крови VIII, IX
Заболевания иммунной системы	Интерлейкины Факторы роста В-лимфоцитов
Ревматизм	Адренокортикотропный гормон
Эмфизема	α_1 -антитрипсин
Вирусные заболевания	Интерфероны
Астма, ревматоидный артрит	Рецептор интерлейкина-1
Повреждение нервной ткани	Фактор роста нервов
Боль	Эндорфины Энкефалины
Женское бесплодие	Хорионический гонадотропин
Роды	Релаксин
Муковисцидоз	ДНКаза I

Получение инсулина

Сахарный диабет как причина смерти стоит на третьем месте после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. Клиническая форма сахарного диабета, для лечения которой необходим инсулин, вызвана избирательной гибелью клеток поджелудочной железы, образующих островки Лангерганса, синтезирующих гормон инсулин. Инсулин – пептидный гормон, регулирующий углеводный обмен и поддерживающий уровень глюкозы в крови. Инсулин обеспечивает проникновение из крови в ткани глюкозы, аминокислот, жирных кислот, стимулирует превращение их в гликоген, белки, жиры, снижение концентрации глюкозы в крови. Для поддержания жизни больного диабетом в инсулинзависимой форме необходимы постоянные инъекции препарата (от 1 до 4 раз в сутки в зависимости от тяжести состояния).

Инсулин синтезируется в виде одноцепочечного препроинсулина, содержащего концевой сигнальный пептид (23 аминокислотных остатка) и соединительный С-пептид (35 аминокислотных остатков). При удалении сигнального пептида в клетке образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков, в котором А- и В-цепи соединены С-пептидом, обеспечивающим им необходимую ориентацию при замыкании дисульфидных связей. После протеолитического отщепления С-пептида образуется инсулин. Молекула инсулина состоит из 51 аминокислотного остатка.

Для получения 100 г кристаллического инсулина необходимо 800–1000 кг поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней. Препараты инсулина, полученные из организма животных, могут вызывать у пациентов серьезные осложнения в виде аллергии, связанные с аминокислотным составом гормона (в том числе С-пептида) различного происхождения.

В 1963 и 1965 гг. в США, Китае и Германии был осуществлен синтез обеих цепей инсулина и соединение их дисульфидными связями.

В 1980 г. датская компания «Ново индастри» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека путем замещения 30-го остатка аланина в цепи В на остаток треонина. Оба препарата инсулина не различались по активности и времени действия.

В 1978 г. в США появилось сообщение о получении штамма *E. coli*, продуцирующего крысиный проинсулин. Также были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством экспрессии их синтетических генов в клетках *E. coli*. Каждый из полученных синтетических генов подстраивался к 3'-концу гена фермента β -галактозидазы и вводился в векторную плазмиду. Клетки *E. coli*, трансформированные такими рекомбинантными плазмидами, производили химерные белки, состоящие из фрагментов β -галактозидазы и А- и В-пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина. При обработке химерного белка бромцианом пептид освобождался. Однако замыкание дисульфидных связей между цепями инсулина происходило с трудом.

В 1980 г. У. Гилберт и его сотрудники выделили мРНК инсулина из опухоли β -клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили кДНК, которую встроили в плазмиду рBR322 *E. coli*, в среднюю часть гена пениллиназы. Рекомбинантная плазида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который выделяли из этого белка обработкой трипсином.

Первым препаратом, прошедшим клинические испытания, был инсулин, производимый американской компанией «Эли Лилли» под коммерческим названием «Хемулин», выпущенный в продажу в 1983 г.

Получение соматотропина

Соматотропин или гормон роста человека (191 аминокислотный остаток) секретируется передней долей гипофиза. Это белок с молекулярной массой 21 кДа. Он необходим для стимуляции роста тела, дифференцировки жировой, мышечной, хрящевой ткани. Недостаток соматотропина приводит к гипофизарной карликовости, которая встречается с частотой 1 : 5000. Соматотропин обладает видовой специфичностью. Он был выделен и очищен в 1963 г. Обычно его получали из трупного материала, но его хватало для лечения одной трети случаев заболевания. Препарат из трупного материала представляет собой смесь форм: интактных молекул, димеров, фрагментов, образующихся в результате протеолиза. После введения такого препарата в организм у 30 % пациентов вырабатываются антитела и гормон роста инактивируется.

Биосинтез соматотропина был осуществлен в 1979 г. группой ученых во главе с Д. Гёдделем (компания *Genentech*). Для этого клонировали двунитевую кДНК. Однако получался ген, кодирующий предшественник соматотропина, который не расщепляется в бактериальных клетках с образованием активного гормона. Поэтому путем расщепления получали нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислотных остатков, а также синтетический полинуклеотид, соответствующий аминокислотным остаткам от 1 до 23 со стартовым кодоном в начале. Оба фрагмента объединяли и подстраивали к *lac*-промотору и участку связывания рибосом. В качестве вектора использовали плазмиду рBR322. Синтезированный в бактериальных клетках кишечной палочки гормон на N-конце полипептидной цепи содержал дополнительный остаток метионина и обладал высокой биологической активностью. Широкомасштабное производство началось с 1984 г. после клинических испытаний.

В 1982 г. гормон роста человека в клетках кишечной палочки и в культуре клеток животных был получен в Институте Пастера в Париже и в Институте молекулярной биологии в Москве.

Получение интерферонов

Интерфероны представляют собой индуцируемые секреторные белки-гистогормоны (цитокины), вырабатываемые клетками эукариот в ответ на действие вирусов и других стимулов (бактерии, микробные продукты, митогены, антигены). Они играют центральную роль в регуляции нормального иммунного ответа.

Интерфероны были открыты в Национальном институте медицинских исследований в Лондоне как факторы устойчивости к вирусной инфекции. Молекулы интерферонов представляют собой гликопротеины, состоящие из 146–166 аминокислотных остатков. Интерфероны видоспецифичны. Лейкоцитарные α -интерфероны кодируются 20 генами, фибробластные β -интерфероны – одним или несколькими генами, γ -интерферон, образующийся в Т-лимфоцитах, – одним геном. Интерфероны- α и - β синтезируются клетками, обработанными препаратами вирусов или вирусной РНК, а интерферон- γ вырабатывается в ответ на действие веществ, стимулирующих рост клеток. Подтипы α -интерферона имеют разную специфичность.

Интерфероны могут быть получены несколькими способами: из крови (из 1 л крови получают 1 мкг интерферона или одну дозу инъекции), из клеток лимфомы после обработки клеток вирусом Сендай с последующим выделением путем хроматографии, из фибробластов плода (β -интерферон). Все способы получения интерферонов характеризуются низким выходом, недостаточной чистотой препарата и его высокой стоимостью.

Генно-инженерный метод получения интерферонов человека включает следующие этапы:

- 1) выделение мРНК из лейкоцитов человека и фракционирование ее по размерам;
- 2) обратная транскрипция на основе изолированной мРНК, получение кДНК и встраивание кДНК в плазмиду рВР322;
- 3) трансформация *E. coli* полученной рДНК с последующей идентификацией клонов, несущих целевой ген;
- 4) гибридизация клонов с интерфероновой мРНК;
- 5) выделение мРНК из гибридов, содержащих клонированную ДНК и мРНК, и ее трансляция в бесклеточной системе синтеза белка;
- 6) определение интерфероновой противовирусной активности исследуемых смесей после трансляции;
- 7) тестирование выявленных клонов с кДНК, гибридизовавшейся с интерфероновой мРНК, и проявивших противовирусную активность для обнаружения клонов с полноразмерной кДНК, кодирующей интерферон человека.

Интерфероны синтезируются в клетках в виде предшественников, содержащих на N-конце сигнальный пептид, который отщепляется с образованием зрелого интерферона. Бактерии не содержат ферменты, способные отщеплять

сигнальный пептид. Поэтому в плазмиду надо вводить только часть гена, соответствующую зрелому интерферону.

Получены интерфероны с комбинированными свойствами путем лигирования нуклеотидных последовательностей генов α -интерферонов, которые проявляли большую противовирусную активность по сравнению с исходными молекулами интерферонов.

Интерфероны- α применяются для лечения волосистой лейкоплакии; саркомы Капоши; остроконечной кандиломы; гепатитов В и С; рака мочевого пузыря, головы и шеи, почки; меланомы; множественной миеломы; неходжкинской лимфомы; папилломавирусной инфекции, ВИЧ-инфекции.

Проблемой при получении β - и γ -интерферонов с помощью *E. coli* является отсутствие у бактерий аппарата гликозилирования эукариотических белков. Поэтому гены интерферонов клонированы в дрожжи *S. cerevisiae* и клетки высших эукариот.

Интерферон- β применяют для лечения рецидивирующего рассеянного склероза, интерферон- γ – для лечения хронического гранулематоза, рака почки.

Получение антител

Генно-инженерное получение антител с помощью комбинаторных библиотек включает следующие этапы:

- 1) выделение мРНК из В-лимфоцитов человека, вырабатывающих антитела;
- 2) синтез кДНК на матрице мРНК;
- 3) ПЦР-амплификация кДНК, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител;
- 4) обработка кДНК тяжелых и легких цепей специфичными для них рестриктазами;
- 5) встраивание кДНК тяжелых и легких цепей в вектор на основе бактериофага λ ;
- 6) объединение ДНК тяжелых и легких цепей в одном векторе;
- 7) скрининг бляшек для выявления антигенсвязывающей активности;
- 8) вырезание плазмиды, содержащей фрагменты ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи;
- 9) трансформация клеток кишечной палочки сконструированной плазмидой, содержащей ДНК тяжелой и легкой цепей;
- 10) выделение антигенсвязывающего фрагмента антител Fv из *E. coli*.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ _____

1. Какие технологии применяют для создания рекомбинантных штаммов *E. coli*?

2. Каковы преимущества *Bacillus subtilis* как продуцента фармацевтических рекомбинантных белков по сравнению с другими микроорганизмами?

3. Какие технологии применяют для создания рекомбинантных штаммов *Bacillus subtilis*?

4. Какие коммерческие продукты получают с помощью рекомбинантных штаммов микроорганизмов?

5. Какие рекомбинантные белки, используемые в медицине, получены с помощью методов генетической инженерии?

6. Какие методические подходы были использованы для создания генно-инженерного инсулина?

7. Каковы основы технологии получения рекомбинантных препаратов соматотропина человека?

8. Охарактеризуйте способы получения препаратов человеческого инсулина.



Организмы, несущие в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, называют трансгенными. Ген, интегрированный в геном реципиента, называют трансгеном. Белковый продукт этого гена называют трансгеном.

Преимущество растений перед животными в экспериментальной биологии связано с тотипотентностью растительной клетки и возможностью выращивания фертильных растений путем регенерации *in vitro* каллусных тканей.

Трансгенные растения используются для изучения фундаментальных проблем функционирования генов у растений; в качестве биореакторов фармацевтически ценных белков; для улучшения качества и хозяйственно ценных признаков важных сельскохозяйственных культур и декоративных растений.

4.1. Получение трансгенных растений

Основные способы получения трансгенных растений – метод агроинфекции на основе Ti-плазмиды грамотрицательной почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* и метод бомбардирования.

Метод агроинфекции

У двудольных растений после их повреждения и инфицирования Ti-плазмиды (от англ. *tumor inducing*) *Agrobacterium tumefaciens* вызывает заболевание – корончатый галл (опухолевые разрастания в местах соединения стебля и корня). Размер этой плазмиды обычно составляет 200–250 т. п. н. T-область (10–30 т. п. н.) Ti-плазмиды способна передаваться в растительную клетку с последующим встраиванием в хромосомы ядра (передача происходит с участием генов вирулентности *vir*). Гены Ti-плазмиды, ответственные за перенос в растение и интеграцию генов T-области, находятся в области вирулентности – *vir*-области. T-ДНК в растении кодирует ферменты синтеза фитогормонов (ауксина и цитокининов, образующихся в избыточном количестве), индуцирующих опухолевое разрастание, а также ферменты синтеза необычных продуктов конденсации аминокислот и сахаров – опинов – источников углерода и азота для *Agrobacterium tumefaciens*. Гены ферментов биосинтеза гормонов и опинов экспрессируются только в растительных клетках. В связи с этим агробактерию

называют «природным геным инженером». T-области ограничены повторяющимися последовательностями, а любая ДНК, вставленная между этими повторами, будет принята за T-область и перенесена в растительную клетку.

К недостаткам T_i-плазмиды относят большой размер, отсутствие уникальных сайтов рестрикции в районе T-ДНК. Кроме того, некоторые гены T-области обуславливают гормонезависимость растительных клеток и, вследствие этого, трудности регенерации целого растения из протопластов. Поэтому конструируют производные T_i-плазмиды, в которых оставляют регуляторный участок T-области, и вместо структурных генов вводят структурную часть нужного гена.

T_i-плазмиды активно изучали в 70-е гг. XX в., а в 80-е гг. и позднее исследователи разработали способы введения чужеродных генов в состав T-ДНК и затем в растительную клетку: бинарную векторную систему и простую бинарную векторную систему *A. tumefaciens*.

T-ДНК и гены вирулентности могут находиться на двух разных репликаонах. Поэтому бинарная векторная система включает бинарный вектор (плазида, содержащая T-ДНК) и помощник, или хелпер (плазида, несущая гены вирулентности). Хелперная плазида имеет делецию всей T-ДНК или ее части и называется обезоруженной. Она способствует встраиванию T-ДНК из бинарного клонирующего вектора в хромосомную ДНК растения.

Бинарный вектор (бинарная векторная система *A. tumefaciens*) – плазида, способная реплицироваться в *E. coli* и *A. tumefaciens* (рис. 21). Длина вектора составляет 12 462 п. н. Ее обязательные элементы – повторы, ограничивающие T-ДНК (25 п. н.), – правая (RB) и левая (LB) границы. Эти повторы ограничивают район, содержащий ген селективного маркера, промоторы и сигналы полиаденилирования мРНК. Между ними по уникальным сайтам рестрикции встраивают целевую кодирующую последовательность. Интеграция T-ДНК происходит с большой точностью по правой границе.

Если T-ДНК и гены вирулентности локализованы в одном репликоне, то вектор называют коинтегративным.

После агробактериальной трансформации растительные клетки культивируют *in vitro* на культуральных средах с добавлением селективных агентов, далее регенерируют трансформанты. После восстановления полноценных растений подтверждают событие интеграции целевых генов с помощью метода ПЦР и др.

Агробактериальная трансформация растений приводит к интеграции ДНК в различные участки разных хромосом. Поэтому уровень экспрессии трансгена у разных трансгенных растений в одном эксперименте сильно варьирует и зависит от положения трансгена в растительном геноме (близость «сильного» промотора, «усилителей» и «глушителей» транскрипции). Возможен эффект сайленсинга (замолкания) трансгена в последующих поколениях вследствие нестабильности конструкции и выщепления трансгена, метилирования промотора, расщепления мРНК. В связи с этим необходимо получать большое количество трансгенных растений.

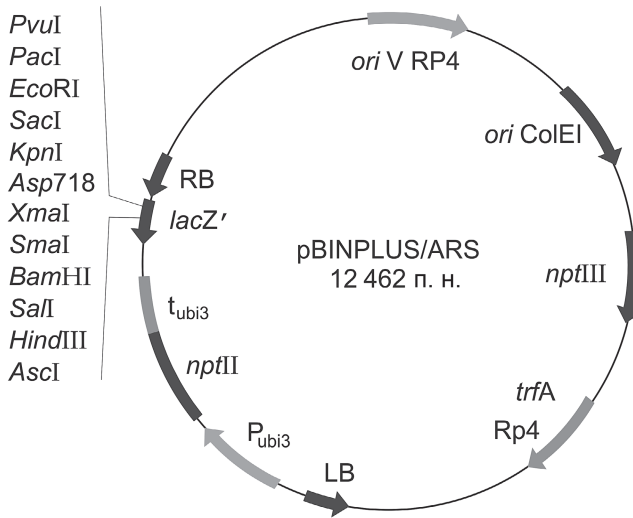


Рис. 21. Структура бинарного вектора агробактериальной трансформации

Для отбора целевых растительных клеток в них вводят маркерные (селективные и репортерные) гены. Маркерные гены служат для быстрого и эффективного отбора трансформированных клеток и растений-регенерантов, у которых произошла встройка чужеродной ДНК в ядерный или хлоропластный геном. Большинство селективных генов обеспечивает преимущества роста и дифференциации трансгенных клеток в присутствии агента, токсичного для нетрансгенных клеток. Репортерные гены позволяют выявлять присутствие в ткани трансформированного растения рекомбинантного белка и предварительно судить об уровне экспрессии самого гена. В качестве селективных генов используют гены устойчивости к антибиотикам (канамицину, гигромицину) и гербицидам (фосфинотрицину); в качестве репортерных – ген зеленого флуоресцентного белка или ген, кодирующий β -глюкуронидазу.

Для предотвращения неконтролируемого распространения в окружающей среде маркерных генов устойчивости к антибиотикам разрабатывают методы получения безмаркерных трансгенных растений. Одним из подходов для решения этой проблемы является котрансформация растений двумя разными молекулами ДНК: с маркерным геном и с целевым геном. В результате 30–80 % растений будут содержать оба гена, интегрированные в разные сайты хромосомной ДНК. После отбора трансформантов маркерный ген удаляют из трансгенных растений путем обычного скрещивания. Второй подход связан с созданием генетических конструкций на основе Т-ДНК, содержащих маркерный ген, встроенный между растительными мобильными элементами и геном транспозазы. Транспозаза вырезает маркерный ген и перемещает его в другой хромосомный сайт. После идентификации целевых растений маркерный ген удаляют при скрещивании.

Метод бомбардирования

Метод бомбардирования – прямой метод введения трансгена в растение, разработанный в 1987 г. Дж. Сэнфордом и его коллегами. Этот метод не зависит от видовой принадлежности растений. Он часто применяется для трансформации однодольных растений. Источниками клеток могут быть клеточные суспензии, культуры клеток, меристематические ткани, незрелые зародыши, колеоптилы, пыльца. На сферические частицы вольфрама или золота (менее токсичны и более удобны) диаметром 0,6–3 мкм адсорбируют (напыляют) ДНК (плазмиды). Микрочастицы помещают внутрь биолиственной (генной) пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризованной средой и помещается под пушку на расстоянии 10–15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. Частицы с плазмидной ДНК выбрасываются из пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток. Выживают клетки, находящиеся на расстоянии 0,6–1 см от центра. Их используют для культивирования и регенерации целых растений. Но большая часть плазмид после попадания в целевые клетки деградирует. Интактные плазмиды рекомбинируют друг с другом и хромосомной ДНК. Встраивание происходит случайным образом, а встроенные структуры подвергаются перестройкам. Поэтому необходимо получать большое количество трансформантов, проводить тщательный анализ ДНК. Эти эксперименты характеризуются высокой трудоемкостью.

С помощью метода бомбардирования были получены трансгенные растения кукурузы, риса, ячменя, пшеницы, ржи, сорго, тополя, ели, гороха, огурца, люцерны, бобов, хлопка, табака, винограда.

Метод бомбардирования применяют и для трансформации пластидного генома растительных клеток. Геном пластид – пластома – кольцевая двухцепочечная молекула ДНК размером 120–180 т. п. н. Каждая пластида может нести 10–100 пластом. Клетка зеленого листа содержит до 100 пластид и соответственно до 10 000 пластидных геномов. Трансформация пластид может обеспечить увеличение количества копий целевого гена (дозы гена) и, следовательно, повышение продуктивности растений в отношении синтеза чужеродного белка (до 70 % целевого белка от белка клетки).

Первые работы по введению экзогенной ДНК в пластидный геном были проведены в конце 80-х – начале 90-х гг. XX в. В качестве целевых растений использовали одноклеточные водоросли *Clamydomonas reinhardtii* и листья табака *Nicotiana tabacum*. Растения, содержащие трансгенные пластомы, называют транспластомными. Созданы транспластомные растения табака, сои, хлопка, салата. Получены транспластомные растения табака с экспрессией генов субъединицы В холерного токсина, инсектицидного токсина *Bt Bacillus thuringiensis*, соматотропина человека.

К недостаткам транспластомных растений относят невозможность направления рекомбинантного белка в эндоплазматический ретикулум и осуществле-

ние ряда посттрансляционных модификаций, а также сложность экспериментальной работы.

Перспективы создания новых транспластомных растений связаны с их большей безопасностью для среды по сравнению с обычными трансгенными растениями, так как пластиды обычно передаются по материнской линии и не содержатся в пыльце. Кроме того, станет возможным получение съедобных вакцин и создание искусственных оперонов для целенаправленного изменения метаболических процессов в растениях.

Осуществляются экспериментальные попытки трансформации митохондриального генома путем биобаллистики клеток *Clamydomonas reinhardtii* и *Arabidopsis thaliana*.

Перенос генов с помощью вирусов

Перенос генов в растения может быть осуществлен с помощью вирусов. Большинство вирусов растений несут одноцепочечную РНК. Поэтому сначала необходимо клонировать в бактериальных плаزمидях ДНК-копии вирусных РНК. С помощью фаговой РНК-полимеразы *in vitro* синтезируют РНК-транскрипты рДНК и трансфецируют ими растительные протопласты или ткани. Наибольшее применение нашли вирусы табачной мозаики (TMV) и мозаики коровьего гороха (CPMV).

Применение вирусов для переноса генов в растительные клетки позволяет получать вирусные частицы, на поверхности которых локализованы иммуногенные эпитопы ряда вирусов (гриппа, иммунодефицита человека, ящура, бешенства и др.) и использовать их для получения вакцин.

Преимущества вирусов растений для переноса генов: высокий уровень экспрессии целевого гена, широкий круг хозяев для экспрессии по сравнению с методом агроинфекции, экспонирование антигенного пептида на поверхности вирусных частиц, простота очистки полученного препарата. Однако векторная система вирусов имеет серьезные недостатки: ограничения по размеру вставки кодирующей последовательности, ограниченная во времени экспрессия гена и продукция вирусных частиц, опасность распространения вирусов в окружающей среде.

Для введения генов в растительные клетки используют также ДНК-содержащие вирусы растений (в частности, вирус мозаики цветной капусты CaMV). К их преимуществам относят малый размер генома и легкость манипуляций вирусной ДНК, ее высокая копияность в целевых клетках, наличие сильных промоторов, а к недостаткам – небольшую емкость вектора (менее 800 п. н.) и ограниченный круг хозяев.

Другие методы прямого переноса генов в растительные клетки – это трансформация растительных протопластов, микроинъекции ДНК, электропорация, упаковка ДНК в липосомы.

4.2. Синтез в растениях чужеродных белков медицинского назначения

Генетически трансформированные растения являются продуцентами рекомбинантных белков медицинского назначения. Создание генетически модифицированных живых организмов с применением методов генетической инженерии для их использования в производстве фармакологически активных субстанций называют биофармингом.

Преимущества растительных систем (клеточных культур и зрелых растений) по сравнению с другими системами экспрессии генов:

1) более дешевые системы производства (нужен свет, углекислый газ, вода, минеральные вещества);

2) в их клетках осуществляются процессы посттрансляционной модификации белков, близких к таковым в животных клетках;

3) высокая инфекционная безопасность растений для человека; в растительных системах не развиваются патогены человека и животных (вирусы, прионы);

4) хорошо разработаны методы трансформации растительных клеток;

5) возможно культивирование трансгенных растений в условиях *in vitro* в суспензионной культуре и каллусной ткани, а также в условиях *in vivo* в целом организме;

6) белки, синтезированные в семенах, клубнях, плодах, стабильны и могут сохраняться длительное время без выделения;

7) присоединение к целевому белку сигнала внутриклеточной локализации в вакуоли или апопласте позволяет длительное время хранить и транспортировать продукт без консервации и заморозки;

8) использование различных промоторов позволяет накапливать целевой белок в определенных органах растения – листьях, корнях, семенах, что облегчает сбор сырого материала;

9) возможно использование (введение в организм) белков медицинского назначения без процедур предварительного выделения и очистки, если они синтезируются в зерне риса, пшеницы, томатах, бананах;

10) применяются отработанные технологии сбора и обработки растений.

Благодаря этим преимуществам значительно снижается стоимость продукции.

Для культур клеток млекопитающих, в отличие от культур клеток растений, характерны: высокая стоимость культивирования, трудности с масштабированием процессов производства, опасность потенциального заражения клеточных культур патогенами человека и животных. Существенным недостатком дрожжевых систем являются особенности посттрансляционных модификаций, связанные с образованием гипергликозилированных рекомбинантных белков.

Производство рекомбинантных белков на основе трансгенных растений осуществляют примерно 20 компаний, в том числе: *Biolex*, *Dow Agro Sciences*, *Large Scale Biology*, *Planet Biotechnology*, *Prodi Gene* (США), *Icon Genetics*, *Novoplant* (Германия), *Medicago* (Канада), *Meristem Therapeutics* (Франция), *ORF Genetics* (Исландия), *Protalix Biotherapeutics* (Израиль).

С помощью трансгенных растений были получены рекомбинантные белки, классические (циркулирующие) гормоны и гистогормоны, антитела, вакцины: соматотропин, сывороточный альбумин, α - и β -глобины, эритропоэтин, энкефалины, человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (далее – КСФ), человеческий гранулоцитарно-макрофагальный КСФ, интерлейкины-2, 3, 4, 7, 10, 12, 13, 18, интерфероны, фактор роста фибробластов, фактор некроза опухолей, фактор роста стволовых клеток, вакцина против вируса атипичной пневмонии H1N1, антитела к вирусу Эбола и др.

В табл. 3 приведены сведения о генно-инженерном получении некоторых рекомбинантных гистогормонов (цитокинов и факторов роста), опосредующих межклеточные взаимодействия и участвующих в регулировании процессов пролиферации, дифференцировки, клеточной подвижности, развития организма, иммунных реакций, опухолевой трансформации.

Выход рекомбинантного белка можно значительно увеличить путем использования транспластомной (транзиентной) экспрессии, эффективных промоторов, выращивания клеток в суспензионной культуре. Созданы и используются для производства биофармацевтических средств клеточные линии табака, риса, люцерны, моркови. Приобретают популярность культуры водных растений (ряска, хламидомонада), так как они обладают высокими темпами роста на простых средах на свету. Зеленый мох *Physcomitrella patens* рассматривается как кандидат на «молекулярное фермерство».

Трансформированные растения – продуценты терапевтических и диагностических антител. А. Хиатт, Р. Кафферки и К. Боудиш в 1989 г. создали трансгенные растения табака, продуцирующие моноклональные антитела IgG1. Для этого ДНК-копии мРНК, выделенных из мышинной гибридомы и кодирующих легкую и тяжелую цепи IgG1, встроили в агробактериальный бинарный экспрессирующий вектор. Генетические конструкции перенесли в клетки табака. На селективной среде отобрали трансгенные растения, охарактеризовали продукцию целевых белков. Трансформанты, продуцирующие цепи иммуноглобулинов, скрестили и получили потомство, экспрессирующее одновременно обе цепи. В таких растениях цепи обоих типов объединялись и образовывали функционально активные молекулы иммуноглобулина.

Первая стратегия получения антител в растительных клетках – ядерная геномная интеграция целевого гена путем агроинфекции, а также прямой доставки ДНК в протопласты в условиях осмотического и электрического шока и бомбардировки микрочастицами. В связи с тем, что молекула антитела состоит из двух тяжелых и двух легких полипептидных цепей, возможно использование двух методов введения генов, кодирующих эти цепи, в растения. Первый метод основан на независимом получении отдельных растений для экспрессии легкой и тяжелой цепей с последующим их скрещиванием и отбором растений, синтезирующих одновременно обе цепи. Суть второго метода состоит в последовательном или одновременном введении генетических конструкций, кодирующих обе цепи. Последний метод использовали для получения в растении *Arabidopsis thaliana* антитела МАК33.

Т а б л и ц а 3

Примеры некоторых рекомбинантных цитокинов,
экспрессированных в растениях

Цитокин	Растение	Способ выращивания	Метод трансформации
Эритропоэтин	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация
Эритропоэтин	Табак	Целые растения	Агробактериальная трансформация
Эритропоэтин	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транспластомная (транзиентная) экспрессия	Агроинфильтрация
ГМ-КСФ	Табак	Суспензия	Агробактериальная трансформация
ГМ-КСФ	<i>Oryza sativa</i>	Суспензия	Биобаллистика
ГМ-КСФ	<i>Oryza sativa</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация
ГМ-КСФ	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транспластомная (транзиентная) экспрессия	Вирусная трансформация
Интерлейкин-2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия Транспластомное растение	Агробактериальная трансформация Биобаллистика
Интерлейкин-2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация
Интерлейкин-3	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транспластомная (транзиентная) экспрессия	Агроинфильтрация
Интерлейкин-4	<i>Nicotiana tabacum</i>	Суспензия Целые растения	Агробактериальная трансформация Агробактериальная трансформация
Интерлейкин-10	Табак, арабидопсис	Зрелые растения Суспензия	Агробактериальная трансформация Агробактериальная трансформация
Интерферон-α	<i>Aloe vera</i> <i>Daucus carota</i>	Целые растения Целые растения	Биобаллистика Агробактериальная трансформация
Интерферон-β	<i>Lactuca sativa</i>	Транспластомная (транзиентная) экспрессия	Агроинфильтрация
Интерферон-γ	<i>Oryza sativa</i>	Суспензия	Агробактериальная трансформация
Фактор роста фибробластов	Табак	Целые растения	Агробактериальная трансформация
Фактор некроза опухоли-α	<i>Solanum tuberosum</i>	Целые растения	Агробактериальная трансформация
Фактор роста стволовых клеток	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Транспластомная (транзиентная) экспрессия	Агроинфильтрация

Вторая стратегия продукции антител – трансформация хлоропластного генома и получение транспластомных растений, главным образом микроводорослей (*Clamydomonas reinhardtii*).

Есть и третья стратегия получения антител, популярная в настоящее время, основанная на кратковременной (транзистентной) экспрессии генов без включения их в геном растения-хозяина. Для временной экспрессии антител используют австралийский табак *Nicotiana benthamiana*. Суспензию *A. tumefaciens* наносят на поверхность листа в присутствии сурфактанта или вводят в межклеточное пространство листа с помощью шприца или вакуума. Применяют бинарный вектор, функционирующий в *E. coli* и *A. tumefaciens*, который несет сегмент Т-ДНК, сайты клонирования, маркерный ген для трансформированных растительных клеток, чужеродный (целевой) ген под контролем активного промотора, а также элементы, необходимые для репликации, и селективные маркерные гены для экспрессии.

На разных стадиях разработки находятся антивирусные и антибактериальные антитела, нейтрализующие ВИЧ, вирус Эбола, респираторный синцитиальный вирус человека, вирус Западного Нила; антитела для лечения сибирской язвы, ботулизма, рака (*Rituximab* для лечения лимфомы и лейкозов, *Trastuzumab* для лечения некоторых видов рака молочной железы и рака желудка).

Получены антитела для предотвращения зубного кариеса. Показано, что антитела против *Streptococcus mutans*, синтезированные в растениях табака, после нанесения на зубы защищают их от кариеса в течение четырех месяцев.

Моноклональные антитела широко применяются в медицине для лечебно-диагностических целей и научных исследований.

Главной проблемой при использовании рекомбинантных белков в медицине являются различия в гликозилировании растительных и животных белков. Дополнительные олигосахаридные остатки растительных белков могут быть аллергенами для человека.

С помощью трансгенных растений получают съедобные вакцины. Последние необходимы для местной иммунизации – эффективной защиты слизистых оболочек (пищеварительной, дыхательной, мочеполовой систем) человека от внедрения патогенов. В результате стимулируется не только местный, но и системный иммунитет. Для этого получают трансгенные растения, продуцирующие протективные антигенные белки инфекционных агентов. Для защиты иммунизирующих антигенов в организме их упаковывают в биодеградируемые полимерные или липидные частицы, которые вводят орально или назально.

Преимущества съедобных вакцин:

- 1) дешевизна получения;
- 2) отсутствие в растениях патогенов человека и животных;
- 3) простота хранения и применения;

4) возможность создания растений, продуцирующих несколько протективных антигенов различных патогенов (мультивалентные съедобные вакцины).

Получены рекомбинантные белки для использования в качестве съедобных вакцин: β -субъединица холерного токсина в картофеле (протективен при поедании сырых клубней); поверхностный белок оболочки вируса гепатита В в табаке, люпине, салате, картофеле; белок капсида вируса гастроэнтерита человека в табаке (протективен при оральном введении экстракта листьев), в картофеле (протективен при поедании сырых клубней); основной капсидный белок вируса папилломы человека в картофеле (протективен при поедании сырых клубней); гемагглютинин вируса кори в салате.

Созданы вакцины для животных, например, от геморрагического заболевания кроликов, от гастроэнтерита свиней.

Основная проблема при получении съедобных вакцин – низкий уровень продукции целевых антигенов в трансгенных растениях.

4.3. Трансгенные растения в сельском хозяйстве

Биотехнологические культуры – это коммерциализированные сорта, созданные на основе генетически модифицированных растений. В 1994 г. в США получено первое разрешение на использование генетически модифицированного пищевого продукта – томатов *Flavr Savr*.

Созданы трансгенные растения с новыми свойствами: более высокой устойчивостью к различным факторам, повышенной продуктивностью.

Для получения растений, устойчивых к гербицидам (глифосату или раундапу, хлорсульфуриновым и имидазолиновым гербицидам), клонированы гены, кодирующие нечувствительные к действию гербицидов ферменты-мишени. Однако в тканях таких растений возможно накопление гербицидов и их используют только в технических целях. Также клонированы гены, кодирующие ферменты деградации некоторых гербицидов (фосфинотрицина, 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, далапона). Устойчивость трансгенных растений к широко распространенному гербициду глифосату связана со сверхпродукцией 5-енолпирувилшкимат-3-фосфатсинтазы, участвующей в синтезе ароматических аминокислот у растений и бактерий. Ген этого фермента из глифосатустойчивого штамма *E. coli*, помещенный под контроль растительного промотора и сигналов терминации транскрипции/полиаденилирования, был перенесен в растительные клетки. В трансгенных растениях табака, томата, картофеля и хлопка за счет сверхпродукции 5-енолпирувилшкимат-3-фосфатсинтазы осуществлялась замена ингибированного гербицидом растительного фермента.

Устойчивость растений к насекомым-вредителям создается путем введения гена эндотоксина *Bacillus thuringiensis*. Это прототоксин, который в кишечнике

насекомых превращается в активный токсин и вызывает лизис клеток кишечного эпителия. Получены устойчивые картофель, хлопок, кукуруза (Bt-растения). В 1995 г. на рынок вышла первая трансгенная культура – кукуруза (Bt), устойчивая к вредителям.

Созданы устойчивые к вирусам растения, содержащие кодирующие последовательности поверхностных вирусных белков. У таких растений происходит ингибирование размножения вируса и снижение степени инфицированности. Так, получен стойкий антивирусный эффект у табака, трансформированного геном оболочки вируса табачной мозаики. Точный механизм устойчивости растений к вирусам не установлен.

Введение в растения генов PR-белков (*pathogenesis related proteins*), синтезирующихся в ответ на проникновение патогенов и угнетающих рост грибов и некоторых бактерий, привело к получению устойчивых к фитопатогенам сортов табака и турнепса. К таким белкам относят хитиназу, β -1,3-глюканазу. В томаты был введен ген защитных пептидов редьки – дефензинов, ответственных за устойчивость к фитопатогенным грибам.

Устойчивость растений к неблагоприятным факторам, в частности, солевому стрессу, связана с осмопротекторами глицинбетаином, пролином. В синтезе глицинбетаина участвуют ферменты холинмонооксидаза и бетаинальдегиддегидрогеназа. Некоторые растения, такие как картофель, рис, томаты, не способны накапливать бетаин. Бактериальные гены, ответственные за синтез ферментов метаболизма осмопротекторов, вводят в растения и получают устойчивые к солевому стрессу сорта.

Трансгенные растения применяют для биосинтеза жиров. Основной компонент растительного масла – жирные кислоты, в частности лауриновая, которые необходимы для получения стиральных порошков, шампуней, косметики. Клонирован ген специфической тиоэстеразы из лавра калифорнийского (содержание лаурата в жире семян – 70 %) и встроено в геном рапса. Растительные жиры используются для производства кондитерских изделий, лекарств, косметики, детергентов, затвердителей, полимеров, смазочных материалов, дизельного топлива.

Методы генетической инженерии используются для улучшения аминокислотного состава запасных белков растений. В белках злаков и бобовых низкое содержание незаменимых аминокислот – метионина и цистеина. Проламины злаков бедны лизином, триптофаном, треонином. Клонированы гены гордеинов ячменя, α - и β -глиадинов, глютелина пшеницы, зеинов кукурузы, легумина бобовых, пататина картофеля. Созданы трансгенные растения, в запасующих органах которых синтезируются белки, обогащенные незаменимыми аминокислотами.

Получены трансгенные растения риса с генами ферментов пути биосинтеза β -каротина, который накапливается в эндосперме семян, хлопка с окрашенным волокном, декоративные растения с необычной окраской цветков.

4.4. Генетически модифицированные растения и риски их использования

Генно-модифицированные растения были получены в начале 80-х гг. XX в. в США корпорацией «Монсанто».

В начале XXI в. посевы генетически модифицированных организмов (далее – ГМО) в мире занимали площади более 58 млн га, в 2013 г. – уже 175,2 млн га. В связи с этим резко возрос интерес к проблеме безопасности технологий создания и использования ГМО.

Данные о распространении генно-модифицированных культур в мире анализирует и публикует Международная служба оценки применения агробиотехнологий (ISAAA) на основе информации, предоставляемой легальными производителями. Согласно сведениям этой организации, в основном используют следующие генно-модифицированные культуры: баклажан, гвоздику, дыню, картофель, кукурузу, лен, люцерну, папайю, перец сладкий, петунию, полевицу ползучую, помидор, пшеницу, рапс, розу, сахарную свеклу, сахарный тростник, сквош (род тыквы), сливу, сою, табак, тополь, фасоль, хлопок, цикорий. Наибольший коммерческий успех имеют соя, кукуруза (компоненты кормов в животноводстве), хлопок (прядельная культура), масличный рапс (сырье для производства технических масел).

К странам, в которых генетически модифицированные растения официально культивируются на площади более 50 тыс. га, относятся США, Бразилия, Аргентина, а также Индия, Канада, Китай, Парагвай, ЮАР, Пакистан, Уругвай, Боливия, Филиппины, Австралия, Буркина-Фасо, Мьянма, Испания, Мексика, Колумбия, Судан. На долю США приходится 40 % всех площадей генетически модифицированных культур. Посевы генетически модифицированных растений площадью менее 50 тыс. га имеются в Чили, Гондурасе, Португалии, Кубе, Чехии, Коста-Рике, Румынии, Словакии.

Большая часть патентов комбинаций генов ГМО в мире – 90 % – принадлежит компании «Монсанто». К компаниям, работающим в области создания трансгенных продуктов, относятся «Доу» и «Дюпон» в США, «Сингента» (до 2000 г. «Новартис») в Швейцарии, «Зенека» в Великобритании, «Рон-Пуленк-Агро» во Франции, «Байер» в Германии.

На первом месте среди новых признаков трансгенных растений находится устойчивость к гербицидам (70 % всех растений), на втором – устойчивость к вредителям (20 % всех растений).

Встраивание в геном организма-хозяина новых генетических конструкций направлено на улучшение полезных для человека свойств и снижение себестоимости сельскохозяйственного производства. Но вместе с новыми полезными для производителя свойствами организм приобретает целый набор новых качеств, обусловленных множественным действием нового белка и свойствами встроенной генетической конструкции, в том числе ее нестабильностью и регуляторным действием на соседние гены.

Все нежелательные явления, связанные с получением и использованием ГМО, объединяют в три группы: пищевые, экологические и агротехнические (А. М. Куликов, 2005).

К пищевым рискам относят:

1) непосредственное действие токсичных и аллергенных трансгенных белков ГМО;

2) риски, опосредованные множественным действием трансгенных белков на метаболизм растений;

3) риски, обусловленные накоплением гербицидов и их метаболитов в устойчивых сортах сельскохозяйственных растений;

4) риски горизонтального переноса трансгенных конструкций в геном симбионтных для человека и животных бактерий (*E. coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium*).

Спектр экологических рисков включает:

1) снижение сортового разнообразия сельскохозяйственных культур вследствие массового применения ГМО, полученных из ограниченного набора родительских сортов;

2) неконтролируемый перенос конструкций, особенно определяющих различные типы устойчивости к пестицидам, вредителям и болезням растений, вследствие переопыления с дикорастущими родственными и предковыми видами, в результате чего снижается биоразнообразие дикорастущих предковых форм культурных растений и формируются «суперсорняки»;

3) риски неконтролируемого горизонтального переноса генетических конструкций в ризосферную микрофлору;

4) негативное влияние на биоразнообразие через поражение токсичными трансгенными белками нецелевых насекомых и почвенной микрофлоры и нарушение пищевых (трофических) цепей;

5) риски быстрого появления устойчивости к используемым трансгенным токсинам у насекомых-фитофагов, бактерий, грибов и других вредителей под действием отбора на признак устойчивости, высокоэффективного для этих организмов;

6) риски появления новых, более патогенных штаммов фитовирусов, при взаимодействии фитовирусов с трансгенными конструкциями, проявляющими локальную нестабильность в геноме растения-хозяина и являющимися наиболее вероятной мишенью для рекомбинации с вирусной ДНК.

Среди основных агротехнических рисков выделяют:

1) риски непредсказуемых изменений нецелевых свойств и признаков модифицированных сортов, связанные с множественным действием гена;

2) риски отсроченного изменения свойств, проявляющиеся через несколько поколений, связанные с адаптацией нового гена генома;

3) неэффективность трансгенной устойчивости к вредителям через несколько лет массового использования данного сорта.

Риски, связанные с производством биотехнологической продукции, начали обсуждаться в научной литературе с 1983 г. К середине 80-х гг. XX в. в развитых странах выработана государственная политика по биотехнологии. В 1995 г. приняты Международные руководящие принципы безопасности ЮНЕП (Программа ООН по окружающей среде) в области биотехнологии.

Практические оценки влияния ГМО на организм при их пищевом потреблении появились в конце XX – начале XXI в. Первые работы принадлежат А. Пуштаи и С. Юэн (Великобритания). Они показали негативное влияние трансгенного картофеля, модифицированного лектином подснежника, на состояние слизистой кишечника, печени, тимуса, вес внутренних органов крыс, содержащихся 9 месяцев на соответствующей диете, по сравнению с контрольными животными. Началась разработка методик оценки пищевых рисков, связанных с действием потенциальных аллергенов трансгенных растений. Фармакологи рекомендовали полностью исключить ГМО из состава детского питания. С 2004 г. в странах Евросоюза запрещено использование ГМО в продуктах питания для детей до 4-х лет.

В мире примерно с 1983 г. развернулась интенсивная полемика сторонников и противников использования ГМО. Противники ГМО рассматривают проблему создания и использования генетически трансформированных растений в нескольких аспектах: медицинском, экологическом, социально-экономическом (внедрение ГМО разоряет фермеров), политическом (ГМО – инструмент подчинения мирового сельского хозяйства и рынка транснациональным корпорациям).

В странах Евросоюза введено требование обязательной маркировки генно-модифицированной продукции. В 1999–2003 гг. действовал мораторий на одобрение новых трансгенных сортов. В 2000 г. ряд крупнейших производителей продуктов питания и торговых сетей объявили об отказе от использования ГМО. Австрия, Венесуэла, Греция, Польша, Швейцария полностью отказались от ГМО.

В нашей стране в начале 2014 г. был введен запрет на производство ГМО. В то же время более 300 отечественных ученых подписали обращение к правительству РФ и заявили, что мнения об опасности ГМО «не имеют научных оснований и рассчитаны на общественные страхи и отсутствие у населения объективной информации», а запрет на производство ГМО «приведет к отставанию России от мировых конкурентов в этой важной отрасли, к утечке молодых перспективных биотехнологов за рубеж, к утрате критических технологий».

Исследователи акцентируют внимание на актуальности проблемы анализа вышеназванных рисков использования ГМО, на необходимости выработки норм экспертизы и тестирования новых сортов с учетом уже известных рисков и жесткого контроля ГМО по сравнению с исходными, не модифицированными сортами. Это требует высокого уровня финансирования и объединения усилий разных специалистов – биохимиков, биофизиков, генетиков, экологов, селекционеров и др. – в оценке биобезопасности генно-инженерных технологий, связанных с получением и использованием трансгенных организмов, и еще раз подчеркивает интегративный характер современной науки и производства.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие методы используют для переноса генов в растительные клетки?
2. Охарактеризуйте технологию получения трансгенных растений с помощью метода агроинфекции.
3. В чем заключается суть метода бомбардирования при получении трансгенных растений?
4. Как получают и используют транспластомные растения?
5. Каковы преимущества и недостатки вирусов как средств переноса генов в растительные клетки?
6. Каковы преимущества использования генетически трансформированных растений в качестве продуцентов рекомбинантных белков медицинского назначения?
7. Какие медицинские препараты получают с помощью генетически трансформированных растений?
8. Охарактеризуйте стратегии получения антител с помощью генетически трансформированных растений.
9. Что означает термин «съедобная вакцина»? Каковы преимущества съедобных вакцин по сравнению с другими типами вакцин?
10. Какие практические задачи в области сельского хозяйства могут быть решены путем использования трансгенных растений?
11. Каковы возможные риски использования генно-модифицированных растений?
12. Как с помощью методов генетической инженерии создать растения, устойчивые к гербицидам?
13. Как с помощью методов генетической инженерии создать растения, устойчивые к насекомым-вредителям?
14. Как следует изменить растение, чтобы обеспечить его защиту от патогенных почвенных грибов?



5.1. Перенос генов в клетки млекопитающих

Перенос чужеродных генов в клетки млекопитающих используется для решения целого ряда задач:

- 1) экспрессии генов в культурах клеток;
- 2) получения трансгенных животных;
- 3) генной терапии;
- 4) исследований функций генов.

Основные способы введения чужеродных генов в клетки млекопитающих – микроинъекция и трансфекция. Микроинъекция – введение ДНК в ядро с помощью микроиглы. Трансфекция – захват клетками ДНК в виде преципитата фосфата кальция.

Трансфекция ДНК может сопровождаться временной (кратковременной) экспрессией трансгена в случае, если 50 % клеток получили рДНК, и стабильной экспрессией, при которой все клетки получают рДНК и возникает новая клеточная линия. Временную экспрессию гена (через 48–72 ч после трансфекции) используют для изучения функций этого гена, определения уровня РНК, получения РНК или белка, кодируемых трансгеном. Трансфекция для стабильной экспрессии гена должна сопровождаться селекцией клонов, в которых чужеродная ДНК интегрирует в случайные сайты хромосом хозяйской клетки.

Для доставки трансгенов в клетки животных используют вирусные векторы. Свободно реплицирующиеся вирусы, размножающиеся внутри хозяйской клетки, но не интегрирующие в ее геном, можно использовать для временной экспрессии гена. Интегрирующиеся вирусы (в частности, ретровирусы) встраиваются в хромосому хозяйской клетки, в результате чего вирусные гены передаются клеточным потомкам. Эти вирусы потенциально опасны, так как могут реактивироваться и активировать различные клеточные гены, в том числе онкогены.

Векторы на основе вирусов конструируют так, чтобы удалить гены, отвечающие за патогенность. При этом гены, необходимые для репликации и упаковки генетического материала, обычно помещают в вирус-хелпер (помощник).

Для создания векторов на основе ДНК-содержащих вирусов чаще всего используют литические аденовирусы (Ad) и аденоассоциированные вирусы (AAV).

Векторы на основе аденовирусов (содержат двуниевую ДНК) не интегрируют в геном и обеспечивают временную экспрессию гена (5–10 дней). Адено-

вирусы имеют широкий круг хозяев и эффективно передают гены в ядра делящихся и неделящихся клеток. Созданы три поколения рекомбинантных аденовирусных векторов с делециями различных вирусных генов с целью переноса больших фрагментов чужеродной ДНК, долговременной экспрессии трансгенов, снижения иммуногенности вирусных белков.

Аденоассоциированные вирусы (содержат однонитевую линейную ДНК) могут интегрировать в хромосомы хозяйской клетки либо не интегрировать в них и находиться в состоянии эписомы. Они инфицируют делящиеся и неделящиеся клетки различных тканей с последующей долговременной экспрессией трансгена. Создают рекомбинантные варианты аденоассоциированных вирусов с целью увеличения их пакующей способности в отношении переноса протяженных трансгенов.

Перспективными векторами для генной терапии являются векторы на основе онкогенного вируса обезьян SV40.

Литические векторы нельзя использовать для стабильного введения гена в клетки, поэтому применяют ретровирусы.

ДНК ретровирусов, синтезированная с помощью вирусной обратной транскриптазы, интегрирует в хромосомы хозяйской клетки и реплицируется вместе с ее ДНК. Интегрированный в геном провирус продуцирует мРНК и вирусные белки. Вирусные частицы после сборки отпочковываются от клетки. Трансген, помещенный в ретровирус, постоянно экспрессируется в клетке. Ретровирусы имеют широкий круг хозяев.

В качестве вирусных векторов используют также производные лентивирусов (HIV-1) и вируса герпеса 1-го типа (HSV-1).

Трансген обычно интегрирует в геном хозяйской клетки млекопитающих путем гетерологичной рекомбинации, т. е. встраивается в неродственную последовательность ДНК. Встраивание чужеродного гена в идентичную последовательность, т. е. гомологичная рекомбинация, перспективна для направленной интеграции гена, изучения его функций и замещения собственного гена на его синтетическое производное. Для этого разрабатывают способы обогащения популяций трансфицируемых клеток клетками, в которых произошла гомологичная рекомбинация.

Отбор трансфектантов, получивших рДНК, осуществляется по наличию в клетках эукариот маркерных генов устойчивости к антибиотикам. Это ген устойчивости к генетицину, изолированный из транспозона Tn5 и кодирующий аминокликозидфосфотрансферазу; ген устойчивости к пуромицину, выделенный из *Streptomyces alboniger* и кодирующий пуромицинацетилтрансферазу; ген устойчивости к гигромицину В, изолированный из *E. coli* и кодирующий гигромицин-фосфотрансферазу; ген устойчивости к зеоцину, выделенный из *Streptoalloteichus hindustans* и кодирующий белок-ингибитор зеоцина; ген устойчивости к бластицидину-S и кодирующий бластицидиндеаминазу.

Для повышения уровня экспрессии трансгена в состав экспрессирующих векторов вводят сильные вирусные промоторы: цитомегаловируса, вируса лейкемии мышей, вируса некроза селезенки, а также некоторые промоторы клеточных генов человека.

Культуры клеток млекопитающих используют для получения вакцин, интерферонов. Основная проблема, возникающая при переносе генов в клетки млекопитающих, – это возможность потери чужеродной ДНК и ее случайная интеграция в хромосомы.

5.2. Получение и применение трансгенных животных

Основные этапы получения трансгенных животных:

- 1) идентификация и конструирование трансгена с тканеспецифичным промотором;
- 2) клонирование трансгена в векторе и трансформация бактерий (*E. coli*) для амплификации гена;
- 3) проверка работы генетической конструкции с трансгеном в эукариотических клетках;
- 4) введение гена в ядро оплодотворенной яйцеклетки путем микроинъекции;
- 5) имплантация оплодотворенных яйцеклеток в суррогатную мать;
- 6) анализ потомства (с использованием методов ПЦР и гибридизации ДНК) и отбор особей, несущих трансген;
- 7) исследование особей, несущих трансген, на стабильность его наследования, процессов регуляции и экспрессии;
- 8) скрещивание животных, содержащих трансген в клетках зародышевой линии.

Метод микроинъекции для введения трансгена был впервые разработан на мышах в 1982 г., применен для получения трансгенных кроликов, овец, свиней и коров. Несмотря на простоту, он имеет ряд недостатков, в том числе нестабильность интеграции инъецированной ДНК; получение мозаичных животных, несущих клетки с трансгеном и без него; случайный характер интеграции трансгена в геном и вариабельность экспрессии гена вследствие эффекта положения. Эффективность трансгенноза низкая: трансгенное потомство дают менее 5 % обработанных яйцеклеток.

Трансгенные животные могут быть получены также с использованием ретровирусных векторов. Вектор вместе с геном инъецируют в перивителлиновое пространство ооцитов на стадии метафазы II (трансдукция ооцитов) или зиготы. К недостаткам ретровирусных векторов относят ограниченную емкость и случайный характер интеграции в геном реципиента.

Перенос трансгенов возможен с помощью сперматозоидов, так как последние способны связывать экзогенную ДНК, поглощать ее и переносить в яйцеклетку при оплодотворении.

Для переноса трансгенов используют плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки мыши, полученные из клеток бластоцисты, из бластомеров и восьмиклеточных эмбрионов. Преимущество этих клеток состоит в их способности развиваться в клетки различных типов, в том числе и клетки зародышевого пути. Возможно получение линий эмбриональных стволовых клеток с направленным включением чужеродного гена в определенный сайт-мишень и дальнейшее создание трансгенных эмбрионов. К недостаткам метода относят получение химерных эмбрионов и необходимость скрещиваний для создания чистых линий животных.

Еще одним методом создания трансгенных животных является пересадка ядер. Для этого соматические клетки, трансфецированные трансгеном, инъецируют в энуклеированный ооцит на стадии метафазы II. Электростимуляция индуцирует слияние мембран ооцита и соматической клетки, а также активацию программ развития. Зародыш на стадии бластоцисты переносят в организм суррогатной матери.

Трансгенные мыши

Геном мыши на 90 % идентичен геному человека, поэтому мышей используют для моделирования болезней человека. Основные методы получения трансгенных мышей – микроинъекция и трансфекция эмбриональных стволовых клеток.

При получении трансгенных мышей методом микроинъекций в один из двух пронуклеусов (обычно мужской) оплодотворенной яйцеклетки вводят раствор клонированной ДНК (пиколитры). Инъецированные ооциты пересаживают в организм реципиентной самки. В потомстве проводят идентификацию трансгенных животных с использованием методов ПЦР и гибридизации ДНК. Для получения гомозиготных трансгенных линий трансгенных мышей-основателей скрещивают с самками дикого типа, получают гетерозиготы в потомстве первого поколения (F_1) с их последующим скрещиванием. Затем в потомстве F_2 находят мышей с экспрессией трансгена. Этот метод получения трансгенных животных характеризуется высокой трудоемкостью и низкой эффективностью. Чужеродная ДНК может встраиваться в различные участки генома, возможно нарушение процессов экспрессии трансгена, поэтому каждое индивидуальное трансгенное животное является уникальным.

При получении трансгенных мышей с помощью эмбриональных стволовых клеток используют методы электропорации, трансфекции и инфекции ретровирусами. Трансфецированные стволовые клетки инъецируют в развивающийся эмбрион на стадии бластоцисты и получают химерный эмбрион. Преимуществом этого метода получения трансгенных животных является возможность удаления определенного гена из генома мыши либо его изменения путем сайт-специфического мутагенеза и, следовательно, контроль процесса интеграции за счет селекции трансфецированных стволовых клеток. Также возможна криоконсервация трансгенных стволовых клеток.

Трансгенные мыши используются в фундаментальных научных исследованиях для изучения функций генов и кодируемых ими белков, а также для предварительного анализа экспрессии трансгена на простой модели (тест-системе) при получении белков, секретлируемых в молоко. Так, трансгенные мыши являются продуцентами белков человека – интерферона, интерлейкина-2, сывороточного альбумина, фактора свертываемости крови IX и др. Трансгенных мышей применяют в качестве моделей различных патологических состояний человека: нейродегенеративных заболеваний (в частности, болезни Альцгеймера), артрита, мышечной дистрофии, гипертонии, заболеваний сердечно-сосудистой и эндокринной систем, онкопатологий.

Трансгенные коровы, козы, овцы

Для получения трансгенных коров, коз, овец используют метод микроинъекций яйцеклеток. Последовательно проводят оплодотворение ооцитов *in vitro*, микроинъекцию ДНК в мужской пронуклеус, культивирование эмбрионов до стадии бластулы, поиск эмбрионов с трансгеном, имплантацию эмбрионов в организм суррогатной матери, анализ потомства с трансгеном.

Крупный рогатый скот – наиболее предпочтительный объект для трансгенеза, направленного на использование молочной железы в качестве «биореактора». Получены трансгенные коровы, продуцирующие: белки человека в молочной железе (инсулин, эритропоэтин, моноклональные антитела, лизоцим, лактоферрин); безлактозное молоко за счет сверхэкспрессии гена лактазы; молоко, соответствующее по составу человеческому молоку; увеличенное количество казеина, необходимого для производства масла и сыра. Для достижения тех же целей используют трансгенных коз и овец. Продукция целевых белков в молочной железе с секрецией в молоко – наиболее привлекательный и удобный способ получения фармакологических белков. Использование небольшого количества трансгенных животных позволит получать в составе молока сотни килограммов рекомбинантного белка в год при его низкой себестоимости.

Получены трансгенные коровы, устойчивые к различным заболеваниям: бактериальным и вирусным инфекциям, паразитарным инвазиям. Трансгенных овец применяют для повышения уровня синтеза цистеина – лимитирующего фактора для роста шерсти, а также экспрессии генов, кодирующих белки-инсектициды (Вt-токсины) в потовых железах. Получены трансгенные козы, продуцирующие в молоке антитромбин III, альбумин и моноклональные антитела.

Трансгенные свиньи

Для получения трансгенных свиней используют методы микроинъекций, вирусной трансфекции ооцитов и переноса генов с помощью сперматозоидов. Получены трансгенные свиньи с геном гормона роста и изменением состава

мяса (уменьшением количества жира), с геном бактериальной фитазы в слюнных железах, уменьшающей уровень загрязнения среды фосфором.

Перспективным представляется использование трансгенных свиней для ксенотрансплантации – трансплантации органов и тканей от животных к людям. Для преодоления дискордантности (несовместимости) и гиперострого отторжения органов свиней при пересадке разрабатываются подходы, направленные на инактивацию (нокаут) генов специфического гликозилирования антигенных детерминант свиньи; перенос генов человека, кодирующих белки системы комплемента и гены гистосовместимости человека. Однако основная проблема при возможном использовании трансгенных свиней для трансплантации – риск переноса патогенных агентов в организм человека за счет присутствия вирусов, «спящих» в организме животных и активирующихся при попадании в тело человека.

Трансгенные рыбы

Преимущество рыб как объектов генно-инженерных исследований состоит в том, что их эмбриогенез протекает вне материнского организма и это значительно упрощает проведение экспериментов. Для переноса генов в организмы рыб (*Oryzias latipes*, *Danio rerio*) используют множество методов: микроинъекцию, перенос ядер, вирусную инфекцию, трансфекцию стволовых клеток, электропорацию, липофекцию, биологическую баллистику.

Трансгенные рыбы перспективны для разработки генно-инженерных методов тестирования загрязнений окружающей среды, в частности, воды. Получены трансгенные рыбы, содержащие репортерный ген (зеленого флуоресцентного белка; люциферазы) с промотором, чувствительным к определенному химическому агенту. По уровню экспрессии репортерного гена можно определить уровень химического вещества в тканях.

Трансгенные рыбы, в частности *Danio rerio*, – модельный объект для изучения механизмов развития патологических состояний человека.

Получены трансгенные лососи и радужная форель со сверхэкспрессией гена гормона роста.

Трансгенные птицы

Для получения трансгенных птиц используют методы микроинъекций, инфекцию ретровирусными векторами, трансфекцию зародышевых клеток или клеток бластодермы, перенос генов с помощью сперматозоидов. Ограничением в случае использования переноса ретровирусных векторов в зародыши птиц является опасность попадания таких генетических конструкций в организм человека при сельскохозяйственном применении трансгенных животных. Получение трансгенных птиц – трудоемкая процедура в связи с особенностями вос-

производства и развития птиц. Перспективы использования трансгенных птиц связаны с получением яиц, содержащих фармацевтические белки человека.

В целом, основные проблемы при получении трансгенных животных связаны с отсутствием контроля процессов интеграции трансгена в геном и ее стабильностью. Случайный характер интеграции трансгенов приводит к нарушению функций различных генов, возникновению патологий у животных. Еще одна важная проблема – безопасность трансгенных животных для человека.

5.3. Клонирование животных

Пересадка ядер и разделение эмбриона – это основные способы клонирования (репродуктивного клонирования) млекопитающих.

Первые успешные попытки пересадки ядер проведены в 1952 г.: ядра из клеток бластулы были пересажены в энуклеированные неоплодотворенные яйца лягушки *Rana pipiens*. После стимуляции ядер из них образовались нормальные головастики. При использовании ядер из клеток, находящихся на более поздних стадиях развития, выживаемость резко падала. В начале 60-х гг. XX в. было проведено успешное клонирование лягушки с использованием дифференцированных ядер головастиков (впоследствии в 2012 г. Дж. Гёрдону и Ш. Яманака присуждена Нобелевская премия по медицине). В 1975 г. путем пересадки ядер (использовали эмбриональные стволовые клетки) были получены кролики, в 1986 г. – овцы, в 1987 г. – коровы.

Наиболее известные результаты были получены в Рослинском университете в Эдинбурге (Шотландия) под руководством И. Уилмута в 80–90 гг. XX в. В середине 1990-х гг. ими был получен клон овец. Родилось пять ягнят. Двое погибли вскоре после рождения, третий – через 10 дней, двое нормально развивались до восьми-девятимесячного возраста. В 1997 г. было объявлено о рождении клона – овечки Долли. Яйцеклетки извлекали из овец породы шотландской черномордой, затем удаляли ядра и трансплантировали в яйцеклетки ядра эмбриональных клеток, соединительных (фибробластных) клеток и клеток молочной железы взрослой овцы финн дорсет, которая находилась на последнем триместре беременности. Далее клетки культивировали и помещали в матку овцы – реципиента. Было получено 277 реконструированных яйцеклеток в серии опытов с клетками молочной железы и родилась только одна Долли.

Овца Долли была клонирована с помощью переноса ядра клетки молочной железы (вымени) взрослого животного. Так впервые была доказана тотипотентность ядра дифференцированной взрослой клетки. Нельзя исключить, что на самом деле донорское ядро было взято из недифференцированной клетки, присутствовавшей в эпителии молочной железы организма-донора. 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, и, возможно, особенностям эмбриогенеза этого животного. В течение первых трех делений зиготы овцы, занимающих несколько суток, происходит только репликация ДНК, ни один из генов не реплицируется. Предполагают, что за это время введенная ДНК освобождается от специфических для клетки регуляторных белков, а гены эмбрионального развития связываются с инициаторными эмбриональными белковыми факторами из цитоплазмы яйцеклетки.

Долли прожила 6 лет. У нее было шесть ягнят, которые родились обычным способом. Умерла она от прогрессивной болезни легких (типичной для овец в закрытых помещениях), у нее был артрит и укорочение теломера в клетках. В 2003 г. Долли усыпили.

Впервые деление эмбрионов для клонирования было проведено в 1885 г. на морских ежах, а на млекопитающих – в 1995 г.

Таким образом, эпоху клонирования млекопитающих принято отсчитывать с 1996 г. С тех пор клонирование с помощью метода переноса ядер из соматических клеток (SCNT – *somatic cell nuclear transfer*) осуществлено для разных животных: коров, мышей, свиней, кошек, кроликов, крыс, собак, хорьков, буйволов, верблюдов.

Клонирование животных, т. е. реконструкция эмбриональных клеток с помощью переноса ядер или деления ранних эмбрионов, осуществляется в более чем 130 лабораториях 20 стран мира. В России в последние десятилетия проводятся работы по изучению факторов, влияющих на выживаемость реконструированных эмбрионов, на пролиферативную активность стволовых клеток, а также по терапевтическому клонированию (В.А. Никитин, Институт биофизики клетки РАН, Пущино). Однако эффективность общепринятых методов клонирования животных остается крайне низкой, составляя для млекопитающих 1–3 % (от 0,1 до 5 %, а для мышей – 1–2 %, что объясняют более ранней активацией зиготических генов по сравнению с другими организмами).

Основной задачей клонирования является эффективное получение здорового потомства с помощью пересадки генома донора в энуклеированный ооцит или яйцеклетку реципиента. По определению, клон – группа из двух или более индивидов с идентичным набором генов, полученная неполовым размножением от единого общего родителя или предка. Согласно этому определению, у животных истинные клоны могут быть получены только при разделении эмбрионов или бластомеров искусственно или так, как это бывает в природе. Сейчас этот термин применяется к животным, полученным методом пересадки ядер.

Основные этапы клонирования:

- 1) удаление ядра (энуклеация) ооцита-реципиента;
- 2) выделение ядра донора;
- 3) инъекция донорного ядра в реципиентный ооцит и его активация;
- 4) культивирование эмбриона и перенос его в организм суррогатной матери.

Наиболее трудный этап – активация деления ооцита, которая должна привести к формированию нормального эмбриона. Выживаемость при этом составляет 0,1–5 %. Вместо микроинъекции донорного ядра в энуклеированный ооцит часто используют слияние соматической клетки-донора с энуклеированным ооцитом.

В этом неполовом процессе генетический материал ядра (кариопласт) переносят из клетки-донора в клетку-реципиент (цитопласт), из которой удален генетический материал. Следовательно, вклад цитоплазмы реципиентного ооцита различен у разных животных, хотя источник донорского ядра может быть один и тот же. Могут происходить незначительные изменения и в генетическом материале донора. Поэтому потомство, полученное пересадкой ядер, по мнению Кэмпбелла (1999), правильнее называть не клоном, а «геномной копией».

В большинстве случаев потомство имеет серьезные аномалии развития либо клоны погибают во время эмбриогенеза и роста плода. Клонированные животные страдают от «синдрома крупного потомства», имеют нарушения в функционировании дыхательной и иммунной (иммунодефицит) систем, обмена веществ, быстро стареют и имеют возрастные нарушения (артрит). Возможно, быстрое старение связано с укороченными теломерами клонов.

Считают, что причиной различных патологий у клонов является нарушение геномного импринтинга во время трансплантации ядра. Для успешного клонирования необходимо модифицировать хроматин так, чтобы эпигенетически перенастроить ядро-донор. Необходимо также активировать эмбриональные гены, обычно молчащие в дифференцированных клетках, сохранять характер экспрессии импринтированных генов.

Практически нет ни одного одинакового протокола проведения экспериментов по клонированию в различных исследовательских центрах. Методы клонирования должны быть усовершенствованы.

В нашей стране первые работы по микрохирургии эмбрионов млекопитающих начались в 1975 г. в Институте биофизики в Пущино (Л. М. Чайлахян, Б. Н. Вепринцев, В. А. Никитин и др.). Был создан комплекс приборов для микрохирургии клеток. Микроинструменты для пересадки ядер или пронуклеусов изготавливали из капилляров, а последние – из трубок молибденового стекла. Молибденовое стекло образует прочные сплавы с металлическим молибденом, легко плавится и обрабатывается.

Успехи при проведении экспериментов по клонированию млекопитающих зависят от целого ряда факторов.

Размер ядра эмбриона мыши с его окружением составляет не менее 10 мкм. Поэтому диаметр микропипетки должен быть ~ 12 мкм или больше, чтобы осуществить забор ядра вместе с окружающей его цитоплазмой.

Микроигла (микропипетка) должна иметь строго цилиндрическую внутреннюю полость, которая не деформирует клетку. Для этого необходимо особое затачивание кончика микропипетки с четырех сторон с помощью специального

устройства. В этих условиях перфорация мембраны клетки быстро репарируется. В противном случае происходят потери содержимого цитопласта.

На развитие эмбриона после пересадки ядер влияет соотношение объемов цитопласта и кариопласта. Наиболее благоприятные условия развития возникают, когда эти объемы одинаковы, либо когда отношение кариопласта и цитопласта составляет 1 : 2.

Также важен выбор места прокола мембраны яйцеклетки (энуклеированной зиготы).

Удержание клетки с помощью микроприсоски-держателя за счет применения отрицательного давления (аспирационный метод) приводит к повреждению кариопласта и утечке внутриклеточного содержимого. Метод удержания клетки за счет использования капиллярных сил микроприсоски-держателя, при котором примерно на два порядка снизилось давление, позволил практически избежать повреждения клеток.

Имеет значение наличие (сохранение) внеклеточного матрикса зиготы – уникального микроокружения для дальнейшего развития. Это внеклеточные белки, низкомолекулярные компоненты (определенный состав ионов, вода, свободный пул аминокислот). Удаление части этого матрикса вызывает изменение осмотического баланса клетки и необходимость клеточной адаптации к новым условиям.

Для введения кариопласта в цитопласт используют метод электрослияния или электростимуляции (длительность электрических импульсов – 0,1 мс). Средний уровень успешных слияний – 78 %.

Методами микроманипуляции с эмбрионами получены однояйцевые близнецы животных. Однако нельзя считать, что эти методы отработаны и стандартизированы в достаточной степени, чтобы быть надежными и найти широкое применение, например, в сельском хозяйстве для репродуктивного клонирования животных или в биотехнологии.

Перспективной технологией является разделение предимплантационных эмбрионов для искусственного получения близнецов животных, которые по показателям не отличаются от нормального потомства. Для этого также используют специальные микроинструменты. Необходимо учитывать и влияние физических факторов. Так, холодный свет белой флуоресценции с доминированием коротковолнового диапазона длин волн видимого света (380–400 нм), обычно используемый в клинических лабораториях, продуцирует увеличенное количество активных форм кислорода в зиготах мышей и хомяков по сравнению со светом теплой белой флуоресценции (400–670 нм). Блостоцисты мышей, развившиеся из зигот, защищенных от света, развиваются лучше, чем в условиях освещения.

Клонирование имеет важное практическое значение для получения трансгенных животных в связи с трудоемкостью их создания методами генетической инженерии. Например, для создания элитных высокопродуктивных коров, овец, свиней и коз, получения лекарственных препаратов, содержащихся в молоке овец, коз и коров (с использованием генно-инженерных методов).

Клонирование позволит сохранить редких исчезающих животных. При этом используют перенос ядра из соматических клеток сохраняемого животного в ооциты домашнего животного близкого вида. Это приводит к появлению гибридного эмбриона, который в большинстве случаев не сможет нормально развиваться из-за присутствия митохондриальной ДНК ооцита-донора. Часто происходит отторжение плода суррогатной матерью из-за несовместимости ее тканей с плацентой плода. Поэтому пока клоны не доживают до рождения, а родившиеся не достигают взрослого состояния. Осуществлены попытки клонирования горбатого быка гаура и африканской степной кошки (в США), европейского муфлона или дикого барана (в Италии), азиатского или индийского буйвола (в Китае) и др.

Наиболее сложная и неоднозначная проблема (психологическая, этическая) – клонирование человека и его органов для выращивания донорных органов с целью трансплантации без отторжения (одна из задач регенеративной медицины). Это клонирование и ксенотрансплантация, т. е. создание функциональных органов из эмбриональных стволовых клеток или индуцированных тотипотентных стволовых клеток. Так, например, острой мировой проблемой клинической медицины является пересадка поджелудочной железы. В мире более 300 млн больных сахарным диабетом. Экспериментальные работы пока проводятся на мышах и свиньях. С 1990-х гг. используют трансплантацию островков Лангерганса, поэтому можно будет пересаживать не целую железу, а отдельные функционирующие островки.

Терапевтическое клонирование – получение стволовых клеток, которые будут использоваться для лечения различных заболеваний. Это репарация поврежденных тканей, замена органов (сердца, печени, почек), выращивание нейронов для лечения нейродегенеративных болезней. Так как клетки получают на основе генетического материала пациента, риск иммунологического отторжения минимален. Основные этапы терапевтического клонирования включают: выделение ядер из клеток больного, перенос ядра в энуклеированную донорную яйцеклетку, образование бластоцисты, культивирование стволовых клеток эмбриона, получение дифференцированных клеток различных типов, выращивание отдельных органов или тканей. Терапевтическое клонирование не требует использования суррогатных матерей и этим отличается от репродуктивного клонирования. Важная этическая проблема – разрушение человеческого эмбриона на ранних стадиях развития для получения культуры стволовых клеток.

Клонирование человека запрещено в большинстве стран мира. Однако в Великобритании, Израиле, Японии разрешено терапевтическое клонирование в научно-исследовательских целях.

Несмотря на то, что успешные работы по пересадке ядер и по использованию других технологий реконструкции клетки вызвали больше вопросов, чем ответов, эти методологии исключительно перспективны как для фундаментальных, так и для прикладных исследований.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Охарактеризуйте способы переноса генов в клетки млекопитающих.
2. Какие вирусы могут быть использованы для переноса генов в клетки млекопитающих? Укажите их преимущества и недостатки.
3. Опишите технологии получения трансгенных животных.
4. Охарактеризуйте методы получения и основные направления использования трансгенных мышей.
5. Для решения каких задач создают трансгенных коров, коз, овец, свиней, рыб, птиц?
6. Каковы основные проблемы при получении трансгенных животных?
7. Какие методы используют для репродуктивного клонирования млекопитающих?
8. Охарактеризуйте основные этапы клонирования животных.
9. Какие проблемы возникают при осуществлении процессов клонирования животных? С действием каких факторов могут быть связаны эти проблемы?
10. С какой целью осуществляют клонирование животных?
11. Что понимают под термином «терапевтическое клонирование»?
12. Каковы основные этапы терапевтического клонирования?

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ И ИХ ПОЛУЧЕНИЕ



Живые вирусные вакцины – это ослабленные (аттенуированные) варианты вирусов, утратившие большинство своих патогенных свойств. Живые вакцины активируют компоненты иммунной системы, обеспечивая сбалансированный иммунный ответ. Их производство является относительно дешевым. К недостаткам живых вакцин относятся: возможность сохранения остаточной патогенности, что может привести к тяжелым формам заболевания у людей с ослабленным иммунитетом и детей; генетическая нестабильность; биологическая нестабильность при хранении и использовании. Из-за генетической нестабильности вирус снова может стать патогенным. Живые вакцины могут быть заражены вирусами. Не для каждого вируса можно получить ослабленный штамм.

Инактивированные вакцины получают путем инактивации патогенного вируса химическими соединениями: формальдегидом, β -пропиолактоном. Инактивация должна затрагивать вирусный геном и не вызывать изменения в белковых компонентах вируса. Преимуществами инактивированных вакцин по сравнению с живыми являются: отсутствие риска заражения, более высокая стабильность, менее сложная технология получения и контроля. Основным недостатком инактивированных вакцин – более низкая эффективность индукции Т-клеточного иммунитета по сравнению с живыми аттенуированными вакцинами. Для развития гуморального иммунитета необходимо периодическое введение инактивированной вакцины в относительно большой дозе, что может провоцировать у некоторых людей развитие аллергии.

К более безопасным по сравнению с живыми и инактивированными вакцинами являются субъединичные вакцины. Они содержат отдельные компоненты патогенного микроорганизма. Субъединичные вакцины представляют собой препарат на основе отдельного очищенного поверхностного протективного белка или набор протективных вирионных белков, выделенных из вирусных частиц.

Если наиболее иммуногенная антигенная детерминанта протективного вирусного белка представлена непрерывной аминокислотной последовательностью (а не пространственно сближенными отдельными участками полипептидной цепи), то можно осуществить ее химический синтез и получить пептидную вакцину. Однако, как правило, такие вакцины характеризуются слабой антигенной активностью из-за небольшого размера, а также трудоемки и дороги с точки зрения технологии производства.

Методы генетической инженерии позволили получить высокоиммуногенные молекулярные субъединичные или пептидные вакцины в про- и эукариотических клетках.

В 80-х гг. XX в. была создана первая разрешенная для использования в медицине генно-инженерная вакцина против гепатита В, полученная путем экспрессии в клетках дрожжей искусственного гена HBsAg (поверхностного антигена вируса гепатита В).

Следующим шагом в создании генно-инженерных вакцин стало получение живых поливалентных вакцин на основе гибридных вирусов, способных синтезировать после заражения хозяина в его организме и свои протективные белки, и протективные белки других вирусов. Такие вакцины способствуют активации Т-клеточного иммунитета (цитотоксических Т-лимфоцитов). Примером поливалентных вакцин является вакцина против полиомиелита. Для ее создания сначала с помощью обратной транскриптазы были получены ДНК-копии генома разных штаммов полиовируса, встроены под прокариотические промоторы фагов T7 или SP6 и транскрибированы в молекулы РНК в условиях *in vitro* с участием РНК-полимеразы этих фагов. После трансфекции пермиссивных клеток молекулами РНК были получены инфекционные вирусы.

С целью преодоления возможных побочных эффектов вакцинации живыми поливалентными вирусными вакцинами были предложены более безопасные и дешевые в производстве ДНК-вакцины. Для этого в организм животных вводили препарат гибридной плазмиды с геном протективного вирусного антигена под контролем эукариотических сигналов инициации и терминации транскрипции. В клетках хозяина (мышь, цыпята, приматы) происходил синтез вирусного антигена и индукция полноценного гуморального и клеточного иммунного ответа. Для производства ДНК-вакцин необходимо лишь культивирование клеток *E. coli*, содержащих гибридную плазмиду, с последующим их разрушением и выделением стабильной плазмидной ДНК.

Разрабатываются вакцины против различных вирусов (вируса иммунодефицита человека, цитомегаловируса, гепатита А и В, гриппа, ротавируса, герпеса); бактерий, вызывающих холеру, столбняк, брюшной тиф и др.; паразитов (*Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Onchocerca volvulus*, *Schistosoma mansoni*).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите основные типы вакцин, их преимущества и недостатки.
2. Какие типы вакцин можно получить с помощью методов генетической инженерии?



7.1. Определение, подходы и методы

Генная (генетическая) терапия – направленное внедрение нового генетического материала в клетки с терапевтическими целями. Это экспериментальная область медицины, в которой используются методы генетической инженерии. Генную терапию применяют для лечения инфекционных, онкологических, наследственных заболеваний, нарушений иммунной системы. В основном генную терапию используют для лечения моногенных наследственных болезней, обусловленных мутацией (дефектом) одного гена: гемофилии (дефицит фактора свертываемости крови VIII, фактора свертываемости крови IX), семейной гиперхолестеринемии (мутация в гене рецептора липопротеинов низкой плотности), тяжелого комбинированного иммунодефицита (нарушение синтеза аденозиндезаминазы), гемоглобинопатий (нарушения в генах α - или β -глобина), муковисцидоза (нарушения трансмембранного регулятора муковисцидоза) и др.

Впервые генная терапия была применена в 1989 г. для переноса кДНК, кодирующей аденозиндезаминазу, четырехлетней девочке с тяжелой формой наследственного иммунодефицита. Дефект гена аденозиндезаминазы приводит к повышению в крови уровня аденозина и дезоксиаденозина, а токсическое действие последних – к гибели лимфоцитов и развитию тяжелого иммунодефицита.

Если моногенные заболевания связаны с мутациями генов, приводящими к уменьшению содержания и (или) активности белка-мишени (т. е. к потере функции), то в ходе терапии необходимо повысить уровень целевых мРНК, белка или активности белка. Это может быть достигнуто за счет введения интактного гена (генная терапия) либо белка-фермента путем заместительной терапии. Желаемый результат можно получить также и другими способами: повышением уровня транскрипции и стабилизацией транскрипта, коррекцией нарушенного сплайсинга, увеличением активности мутантного белка и др.

Если моногенное заболевание обусловлено мутацией гена, приводящей к повышению уровня и (или) активности белка, то целью терапии будет уменьшение содержания мРНК или мутантного белка путем их дестабилизации, ингибирования процессов транскрипции и трансляции, ингибирования активности этого белка.

Выбор стратегии генной терапии зависит от типа патологии. Стратегии генной терапии могут быть различными: трансплантация гена, его коррекция

(исправление дефекта), увеличение экспрессии гена, коррекция с помощью сайт-специфического мутагенеза, направленное ингибирование экспрессии гена, терапия с помощью соматических клеток, направленное уничтожение клеток определенного типа (опухолевых клеток).

Экспрессия вводимого гена может быть постоянной или временной. Временная трансфекция связана с повторным введением генетических конструкций (например, рибозимов и антисмысловых нуклеотидов).

Использование генной терапии в клинической практике возможно при соблюдении ряда требований:

1) болезнь изучена, выявлены ее симптомы, идентифицирован ген, установлен тип его мутации;

2) разработана модель патологии на животных;

3) клетки человека, в которых экспрессируется ген, можно размножить в культуре;

4) невозможно применение альтернативных подходов к лечению патологии;

5) проведена оценка безопасности используемых подходов генной терапии.

Генная терапия *ex vivo* включает этапы подготовки культуры клеток пациента (фибробластов, гемопоэтических стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток); трансфекцию гена в составе вектора в клетки культуры; отбор, выращивание и тестирование трансфецированных клеток; введение трансфецированных клеток (трансплантация, трансфузия) в организм пациента. Преимуществом генной терапии *ex vivo* является ее безопасность. Однако она применима к ограниченному числу болезней. Генную терапию *ex vivo* используют для устранения патологий, связанных с трансплантацией костного мозга. В костном мозге присутствуют тотипотентные эмбриональные стволовые клетки, которые могут пролиферировать и дифференцироваться в Т- и В-лимфоциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты, остеокласты. Процедуры удаления клеток из организма пациента, их трансфекции и реимплантации сложны.

Генная терапия *in vivo* подразумевает прямой перенос (инъекцию) гена в составе вектора путем введения в кровотоки или ткани. Она может быть адаптирована к любому типу патологии. К ее серьезным недостаткам относят сложность осуществления в связи с особыми требованиями к безопасности и эффективности систем переноса гена.

Для доставки генов в клетки человека возможно использование вирусных и невирусных систем. Наиболее эффективными средствами для доставки генетических конструкций в клетки до настоящего времени являются векторы на основе вирусов. Однако их недостатками являются высокая иммуногенность и канцерогенность *in vivo*. По сравнению с вирусными системами невирусные системы характеризуются меньшей эффективностью, но большей гибкостью и безопасностью.

Вирусные векторы не должны содержать потенциально опасные вирусные гены (т. е. не должны быть токсичными и иммуногенными) и должны быть тка-

неспецифичными и репликативно некомпетентными. Векторы должны быть стабильными, не накапливать мутации и не вызывать мутации генома клетки хозяина. Векторы должны иметь достаточную «вместимость» для переноса одного или нескольких трансгенов. Трансген должен встраиваться в определенный участок хозяйской ДНК и экспрессироваться только в определенном типе клеток организма. Экспрессия трансгена должна быть регулируемой, тканеспецифичной или индуцибельной. Имеет значение и уровень продукции вектора, а также легкость его получения.

7.2. Вирусные и невирусные системы доставки генов

Для создания генно-терапевтических векторов наиболее перспективны ретровирусы – РНК-геномные вирусы, которые легко интегрируют в геном клетки-хозяина, обеспечивая долговременную экспрессию необходимого гена. Использование ретровирусных векторов, не способных к самостоятельной репликации, обеспечивает стабильное и эффективное встраивание чужеродной ДНК в геном и постоянство генетических изменений в клетках-мишенях. Преимущество ретровирусов состоит в том, что интеграция происходит по известному механизму: в один сайт на хромосоме встраивается только одна копия и не происходит перегруппировок встроенного материала. Еще одно их достоинство – легкость доставки на различных стадиях развития и относительно низкая иммуногенность.

Наряду с достоинствами ретровирусные векторы имеют и ряд существенных недостатков. Это ограничение размера ДНК, которую можно переносить с их помощью (до 8000 пар оснований). К тому же эти векторы (кроме лентивирусных) встраиваются только в делящиеся клетки, могут вызывать инсерционные мутации, дают сравнительно низкие титры рекомбинантного вируса, а уровень экспрессии встроенного гена, интегрированного в геном клетки-хозяина случайным образом, зависит от эффекта положения. Ретровирусные системы представляют потенциальную опасность для здоровья человека, поскольку способны активировать онкогены и блокировать опухолевые супрессорные гены в инфицированных клетках. Так, в первых работах по генной терапии использовались векторы на основе вируса мышинной лейкемии (MLV), относящиеся к группе γ -ретровирусов. Этот вирус интегрирует в активно транскрибируемые участки генома, ближе к началу гена, что может вызвать онкогенный эффект. В первом клиническом испытании у пяти пациентов из двадцати имело место развитие лейкозов. Побочные эффекты генной терапии, связанные с инсерционным мутагенезом, обозначают термином «генотоксичность».

Для повышения эффективности доставки ДНК ретровирусного вектора в ядро клетки-мишени и ее интеграции в геном разработан специальный метод упаковки РНК ретровируса в интактные вирусные частицы, хорошо проникающие в клетки. Суть метода состоит в том, что сначала генно-инженерными

методами создают «пакующую» клеточную линию, в участках генома которой содержатся сегменты, лишенные последовательности пси (Ψ), необходимой для упаковки РНК в вирусную частицу. В этих клетках формируются пустые вирусные частицы. При трансфекции ДНК ретровирусного вектора (с «терапевтическим» и селективным маркерным генами) в «пакующие» клетки она встраивается в хромосомную ДНК и транскрибируется с образованием полноразмерной РНК ретровируса, содержащей Ψ -последовательность. РНК вектора упаковывается в капсиды. Вирусные частицы теперь можно использовать для доставки ретровирусного вектора в клетки-мишени. В «пакующей» клеточной линии не образуются компетентные по репликации ретровирусы, способные встраиваться в гены и вызывать онкогенные эффекты.

Особое место среди ретровирусных систем трансгенного переноса занимают лентивирусные системы, созданные на базе вирусов семейства *Lentiviridae*, поскольку они способны доставлять гены в неделящиеся клетки млекопитающих и являются более предпочтительными для генной терапии. К лентивирусам относится и вирус иммунодефицита человека. Преимущество лентивирусов состоит в том, что у них низкая вероятность интеграции в целевую ДНК ближе к началу генов. Однако не исключена и вероятность процессов онкогенеза у пациентов. Первая векторная система на основе лентивируса была создана в 1996 г.

В отличие от ретровирусных векторов аденовирусные векторы, сконструированные на базе ДНК-содержащих вирусов позвоночных, могут переносить достаточно длинные гены (кодирующая емкость трансгенов до 37 000 пар оснований). Они способны с высокой эффективностью инфицировать широкий спектр клеток организма человека, достигая 100 % эффективности *in vitro*, трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Аденовирусы относительно стабильны и имеют высокий титр при наработке в культуре. Аденовирусные векторы успешно используются для генотерапии различных заболеваний животных, включая диабет, ревматоидный артрит и миокардит. Использование аденовирусов связано с созданием стратегий генотерапии опухолей человека.

Для использования в качестве векторов в генной терапии аденовирусы аттенуируют (ослабляют) путем делеции участков генома, кодирующих ранние белки. Возможно удаление разного количества генов: от одного (первое поколение векторов) до большинства ранних генов (второе поколение векторов) и до полной делеции всего генетического материала аденовируса (*gutless*-векторы, требующие «упаковочной» клеточной линии). Размеры вставок генов могут составлять от 1–2 т. п. н. у векторов первого поколения до 30 т. п. н. у *gutless*-векторов.

Однако у аденовирусов есть и недостатки: они не обеспечивают длительную экспрессию гена, не интегрируются в геном, могут быть токсичны и иммуногенны. Структурные элементы аденовирусов могут связываться с компонентами крови (белками системы свертывания, системы комплемента, эритроцитами, тромбоцитами) пациента, в результате чего происходит инактивация вируса. Системное введение аденовируса в высоких дозах вызывает системный

воспалительный ответ с возможностью летального исхода. Примерно 50–80 % взрослых людей имеют антитела к наиболее распространенным серотипам аденовируса. В связи с этим аденовирусы используют для разработки способов терапии опухолей и вакцин. В настоящее время в целом наблюдается снижение популярности аденовирусных векторов для генной терапии.

Единственными из известных вирусов млекопитающих, способными к стабильной сайт-специфической интеграции в геном, являются аденоассоциированные вирусы (AAV), которые относятся к парвовирусам человека. Это мелкие безоболочечные ДНК-содержащие вирусы семейства *Parvoviridae* с одноцепочечным ДНК-геномом. Аденоассоциированные рекомбинантные векторы трансдуцируют и делящиеся, и неделящиеся клетки. Продемонстрирована эффективная трансдукция клеток печени, легких, мозга, скелетных мышц, гематопозитических стволовых и других типов клеток экспериментальных животных *in vivo*. Положительные результаты были получены при терапии тяжелой формы болезни Паркинсона у пациентов, которые были невосприимчивы к традиционной терапии. Вместе с тем аденоассоциированные вирусы обладают достаточно высокой иммуногенностью и низкой кодирующей емкостью (менее 5000 п. н.) трансгенов, что ограничивает их клиническое использование. Кроме того, аденоассоциированные вирусы, способные к случайному интегрированию в геном, могут активировать онкогены. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов наиболее перспективны для временной экспрессии генов при генной терапии. В настоящее время их популярность растет.

Разрабатываются векторные системы и на основе других вирусов, например, вируса простого герпеса. Это крупный ДНК-содержащий вирус, который при трансформации не интегрируется в геном, формируя в ядрах эписомные структуры. Уникальной особенностью этого вируса является его выраженная тропность к клеткам нервной системы, что делает вирус простого герпеса перспективным вектором для лечения опухолей мозга, болезни Паркинсона и многих других. Его преимущество – достаточно большая пакующая способность (кодирующая емкость трансгенов до 30 000 пар оснований). С помощью системы на основе вируса простого герпеса впервые была реализована схема генной терапии с использованием пролекарств. Она заключается в том, что клетки при системном введении вируса с «терапевтическим геном» приобретают способность превращать нетоксичное пролекарство в цитотоксин. Фермент вируса простого герпеса – тимидинкиназа фосфорилирует противовирусный агент ганцикловир, являющийся ациклическим аналогом нуклеотида гуанозина. Включение фосфорилированного ганцикловира в ДНК приводит к апоптозу не только клеток-мишеней, но и соседних клеток. На основе вируса простого герпеса получают его искусственные производные – ампликон-продукты, лишенные практически всех генов вируса, но способные к репликации. Ампликоны используются для переноса генов в нейроны *in vitro* и клетки мозга *in vivo*. Активно разрабатываются системы для использования этих вирусов в гематологии, одна-

ко цитотоксичность вируса простого герпеса ограничивает его использование в клинических испытаниях.

В целом вирусные векторы, предназначенные для введения генетического материала в клетки-мишени, в генной терапии имеют общие недостатки:

- 1) токсичность многих естественных продуктов экспрессии генома вирусов;
- 2) индукция иммунного ответа на вирусные белки, что затрудняет проведение повторных курсов лечения;
- 3) длительный период элиминации вирусных частиц из организма, что требует дополнительных исследований отсроченных эффектов лечения;
- 4) опасность спонтанной мутации вируса в организме пациента и приобретения им патогенных свойств;
- 5) инсерционный мутагенез, возникающий случайно в результате интеграции трансгенов в геном клеток-мишеней, что может блокировать экспрессию нормальных клеточных генов или активировать онкогены;
- 6) ограниченность размеров генетических конструкций, которые могут быть включены в геном вирусов.

Вирусные векторы эффективно работают на клеточных культурах, а при переходе к исследованиям *in vivo* возникают непредсказуемые побочные эффекты.

Альтернативой вирусным векторам являются невирусные системы доставки, которые включают введение в клетки генетических конструкций в составе наночастиц. В качестве невирусных нанотранспортных систем доставки генов могут быть использованы липосомы, липоплексы (комплексы ДНК с катионными липидами), векторы на основе рекомбинантных белков, содержащих сигнал ядерной локализации, хитозан, дендримеры, катионные полимерные материалы и др. Эти носители в значительной мере лишены недостатков, присущих вирусным векторам, однако способность к трансфекции у большинства из них ниже, чем у вирусных векторов. Конструирование невирусных систем доставки генетического материала в клетки является перспективным направлением в создании препаратов генной терапии.

7.3. Применение генной терапии

Для того, чтобы лекарственный препарат был разрешен к применению, он должен пройти четыре стадии проверки. Первая фаза – доклинические испытания. Это исследования *in vitro* и на лабораторных животных. Далее осуществляются фазы клинических испытаний. Первая фаза клинических испытаний проводится с целью проверки безопасности препарата, исследования его переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики на 20–100 добровольцах. Вторая фаза клинических испытаний осуществляется с целью проверки эффективности действия препарата примерно на 300 добровольцах и пациентах. Третья фаза клинических испытаний (наиболее дорогая, продолжительная и трудоемкая) проводится с привлечением большого количества испытуемых (300–3000 и бо-

лее) с целью исчерпывающего анализа надежности и эффективности препарата, выявления побочных реакций. Последняя фаза – постмаркетинговые исследования – реализуется после официальной регистрации препарата. При этом определяются редкие побочные эффекты на очень больших группах населения.

Наиболее широкое применение нашла генная терапия соматических клеток, в частности при лечении заболеваний системы кроветворения и иммунодефицитов, так как возможно выделение гематopoэтических стволовых клеток пациентов, их культивирование *ex vivo*, трансдукция. С 1990 г. проводятся испытания по генной терапии тяжелого комбинированного иммунодефицита, опухолевых заболеваний (меланомы, глиобластомы, рака почки, кишечника, яичников, молочной железы, плоскоклеточного рака головы и шеи), гемофилии, гиперхолестеринемии, СПИДа, муковисцидоза, артрита, бокового амиотрофического склероза.

Количество терапевтических препаратов, разрешенных к применению в клинической практике, невелико. Препарат «Гендецин» (китайская компания *Si Biono Gene Tech Co*) используется для лечения опухолей с мутацией гена p53. Этот препарат представляет собой рекомбинантный аденовирус, содержащий ген супрессора опухоли p53 дикого типа. Действие разрешенного китайского препарата «Онкорин» основано на использовании онколитического аденовируса, избирательно инфицирующего опухолевые клетки с дефектом p53. Он применяется для лечения опухолей головы и шеи совместно с химиотерапией. В Новосибирске в государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» разработан его аналог – препарат «Канцеролизин».

В России разрешен к применению препарат «Неоваскулин», разработанный компанией «Институт стволовых клеток человека» для лечения атеросклероза нижних конечностей. Препарат содержит плазмиды, кодирующие эндотелиальный фактор роста сосудов.

В Европе в 2012 г. разрешен к терапевтическому использованию препарат «Глибера» (основанный на аденоассоциированном вирусном векторе) для лечения наследственного дефицита липопротеинлипазы для лечения дислипидемии (болезни Бюргера – Грютца).

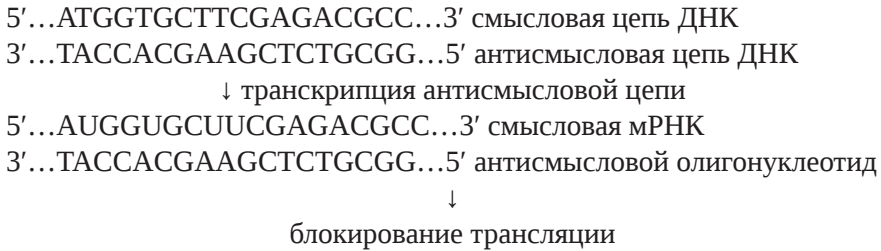
Существенным недостатком генной терапии в настоящее время является высокая стоимость лечения.

Несмотря на все сложности и проблемы, сопровождающие исследования по генной терапии, эта область на стыке генетической инженерии и медицины активно развивается.

7.4. Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов

Для лечения патологий, связанных с гиперпродукцией белков (воспалительных и онкологических заболеваний, вирусных и паразитарных инфекций), разрабатываются лекарственные средства на основе олигонуклеотидов. Принцип

их действия заключается в том, что олигонуклеотид гибридизуется со специфическим геном или мРНК, снижает уровень транскрипции гена или трансляции белка-мишени:



Олигонуклеотид, который гибридизуется с целевым геном и блокирует его транскрипцию, называют «антигенным». Олигонуклеотид, гибридизующийся с целевой мРНК, называют «антисмысловым» («антисенс»).

Для получения «антисмысловых» мРНК длиной 15–20 нуклеотидов в условиях *in vivo* используют экспрессирующие векторы со вставками ДНК в такой ориентации, чтобы их транскрипты были «антисмысловыми» по отношению к мРНК. Наборы «антисмысловых» олигонуклеотидов тестируют с использованием культур клеток, синтезирующих мРНК-мишень.

Для защиты олигонуклеотидов от действия внутриклеточных нуклеаз без потери способности связывать мишень разрабатывают способы модификации пиримидиновых оснований и дезоксирибозы. Синтезированы устойчивые к нуклеазам «антисмысловые» олигонуклеотиды с фосфорамидитной и полиамидной (пептидной) связями.

«Антисмысловые» олигонуклеотиды применяют, в первую очередь, для разработки способов лечения вирусных заболеваний (вызванных вирусом иммунодефицита человека, цитомегаловирусом и др.), а также онкозаболеваний.

Олигонуклеотиды могут быть использованы в качестве аптамеров. Аптамеры – молекулы, способные специфически связываться с молекулой-мишенью, выполняя функции лигандов или рецепторов. В научных исследованиях аптамеры применяют для исследования взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами, выделения белков, селективного ингибирования белков. На основе аптамеров создают сенсоры для диагностики (выявления патогенных бактерий, одноклеточных, определения уровня глюкозы), а также новые лекарственные препараты. Так, например, создан аптамер, связывающий и ингибирующий тромбин. Антитромбиновый аптамер – антикоагулянт прямого действия. Получены аптамеры для выявления (детекции) опухолей.

Рибозимы – природные РНК, обладающие каталитической активностью, связывающиеся с комплементарной РНК-мишенью и расщепляющие ее в специфическом месте. Путем модификации нуклеотидной последовательности субстратсвязывающего домена можно получить рибозим, специфически расщепляющий определенный тип мРНК.

Олигонуклеотиды можно использовать и для коррекции генетических дефектов – «исправления» двух нуклеотидов в мутантном гене. Для этого используют химерный (ДНК-РНК) олигонуклеотид. Гетеродуплексы РНК-ДНК эффективнее связываются с гомологичными нуклеотидными последовательностями по сравнению с двухцепочечными ДНК.

Малые интерферирующие РНК могут быть использованы для создания лекарственных препаратов на основе явления РНК-интерференции.

Явление РНК-интерференции было открыто в 1998 г. Это направленное подавление активности генов у прокариот и эукариот. Посттрансляционное умолкание генов играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов эукариот. РНК-интерференция представляет собой механизм распознавания вирусов и их последующей деградации. В клетках РНК-интерференция может быть индуцирована экзогенными двухцепочечными РНК, эндогенными РНК, экспрессируемыми с плазмиды, короткими шпилечными РНК, полностью соответствующими последовательности РНК-мишени. В РНК-интерференции участвуют короткие (малые) интерферирующие РНК (siРНК), микроРНК (miРНК) и РІWI-ассоциированные РНК (piРНК). siРНК происходят из экзогенных РНК и вызывают сайленсинг (умолкание) соответствующих генов-мишеней; miРНК – продукты транскрипции собственного генома организма, участвующие в регуляции экспрессии генов; piРНК образуются из однопитевых РНК-предшественников и служат для сайленсинга ретротранспозонов и других мобильных генетических элементов. В процессе РНК-интерференции длинные двухцепочечные молекулы РНК (в том числе вирусных РНК, трансгенов, транспозонов) с помощью РНКаз расщепляются с образованием siРНК или miРНК. Двухцепочечные молекулы интерферирующих РНК расплетаются, одна из цепей встраивается в эффекторный комплекс (RISC) и действует в качестве «поисковой матрицы» для распознавания комплементарных нуклеотидных последовательностей специфических транскриптов с их последующим ферментативным гидролизом или трансляционной репрессией. Комплементарное спаривание между нуклеотидами интерферирующих РНК и РНК-мишени обеспечивает эффективное обнаружение этой мишени. Эффекторный комплекс RISC (*RNA-induced silencing complex*) включает белок-аргонавт с эндонуклеазной активностью и короткую гидовую (интерферирующую) РНК длиной 19–22 нуклеотида. В результате происходит расщепление мРНК и ее последующая деградация.

РНК-интерференция – мощный инструмент для избирательного подавления генов в фундаментальных исследованиях и в терапевтических целях.

В медицине пытаются применять и синтетические мРНК. Преимуществами использования мРНК в терапевтических целях по сравнению с ДНК являются: отсутствие риска возникновения мутаций и интеграции в геном; возможность доставки в неделящиеся клетки (так как нет необходимости проникновения в ядро), высокая эффективность трансфекции (до 100 %). Матричную РНК получают путем ферментативного синтеза *in vitro* или в бесклеточных системах.

Возможна оптимизация последовательности мРНК путем замены нестабильных участков мРНК в нетранслируемых областях на последовательности со стабильной структурой. Матричные РНК можно применять для создания РНК-вакцин. Однако при введении в кровь происходит быстрая деградация мРНК рибонуклеазами. Терапевтическое применение мРНК имеет перспективы для иммунотерапии рака, вакцинации против инфекционных заболеваний, заместительной терапии, регенеративной медицины. Разработана двухкомпонентная вакцина для лечения рака предстательной железы, состоящая из антигенкодирующей (гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор) мРНК и добавки комплекса мРНК – протамин для усиления иммунного ответа. Создана двухкомпонентная вакцина, содержащая вспомогательную мРНК и мРНК с антигеном гемагглютинаина для лечения гриппа. На мышинной модели интрамиокардиальное введение (заместительная терапия) мРНК, кодирующей фактор роста эндотелия сосудов, после инфаркта приводило к значительной регенерации сосудов и увеличению продолжительности жизни животных.

В целом, в настоящее время в мире активно разрабатываются технологии для биомедицинского применения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что понимают под термином «генная терапия»?
2. Для лечения каких заболеваний человека используют генную терапию?
3. Охарактеризуйте стратегии генной терапии и условия ее использования в клинической практике.
4. Каковы отличия генной терапии *ex vivo* и *in vivo*?
5. Какие системы могут быть использованы для доставки генов в клетки человека?
6. Охарактеризуйте вирусные векторы, предназначенные для доставки целевых генов в клетки человека.
7. Каковы преимущества и недостатки вирусных векторов при использовании в генной терапии?
8. Какие невирусные системы могут быть использованы для доставки генов в клетки человека при генной терапии? Каковы их преимущества и недостатки по сравнению с вирусными системами?
9. Каков принцип действия лекарственных средств на основе олигонуклеотидов? Для лечения каких заболеваний человека они используются?
10. Охарактеризуйте современное состояние исследований в области генной терапии.
11. Каковы основные проблемы, «сдерживающие» прогресс в области генной терапии? Как их пытаются решать?



8.1. Определение, основные подходы и методы

Белковая инженерия (протоинженерия) – научное направление на стыке генетической инженерии, молекулярной биологии, биохимии, биофизики, целью которого является изменение свойств природных белков и создание белков с новыми свойствами. Путем изменений структуры и свойств природных белков можно повысить стабильность белковых молекул по отношению к физико-химическим факторам (рН, температуре, действию протеаз, окислительных агентов), смене растворителя. Возможно изменение каталитических и регуляторных характеристик ферментов: константы Михаэлиса, максимальной скорости реакции, специфичности активного центра, сродства к кофакторам и ингибиторам. В результате упрощаются процедуры выделения и очистки белков, увеличивается их выход и выход целевых биотехнологических продуктов, образующихся с участием этих белков (ферментов).

Изменить свойства природных белков и создать белки с новыми (заданными) свойствами можно путем модификации структуры белковых молекул и кодирующих их генов.

Направленный мутагенез – это внесение специфических изменений в нуклеотидную последовательность ДНК (гена), ответственную за синтез белка. Для осуществления направленного мутагенеза разработаны различные экспериментальные подходы: олигонуклеотид-направленный мутагенез и случайный мутагенез.

Олигонуклеотид-направленный (сайт-специфический) мутагенез – наиболее простой метод внесения точковых мутаций в структуру клонированного гена. Ген-мишень нужно встроить в двухцепочечную форму вектора на основе бактериофага М13. Для этого получают одноцепочечную форму вектора (плюс- цепь М13), несущую ген-мишень с известной структурой. Проводят смешивание и отжиг этого вектора с комплементарным синтетическим олигонуклеотидом, содержащим один нуклеотид, не комплементарный определенному нуклеотиду исходной ДНК. Неспаривающийся нуклеотид соответствует тому нуклеотиду кодона мРНК, который нужно изменить. Спаривание азотистых оснований (гибридизация) между вектором и олигонуклеотидом происходит при высокой концентрации олигонуклеотида, низкой температуре и высокой ионной силе. Неспаривающийся нуклеотид должен располагаться примерно посередине олигонуклеотидной цепи. Далее осуществляют репликацию с участием фраг-

мента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Матрицей для синтеза ДНК является молекула вектора M13, а затравкой (праймером) для синтеза ДНК – олигонуклеотид. Далее синтезированную полноразмерную цепь ДНК замыкают в «кольцо» с помощью ДНК-лигазы T4.

Двухцепочечными молекулами ДНК фага M13 трансформируют клетки *E. coli*. В хозяйских клетках образуются фаговые частицы, большая часть которых содержит ДНК дикого типа, а оставшаяся – мутантную ДНК с заменой нуклеотида. Путем ДНК-гибридизации идентифицируют и отбирают частицы с мутантным геном. Мутантный ген выделяют, встраивают в экспрессирующий вектор и вводят в *E. coli*. Клетки *E. coli* синтезируют мутантный белок. Разработаны генно-инженерные подходы для повышения выхода мутантного фага.

Недостатком этого метода является его высокая трудоемкость. Поэтому применяют олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК. Для этого ген-мишень встраивают в плазмидный вектор с активным геном устойчивости к тетрациклину и неактивным геном устойчивости к ампициллину (в «середине» этого гена заменен один нуклеотид). Проводят щелочную денатурацию двухцепочечной плазмидной ДНК для получения одноцепочечных кольцевых молекул. Одноцепочечную плазмидную ДНК отжигают с тремя олигонуклеотидами:

- 1) мутантным олигонуклеотидом;
- 2) олигонуклеотидом, восстанавливающим устойчивость к ампициллину;
- 3) олигонуклеотидом, придающим чувствительность к тетрациклину.

Молекула вектора с геном-мишенью – матрица для синтеза второй цепи ДНК, олигонуклеотиды – праймеры для синтеза, который осуществляется с участием ДНК-полимеразы T4. ДНК-лигаза устраняет одноцепочечные разрывы в новосинтезированной цепи ДНК. Продуктами реакции трансформируют клетки *E. coli*. Отбирают трансформанты, устойчивые к ампициллину и чувствительные к тетрациклину. Примерно 90 % этих трансформантов несут целевую мутацию в клонированном гене.

Для получения больших количеств мутантных генов разработан метод сайт-специфического мутагенеза с использованием ПЦР-амплификации.

Если неизвестна роль определенного аминокислотного остатка в реализации функциональной активности белка, то неясно, замену какого нуклеотида в ДНК нужно осуществить. В этих условиях проводят случайный мутагенез с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров. Синтезируют набор олигонуклеотидных праймеров, в молекулах которых в определенном сайте локализованы различные нуклеотиды. На их основе получают набор мутантных генов с заменой нуклеотидов в этом сайте. В результате возможен синтез белков с различными новыми свойствами.

Разработаны и другие методы для осуществления случайного мутагенеза.

Метод фагового дисплея основан на введении в состав генома нитевидных фагов нуклеотидных последовательностей, ответственных за синтез целевых

аминокислотных последовательностей белков. Эти аминокислотные последовательности в составе химерных белков оболочки фага экспрессируются на поверхности фаговых частиц после их сборки. Такие гибридные вирионы (слитые фаги) могут быть выявлены путем их аффинного связывания с определенными молекулами – специфическими моноклональными антителами.

Фаговая эпитопная (пептидная) библиотека – смесь нитевидных фагов, экспрессирующих в составе поверхностного белка любые возможные аминокислотные последовательности определенного размера, которые могут быть выявлены иммунохимическими методами. После отбора слитых фагов, специфично взаимодействующих с определенным антителом, возможно секвенирование нуклеотидных вставок и получение информации о структуре пептидных эпитопов, «узнаваемых» этим антителом. На основании анализа полученных результатов проводят картирование эпитопов белков, разрабатывают тест-системы для идентификации инфекционных агентов, осуществляют дизайн генно-инженерных вакцин.

На основе метода фагового дисплея разработан методический подход, который был назван направленной эволюцией белков.

Суть одного из вариантов этого подхода состоит в том, что последовательности ДНК, ответственные за синтез целевых пептидов слитых фагов, связывающихся с определенным антителом, подвергают мутагенезу и создают вторичную фаговую библиотеку. Эта библиотека содержит разные варианты нуклеотидной последовательности, отобранной на первом этапе библиотеки. После проведения иммунохимического анализа отбирают тип фага, связывающийся с антителом (специфической макромолекулой) с более высокой эффективностью.

Метод фагового дисплея перспективен для поиска специфических антител, взаимодействующих с целевыми антигенами, – библиотеки антител, представленных на поверхности фаговых частиц. В качестве источника генов иммуноглобулинов IgG используют В-лимфоциты специфически иммунизированных доноров. Фрагменты генов тяжелой и легкой цепей IgG амплифицируют с помощью метода ПЦР, затем собирают в кодирующие последовательности в составе фагмид и вводят в клетки *E. coli*. После инфицирования фагом-помощником получают библиотеку Fab-фрагментов антител человека. Библиотеки Fab-фрагментов могут содержать 10^9 – 10^{10} клонов слитых фагов. Для получения антител с более высоким сродством к целевому антигену на основе слитых фагов путем мутагенеза генов переменных цепей IgG создают вторичные фаговые библиотеки антител.

Без применения генно-инженерных методов для конструирования белков с новыми свойствами наряду с другими современными биотехнологическими разработками невозможен прогресс в медицинской диагностике, профилактике и лечении заболеваний человека.

8.2. Применение белковой инженерии

Белки-ферменты, модифицированные методами генетической инженерии с целью их стабилизации, перспективны для применения как в промышленных биотехнологических процессах, так и в медицине.

Термостабильность белков можно повысить путем образования в их молекулах дополнительных дисульфидных связей, которые не должны влиять на функциональную активность ферментов. С использованием олигонуклеотид-направленного мутагенеза получены термостабильные варианты лизоцима фага T4 с внутримолекулярными S–S-связями, а также ксиланазы *Bacillus circulans*, используемой для получения бумаги.

Снижение стабильности некоторых рекомбинантных белков может быть обусловлено присутствием в их молекулах свободных сульфгидрильных групп, участвующих в образовании S–S-связей. В результате в реципиентных (хозяйских) клетках (например, *E. coli*) формируются димерные и олигомерные неактивные комплексы белков. Такая проблема возникла при получении с помощью *E. coli* β -интерферона человека. Замена одного из остатков цистеина на остаток серина в молекуле β -интерферона, осуществленная методами генной инженерии, привела к синтезу активного и стабильного при хранении препарата β -интерферона.

Исследования в рамках белковой инженерии осуществляют в настоящее время с применением компьютерных методов моделирования пространственной структуры белков.

Проведены эксперименты с использованием олигонуклеотид-направленного мутагенеза и компьютерного моделирования пространственной структуры белков по изменению специфичности связывания субстрата тирозил-тРНК-синтетазой *Bacillus stearothermophilus*. Получены препараты мутантного субтилизина (протеазы, используемой в качестве детергента в промышленных процессах), молекулы которого были лишены кальций-связывающего домена и затем стабилизированы путем замены аминокислотных остатков в определенных участках полипептидной цепи.

Перспективным направлением белковой инженерии является создание новых сайт-специфичных эндонуклеаз рестрикции.

Получен активный мутантный фермент – активатор тканевого плазминогена, необходимый для растворения тромбов, характеризующийся повышенным сродством к фибрину и более высокой стабильностью в плазме по сравнению с исходной формой.

Создан препарат мутантного α_1 -антитрипсина (ингибитор нейтрофильной эластазы, гидролизующей компоненты соединительной ткани), устойчивый к химическому окислению, который может быть использован для лечения эмфиземы у курящих пациентов.

Генно-инженерный α_1 -антитрипсин с измененной субстратной специфичностью может быть применен для создания тромболитического препарата без использования гепарина, способного вызывать кровотечения.

Методы белковой инженерии перспективны для конструирования мультидоменных белков с новыми свойствами. В этом направлении проводятся эксперименты по созданию генов с «кассетной» структурой, что позволит комбинировать в новых сочетаниях и удалять отдельные домены сложных белков, исследовать их новые свойства, получать белки с комбинацией доменов из разных белковых молекул.

Предприняты успешные попытки создания гибридных генов мышинового интерферона с более высокой по сравнению с исходными формами противовирусной активностью; гибридного гена, кодирующего химерный белок на основе интерферона- γ и интерлейкина-2 человека.

С помощью генно-инженерных методов создают моноклональные антитела. Их используют в качестве диагностических и терапевтических агентов, а также «нацеливающих» модулей для направленной доставки диагностических и терапевтических средств или клеток собственной иммунной системы к клеткам-мишеням. Для этого получают химические конъюгаты моноклональных антител и их фрагментов с токсинами и радиоизотопами, а также рекомбинантные составные белки с моноклональными антителами, другими антителами, цитокинами, белковыми токсинами, ферментами, флуоресцентными белками. В клинической практике сейчас используется примерно 40 препаратов антител.

Классический метод получения моноклональных антител – гибридомная технология, предложенная Ж. Кёлером и С. Мильштейном в 1975 г. Однако такие антитела первого поколения оказались неэффективными для использования в клинической практике.

Суть ферментного метода получения Fab-фрагментов антител в качестве нацеливающих агентов состоит в обработке интактных IgG протеолитическими энзимами – папаином и пепсином с последующей очисткой.

Методы генной инженерии были использованы для получения укороченных производных антител – одноцепочечных переменных фрагментов scFv (мини-антител). Мини-антитела кодируются одним геном и содержат один антигенсвязывающий участок, состоящий из переменных доменов легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, соединенных пептидным линкером (рис. 22).

Перспективный источник антигенсвязывающих фрагментов – неканонические антитела хрящевых рыб, верблюдов, лам. Они состоят из димера только одной укороченной (без CH1-домена) тяжелой цепи, а легкая цепь отсутствует (рис. 22, б). Антиген-узнающий участок HCAb формируется лишь одним переменным доменом (VHH), который непосредственно связан через шарнирный район с Fc-доменом. Домен VHH называют «нанотелом», «однодоменным антителом», «мини-антителом» или «наноантителом».

Нуклеотидную последовательность гена наноантитела можно эффективно клонировать и экспрессировать в бактериях (выход составляет 1–10 мг из 1 л культуры *E. coli*) и дрожжах, а также в клетках растений и млекопитающих. Получаемое в виде мономера однодоменное наноантитело (размером $\sim 2,5 \times 4$ нм, 12–15 кДа) – наименьший белок, обладающий свойством специфически связывать антиген.

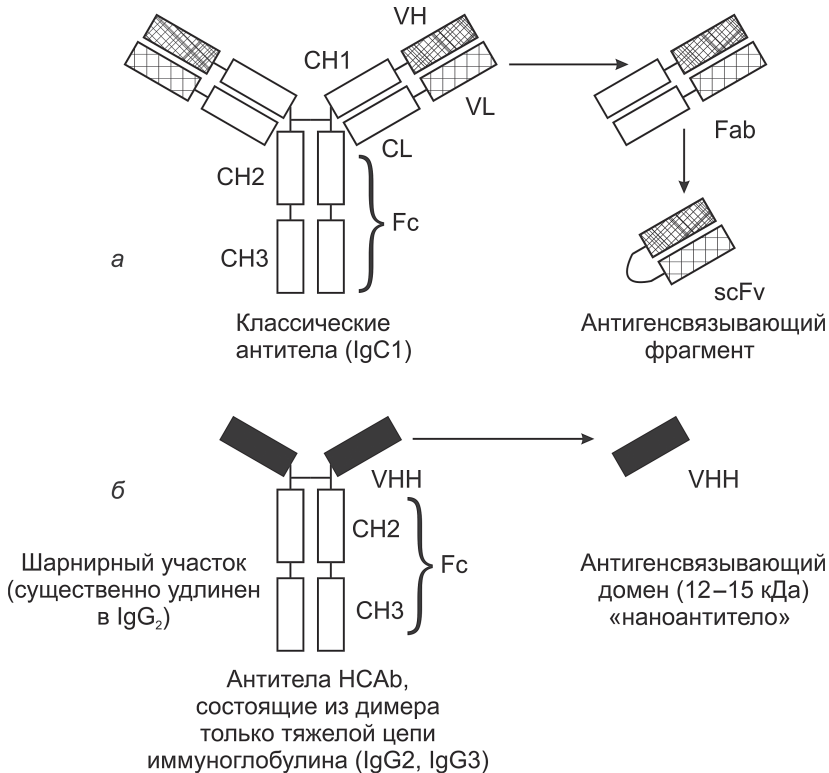


Рис. 22. Схематическое изображение классических антител (а) и антител, состоящих только из тяжелых цепей (б)

Сконструированы библиотеки рекомбинантных фрагментов антител и разработаны методы их модификации и оптимизации функций, направленные на уменьшение иммуногенности, улучшение аффинности, видоизменение специфичности, улучшение фармакокинетики и эффекторных свойств.

Для клинического применения антител разработана стратегия их гуманизации. Путем последовательной замены отдельных аминокислотных остатков молекулы наноантител они были максимально приближены к структуре вариабельного домена тяжелой цепи IgG человека с сохранением стабильности и аффинности.

Разрешены для клинического применения препараты антител для терапии опухолевых заболеваний: *Adcetris*[®], или *Brentuximab vedotin* (иммунотоксин IgG1 химерный, компания *Seattle Genetics*), *Arzerra*[®], или *Ofatumumab* (IgG каппа человека, компания *Glaxo Group Limited*), *Gazyva*[®], или *Obinutuzumab* (IgG1 каппа гуманизированный, компания *Genentech*), *Kadcyla*[®], или *Trastuzumab* (иммунотоксин IgG1, компании *Roche*, *Genentech*); для терапии аутоиммунных заболеваний: *Actemra*[®], или *Tocilizumab* (IgG1 гуманизированный, компания *Genentech*), *Benlysta*[®], или *Belimumab* (IgG λ человека, компания *Human Genome Sciences*) и др.

С использованием методов белковой инженерии созданы иммунотоксины и иммуноконъюгаты – конъюгаты антител с различными эффекторными молекулами: радиоизотопами, токсинами, цитокинами, ферментами, активными лекарственными препаратами. Они имеют более высокий терапевтический индекс по сравнению с химиопрепаратами. Иммунотоксины и иммуноконъюгаты получают путем химической конъюгации по аминок группам остатков лизина или по SH-группам остатков цистеина.

Иммунотоксины – гибридные комплексы, полученные путем конъюгации *in vitro* специфических антител и полипептидных токсинов. Иммунотоксины используют для направленного уничтожения клеток-мишеней, в частности, опухолевых, на поверхности которых имеются рецепторы для этих антител. Так, в 80-е гг. XX в. был сконструирован гибридный ген, который обеспечивал в клетках *E. coli* синтез химерного белка А-субъединицы дифтерийного токсина и меланоцитстимулирующего гормона α человека, токсичного для культуры клеток меланомы человека с рецепторами для меланостимулирующего гормона. На основе псевдомонадного экзотоксина А, блокирующего в клетках биосинтез белка, создан целый ряд иммунотоксинов. Разрешенный для применения в клинической медицине препарат *Adcetris*[®] – химерное анти-CD30-антитело, конъюгированное с ингибитором клеточного деления монометилауристаминном. Препарат *Kadcyla*[®] – конъюгат гуманизированного анти-HER2-антитела с токсином эмтанзином.

Перспективный агент для создания противораковых иммунотоксинов – бактериальная рибонуклеаза барназа. Этот белок токсичен для клеток, но нечувствителен к природному ингибитору РНКаз человека. Присоединение барназы к «нацеливающему» антителу увеличит эффективность и специфичность ее действия на опухолевые клетки.

Исследуются возможности создания иммунотоксинов для лечения опухолевых заболеваний на основе цитокинов с иммуномодулирующим и противоопухолевым действием: интерлейкинов ИЛ-1 и ИЛ-2, фактора некроза опухоли-α, интерферона-γ и др.

Фотоиммуносенсибилизаторы – белковые гибридные молекулы, состоящие из «нацеливающего» мини-антитела и белкового фототоксина, например, фототоксичного флуоресцентного белка *Killer Red*, высокотоксичного флавопротеи-

на miniSOG, генерирующего синглетный молекулярный кислород при облучении в присутствии флавиномононуклеотида.

Каталитические антитела или абзимы (антитела-ферменты) специфически связывают антигены и способны к их направленной деструкции. Природной абзимной активностью могут обладать антитела, выделенные из сывороток крови больных с аутоиммунными патологиями и модельных животных с аутоиммунными процессами. Абзимы катализируют различные эстеразные и оксидазные реакции. Получены абзимы с протеазной, ДНКазной, РНКазной ферментативной активностью. Абзимы могут катализировать реакции, не имеющие ферментативных аналогов. Перспективы применения абзимов связаны с созданием «каталитических вакцин», способных катализировать разрушение патогенов, пестицидов, наркотиков, ядов; а также расщепление белков (в том числе патогенных), нуклеиновых кислот, углеводов.

Биспецифические антитела, способные связываться одновременно с двумя мишенями, используют для перенацеливания цитотоксических иммунных клеток на патологические мишени, для увеличения avidности (отражает прочность связывания антител с антигенами) и селективности воздействия при взаимодействии с разными антигенами опухолевой клетки, а также для доставки цитотоксических агентов в опухоль.

Скаффолды (альтернативные «каркасные» белки, «каркасные» пептиды) – молекулярные конструкции, альтернативные связывающим доменам антител. Это белковые каркасы, которые могут нести видоизмененные аминокислотные остатки или небольшие последовательности, придающие различным вариантам белка разные функции, в частности, возможность эффективного связывания со специфическими мишенями. Их преимуществами являются небольшие размеры, способность проникать в ткани, возможность дополнительной функционализации, получение путем экспрессии в бактериальных системах. В качестве примеров природных и неприродных каркасных белков можно привести: аднектин, аффибоди, антикалин, авимер, дарпин. Одни искусственные связывающие белки (аднектины или монободи) создают на основе домена фибронектина, другие – на основе анкириновых повторов. Наиболее часто для создания скаффолдов используют метод фагового дисплея.

Основными преимуществами генно-инженерных методов конструирования белковых мультифункциональных терапевтических агентов по сравнению с традиционными методами химической модификации белков являются: воспроизводимость и постоянство состава конъюгатов, отсутствие эффекта снижения аффинности антитела или эффективности действия токсина. Рекомбинантные терапевтические агенты могут быть использованы не только в виде белковых молекул, синтезированных в биотехнологических системах экспрессии, но и в виде генов для генной терапии, доставляемых в клетки-мишени (опухолевые клетки) с помощью вирусных векторов.

Без комплексного применения методов геной и белковой инженерии невозможен прогресс в биотехнологии, биомедицине, физико-химической биологии в будущем, особенно в плане создания роботизированных технологий и супрамолекулярных наноструктур.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ _____

1. Дайте определение термина «белковая инженерия».
2. Каковы научно-практические задачи белковой инженерии?
3. Какие методические подходы используют для создания белков с новыми свойствами? Какие свойства белков можно изменять?
4. Опишите последовательность этапов реализации олигонуклеотид-направленного мутагенеза.
5. Охарактеризуйте суть метода фагового дисплея. Для решения каких задач можно использовать метод фагового дисплея в белковой инженерии?
6. Охарактеризуйте направления практического использования достижений белковой инженерии.
7. Какие медицинские препараты для клинического применения были созданы с использованием методов белковой инженерии? Для лечения каких заболеваний они предназначены?
8. Каковы современные перспективные направления белковой инженерии, связанные с их биомедицинским применением?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ



Генетическая инженерия – ключевое направление современной биотехнологии, целью которого является создание и использование искусственных генетических программ для решения различных научно-практических задач в области биологии, медицины, промышленности, сельского хозяйства. Генетическая инженерия базируется на технологии рекомбинантных молекул ДНК, разработанной в начале 70-х гг. XX в. на основе крупных научных открытий в области биохимии, молекулярной биологии и молекулярной генетики.

Технология рекомбинантных молекул ДНК – совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой. Основными этапами генно-инженерных проектов являются: получение целевого гена; встраивание его в генетический вектор и конструирование рекомбинантной молекулы ДНК; введение рДНК в клетку-реципиент; идентификация реципиентных клеток, несущих целевой ген. В качестве важнейших инструментов генно-инженерных разработок применяют целый ряд ферментов: рестрицирующие эндонуклеазы, ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы, нуклеазы, фосфатазы. Для получения целевых генов используют либо методы их ферментативного и химико-ферментативного синтеза, либо «разрезания» ДНК с помощью рестриктаз. Конструирование рДНК осуществляется путем комплементарных взаимодействий участков «линеаризованных» молекул векторов и целевых генов с последующим их «сшиванием» с помощью ДНК-лигаз. Совершенствуются генно-инженерные методы создания различных типов генетических векторов на основе плазмидных и вирусных ДНК. Введение рДНК в реципиентные клетки осуществляют путем трансформации, трансфекции, трансдукции, электропорации, липофекции, микроинъекции, биологической баллистики. Для идентификации реципиентных клеток, получивших целевой ген, применяют методы гибридизации нуклеиновых кислот, иммунологические методы и методы, основанные на определении активности белка, кодируемого геном-мишенью.

В настоящее время работы в области генной инженерии, позволяющие осуществлять синтез молекул нуклеиновых кислот и идентификацию их участков, невозможны без секвенирования ДНК – определения ее нуклеотидной последовательности с помощью ферментативного и химического методов анализа и их модификаций. Созданы международные электронные базы данных секвенированных нуклеотидных последовательностей различных организмов. Реализова-

ны и иницируются геномные проекты, направленные на расшифровку крупных геномов различных организмов, в том числе патогенных. В начале XXI в. завершен Международный проект по расшифровке генома человека. Без осуществления геномных проектов невозможны дальнейшие исследования функций генов, а также изучение механизмов развития патологических состояний человека и разработка методов их лечения.

Конструирование генетически трансформированных прокариотических клеток для получения рекомбинантного белка предполагает разработку генно-инженерных стратегий оптимизации экспрессии клонированных генов, направленных на регулирование эффективности процессов их транскрипции и трансляции белковых молекул, стабилизацию последних и повышение секреции из клеток. Во многих случаях для получения стабильных и активных молекул рекомбинантных белков эукариотического происхождения, требующих посттрансляционных модификаций, необходимы эукариотические системы экспрессии на основе дрожжей, бакуловирусов, растительных клеток и клеток млекопитающих.

Рекомбинантные штаммы бактерий, полученные генно-инженерными методами, используются для получения различных биотехнологических продуктов: белков, ферментов, аминокислот, нуклеотидов, витаминов, антибиотиков, инсектицидов и др. Трансформированные бактериальные клетки – продуценты гормонов: инсулина, соматотропина, интерферонов, а также моноклональных антител и других медицинских препаратов.

Генетически трансформированные растения используются в качестве биореакторов для получения фармацевтических препаратов: рекомбинантных белков, гормонов, антител, вакцин. Созданы трансгенные сорта сельскохозяйственных растений с новыми свойствами: более высокой устойчивостью к различным факторам (гербицидам, насекомым-вредителям, вирусам, грибам, бактериям, солевому стрессу), повышенной продуктивностью и другими хозяйственно ценными признаками. Конструирование и всестороннее исследование генетически трансформированных растений – основа для выявления механизмов функционирования генов растений и их регуляции.

Вакцины, гормоны и рекомбинантные белки получают с помощью генетически трансформированных культур клеток млекопитающих. Перспективы применения трансгенных животных (коров, коз, овец) связаны с продукцией в их организме фармацевтических белков человека, секретируемых в молоко. Особую актуальность для медицины имеют генно-инженерные работы, направленные на использование трансгенных свиней для трансплантации органов и тканей от животных к людям. Перспективы использования трансгенных птиц связаны с получением яиц, содержащих фармацевтические белки человека.

Трансгенные мыши и рыбы используются в качестве моделей патологических состояний человека, в фундаментальных научных исследованиях для изучения функций генов и кодируемых ими белков.

Созданы породы трансгенных коров, устойчивых к бактериальным и вирусным инфекциям, паразитарным инвазиям, а также трансгенных свиней с уменьшенным количеством жира и другими полезными характеристиками.

Трансгенные рыбы используются для разработки генно-инженерных методов тестирования загрязнений воды.

Репродуктивное клонирование млекопитающих, которое осуществляется путем пересадки ядер и деления эмбрионов, перспективно для создания элитных высокопродуктивных сельскохозяйственных животных, получения фармакологических белков с использованием молочной железы в качестве биореактора, сохранения редких исчезающих животных. Основной задачей терапевтического клонирования является получение стволовых клеток, которые могут быть использованы для репарации поврежденных тканей и замены органов человека.

С использованием методов генетической инженерии получены субъединичные, поливалентные и ДНК-вакцины.

Совершенствуются методы генной (генетической) терапии, направленные на лечение инфекционных, онкологических, наследственных заболеваний и нарушений иммунной системы человека. Для этого разрабатываются различные вирусные и невирусные системы доставки генов в целевые клетки.

В рамках генной терапии перспективны исследования, целью которых является создание терапевтических и диагностических средств на основе олигонуклеотидов: антисмысловых олигонуклеотидов, аптамеров, малых интерферирующих РНК, синтетических мРНК.

Для развития промышленной биотехнологии, медицины и научных исследований важны работы в области белковой инженерии, направленные на изменение свойств природных белков и создание белков с новыми свойствами: ферментов, ингибиторов ферментов, мультидоменных белков, моноклональных антител, иммунотоксичных и других молекул.

Итак, методы генетической инженерии, разработанные на основе важнейших открытий биохимии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, позволяют направленно изменять генетическую природу клеток-продуцентов, конструировать новые системы экспрессии генов и получать ценные биотехнологические продукты для использования в промышленности, медицине, сельском хозяйстве и экологии.

Работы в области генетической инженерии – это, в сущности, эксперименты с применением природных молекул нуклеиновых кислот и ферментов как инструментов для расщепления и «сшивания» фрагментов ДНК, направленные на создание функционально активных генетических конструкций в целевых клетках. В настоящее время эти исследования невозможны без использования методов секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей различных организмов, синтеза молекул нуклеиновых кислот, а также компьютерного моделирования пространственной структуры биополимеров. Разрабатываются

подходы к созданию искусственных (синтетических) генетических конструкций и конструированию новых биологических систем с заданными свойствами. Появился термин «синтетическая биология», не имеющий пока однозначной трактовки, но обозначающий современные тенденции развития биологии – интеграцию и «взаимопроникновение» отдельных биологических дисциплин и направлений: биотехнологии, генетической и клеточной инженерии, молекулярной биологии, молекулярной генетики, биохимии, биоинформатики, использование комплексного подхода и арсенала различных аналитических методов и методических приемов для решения определенной научно-практической задачи. Речь идет не только об изменениях структуры и функций естественных биомолекул, но и о проектировании и создании (биоинжиниринге) управляемых искусственных биологических систем для их использования в промышленности, медицине, энергетике, сельском хозяйстве и других отраслях производства и науки. Промышленное получение биотехнологических продуктов с использованием генно-инженерных методов, уже ставших традиционными, и реализация «амбициозных» биоинженерных проектов будущего невозможны без подготовки грамотных студентов, владеющих теоретическими основами генетической инженерии и смежных биологических дисциплин.

Надеемся, что данное учебное пособие поможет студентам в освоении учебного материала по дисциплинам «Введение в биотехнологию», «Основы бионанотехнологии» и будет способствовать их качественной профессиональной подготовке.

ЗАДАНИЯ И ЗАДАЧИ



ЗАДАНИЯ

Задание 1

Выберите правильный ответ или ответы.

1. Ген-маркер необходим в генетической инженерии для:

- а) включения вектора в клетки хозяина;
- б) отбора колоний, образуемых клетками, в которые проник вектор;
- в) для включения гена-мишени в вектор;
- г) для повышения стабильности вектора.

2. Вектор на основе плазмиды предпочтительней вектора на основе фаговой ДНК благодаря:

- а) большему размеру;
- б) меньшей токсичности;
- в) высокой частоты включения;
- г) отсутствию лизиса клетки хозяина.

3. В генно-инженерных проектах используют ферменты:

- а) рестриктазы;
- б) ДНК-лигазы;
- в) лиазы;
- г) аминоксиллазы;
- д) ДНК-полимеразы;
- е) щелочную фосфатазу;
- ж) кислую фосфатазу.

4. Понятие «липкие» концы применительно к генетической инженерии отражает:

- а) комплементарность нуклеотидных последовательностей;
- б) взаимодействие нуклеиновых кислот и гистонов;
- в) реагирование друг с другом SH-групп с образованием дисульфидных связей;
- г) гидрофобное взаимодействие липидов.

5. В генетической инженерии человека введение гена в целевые клетки осуществляют с использованием:

- а) липосом;
- б) Ti-плазмид;
- в) электропорации;
- г) метода биологической баллистики.

6. Фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК, называется:

- а) ДНК-полимеразой;
- б) ДНК-лигазой;
- в) ДНК-зондом;
- г) нуклеазой S1.

7. Вектор, предназначенный для встраивания клонированной ДНК в геном клетки-хозяина, называют:

- а) клонирующим;
- б) экспрессирующим;
- в) интегрирующим;
- г) челночным.

8. Спаривание двух молекул ДНК за счет образования водородных связей между комплементарными нуклеотидами – это:

- а) лигирование;
- б) денатурация;
- в) гибридизация;
- г) кроссинговер.

9. Эффективность инициации трансляции на рибосоме определяет нуклеотидная последовательность, называемая:

- а) последовательностью Шайн – Дальгарно;
- б) боксом Прибнова;
- в) боксом Хогнесса;
- г) линкерной последовательностью.

10. Вектор, объединяющий свойства плазмидного вектора и вектора на основе фага λ , имеющий cos-сайты, называют:

- а) фагмидой;
- б) космидой;
- в) фазмидой;
- г) искусственной бактериальной хромосомой.

Задание 2

Оцените, верно ли суждение. Исправьте ошибки в неверных суждениях.

1. Работы в области генетической инженерии подразумевают создание и использование рекомбинантных ДНК.

2. Молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и обеспечивать ее репликацию, называют линкерами.

3. ДНК-гибридизация – это один из методов получения нужного гена.

4. Для получения гена из бактериальной клетки используют метод обратной транскрипции.

5. Внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации, – это плазида.

6. «Липкие» концы – это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию.

7. Нужный ген в генетической инженерии при воссоздании его на основе изолированной матричной РНК получают при помощи фермента ДНК-зависимой ДНК-полимеразы.

8. Для генетической трансформации бактериальных клеток используют метод биологической баллистики.

9. Для введения чужеродной ДНК в клетки млекопитающих используют вирусные векторы.

10. Для создания растений, устойчивых к гербицидам, используют трансформацию растительных клеток генами эндотоксина.

11. Методы генетической инженерии были использованы для создания популяций крупного рогатого скота, устойчивых к некоторым кровепаразитарным заболеваниям.

12. Для создания интегрирующего вектора используют плазмиды, не способные к самостоятельной репликации в клетках хозяина.

13. Отжиг – это процесс образования двухцепочечных молекул из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

14. Для скрининга геномной библиотеки используют метод физиологической комплементации.

15. Рестриктазно-лигазный метод используют для получения векторных молекул.

16. Векторы для клонирования и экспрессии генов содержат одинаковые регуляторные элементы.

17. Последовательность оснований длиной 6–8 нуклеотидов, расположенная перед иницирующим кодоном АУГ и определяющая эффективность трансляции, называется промотором.

18. Коллекция клонов кДНК, синтезируемых *in vitro* на матрицах мРНК, происходящих из одной ткани или клеточной популяции, – это библиотека кДНК.

19. Участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов, – это промотор.

20. Дидезоксинуклеотидный метод применяют для секвенирования ДНК.

ЗАДАЧИ

1. Участок ДНК, выделенный из *E. coli*, имеет следующий вид:



Сколько пептидов он кодирует? Напишите их аминокислотный состав.

Таблица 4

Таблица генетического кода (мРНК)

Первое основание	Второе основание				Третье основание
	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	–	–	А
	Лей	Сер	–	Три	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асн	Сер	У
	Иле	Тре	Асн	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

2. Перед вами все последовательности ДНК для семейства β-глобина (рис. 23), однако вам неизвестно, с каким участком гена вы имеете дело – интроном или экзоном. Известно, что последовательности, представленные на рисунке, расположены на одной из границ – экзон/интрон или интрон/экзон, и что эта граница проходит по сплошной линии. Вы знаете также, что интроны всегда начинаются динуклеотидами ГТ и заканчиваются АГ, но понимаете, что

эти специфические последовательности могут быть расположены либо в начале, либо в конце интрона.

Необходимо определить, с какой стороны от сплошной линии расположен интрон, и разрешить эту задачу с эволюционной точки зрения. Вы знаете, что интроны меняются быстрее (в них чаще происходят нуклеотидные замены), чем экзоны, так как изменение последовательностей интронов не затрагивает функцию. Поможет ли такой подход идентифицировать интрон?

Г	Г	Т	Г	Г	Т	Г	А	Г	Г	Ц	Ц	Т	Г	Г	Г	Ц	А	Г	Г	Т	А	Т	Ц	Ц	А	Ц	Т	Т	А	Ц	А	А	Г	Корова									
Г	Г	Т	Г	Г	Т	Г	А	Г	А	Т	Т	Ц	Т	Г	Г	Г	Ц	А	Г	Г	Т	А	Т	Т	Г	Г	А	А	Г	Ц	Ц	Г	Г	Г	Г	Горилла							
Г	Г	Г	Г	Г	Ц	Г	А	А	Г	Ц	Ц	Т	Г	Г	Г	Ц	А	Г	Г	Т	А	Г	Т	Ц	Ц	А	Г	Ц	А	Т	Курица												
Г	Г	Т	Г	Г	Т	Г	А	Г	Г	Ц	Ц	Т	Г	Г	Г	Ц	А	Г	Г	Т	Т	Г	Т	Ц	Ц	А	А	Г	Г	Т	Т	А	Ц	А	А	Г	Человек						
Г	Г	Т	Г	Г	Т	Г	А	Г	Г	Ц	Ц	Т	Г	Г	Г	Ц	А	Г	Г	Т	Т	Г	Т	А	Т	Ц	Ц	А	Г	Г	Т	Т	А	Ц	А	А	Г	Мышь					
Г	Г	Т	Г	Г	Т	Г	А	Г	Г	Ц	Ц	Т	Г	Г	Г	Ц	А	Г	Г	Т	Т	Г	Т	А	Т	Ц	Ц	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т	А	Ц	А	Г	Ц	Кролик			
Г	Г	Ц	А	Т	Г	А	Т	Г	Ц	Ц	Т	Г	А	Ц	Ц	А	Г	Г	Т	А	Ц	Т	Т	Г	А	А	Ц	Т	Т	Г	А	А	Г	Ц	А	Ц	А	Т	Т	Г	Ц	Т	Лягушка

Рис. 23. Последовательности ДНК для семейства β-глобина

3. Вы изучаете особенности синтеза белка у одноклеточной инфузории *Tetrahymena*. При этом у вас есть как успехи, так и неудачи. Успехи – это получение первых данных о последовательностях белка и нуклеиновой кислоты для С-конца одного из белков *Tetrahymena*:

Иле Мет Тир Лиз Глн Вал Ала Глн Тре Глн Лей *
 АУУ АУГ УАУ ААГ УАГ ГУЦ ГЦА УАА АЦА ЦАА УУА УГА ГАЦ УУА

Неудачи состоят в том, что вам не удается провести трансляцию очищенной мРНК *Tetrahymena* в лизате ретикулоцитов, который служит стандартной системой для анализа синтеза белка *in vitro*. Эту мРНК можно было считать хорошей по всем критериям, но продуктами ее трансляции были в основном мелкие полипептиды (рис. 24, дорожка 1).

Чтобы разобраться в причинах неудач, вы ставите несколько контрольных опытов с очищенной мРНК вируса табачной мозаики, которая кодирует белок с массой 116 кДа. Эта мРНК хорошо транслируется в системе *in vitro*; при этом образуется белок с массой 116 кДа – ожидаемый продукт, который на электрофореграмме дает основную полосу, и белок с массой на 50 кДа больше, который дает очень слабую полосу (рис. 24, дорожка 2). При добавлении РНК *Tetrahymena* отмечается значительное возрастание количества продукта с более высокой молекулярной массой (рис. 24, дорожка 3). Когда вы добавляете в систему некоторое количество цитоплазмы *Tetrahymena* (без рибосом), мРНК вируса табачной мозаики дает преимущественно продукт с большей массой (рис. 24, дорожка 4); кроме того, к вашему удовольствию, ранее неактивная мРНК *Tetrahymena*, по-видимому, начинает транслироваться (рис. 24, дорож-

ка 4). Вы убеждаетесь в этом, исключая из системы мРНК вируса табачной мозаики (рис. 24, дорожка 5).

1. Чем необычна кодирующая последовательность для белка *Tetrahymena*?

2. Как, по вашему мнению, образуется минорный продукт с большей молекулярной массой за счет мРНК вируса табачной мозаики в лизате ретикулоцитов?

3. Объясните, почему изменяется соотношение между количествами основного и минорного белков вируса табачной мозаики при добавлении только РНК *Tetrahymena* и этой РНК вместе с цитоплазмой *Tetrahymena*. Какие компоненты *Tetrahymena* вероятнее всего необходимы для эффективной трансляции мРНК *Tetrahymena*?

4. Объясните значение результатов ваших экспериментов с эволюционной точки зрения.

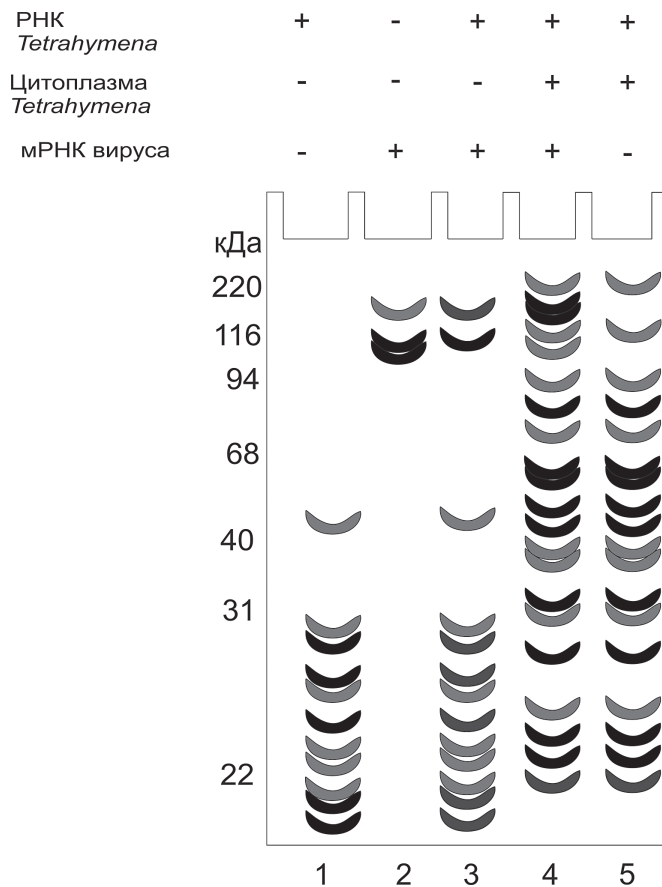


Рис. 24. Трансляция мРНК вируса табачной мозаики в присутствии и в отсутствие разных компонентов *Tetrahymena*

4. Вы выделили из культуры бактерий антибиотик эдеин. Он ингибирует синтез белка, но не затрагивает ни синтеза ДНК, ни синтеза РНК. При добавлении эдеина к лизату ретикулоцитов синтез белка прекращается спустя некоторое время (рис. 25). В отличие от этого циклогексимид останавливает синтез белка сразу после добавления. Анализ лизата после ингибирования эдеином, проведенный методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, показал, что после остановки синтеза белка в лизате не оставалось полирибосом. Вместо них вся мРНК глобина накапливалась в аномальном пике 40S, содержащем также эквивалентные количества малых субъединиц рибосом и инициаторную тРНК.

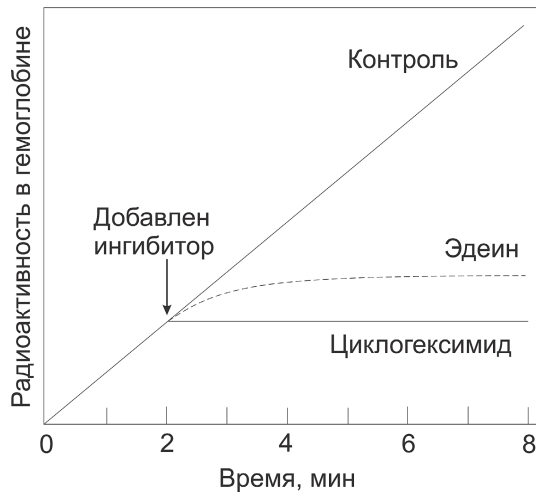


Рис. 25. Действие ингибиторов эдеина и циклогексимид на синтез белка в лизатах ретикулоцитов

1. Какой этап в синтезе белка ингибирует эдеин?
2. Почему синтез белка прекращается не сразу после добавления эдеина? От чего зависит длительность этой задержки?
3. Следует ли ожидать исчезновения полирибосом, если вы добавите одновременно с эдеином циклогексимид?

5. SOS-ответ у *E. coli* представляет собой экстренную реакцию на повреждение ДНК. Как видно из рис. 26, при нормальных условиях SOS-набор генов, индуцируемых повреждением, выключен репрессором *lexA*, который частично подавляет также свой собственный синтез и синтез *recA*. В ответ на повреждение ДНК некий сигнал (по-видимому, это одноцепочечная ДНК) активирует *recA*, который затем вызывает расщепление *lexA*. В отсутствие *lexA* все гены экспрессируются максимально. SOS-ответ повышает выживаемость клеток в

условиях повреждения ДНК, временно увеличивает скорость мутирования и, следовательно, изменчивость в популяции бактерий. Экспрессия SOS-генов необходима в случаях резких повреждений, но их постоянная экспрессия могла бы оказаться очень вредной для клеток.

Один из аспектов регуляции SOS-ответа кажется совершенно парадоксальным: экспрессия *lexA* (репрессора SOS-ответа) существенно возрастает при SOS-ответе. Если целью последнего является максимальная экспрессия генов, индуцируемых при повреждении ДНК, то как может находиться при этом на высоком уровне и экспрессия репрессора? Другими словами, почему *lexA* не экспрессируется все время с низкой скоростью? Видите ли вы какое-нибудь преимущество в том, что для регуляции SOS-ответа требуется экспрессия *lexA*?

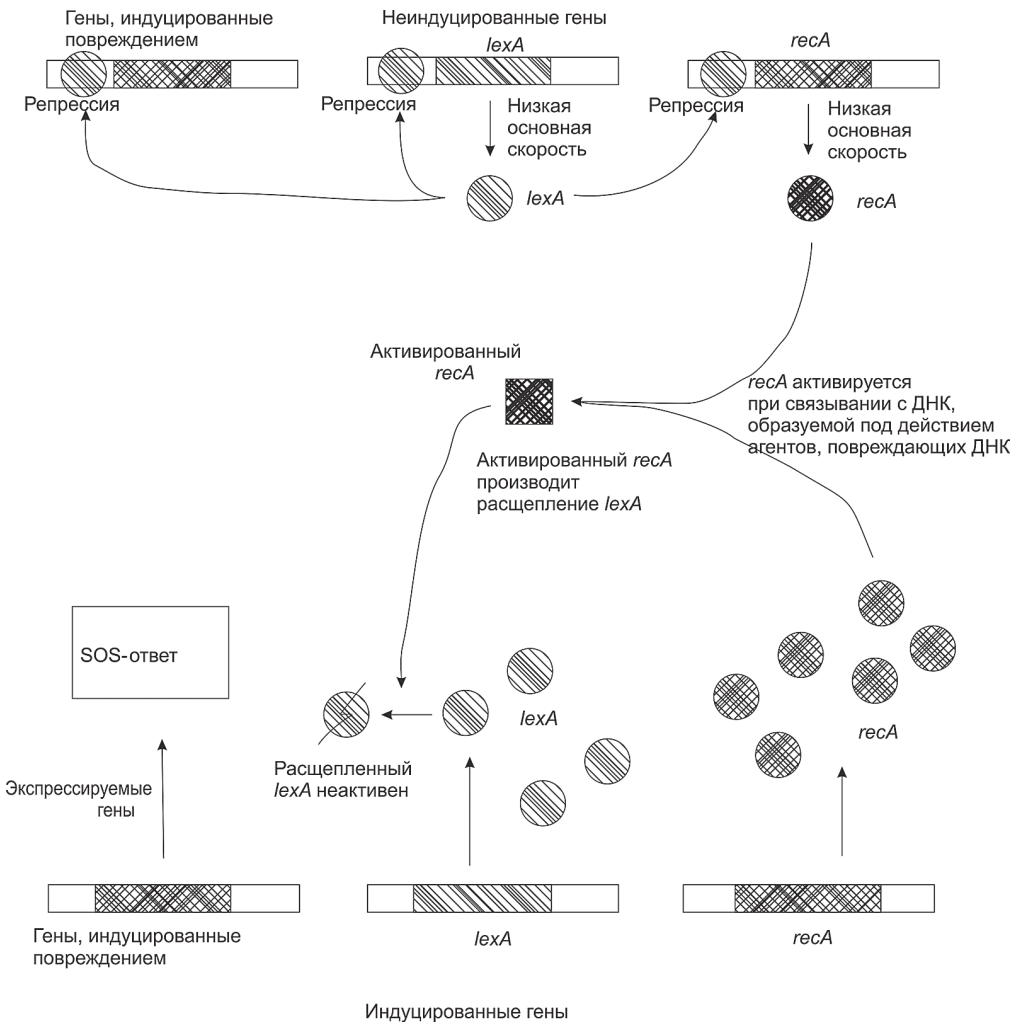


Рис. 26. SOS-ответ у *E. coli*

6. После проведения пульс-электрофореза в агарозном геле, окрашенном этидиумом бромидом, минимальное количество ДНК (в полосе шириной 5 мм), все еще различимое глазом (под УФ освещением), составляет примерно 3 нг. Сколько копий геномной ДНК *E. coli* находится в такой полосе?

Для решения задачи необходимо знать следующие соотношения:

- 1) размер генома *E. coli* – 4×10^6 пар оснований;
- 2) Мг пары нуклеотидов ~ 660 а. е. м;
- 3) 1 моль вещества содержит 6×10^{23} молекул (N_A , число Авогадро).

7. Какие из сайтов GAATCG, GATATC, AAATTT, ACGGCA могут быть сайтами узнавания для эндонуклеазы рестрикции (ЭР) II класса?

8. Придумайте гипотетический сайт для эндонуклеазы рестрикции (ЭР) II типа, состоящий из восьми пар нуклеотидов.

9. Каков будет средний размер фрагментов ДНК, образующихся при обработке хромосомной ДНК ЭР *Sau3A* (/GATC) и ЭР *BamHI* (G/GATCC), при равной частоте встречаемости всех нуклеотидов в хромосомной ДНК?

10. Какая доля молекул из лигированной смеси, в которой была ДНК, расщепленная *Sau3A*, будет затем разрезаться *BamHI*? И наоборот, какая доля молекул из лигированной смеси, в которой была ДНК, расщепленная *BamHI*, будет разрезаться затем *Sau3A*?

11. Вам нужно порезать 1 мкг линейной ДНК длиной 2,4 kb эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*. Для этой ЭР в ПЦР-продукте имеется два сайта узнавания. Какое минимальное количество единиц фермента *EcoRI* вам потребуется для проведения реакции за 1 ч.?

Для решения задачи нужно знать следующее: за одну единицу ЭР принято принимать количество фермента, необходимое для разрезания 1 мкг ДНК бактериофага λ в течение 1 ч. при температуре 37 °C в 50 мкл специфического буфера. Длина ДНК фага λ приблизительно равна 48 kb. В ДНК фага λ – пять сайтов рестрикции *EcoRI*.

12. Вы вырезали один фрагмент эндонуклеазой рестрикции *PstI* (CTGCA/G), а другой – *EcoRI* (G/AATCC), но хотите провести лигирование по «тупым» концам этих фрагментов в вектор, обработанный ЭР *SmaI* (CCC/GGG). Предложите план эксперимента.

13. В пробирке находится фрагмент молекулы двухцепочечной ДНК следующего состава:



На сколько частей и какими способами можно разрезать этот фрагмент молекулы двухцепочечной ДНК?

Воспользуйтесь для решения данной задачи табл. 5, в которой перечислены рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

Таблица 5

Рестриктазы, активно используемые в генной инженерии, и расщепляемые ими последовательности

Рестриктазы	Участки распознавания и места разреза ДНК	Рестриктазы	Участки распознавания и места разреза ДНК
BamI	5'-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3' 3'-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5'	HaeIII	5'-Г-Г-Ц-Ц-3' 3'-Ц-Ц-Г-Г-5'
EcoRI	5'-Г-А-А-Т-Т-Ц-3' 3'-Ц-Т-Т-А-А-Г-5'	HpaII	5'-Ц-Ц-Г-Г-3' 3'-Г-Г-Ц-Ц-5'
HindIII	5'-А-А-Г-Ц-Т-Т-3' 3'-Т-Т-Ц-Г-А-А-5'	SmaI	5'-Ц-Ц-Ц-Г-Г-3' 3'-Г-Г-Г-Ц-Ц-5'

14. В пробирке находятся два фрагмента молекул двухцепочечных ДНК следующего состава.

Фрагмент № 1:



Фрагмент № 2:



Как вы думаете, с помощью каких ферментов-рестриктаз можно разрезать эти двухцепочечные молекулы ДНК на фрагменты с «липкими» концами?

Воспользуйтесь для решения данной задачи табл. 5, в которой перечислены рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

Какую гибридную молекулу ДНК можно получить из этих фрагментов?

15. Вы секвенировали ДНК мутанта по гену X и обнаружили три нуклеотидные замены в трех разных кодонах. Одна из них – это незначущая замена (*silent change*), две другие – точечные мутации (*missense mutations*). Как вы докажете, что эти замены действительно мутации, а не ошибки секвенирования? Предполагается, что точность секвенирования – 99,9 %.

16. Вы хотите обнаружить гетерозиготность по определенной нуклеотидной позиции в гене X у диплоидных дрожжей. Можно ли сделать это, проведя лишь одну реакцию секвенирования?

17. В каком количестве ВАС-клонов (средний размер вставки 150 kb) поместится геном человека (3×10^9) с 15-кратным покрытием?

18. Какой подход вы выберете для секвенирования генома вновь открытой бактерии? Ответ поясните.

19. Ваш друг попросил вас секвенировать два гена бактерий, один из которых кодирует ДНК-связывающий регуляторный белок, а другой – протеазу, активную в кислой среде. При этом он сказал вам, что одна из бактерий – мезофильный почвенный микроорганизм, а другая – термофил из горячего источника, однако, забыл подписать пробирки с образцами, переданными на секвенирование. У вас получились следующие последовательности:

1...ААТ ГАА АГТ ГАА АТГ ГАТ ТГТ ГЦТ...

2...ГЦГ ЦГГ ГГГ АГГ ГГЦ ГЦЦ ААГ ЦЦГ...

Приведены два фрагмента кодирующих цепей, для удобства разбитые на кодоны.

Переведите последовательности 1 и 2 нуклеотидов в последовательности аминокислот по табл. 4. Ответьте на вопросы:

1. Какая последовательность, вероятно, кодирует ДНК-связывающий белок и почему?

2. Какая последовательность, вероятно, принадлежит термофильной бактерии и почему?

20. Сколько нужно проанализировать клонов из геномной библиотеки, полученной в векторе на основе бактериофага λ , чтобы полностью просеквенировать геном *E. coli* (4×10^6 п. н.)?

21. Ваш научный руководитель посоветовал взять 50 нг вектора размером 10 kb и 15 нг вставки размером 1 kb для клонирования. В каком соотношении по массе следует взять вставку по отношению к вектору?

22. Для трансформации бактерий взяли 100 мкл компетентных клеток и 0,1 нг плазмиды. После инкубации бактерий с плазмидой и проведения теплового шока к клеткам добавили 900 мкл среды LB (от англ. *Lysogeny Broth* – «лизогенный бульон», среда для выращивания бактерий). Через час перед высевом бактерии еще раз развели в 10 раз средой LB и 100 мкл смеси выселили в две чашки. На двух чашках выросло всего 200 колоний. Рассчитайте эффективность трансформации (эффективность трансформации – это количество трансформантов в расчете на 1 мкг ДНК).

23. Вы планируете амплифицировать ген HIS3 дрожжей *S. cerevisiae* с плазмиды, которая его содержит, с последующим клонированием в вектор по сайтам EcoRI и BamHI. Опишите ваши действия.

24. Вы хотите клонировать ген, кодирующий определенную тРНК. Вы имеете образец данной тРНК и плазмиду рBR322 *E. coli*, которая содержит уникальный сайт Sall в гене Tet^R (гене, отвечающем за устойчивость к тетрациклину). В плазмиде также есть ген устойчивости к ампициллину Amp^R. Как вы будете клонировать ген тРНК?

25. Известно, что у *Neurospora crassa* к замедленному росту приводит мутация в актиновом гене. Геном данного организма полностью просеквенирован. Как вы будете клонировать мутантный ген?

26. Вам необходимо получить препарат белка млекопитающего, геном которого не секвенирован, в больших количествах. Известна только аминокислотная последовательность части белка. Вы будете нарабатывать белковый продукт в клетках *E. coli*. Предложите схему эксперимента.

27. Рестриктазы BamHI и PstI разрезают узнаваемые ими последовательности, как показано на рис. 27. При этом на рисунке изображены только те нуклеотиды, которые образуют сайты узнавания.

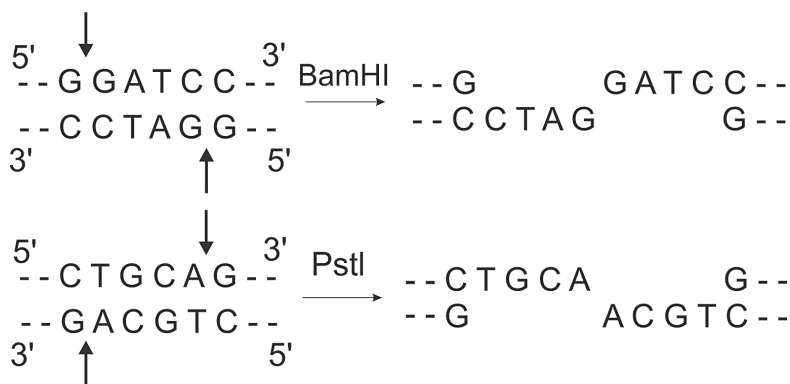


Рис. 27. Расщепление рестриктазами BamHI и PstI узнаваемых ими последовательностей

1. Укажите, где находятся 5'- и 3'-концы разрезаемых молекул ДНК.
2. Как будут модифицироваться эти концы, если инкубировать разрезанные молекулы ДНК с ДНК-полимеразой в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов?
3. Могут ли концы, появившиеся в результате разрезания ферментом BamHI, соединиться вновь при инкубации с ДНК-лигазой фага T4 после того, как была проведена реакция, о которой шла речь в пункте 2? Можно ли соединить вместе концы ДНК, образовавшиеся при обработке PstI? Лигаза ДНК фага T4 соединяет вместе «тупые» концы так же, как и «липкие».

4. Будет ли регенерировать узнаваемый BamHI сайт, о котором шла речь в пункте 3, при соединении концов? Будет ли регенерировать сайт, узнаваемый PstI?

28. Фермент рестрикции Sau3A узнает последовательность –GATC– и расщепляет цепь ДНК на 5'-конце (слева) от G. Одноцепочечные концы, возникающие при расщеплении рестриктазой Sau3A, идентичны концам, возникающим при расщеплении рестриктазой BamHI (рис. 27), что позволяет им соединяться при инкубации с ДНК-лигазой.

1. Какая доля сайтов, узнаваемых BamHI, может быть разрезана рестриктазой Sau3A? Какая доля сайтов, узнаваемых Sau3A, может быть разрезана рестриктазой BamHI?

2. Если два конца, образовавшиеся при расщеплении BamHI, сшиваются вместе, то образующийся сайт может быть снова расщеплен BamHI. То же самое справедливо для двух концов, образующихся при расщеплении Sau3A. Предположите, однако, что вы сшиваете конец, образовавшийся при обработке Sau3A, с концом, образовавшимся при обработке BamHI. Может ли гибридный сайт разрезаться рестриктазой Sau3A, рестриктазой BamHI?

3. Каков будет средний размер фрагментов ДНК, образующихся при обработке хромосомной ДНК рестриктазой Sau3A, рестриктазой BamHI?

29. Вы очистили два фрагмента ДНК, образующиеся при обработке BamHI рекомбинантной плазмидной ДНК. Один фрагмент содержит 400 п. н., другой – 900 п. н. Вы хотите объединить их вместе, как показано на рис. 28, чтобы создать гибридный ген, который в том случае, если ваши ожидания правильны, будет иметь новые удивительные свойства.

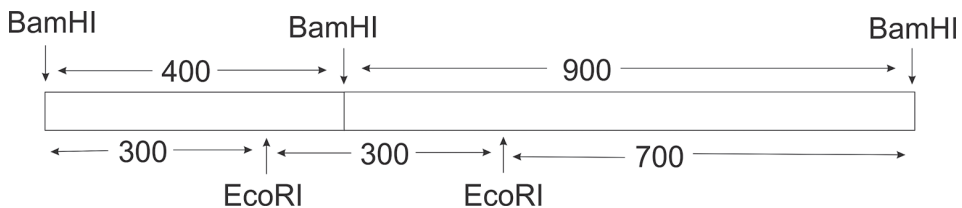


Рис. 28. Окончательная структура гибридного гена

Вы смешиваете два фрагмента в присутствии ДНК-лигазы и инкубируете смесь. Через 30 мин. после начала инкубации и второй раз через 8 ч. вы отбираете пробы и анализируете их методом электрофореза в геле. Вас удивляет, что вместо ожидаемой рекомбинантной молекулы размером 1,3 т. п. н. электрофореграмма содержит сложный набор фрагментов (рис. 29, а). Вы замечаете, что при более длительной инкубации интенсивность полос, соответствующих более

мелким фрагментам, уменьшается, а интенсивность полос, соответствующих более крупным фрагментам, увеличивается. Если вы добавляете к смеси сшиваемых молекул BamHI, то вновь образуются исходные фрагменты (рис. 29, а).

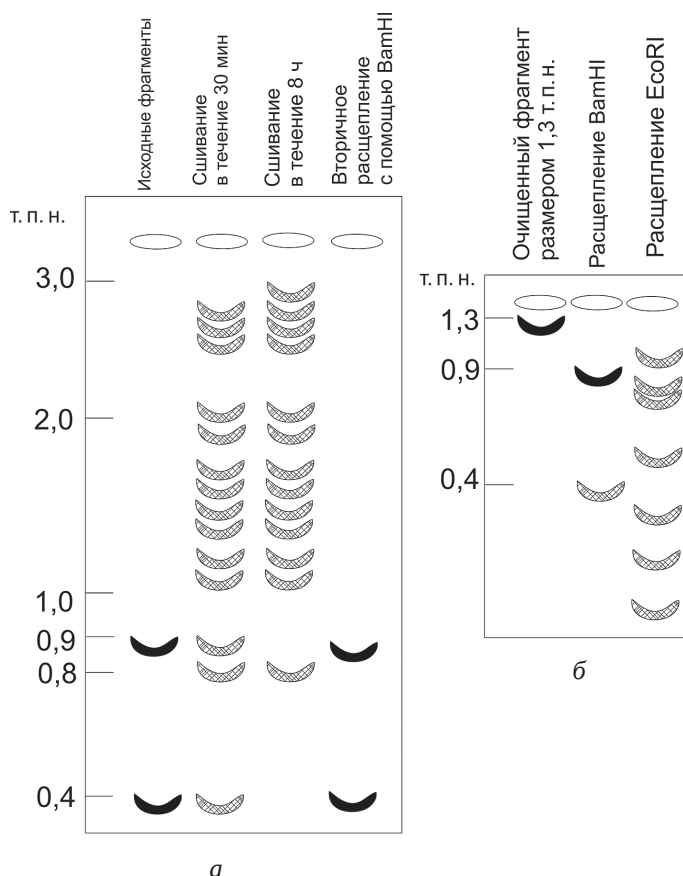


Рис. 29. Сшивание фрагментов очищенной ДНК (а) и диагностическое расщепление очищенного фрагмента длиной 1,3 т. п. н. (б)

Находясь в недоумении, но настойчиво продолжая исследование, вы проводите очистку фрагмента размером 1,3 т. п. н. с помощью гель-электрофореза, контролируя его структуру путем обработки пробы рестриктазой BamHI. Как вы и ожидали, при этом заново появляются две исходные полосы (рис. 29, б). Чтобы убедиться все-таки, что это именно та структура, которую вы хотели получить, вы обрабатываете другую пробу рестриктазой EcoRI. Вы ожидали, что при этом получатся два фрагмента длиной 300 нуклеотидов и один фрагмент размером 700 нуклеотидов. И снова вы удивлены сложностью набора полос в геле (рис. 29, б).

1. Почему исходная смесь соединяющихся фрагментов ДНК дает так много полос в геле?

2. Почему при обработке очищенного фрагмента длиной 1,3 т. п. н. рестриктазой *EcoRI* образуется так много фрагментов?

30. Вы провели клонирование сегмента (4000 п. н.) интересующего вас гена в плазмидном векторе (рис. 30) и теперь хотите получить карту рестрикции этого гена, чтобы перейти затем к другим манипуляциям с ДНК. Ваш руководитель оставил вам инструкции относительно того, как все это нужно сделать, и отправился в отпуск, так что вы можете полагаться только на себя самого.

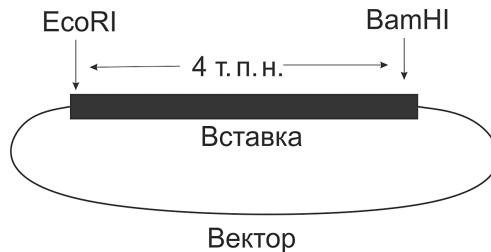


Рис. 30. Рекombинантная плазида, содержащая клонированный сегмент ДНК

Вы следуете его инструкциям, перечисленным ниже.

1. Разрезать плазмиду рестриктазой *EcoRI*.
2. Добавить к концам, образовавшимся после обработки *EcoRI*, радиоактивную метку.
3. Разрезать меченую ДНК рестриктазой *BamHI*.
4. Очистить встроенную ДНК от плазмиды.
5. Обработать меченую ДНК-вставку рестриктазой в течение короткого периода времени так, чтобы каждая меченая молекула была разрезана в среднем один раз.
6. Повторить этап 5, используя разные рестриктазы.
7. Провести электрофорез частично расщепленных ДНК в агарозном геле, причем препараты, обработанные разными рестриктазами, нанести на гель рядом друг с другом.
8. Наложить гель на рентгеновскую пленку, чтобы получился радиоавтографическая картина фрагментов с радиоактивным концом.
9. Нарисовать рестрикционную карту.

Наиболее трудным для вас был этап 5, однако, уменьшая количество фермента и снижая температуру, вам удалось подобрать условия для частичного расщепления. Затем вы смогли полностью выполнить этап 8 и получить радиоавтограмму, представленную на рис. 31.

К сожалению, руководитель не объяснил вам достаточно подробно, как строить карту по данным радиоавтограммы. Он должен вернуться завтра. Постройте, пожалуйста, рестрикционную карту к его возвращению.

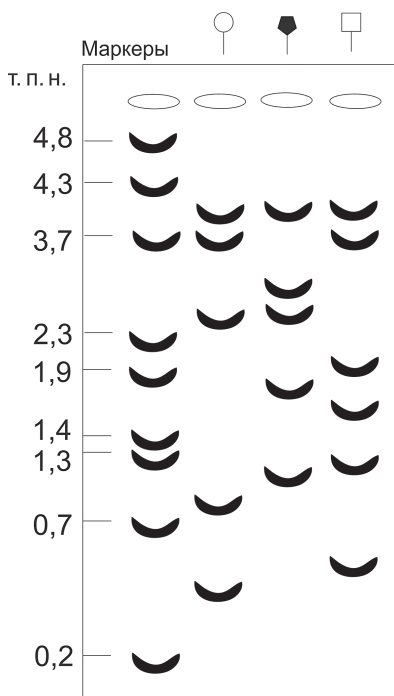


Рис. 31. Радиоавтограмма, показывающая электрофоретическое разделение меченых фрагментов после частичного расщепления тремя рестриктазами, обозначенными разными символами. Числа слева указывают размеры маркерных фрагментов

31. Ваш коллега поделился с вами грандиозным проектом. Он потратил два последних года на очистку белка, представляющего собой сильный модулятор иммунного ответа. Вечером он получил первые 30 аминокислот на аминокислотном анализаторе (рис. 32). Ему нужен ваш совет, как лучше клонировать ген, чтобы добиться высокого уровня его экспрессии в бактериях. Он доказывает, что этот белок благодаря стимулированию иммунной системы мог бы служить отличным средством для лечения простуды. Ваш коллега и название ему уже подобрал – иммустим.

10
20
30
MFYWMIGRST
EDWMPYMKD
FWAKHSLICE

Рис. 32. Первые 30 аминокислот, определенные вашим коллегой с помощью аминокислотного анализатора

Вы откликаетесь на просьбу вашего коллеги, пообещав позвонить через 15 мин., как только переведете аминокислотную последовательность в нуклеотидную. Какие два набора олигонуклеотидов размером по 20 нуклеотидов вы порекомендуете ему в качестве наилучших зондов гибридизации для скрининга библиотеки геномной ДНК?

32. В отсутствие глюкозы *E. coli* может расти на арабинозе (пентоза), используя набор индуцибельных генов, расположенных на хромосоме тремя группами (рис. 33). В одном из таких сайтов гены *araA*, *araB* и *araD* кодируют ферменты, участвующие в метаболизме арабинозы, тогда как ген *araC* кодирует белок-регулятор, связывающийся неподалеку от промотора арабинозных генов и координирующий экспрессию генов, входящих в арабинозный оперон. Две другие группы генов кодируют белки, участвующие в транспорте арабинозы.

Гены, ответственные
за метаболизм и регуляцию арабинозы



Гены, ответственные
за транспорт арабинозы

Рис. 33. Локализация генов метаболизма арабинозы в хромосоме

Для изучения регуляторных свойств белка *araC* вы получаете мутантную бактерию, у которой ген *araC* нокаутирован. Как показано в табл. 6, мутантный штамм при добавлении в среду арабинозы не экспрессирует продукт гена *araA*.

Таблица 6

Реакция мутантных бактерий и бактерий дикого типа на присутствие арабинозы в среде

Генотип	Продукт гена <i>araA</i>	
	В отсутствие арабинозы	В присутствии арабинозы
<i>araC</i> ⁺	1	1000
<i>araC</i> ⁻	1	1

1. Можно ли по данным табл. 6 судить о том, негативную или позитивную регуляцию арабинозного оперона осуществляет белок *araC*?
2. Как выглядели бы цифры в табл. 6, если бы белок осуществлял регуляцию противоположного типа?

33. Клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши 10T1/2 представляет собой весьма стабильную линию, клетки которой проявляют свойства фибробластов. Однако если клетки этой линии инкубировать в течение 24 ч в среде, содержащей 5-азациитидин (5-аза-С), то при высокой плотности культуры они начнут дифференцироваться в клетки хряща, жировые или мышечные клетки. Обработка 5-аза-С снижает общий уровень метилирования ДНК, что способствует активации ранее неактивных генов. Если после обработки клетки растут в условиях низкой плотности культуры, то они вначале сохраняют свои исходные свойства фибробластов, но все же дифференцируются позже, когда проходит много поколений и культура достигает высокой плотности. Клетки 10T1/2, не обработанные 5-аза-С, не дифференцируются, какой бы ни была плотность культуры.

При дифференцировке обработанных клеток около 25 % из них превращаются в мышечные клетки (миобласты). Высокая частота образования миобластов наталкивает вашего руководителя на мысль, что всю трансформацию может запускать единственный главный ген-регулятор, который в норме находится в репрессированном состоянии вследствие метилирования. Чтобы это проверить, руководитель уговаривает вас провести дорогостоящую поисковую работу: проклонировать этот ген. Вы предполагаете, что ген до обработки 5-аза-С находится в выключенном состоянии и включается лишь в индуцированных миобластах. Если это предположение правильное, то среди кДНК-копий с мРНК, синтезируемых после обработки 5-аза-С, должны обнаружиться последовательности, соответствующие этому гену.

Вам необходимо проверить имеющуюся библиотеку кДНК для нормальных миобластов (которые в соответствии с вашим предположением также будут экспрессировать этот ген); используя набор радиоактивных зондов для идентификации искомым клоном кДНК, вы готовите три радиоактивных зонда.

Зонд 1. Вы выделяете РНК из миобластов, индуцированных 5-аза-С, и готовите радиоактивные кДНК-копии.

Зонд 2. Вы гибридизуете радиоактивную кДНК для индуцированных миобластов с РНК из необработанных клеток 10Т1/2 и удаляете все гибриды ДНК-РНК.

Зонд 3. Вы выделяете РНК из нормальных миобластов и готовите радиоактивные меченые кДНК-копии, которые затем гибридизуете с РНК из необработанных клеток 10Т1/2, после чего удаляете гибриды РНК-ДНК.

Первый зонд гибридизуется со многими клонами из библиотеки кДНК, но лишь около 1 % из этих клонов гибридизуется с зондами 2 и 3. Всего вы обнаруживаете четыре различных типа гибридизации (табл. 7).

Таблица 7

Гибридизация кДНК-копий РНК миобластов
с радиоактивными мечеными зондами

Класс	Зонд 1	Зонд 2	Зонд 3
А	+	–	–
В	+	–	+
С	+	+	–
Д	+	+	+

1. Для чего проводилась гибридизация меченой кДНК для двух типов миобластов с РНК из необработанных клеток 10Т1/2? Иными словами, зачем нужны зонды 2 и 3?

2. Какие общие гены вы ожидаете обнаружить в каждом из четырех классов кДНК-клонов (А, В, С и Д в табл. 7)? Какой класс кДНК-клонов вероятнее всего содержит последовательности, соответствующие искомому гипотетическому гену-регулятору?

34. Клетки *E. coli* растут на моносахариде глюкозе быстрее, чем на дисахариде лактозе, по двум причинам: 1) лактоза поглощается медленнее, чем глюкоза; 2) для того, чтобы лактоза использовалась клетками, она должна быть сначала гидролизована β-галактозидазой до глюкозы и галактозы.

Если *E. coli* выращивать на среде, содержащей одновременно глюкозу и лактозу, то кривая роста будет иметь сложную форму (рис. 34). Вначале бактерия растет с большей скоростью, чем в конце периода роста, а между этими двумя фазами роста наблюдается период задержки, когда рост практически останавливается. Определение концентрации глюкозы и лактозы в среде показывает, что после нескольких циклов деления клетки содержание глюкозы резко снижается, а концентрация лактозы остается высокой почти до конца. Хотя концентрация лактозы остается высокой в течение всего эксперимента, однако ген β-галактозидазы, регулируемый как часть *lac*-оперона, индуцируется только через 100 мин.

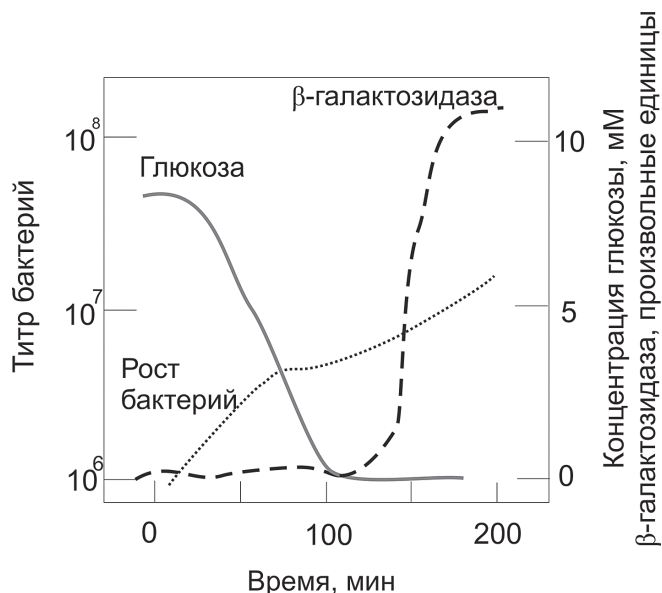


Рис. 34. Рост *E. coli* на среде с глюкозой и лактозой

1. Объясните, почему кривая роста бактерий в этом эксперименте имеет такую форму. Учтите быстрый начальный рост, замедление роста в конце и «остановку» роста в середине опыта.

2. Объясните, почему *lac*-оперон не индуцируется лактозой во время короткой начальной фазы роста бактерий.

35. Вы провели клонирование нескольких неполных последовательностей кДНК, кодирующей фактор транскрипции, в экспрессионном векторе, чтобы определить, будут ли соответствующие этим фрагментам части белка связываться с энхансером, узнаваемым целым фактором транскрипции. Клоны, содержащие неполные последовательности кДНК, укорочены на разные отрезки со стороны 5'-конца гена (рис. 35, а). Вы транскрибируете, а затем транслируете эти клоны кДНК *in vitro* и смешиваете продукты трансляции с высокорadioактивной ДНК, несущей энхансер. При анализе этих смесей методом электрофореза в полиакриламидном геле некоторые из белков, кодируемых клонами кДНК, связываются с фрагментом ДНК, вызывая замедление его движения в геле (рис. 35, б, дорожки 3, 4 и 5). Если перед транскрипцией и трансляцией смешать вместе клоны 3 и 4 кДНК, то в геле появятся три полосы (рис. 35, б, дорожка 6).

1. Почему запаздывающие полосы находятся в геле на разных уровнях?

2. Где в молекуле фактора транскрипции расположен домен, связывающийся с энхансером?

3. Почему при смешивании клонов 3 и 4 кДНК в геле появляются три запаздывающие полосы? Какой вывод о структуре фактора транскрипции можно сделать на основе этих данных?

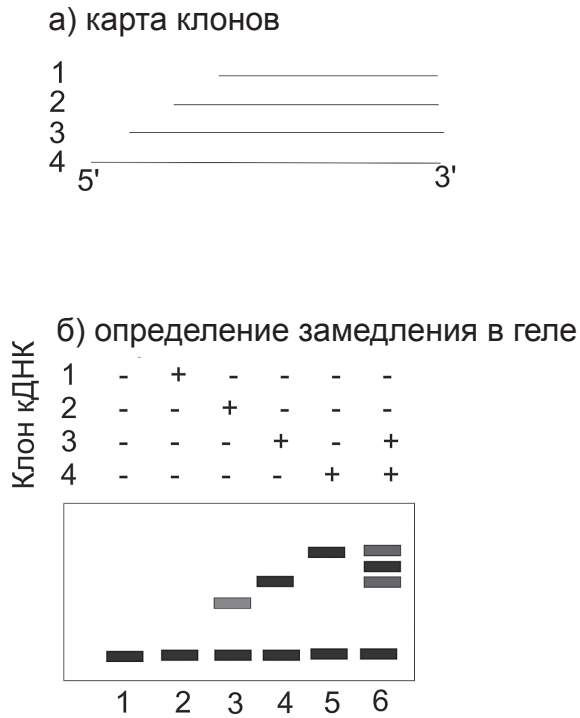


Рис. 35. Структура неполных последовательностей кДНК, кодирующих фактор транскрипции (а), и определение кодируемых ими белков методом торможения в геле (б); радиоактивность полос обусловлена меченой ДНК

ОТВЕТЫ К ЗАДАЧАМ



1. Участок одной цепи ДНК кодирует три различных пептида, так как имеются три разные рамки считывания комплементарной ей мРНК:

5'-ГУАГЦЦУАЦЦАУАГГ-3'.

Во второй рамке считывания первый кодон является стоп-кодоном UAG, однако последующие кодоны могут транслироваться:

Рамка 1 Вал-Ала-Тир-Про-*

Рамка 2 *-Про-Тре-Гис-Арг

Рамка 3 Сер-Лей-Про-Иле

На этой ДНК может синтезироваться и другая мРНК:

5'-ЦЦУАУГГГУАГГЦУАЦ-3'

Рамка 1 Про-Мет-Вал-Гли-*

Рамка 2 Лей-Три-*

Рамка 3 Тир-Гли-Арг-Лей

Надо быть внимательным к тому, чтобы правильно соблюсти полярность цепей, очень легко попасть в ловушку, считая, что комплементарная последовательность первой мРНК есть 5'-ЦАУЦГГАУГГГУАУЦЦ-3', а это неверно, так как цепи ДНК ориентированы в противоположных направлениях.

2. Левая часть более консервативна – экзон, правая более вариабельна – интрон.

3. 1. Кодирующая последовательность для белка *Tetrahymena* необычна в том отношении, что в отличие от других микроорганизмов, у которых УАГ и УАА являются стоп-кодонами, у *Tetrahymena* они определяют аминокислоту глутамин.

2. Белок, образующийся в наименьшем количестве, синтезируется на очищенной мРНК вируса табачной мозаики в результате того, что считывается кодон, обычно служащий стоп-кодоном. Хотя механизм такого редкого события и трудно понять, но можно все же предположить, что оно происходит тогда, когда трансляционная система ретикулоцитов ошибочно встраивает в сайте стоп-кодона аминокислоту, вместо того чтобы закончить синтез. Несколько удивительно то, что второй кодон терминации не встречается на протяжении 506 кодонов.

3. Считая, что УАГ и УАА используются у *Tetrahymena* как кодоны для глутамина, увеличение доли белка вируса табачной мозаики, считываемого от на-

чала до конца, можно объяснить присутствием такой тРНК^{Gln}, у которой антикодон комплементарен нормальному стоп-кодону вируса – УАГ.

Добавление РНК *Tetrahymena* вызывает незначительный сдвиг в количественном соотношении двух белков, потому что в ней содержится некоторое количество активированной тРНК^{Gln}. Цитоплазма вызывает больший сдвиг, потому что она содержит также соответствующую аминоацил-тРНК-синтетазу. Увеличение сдвига при добавлении цитоплазмы указывает на то, что тРНК-синтетазы, присутствующие в лизате ретикулоцитов, не могут снова «нагружать» аминокислотой специальную тРНК *Tetrahymena*. Эти результаты показывают, что по крайней мере два компонента из *Tetrahymena* – специальная тРНК и соответствующая тРНК-синтетаза – должны быть добавлены к лизату ретикулоцитов, чтобы могла идти эффективная трансляция мРНК *Tetrahymena*. Эти компоненты эффективно конкурируют с факторами терминации ретикулоцита, обеспечивая считывание мРНК *Tetrahymena*.

4. Незначительные вариации в генетическом коде были открыты несколько лет назад и в геномах митохондрий, однако, они не столь удивительны, как изменения кода у *Tetrahymena*. В конце концов митохондриальные геномы малы и кодируют сравнительно немного белков, так что не столь трудно представить себе, как могли произойти изменения. Однако геном *Tetrahymena* кодирует тысячи белков. Поразительнее всего то, что этот организм смог пережить предполагаемый переход от стандартного кода к его нынешнему коду.

4. 1. Эдеин – это антибиотик, выделяемый некоторыми штаммами *Bacillus brevis*. Эдеин специфически ингибирует инициацию синтеза белка, препятствуя соединению 40S-субъединицы рибосомы с комплексом 40S-субъединица/мРНК/инициаторная тРНК. Поскольку элонгация при этом не блокируется, то рибосомы, которые уже начали синтез, завершают построение своих индивидуальных полипептидных цепей и покидают мРНК, так что присоединенными к этой нуклеиновой кислоте остаются только малая субъединица рибосомы и инициаторная тРНК.

2. Причина того, что синтез белка прекращается не сразу, а после некоторой задержки, связана с механизмом действия эдеина. Он ингибирует инициацию, не затрагивая реакций элонгации в синтезе белка. Таким образом, ничто не мешает рибосоме, которая только что начала синтезировать новый полипептид, довести синтез до конца. Включение метки продолжается в течение всего периода образования исследуемого белка (в данном случае, глобиновых цепей гемоглобина), т. е. около 1 мин.

3. Если циклогексимид (или любой другой ингибитор элонгации) добавляется одновременно с ингибитором инициации, полирибосомы как бы «замирают». Для того, чтобы полирибосомы повреждались ингибиторами инициации, должно осуществляться продвижение рибосом, а оно блокируется ингибиторами элонгации.

5. Индуцированная экспрессия *lexA* имеет то преимущество, что позволяет быстро вернуться к нормальному состоянию сразу же после окончания повреждающего воздействия. Если опасность для структуры ДНК все еще сохраняется, то *recA* будет оставаться в активированном состоянии и вызывать расщепление всех белков *lexA*. Когда повреждение исправлено, одноцепочечная ДНК исчезает, а белок *recA* инактивируется. В это время активный *lexA* экспрессируется на максимальном уровне, вызывая резкое отключение SOS-ответа. Если бы белок *lexA* всегда экспрессировался с низкой скоростью, выключение SOS-ответа не могло бы происходить так быстро.

6. Масса ДНК *E. coli* – $4 \times 10^6 \times 660 = 2,6 \times 10^9$ г/моль.

Значит, в 3 нг (3×10^{-9} г) содержится: $3 \times 10^{-9} / 2,6 \times 10^9 = 1,2 \times 10^{-18}$ М геномной ДНК или $1,2 \times 10^{-18} \times 6 \times 10^{23} = 7,2 \times 10^5$ молекул.

7. Сайты GATATC, AAATTT являются палиндромами, т. е. одинаковы в направлении $5' \rightarrow 3'$ цепи в обеих цепях ДНК.

8. 5'-TTTTAAAA-3' (один из возможных вариантов).

9. Сайт для эндонуклеазы рестрикции Sau3A в среднем встречается один раз на 256 нуклеотидов $(1/4)^4$, а сайт для BamHI – один раз на 4096 нуклеотидов $(1/4)^6$. Соответственно, размеры фрагментов при полном гидролизе будут приблизительно 256 и 4096 нуклеотидов.

10. В первом случае 1/16, во втором – 100 %.

11. Если у бактериофага λ пять сайтов рестрикции, то один сайт приходится на 9,6 kb ($48/5 = 9,6$). В изучаемом фрагменте ДНК два сайта рестрикции и длина фрагмента составляет 2,4 kb, поэтому на 1,2 kb будет приходиться по одному сайту рестрикции ($2,4/2 = 1,2$). То есть, по сравнению с фагом λ , сайты рестрикции у изучаемого фрагмента ДНК расположены в восемь раз чаще ($9,6/1,2 = 8$), соответственно и ЭР потребуются в восемь раз больше, т. е. восемь единиц.

12. Прежде всего необходимо сделать тупыми концы фрагментов. В первом случае получают 3'-выступающие концы, поэтому нужно взять, например, ДНК-полимеразу фага T4, которая в отсутствие нуклеотидов отрежет одноцепочечный участок, так как имеет высокую $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазную активность. Во втором случае, когда образуется 5'-выступающий одноцепочечный конец, нужно добавить фрагмент Кленова и провести достройку концов в присутствии dNTPs. Далее провести лигирование с помощью лигазы фага T4.

13. Рестриктаза BamI разрезает на две части. Для остальных нет сайтов рестрикции.

5'-ЦТГААТТАГ ГАТЦЦАГГЦААТАГТГТГ-3'
3'-ГАЦТТААТЦЦТАГ ГТЦЦГТТАТЦАЦАЦ-5'

14. Фрагмент № 1

EcoR I

5'-АААГЦТТЦТГ ААТЦЦГАТЦГ-3'
3'-ТТТЦГААГАЦТТА ГГЦТАГЦ-5'

HindIII

5'-АА АГЦТТЦТГААТЦЦГАТЦГ-3'
3'-ТТТЦГА АГАЦТТАГГЦТАГЦ-5'

Фрагмент № 2

HindIII

5'-ГТАЦЦАГАТЦЦТАГГАТА АГЦТТА-3'
3'-ЦАТГАГТЦТАГГАТЦЦТАГТЦГА АТ-5'

Гибриды:

5'-АААГЦТТА-3'
3'-ТТТЦГААТ-5'

5'-ГТАЦЦАГАТЦЦТАГГАТАААГЦТТЦТГААТЦЦГАТЦГ-3'
3'-ЦАТГАГТЦТАГГАТЦЦТАГТЦГААГАЦТТАГГЦТАГЦ-5'

15. Пересеквенировать; затем заменить последовательность дикого типа на мутантную (*gene replacement*) (если это возможно у данного организма), чтобы проверить, действительно ли причиной мутантного фенотипа являются выявленные мутации.

16. Можно просеквенировать ПЦР-продукт, не клонируя отдельные копии продукта, тогда на хроматограмме вы увидите два пика одинаковой интенсивности в тех нуклеотидных позициях, по которым организм гетерозиготен.

17. ВАС-вектор на основе бактериальной искусственной хромосомы способен нести вставки размером до 350 kb, и, таким образом, весь человеческий геном с 15-кратным покрытием может «поместиться» в клонотеке из 300 тысяч таких клонов. Принимая средний размер вставки равным приблизительно 150 kb, получаем:

$$3 \times 10^9 / 150\,000 \times 15 = 300\,000.$$

18. Поскольку у бактерий сравнительно небольшой геном (3 Mb) и нет повторов, подойдет полногеномное секвенирование методом дробовика (*WGS – whole genome shotgun*).

19. 1. Асн Глу Сер Глу Мет Асп Цис Ала

2. Ала Арг Гли Арг Гли Ала Лиз Про

Вторая последовательность кодирует ДНК-связывающий белок, так как она кодирует белок, богатый положительно заряженными аминокислотами – аргинином и лизином, которые хорошо связываются с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК.

Вторая последовательность принадлежит термофильной бактерии, так как в ней преобладают пары ГЦ, которые из-за трех водородных связей имеют более высокую температуру плавления, чем АТ.

20. Необходимо весь геном поделить на величину вставки (для фага λ емкость вектора 15–20 kb) и умножить на 10. Тогда получится:

$$4 \times 10^6 / 20\ 000 \times 10 = 20\ 00 \text{ вставок.}$$

21. При соотношении вставка/вектор = 1/1, на 50 нг вектора размером 10 kb нужно взять 5 нг вставки размером 1 kb. Поскольку руководитель предложил взять 15 нг вставки, то соотношение вставка/вектор = 3/1.

22. Клетки развели в 100 раз, а количество ДНК взяли в 10^4 раз меньше, поэтому эффективность трансформации будет равна:

$$200 \times 100 \times 10^4 = 2 \times 10^8 \text{ кл/мкг ДНК.}$$

23. Сначала необходимо подобрать праймеры к гену HIS3, содержащие на 5'-концах сайты EcoRI и BamHI. Нуклеотидную последовательность гена можно узнать из базы данных дрожжей. Праймеры заказывают в фирме и затем с ними проводят ПЦР, в качестве матрицы используют плазмиду с HIS3. Полученные молекулы двухцепочечной ДНК необходимо обработать ЭР EcoRI и BamHI и почистить на колонках или с помощью гель-электрофореза. Далее необходимо провести рестрикцию вектора по сайтам EcoRI и BamHI и его очистку. Измерив концентрацию фрагмента и вектора (с помощью спектрофотометра), следует подобрать их правильное соотношение для последующего лигирования. Лигазной смесью проводят трансформацию бактерий, а затем отбирают клоны, содержащие плазмиду со встроенным геном HIS3, например, методом ПЦР с колоний с использованием праймеров для клонирования.

24. Первый способ: провести гидролиз геномной ДНК ферментом Sall, очистить фрагменты, поставить лигазную реакцию с вектором, порезанным по Sall. После трансформации реципиентного штамма *E. coli* необходимо отобрать клоны, которые не растут на среде с тетрациклином и растут на среде с ампициллином. Далее требуется провести анализ клонов с помощью гибридизации *in situ* с зондом (зондом будет меченая искомая тРНК).

Второй способ: после расщепления геномной ДНК ЭР Sall нужно разделить фрагменты с помощью гель-электрофореза, после чего провести Саузерн-блот гибридизацию с зондом для идентификации участка, содержащего ген тРНК. Идентифицированный фрагмент затем нужно выделить из геля и провести его очистку, после чего клонировать данный фрагмент в вектор по сайту Sall, далее с помощью гибридизации *in situ* найти искомый клон (количество клонов меньше, чем в первом случае).

25. Поскольку геном данного организма просеквенирован, то можно подобрать праймеры для амплификации мутантного гена с геномной ДНК после амплификации и очистки ПЦР-фрагмента, можно клонировать его по тупым концам (если использовали Pfu-полимеразу) в вектор предварительно порезанный уникальной ЭР, например SmaI.

26. На основе аминокислотной последовательности можно составить зонды для гибридизации; выделить общую мРНК, получить кДНК (гены млекопитающих имеют интроны), клонировать в вектор, с помощью гибридизации с зондом найти клоны с рДНК, после чего секвенировать вставку из плазмидной ДНК данного клона; провести переклонирование гена, кодирующего целевой белок в вектор для экспрессии в клетках *E. coli*, трансформировать клетки бактерий, отобрать трансформантов, засеять их в селективную жидкую среду, после чего индуцировать экспрессию целевого гена, выделить белок и очистить его с помощью хроматографии.

27. 1. 5'- и 3'-концы разрезанных молекул показаны на рис. 36. Последовательности ДНК обычно представляют таким образом, что 5'-конец верхней цепи находится слева.

2. Как показано на рис. 36, концы, образующиеся при обработке BamHI, могут быть достроены ДНК-полимеразой, а концы, образующиеся при обработке PstI, – нет. Это различие объясняется известным свойством ДНК-полимеразы: для ее работы необходимы праймер с 3'-ОН-концом, к которому могут присоединяться дезоксинуклеозидтрифосфаты, и матричная цепь, определяющая, какой нуклеотид должен присоединиться. Эти требования выполняются в случае BamHI-концов, но не в случае концов, образуемых рестриктазой PstI, которая разрезает дальше от 5'-конца, в результате чего фрагменты не достраиваются ДНК-полимеразой, так как 5'-конец не может служить затравкой.

Примечание: обычно в технологии рДНК используется ДНК-полимераза фага T4, чтобы «затупить» концы обоих типов. Концы BamHI будут «затупляться» в результате пришивания к ним соответствующих нуклеотидов, как показано на рис. 36. Однако PstI-концы также будут затупляться благодаря ассоциированной 3' → 5'-экзонуклеазной активности, которая удаляет участок у 3'-конца, оставляя «тупой» конец.

3. Как видно на рис. 36, «затупленные» концы в случае BamHI и немодифицированные концы в случае PstI могут соединяться ДНК-лигазой фага Т4.

4. Соединение обработанных концов приводит к восстановлению PstI-сайта, но не BamHI-сайта. За счет соединения достроенных концов в случае BamHI образуются два новых рестрикционных сайта, как указано на рис. 36. Расщепление, достраивание на концах и соединение концов заново часто приводят к появлению новых рестрикционных сайтов, которые иногда полезны для дальнейших манипуляций с ДНК.

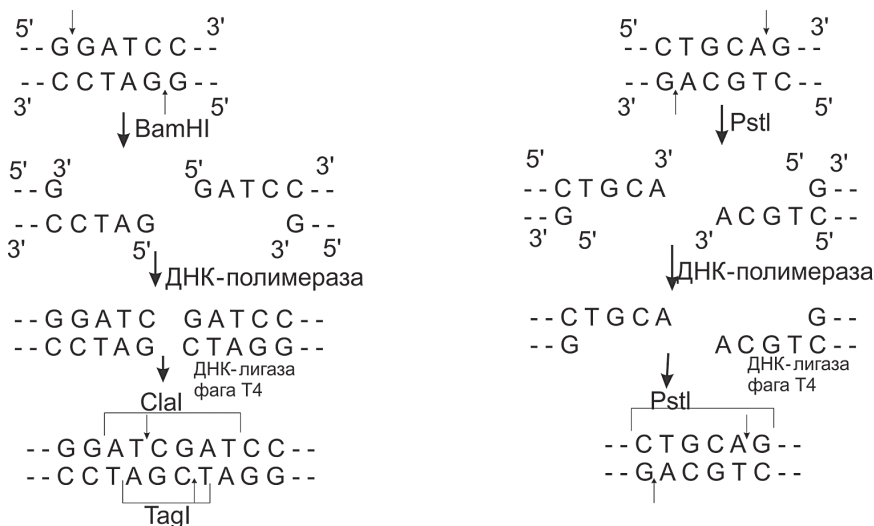


Рис. 36. Расщепление, модификация и сшивание ДНК, содержащей BamHI-сайт или PstI-сайт

28. 1. Четыре центральных нуклеотида в сайте, узнаваемом BamHI, образуют сайт, узнаваемый Sau3A. Поскольку Sau3A узнает только эти четыре нуклеотида, все BamHI-сайты будут разрезаться ферментом Sau3A. Обратного, однако, не может быть, потому что BamHI узнает сайт, состоящий из шести нуклеотидов. Таким образом, BamHI будет разрезать только часть сайтов, узнаваемых Sau3A, у которых есть соответствующие соседние нуклеотиды (т. е. 5'G и 3'C). Поскольку в среднем один из четырех соседних нуклеотидов на каждой стороне окажется правильным, то лишь одно из 16 возможных расположений двух пограничных нуклеотидов будет подходящим для того, чтобы сайт расщеплялся BamHI. Таким образом, только 1 из 16 сайтов, узнаваемых Sau3A, будет разрезаться BamHI.

2. Поскольку для Sau3A, как уже было отмечено, не имеют значения пограничные нуклеотиды, все гибридные сайты Sau3A/BamHI могут разрезаться с помощью Sau3A. Однако с помощью BamHI будет разрезаться в среднем только

один из четырех гибридных сайтов. В гибридном сайте пять из шести нуклеотидов будут соответствовать BamHI-сайту; шестой нуклеотид окажется правильным примерно в одном из четырех гибридных сайтов.

3. Вероятность того, что любая четырехнуклеотидная последовательность окажется Sau3A-сайтом, равна $(1/4)^4$, или 1 из 256, в выбранной случайным образом последовательности ДНК, где все четыре нуклеотида встречаются с одинаковой частотой. Таким образом, сайт, узнаваемый Sau3A, будет встречаться в среднем один раз на 256 п. н. в цепи ДНК. Сайт, узнаваемый BamHI и состоящий из шести нуклеотидных пар, будет встречаться один раз на 4096 п. н. $((1/4)^6 = 4096)$ в случайной последовательности ДНК.

29. 1. Сложность набора фрагментов после сшивания объясняется тем, что соединяться могут любые два BamHI-конца. Таким образом, при соединении фрагментов длиной 0,4 т. п. н. может создаваться целый набор фрагментов с размерами 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 т. п. н. и т. д. Подобно этому, фрагменты длиной 0,9 т. п. н. будут соединяться с образованием набора следующих фрагментов: 1,8; 2,7; 3,6 т. п. н. и др. И наконец, комбинации двух фрагментов дадут третий набор фрагментов с размерами 1,3; 1,7; 2,1; 2,2 т. п. н. и т. д. Наблюдаемая картина распределения часто еще более сложна, так как эти фрагменты при соединении их концов могут образовывать кольцевые структуры.

2. Поскольку два любых BamHI-конца способны соединяться между собой, то могут возникнуть одинаковые по размеру, но различающиеся по структуре фрагменты, как показано на рис. 37 для фрагмента размером 1,3 т. п. н. Обработка популяции фрагментов размером 1,3 т. п. н. рестриктазой EcoRI приводит к образованию разнообразных фрагментов с размерами от 0,1 т. п. н. (см. левые концы структур 3 и 4, рис. 37) до 1,0 т. п. н. (см. внутренние фрагменты структуры 4, рис. 37).

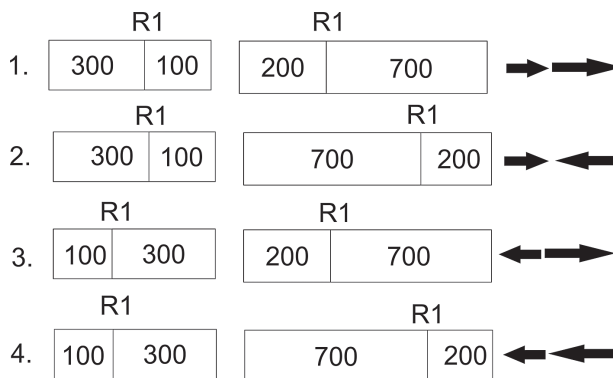


Рис. 37. Различные положения фрагментов 0,4 и 0,9 т. п. н., полученных путем обработки BamHI, при образовании фрагмента 1,3 т. п. н.

30. Принцип, на котором основан метод построения рестрикционных карт, очень похож на тот, который используется при химическом секвенировании ДНК. В обоих случаях молекулы метят на одном конце, затем частично фрагментируют с помощью неполного расщепления в нескольких специфических сайтах и, наконец, распределяют фрагменты по размерам. Длина меченого фрагмента указывает на расстояние от меченого конца до сайта, по которому произошло расщепление.

Рестрикционная карта, полученная на основе радиоавтограммы, изображенной на рис. 31, представлена на рис. 38, где она сопоставляется с продуктами неполного расщепления, производимого одной рестриктазой (см. пунктирные линии). Размеры рестриктоов оценивают путем сравнения с набором маркерных фрагментов на рис. 38. Из рисунка видно, что расстояние, на которое мигрируют эти фрагменты при электрофорезе, связано с их размерами нелинейно, чем могут объясняться различия между вашими оценками и оценками, представленными на рис. 38.

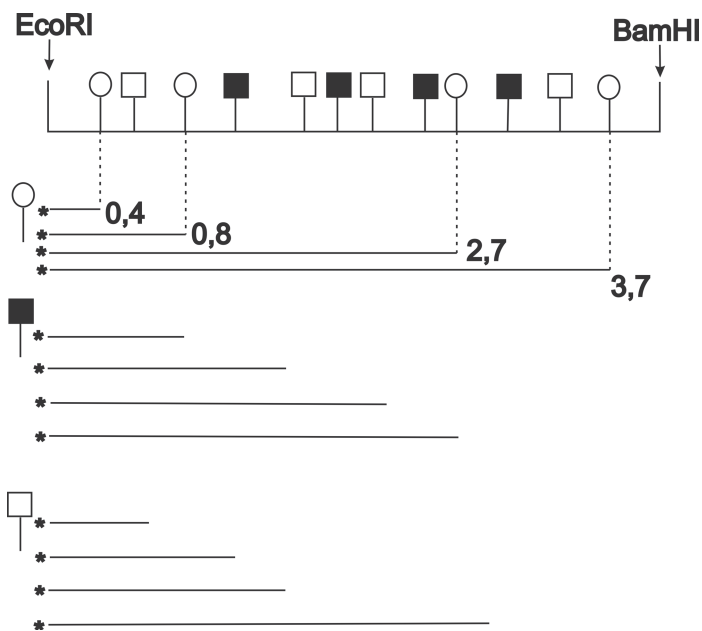


Рис. 38. Карта рестрикции клонированного вами сегмента ДНК и продукты частичного расщепления, по которым она составлена. Числа рядом с фрагментами означают их длину

31. На рис. 39 показаны два участка полученного вашим коллегой белка, характеризующиеся наименьшей многозначностью, и соответствующие этим участкам олигонуклеотидные зонды. Кодоны приведены под последовательностью аминокислот в форме РНК, чтобы легче было перейти к генетическому

так и в миобластах. Подобная гибридизация с зондами, лишенными определенных последовательностей (безбалластная гибридизация), делает зонд более специфичным и позволяет исключить из анализа большой класс клонов кДНК, которые, как вы предполагаете, не содержат искомого гена.

2. Клоны класса А содержат кДНК, соответствующие видам РНК, общим для трех типов клеток: 10Т1/2, индуцированных и нормальных миобластов. В этом классе содержатся все обычно присутствующие в клетках гены «домашнего хозяйства». Это и есть тот класс клонов, который должен быть удален в результате безбалластной гибридизации. Поскольку зонды 2 и 3 гибридизуются лишь с 1 % клонов кДНК, выявляемых зондом 1, РНК, соответствующие генам «домашнего хозяйства», должны составлять большую часть всех видов мРНК, присутствующих в клетках.

Клоны класса В содержат молекулы кДНК, соответствующие тем молекулам РНК, которые были индуцированы обработкой 5-аза-С, но отсутствуют в нормальных миобластах и в клетках 10Т1/2. Поскольку 5-аза-С приводит к деметилированию, то неудивительно, что это вещество активирует некоторые гены, которые в норме в миобластах не экспрессируются.

Клоны класса С содержат кДНК, соответствующую той РНК, которая присутствует в нормальных миобластах, но отсутствует в миобластах, обработанных 5-аза-С. Если бы индуцированные миобласты были идентичны нормальным миобластам, такого класса клонов просто не существовало бы. Можно было бы подозревать в индуцированных миобластах какой-то изъян, однако, по-видимому, все дело в популяции нормальных миобластов. Последняя содержит небольшую фракцию полностью дифференцированных миотрубочек, которые отсутствуют в популяции индуцированных миобластов. Таким образом, РНК, выделенная из популяции нормальных миобластов, включает и РНК клеток более дифференцированных типов. При анализе было обнаружено, что клоны класса С кодируют продукты генов, специфичные для мышц, такие, как тропонин I, а также тяжелая и легкая цепи миозина.

В клонах класса D содержится кДНК, соответствующая РНК, специфичной для миобластов. Именно в этих клонах вы надеетесь обнаружить ген-регулятор, контролирующей дифференцировку миобластов.

Реально ген, контролирующей, по-видимому, дифференцировку миобластов, был обнаружен как раз в клонах этого класса. Он был идентифицирован с помощью тестов, основанных на следующих предположениях:

- 1) ген-регулятор не должен экспрессироваться вообще в клетках 10Т1/2;
- 2) его экспрессия должна достигать максимума в миобластах;
- 3) его экспрессия должна снижаться в миотрубочках;
- 4) он не должен экспрессироваться в таких клетках 10Т1/2, которые не дифференцируются после обработки 5-аза-С.

На последней стадии этих экспериментов клонированная кДНК была введена в клетки 10Т1/2 и заставила эти клетки дифференцироваться в миобласты.

34. 1. Быстрый рост бактерий в начале эксперимента происходит в результате метаболизма глюкозы, а замедленный рост в конце – вследствие метаболизма лактозы. Бактерии переставали расти в середине эксперимента, поскольку они уже исчерпали всю глюкозу, но у них еще не было ферментов, необходимых для метаболизма лактозы. Перед тем как они смогут использовать лактозу, содержащуюся в среде, в них должна произойти индукция *lac*-оперона. Задержка роста приходится как раз на то время, когда происходит индукция.

2. Для индукции лактозного оперона необходимы два условия: в среде должна содержаться лактоза, а глюкозы быть не должно. В первой части эксперимента в среде присутствуют и глюкоза, и лактоза, следовательно, это требование не выполняется. Лишь когда вся глюкоза оказывается израсходованной, создаются условия, необходимые для индукции.

В индукции участвуют CAP и репрессор лактозного оперона (рис. 40). Для включения оперона CAP должен связаться с ним, а репрессор лактозного оперона должен отделиться. Присутствие лактозы в среде способствует повышению внутриклеточной концентрации аллолактозы, которая связывается с лактозным репрессором, вследствие чего происходит снижение его сродства к соответствующему сайту связывания и в результате – отсоединение от ДНК. С удалением лактозного репрессора удовлетворяется одно условие индукции. Второе условие связано с концентрацией глюкозы. При снижении концентрации глюкозы внутриклеточный уровень cAMP повышается; cAMP связывается с CAP и изменяет его конформацию таким образом, что тот становится способным взаимодействовать со своим сайтом связывания. Когда CAP присоединен (а репрессор лактозного оперона отсутствует), РНК-полимераза может связаться с промотором и начать транскрипцию.

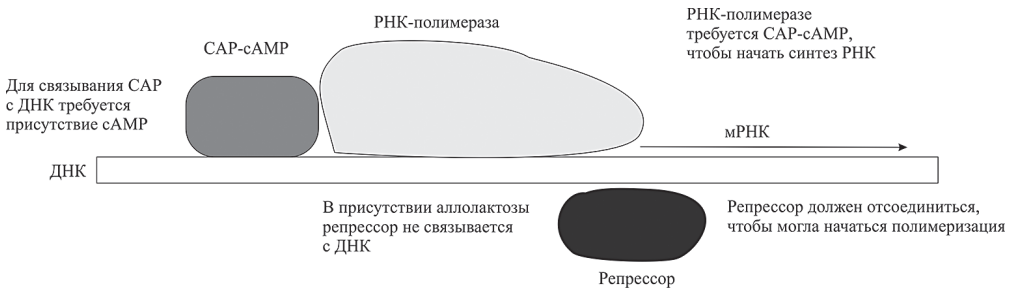


Рис. 40. Индукция *lac*-оперона

35. 1. Запаздывающие полосы расположены в полиакриламидном геле на разных уровнях потому, что кодируемые кДНК белки имеют разные размеры. Поскольку подвижность комплекса ДНК-белок зависит от суммарной молекулярной массы, то самый короткий из связывающихся белков (кодируемый клоном 2 кДНК) замедляет миграцию фрагмента ДНК в наименьшей степени, а

самый длинный из связывающихся белков (кодируемый клоном 4 кДНК) – в наибольшей.

2. Поскольку продукты клонов 2, 3 и 4 кДНК тормозят движение в геле, они должны кодировать домен связывания с энхансером. Слабое связывание белка, кодируемого кДНК из клона 2, показывает, что в последовательности мРНК отсутствует некоторая часть, необходимая для того, чтобы белок нормально связывался. Белок, кодируемый кДНК клона 1, совсем не связывается с энхансером, следовательно, в этом клоне не закодирован весь связывающий домен. Таким образом, весьма важная часть связывающего домена должна располагаться между 5'-концами клонов 1 и 2 кДНК. Эти опыты не позволяют определить, какова протяженность этого домена в направлении 3'-конца. 3'-конец связывающего домена можно определить точнее, если использовать набор делеций, которые затрагивают разные по длине участки со стороны 3'-конца при том, что 5'-конец остается интактным.

3. Присутствие трех по-разному запаздывающих в геле полос, выявляемых при анализе смеси продуктов трансляции клонов 3 и 4 кДНК, указывает на взаимодействие данных белков. Появление одной новой полосы говорит о том, что в норме фактор транскрипции, связывающийся с энхансером, имеет форму димера.

Новые полосы появляются потому, что одна молекула, синтезируемая на кДНК клона 3, взаимодействует с одной молекулой, синтезируемой на кДНК клона 4, причем образуемый ими димер имеет промежуточную молекулярную массу по сравнению с димерами, состоящими из идентичных субъединиц. Промежуточная молекулярная масса определяет и то промежуточное положение, которое эта полоса занимает в геле.

СЛОВАРЬ ОСНОВНЫХ ТЕРМИНОВ



Адаптор – синтетический двухцепочечный олигонуклеотид с одним «тупым» концом, который пришивают к ДНК-мишени, и одним «липким» концом, который используют для встраивания ДНК-мишени в вектор.

Антиген – структурно чужеродное для данного конкретного организма вещество, способное вызывать иммунный ответ.

Антисмысловая РНК – РНК-последовательность, комплементарная какому-то участку или всей молекуле специфической мРНК.

Антисмысловая цепь – одна из цепей в двухцепочечной молекуле ДНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна таковой у соответствующей мРНК.

Антитела (специфические иммуноглобулины) – белки сыворотки крови, продуцируемые плазматитами в ответ на введение антигена; характерная особенность антител – строгая специфичность по отношению к введенному в организм антигену.

Аффинность – сила связывания (степень сродства) между отдельными участками взаимодействующих молекул.

Бактериофаг – вирус, инфицирующий бактерии.

Бакуловирусы – семейство вирусов *Baculoviridae*, патогенных для насекомых (чешуекрылых, двукрылых, перепончатокрылых), безвредных для млекопитающих, птиц, рыб. Используются в качестве избирательно действующих вирусных инсектицидов, а также молекулярных векторов для введения и экспрессии чужеродных генов в организме насекомых и культурах клеток насекомых.

Барназа – рибонуклеаза *Bacillus amyloliquefaciens*, образует прочный комплекс с ингибитором барстаром.

Библиотека кДНК – коллекция клонов кДНК, синтезируемых *in vitro* на матрицах мРНК, происходящих из одной ткани или клеточной популяции.

Бинарная векторная система – двухплазмидная система *Agrobacterium*, состоящая из двух плазмид, предназначенная для переноса участка Т-ДНК с клонированным геном, в растительные клетки. Т-ДНК находится на одной плазмиде, а гены вирулентности – на другой. Используется для получения трансгенных растений.

Биологическая баллистика – метод введения чужеродной ДНК в клетки-мишени (растительные и животные), основанный на их «обстреле» золотыми или вольфрамовыми частицами с осажденной на них ДНК.

Блоттинг – перенос разделенных молекул из одной среды (геля) на твердый носитель (обычно нитроцеллюлозный фильтр).

Вакцина – препарат, лишенный патогенных свойств возбудителя того или иного инфекционного заболевания (аттенуированный), но сохраняющий иммуногенные свойства, обеспечивающие развитие иммунного ответа; применяется для профилактики инфекционного заболевания.

Варибельные домены антител – участки полипептидных цепей антител, отвечающие за их антигенную специфичность.

Вектор – самореплицирующаяся молекула ДНК (например, бактериальная плаزمид), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

Вирион – вирусная частица.

Вирус-помощник – вирулентный штамм вируса, в присутствии которого дефектный вирус может размножиться в клетке-хозяине.

Генная иммунизация – индукция у организма иммунного ответа без введения антигена путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.

Генная терапия *ex vivo* – введение гена (генов) в изолированные клетки больного. После культивирования и трансформации клетки вводят в организм больного с помощью трансфузии, инфузии или инъекции. Эта процедура позволяет устранить генетические дефекты.

Генная терапия *in vivo* – введение гена (генов) непосредственно в ткань или орган с целью устранения генетического нарушения.

Геномная библиотека, банк (библиотека) генов – набор клонированных фрагментов ДНК, в совокупности составляющих индивидуальный (групповой, видовой) геном.

Ген-репортер – ген, кодирующий легко выявляемый продукт, используемый для выявления клеток, в которые был введен этот ген.

Гибридизация ДНК – спаривание двух молекул ДНК (ДНК-мишени и ДНК-зонда) за счет водородных связей между комплементарными нуклеотидами, которое используется для выявления специфических нуклеотидных последовательностей в молекуле ДНК (мишени).

Гибридный (химерный) белок – продукт клонированных совместно двух или более кодирующих последовательностей разных генов, представляющий собой одну полипептидную цепь.

Гибридный ген – ген, состоящий из двух или нескольких генов и экспрессирующийся с образованием одного гибридного (химерного) белка.

Гибридома – гибридная клеточная линия, полученная путем соматической гибридизации (слияния) антителообразующих клеток (лимфоцитов) и злокачественных миеломных клеток, которая способна к неограниченному росту *in vitro* и синтезу моноклональных антител.

Двойной кроссинговер – кроссинговер, происходящий одновременно в двух точках пары гомологичных хромосом.

ДНК-зонд – фрагмент ДНК, меченый тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком в молекуле ДНК; позволяет идентифицировать комплементарные ему нуклеотидные последовательности.

ДНК-лигаза – фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК.

ДНК-полимераза – фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки (праймера) со свободной 3'-гидроксильной группой.

Емкость вектора – максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в данном векторе.

Иммунологический скрининг – скрининг геномной библиотеки, основанный на выявлении белкового продукта целевого гена с помощью иммунологических методов.

Иммунотоксин – химерный белок, состоящий из двух доменов, один из которых обладает свойствами антитела, а другой – токсина; предназначен для целевой доставки токсина к молекуле или клетке-мишени (с рецептором к антителу на поверхности). Используется для инактивации молекулы-мишени или уничтожения клетки-мишени (например, опухолевой).

Инсерция – тип генной или точечной мутации, представляющий собой вставку нуклеотида.

Интеграция – встраивание чужеродной ДНК в хромосому хозяйской клетки.

Интегрирующий вектор – вектор, предназначенный для встраивания (интеграции) клонированной ДНК в геном клетки-хозяина.

Интерференция РНК – феномен, ведущий к посттрансляционному молчанию генов, который заключается в расщеплении введенной двухцепочечной РНК на фрагменты, действующие как матрица для разрушения гомологичных последовательностей РНК.

Искусственная бактериальная хромосома – векторная система на основе F-плазмиды *E. coli*, используемая для клонирования длинных (100–300 т. п. н.) последовательностей.

Искусственная дрожжевая хромосома – рДНК, состоящая из дрожжевой плазмиды и интегрированных в нее центромерных и теломерных областей хромосом дрожжей и маркерных генов и содержащая несколько сайтов инициации репликации.

Капсид – белковая оболочка вирусной частицы.

Килобаза (кб; kilobase, kb) – единица измерения, используемая для выражения длины нуклеиновых кислот. 1 кб = 1000 нуклеотидов в РНК и одноцепочечной ДНК или пар нуклеотидов (п. н.) в двухцепочечной ДНК.

Клеточная линия – группа клеток, поддерживаемая в культуре путем пересевов.

Клонирующий вектор (вектор для клонирования) – плазмидная или вирусная ДНК, предназначенная для клонирования ДНК-мишени (увеличения числа копий генов) в хозяйской клетке.

Комплементарная ДНК, кДНК – молекула ДНК, синтезированная на РНК-матрице с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы.

Конъюгация – однонаправленный перенос ДНК из одной бактериальной клетки в другую при их контакте.

Лигирование – соединение двух молекул ДНК с помощью фосфодиэфирных связей; в условиях *in vitro* этот процесс катализирует ДНК-лигаза фага Т4.

Линкер – синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. Используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания «тупых» концов присоединены линкеры.

Лимфоциты – округлые клетки со слабо развитой цитоплазмой; основные клеточные участники специфического иммунного ответа. Лимфоциты В (В-клетки) – клеточные элементы В-системы иммунитета, осуществляющей гуморальную форму иммунного ответа; основной их признак – наличие поверхностного антигенраспознающего иммуноглобулинового рецептора (sIg); при антигенной активации В-клетки дифференцируются в плазматциты, продуцирующие антитела той специфичности, которой обладал антигенраспознающий рецептор. Лимфоциты Т (Т-клетки) – один из классов лимфоцитов, в становлении которого ведущая роль принадлежит тимусу; главные участники Т-системы иммунитета, осуществляющей клеточную форму иммунной защиты; основной их признак – наличие Т-клеточного антигенраспознающего гетеродимерного рецептора (TCR), ассоциированного с однодоменными СЗ-белками.

«Липкие» концы – взаимно комплементарные одноцепочечные участки ДНК, образующиеся в результате «разрезания» двухцепочечных молекул ДНК рестрицирующими эндонуклеазами (рестриктазами).

Липосомы – однослойные или многослойные везикулы (пузырьки) с внутренней полостью, ограниченные двуслойной липидной мембраной.

Макрофаги – большие мононуклеарные клетки, широко представлены в тканях организма; производные костномозговых предшественников; играют критическую роль в развитии иммунитета; в неспецифическом врожденном иммунитете выполняют роль фагоцитирующих клеток с киллерной активностью, а также основных участников воспалительной реакции. Активированные макрофаги способны уничтожать некоторые формы опухолевых клеток; в специфическом адаптивном иммунитете выполняют роль антигенпрезентирующих клеток и продуцируют группу цитокинов – эндогенных регуляторов иммунного ответа.

Малые интерферирующие РНК – фрагменты, образующиеся после «разрезания» длинных двухцепочечных РНК белком Dicer (рибонуклеаза); связываются с белковым комплексом RISC, осуществляющим «разрезание» комплементарных одноцепочечных РНК в месте узнавания, что исключает трансляцию этих РНК.

Маркерные гены – гены с известной хромосомной локализацией, имеющие четкие фенотипические проявления (устойчивость к антибиотику, ферментативная активность); используются для выявления клеток, несущих генетический вектор.

Метод фагового дисплея – один из методов белковой инженерии, суть которого заключается в том, что в составе химерных (гибридных) оболочечных белков нитевидных фагов экспрессируются целевые аминокислотные последовательности, находящиеся на поверхности фаговых частиц после их сборки. Гены со встройками, кодирующими целевые пептиды, находятся внутри таких вирионов в составе упакованного фагового генома, то есть химерный белок и кодирующий его ген физически сцеплены. Гибридные вирионы могут быть селектированы путем аффинного связывания представленных на их поверхности чужеродных аминокислотных последовательностей с какими-либо макромолекулами. Таким образом интересующий исследователя вариант фага можно выделить и размножить для дальнейшего изучения. Для поиска методом фагового дисплея специфичных антител, взаимодействующих с целевыми антигенами, создают библиотеки антител (Fab-фрагментов), представленных на поверхности фаговых частиц. Отобранные методом фагового дисплея гены Fab-фрагментов используются для реконструкции кодирующей последовательности молекулы иммуноглобулина.

Микроинъекция – введение в изолированную эукариотическую клетку ДНК с помощью тонкой иглы.

Моноклональные антитела – антитела, продуцируемые одним клоном В-клеток и обладающие специфичностью к конкретному эпитопу, взаимодействие с которым характеризуется высокой аффинностью.

Наноантитела – неканонические антитела из крови представителей семейства верблюдовых, молекула которых состоит из димера одной укороченной (без константного СН1-домена) тяжелой цепи.

Наночастицы – объекты или устройства, размеры которых, по крайней мере, в двух измерениях лежат на наномасштабе (как правило, менее 10 нм), и которые обнаруживают новые свойства, физические, химические или биологические, либо изменяют свойства макроматериалов вследствие своего размера.

Обратная транскриптаза – РНК-зависимая ДНК-полимераза, катализирующая синтез комплементарной цепи ДНК по матрице РНК.

Онкоген – ген, экспрессия которого приводит к неконтролируемой пролиферации (трансформации) клеток.

Отжиг – процесс образования двухцепочечных молекул (ДНК–ДНК или ДНК–РНК) из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

Пакующая клеточная линия – клеточная линия, созданная для продуцирования вирусных частиц, не содержащих инфекционной нуклеиновой кислоты.

Палиндром – участок двухцепочечной ДНК, обе цепи которого имеют одинаковую нуклеотидную последовательность при прочтении в направлении 5' → 3'; распознается определенной рестриктазой.

Пептидная вакцина – аминокислотная последовательность, индуцирующая образование антител в специфичному инфекционному агенту.

Поливалентная вакцина – вакцина, дающая иммунный ответ на несколько инфекционных агентов или на разные эпитопы одной молекулы.

Плазида – внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации; обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК длиной 1–200 тысяч пар нуклеотидов.

Полимеразная цепная реакция, ПЦР – метод амплификации специфического сегмента ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы с использованием олигонуклеотидных ДНК-зондов, комплементарных последовательностям противоположных цепей ДНК, фланкирующим амплифицируемый сегмент. Процесс состоит из серии циклически повторяющихся реакций: денатурации ДНК, отжига зондов, синтеза ДНК.

Промотор – участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов.

Рекомбинантная ДНК, рДНК – молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде в природе не существующих, фрагментов ДНК.

Рекомбинантный белок – белок, кодируемый клонированной рДНК.

Рестрицирующие эндонуклеазы (рестриктазы) – бактериальные ферменты, расщепляющие двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах или на некотором расстоянии от них.

Ретровирусы – группа РНК-содержащих вирусов, имеющих в своем составе обратную транскриптазу; синтезированная на РНК-матрице двухцепочечная ДНК может встраиваться в хромосому инфицированной этим вирусом клетки.

Сайт встраивания (клонирования) – специфический участок молекулы вектора, в который встраивают чужеродную ДНК; обычно представляет собой уникальный сайт рестрикции.

Сайт рестрикции – нуклеотидная последовательность (обычно короткая палиндромная последовательность) в молекуле ДНК, узнаваемая определенной рестриктазой.

Сайт-специфический (олигонуклеотид-направленный) мутагенез – внесение мутации в определенный сайт клонированной нуклеотидной последовательности в условиях *in vitro*, направленное на получение белков с заданными свойствами.

Серотип – антигенная характеристика клетки, установленная на основании анализа ее связывания с антителами.

Субъединичная вакцина – вакцина, содержащая отдельные компоненты патогенного организма.

Трансген – ген, интегрированный в геном реципиента.

Трансдукция – перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую с помощью бактериофага.

Транспозиция – перемещение мобильного генетического элемента из одного локуса в другой.

Транспозоны – мобильные генетические элементы, несущие структурные гены, которые обуславливают функции, не связанные с процессом перемещения (например, гены устойчивости к антибиотикам).

Трансфекция – искусственное введение в эукариотические клетки изолированных молекул ДНК.

Трансформация – перенос генетической информации в бактериальные клетки с участием плазмид или без них, но всегда – без участия вирусов; часто приводит к изменению фенотипа реципиентной клетки.

«Тупой» конец – конец двухцепочечной молекулы ДНК, образующийся после ее «разрезания» рестриктазой, у которого не выступает ни одна из цепей.

Фагмидные векторы – молекулярные векторы, полученные путем совмещения генетических элементов плазмид и нитевидных фагов в составе одной молекулы ДНК.

Фотодинамическая терапия – метод лечения опухолевых заболеваний, основанный на облучении опухолей красным светом в присутствии фотосенсибилизаторов (главным образом, производных гематопорфирина) и генерировании синглетного молекулярного кислорода, повреждающего раковые клетки и сосуды опухоли.

Цитокины – группа гистогормонов (тканевых гормонов или локальных химических медиаторов), т. е. соединений, вырабатываемых неэндокринными клетками, распространяющихся путем диффузии в межклеточном пространстве и оказывающих в основном местное действие на соседние клетки-мишени и на саму клетку-продуцент. Представляют собой низкомолекулярные белки, формирующие сеть коммуникационных сигналов между клетками иммунной системы и других органов и тканей.

Челночный вектор – плазмидный вектор, способный реплицироваться в клетках двух разных типов (например, в бактериальной и дрожжевой).

Экспрессирующий вектор (вектор для экспрессии) – плазмидный вектор, предназначенный для экспрессии клонированного гена в течение определенного времени в определенной фазе клеточного цикла хозяйской клетки; несет «сильный» регулируемый промотор.

Экспрессия – транскрипция и трансляция гена.

Электропорация – метод введения чужеродной ДНК в клетку-реципиент, основанный на воздействии электрического тока и образовании пор в плазматической мембране клетки.

Эмбриональные стволовые клетки – клетки эмбрионов на стадии бластоцисты, способные к дифференцировке в любые типы клеток при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты.

Эндонуклеаза рестрикции – фермент, катализирующий гидролиз (расщепление) фосфодиэфирных связей в молекулах нуклеиновых кислот.

Эписомы – генетические факторы, способные к самостоятельному размножению в цитоплазме; кольцевые двухцепочечные ДНК. Возможность обратимого включения в хромосому отличает их от других плазмид. К ним относят некоторые половые факторы, умеренные бактериофаги.

Эпитоп (антигенная детерминанта) – участок антигена, распознаваемый антителами.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК



1. Белки-аргонавты и механизмы РНК-интерференции у эукариот и прокариот / А. В. Олина [и др.] // Биохимия. – 2018. – Т. 83, вып. 5. – С. 645–661.
2. Брагина М. К. Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований / М. К. Брагина, Д. А. Афонников, Е. А. Салина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23, № 1. – С. 38–48.
3. Бурлаковский М. С. Растения – продуценты рекомбинантных цитокинов / М. С. Бурлаковский, В. В. Емельянов, Л. А. Лутова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, № 2. – С. 149–167.
4. Васильев Г. В. Геномика / Г. В. Васильев // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 158–165.
5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
6. ГМО – скрытая угроза России. Материалы к докладу Президенту Российской Федерации. – М., 2004.
7. Дейнеко Е. В. Генетическая инженерия растений / Е. В. Дейнеко // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 125–137.
8. Дейнеко Е. В. Растительные системы экспрессии в качестве продуцентов рекомбинантных фармацевтически ценных белков / Е. В. Дейнеко, А. А. Загорская // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21, № 8. – С. 979–985.
9. Журавлева Г. А. Генная инженерия в биотехнологии / Г. А. Журавлева [и др.]. – СПб. : Эко-Вектор, 2016. – 328 с.
10. Журавлева Г. А. Генная инженерия в биотехнологии (семинары) : учеб. пособие / Г. А. Журавлева [и др.]. – СПб. : Эко-Вектор, 2017. – 135 с.
11. Кособокова Е. Н. Вспомогательные домены в рекомбинантных белках / Е. Н. Кособокова, К. А. Скрыпник, В. С. Косоруков // Биохимия. – 2016. – Т. 81, вып. 3. – С. 299–314.
12. Кузнецов И. А. Технология и риски генной инженерии в растениеводстве / И. А. Кузнецов // Вестник Российской академии наук. – 2015. – Т. 85, № 4. – С. 329–337.
13. Кузнецова С. А. Нанотранспортные системы адресной доставки нуклеиновых кислот в клетки / С. А. Кузнецова, Т. С. Орецкая // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5, № 9–10. – С. 40–52.
14. Куликов А. М. Генетически-модифицированные организмы и риски их использования / А. М. Куликов // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 115–128.

15. Лукашев А. Н. Вирусные векторы для генной терапии : современное состояние и клинические перспективы / А. Н. Лукашев, А. А. Замятин // Биохимия. – 2016. – Т. 81, вып. 7. – С. 926–936.

16. Наквасина М. А. Бионанотехнологии : достижения, проблемы, перспективы развития / М. А. Наквасина, В. Г. Артюхов. – Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2015. – 152 с.

17. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами : оптимизация функций через направленное изменение структуры / С. М. Деев [и др.] // Успехи химии. – 2015. – Т. 84, № 1. – С. 1–26.

18. Никитин В. А. Задачи и загадки клонирования / В. А. Никитин // Биофизика. – 2010. – Т. 55, вып. 3. – С. 434–444.

19. Общая биотехнология : учебник / В. В. Ревин [и др.] ; под общ. ред. А. И. Мирошникова. – 3-е изд., доп и перераб. – Саранск : Изд-во Мордов. гос. ун-та, 2019. – 416 с.

20. Открытое письмо в поддержку развития генной инженерии в Российской Федерации. – URL: <http://onr-russia.ru/content/открытое-письмо-в-поддержку-развития-генной-инженерии-в-российской-федерации>

21. Последние достижения в области молекулярного клонирования / М. Ashwini [и др.] // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50, № 1. – С. 3–9.

22. Савицкая Е. Е. Разнообразие механизмов CRISPR-Cas-систем адаптивного иммунитета прокариот и возможности их применения в биотехнологии / Е. Е. Савицкая, О. С. Мушарова, К. В. Северинов // Биохимия. – 2016. – Т. 81, вып. 7. – С. 870–880.

23. Сергеева О. В. Применение мРНК для терапии – достижения и перспективы / О. В. Сергеева, В. Э. Котелянский, Т. С. Зацепин // Биохимия. – 2016. – Т. 81, вып. 7. – С. 937–952.

24. Современные методы генетического конструирования промышленных штаммов на основе бактерий рода *Bacillus* / Н. П. Закатаева [и др.] // Биотехнология. – 2013. – № 5. – С. 8–23.

25. Тиллиб С. В. «Верблужки наноантитела» – эффективный инструмент для исследований, диагностики и терапии / С. В. Тиллиб // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 77–85.

26. Уилсон Дж. Молекулярная биология клетки : сборник задач : пер. с англ. / Дж. Уилсон, Т. Хант. – М. : Мир, 1994. – 520 с.

27. Фармацевтическая биотехнология / Т. А. Ковалева [и др.]. – Воронеж : ИПЦ ВГУ, 2013. – 333 с.

28. Фундаментальная биотехнология : учебник / В. В. Ревин [и др.]. – 2-е изд., доп. и перераб. – Саранск : Изд-во Мордов. гос. ун-та, 2012. – 476 с.

29. Холявка М. Г. Микробные биотехнологии : теоретический и практический аспекты / М. Г. Холявка, М. А. Наквасина, В. Г. Артюхов. – Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2017. – 236 с.

30. Холявка М. Г. Практикум по биотехнологии : иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ / М. Г. Холявка, М. А. Наквасина, В. Г. Артюхов. – Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2017. – 161 с.
31. Чугунова А. А. Методы изменения геномов : новая эра в молекулярной биологии / А. А. Чугунова, О. А. Донцова, П. В. Сергиев // Биохимия. – 2016. – Т. 81, вып. 7. – С. 881–898.
32. Шешукова Е. В. Растительная фабрика продукции моноклональных антител / Е. В. Шешукова, Т. В. Комарова, Ю. Л. Дорохов // Биохимия. – 2016. – Т. 81, вып. 10. – С. 1392–1409.
33. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособие / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.
34. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part III. Biocatalysis, metabolic engineering and molecular modelling / A. Stryjewska [et al.] // Pharmacol. rep. – 2013. – V. 65. – P. 1102–1111.
35. Bruce D. Engineering genesis : ethics of genetic engineering in non-human species / D. Bruce, A. Bruce. – Routledge, 2014. – 352 p.
36. Datta A. Genetic engineering for improving quality and productivity of crops / A. Datta // Agric & Food Secur. – 2013. – V. 2. – P. 15.
37. Genome engineering tools in plant syntetic biology / K. M. Rai [et al.] // Currntny developments in biotechnology and bioengineering : synthetic biology, cell engineering and bioprocessing technologies. – Elsevier, 2018. – P. 47–73.
38. Guleria P. Genetic engineering : a possible strategy for protein-energy malnutrition regulation / P. Guleria, V. Kumar, S. Guleria // Mol. biotechnol. – 2017. – V. 59. – P. 499–517.
39. Heslot H. Molecular biology and genetic engineering of yeasts / H. Heslot, C. Gaillardin. – CRC Press, 2018. – 405 p.
40. Kumar J. A CRISPR technology and biomolecule production by synthetic biology approach / J. Kumar, L. K. Narnoliya, A. Alok // Currntny developments in biotechnology and bioengineering : synthetic biology, cell engineering and bioprocessing technologies. – Elsevier, 2018. – P. 143–161.
41. Lu Y. Advances in cell-free biosynthetic technology / Y. Lu / Currntny developments in biotechnology and bioengineering : synthetic biology, cell engineering and bioprocessing technologies. – Elsevier, 2018. – P. 23–45.
42. Ostash B. Site-specific recombinases in genetic engineering : modern in vivo technologies / B. Ostash // Cytol. Genet. – 2010. – V. 44. – P. 244–251.
43. Ren J. Recent advances in genetic engineering tools based on synthetic biology / J. Ren, J. Lee, D. Na // J. Microbiol. – 2020. – V. 58. – P. 1–10.

Учебное издание

**Наквасина Марина Александровна,
Холявка Марина Геннадьевна,
Артюхов Валерий Григорьевич**

**БИОИНЖИНИРИНГ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОСНОВЫ,
АНАЛИТИЧЕСКИЕ
И СИНТЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

Учебное пособие

Редактор *Е. В. Поликаркина*
Компьютерная верстка *Е. Е. Комаровой*

Подписано в печать 15.07.2021. Формат 70×100/16
Уч.-изд. л. 9,8. Усл. п. л. 13,33. Тираж 500 экз. Заказ 641

Издательский дом ВГУ
394018 Воронеж, пл. Ленина, 10
Отпечатано в типографии Издательского дома ВГУ
394018 Воронеж, ул. Пушкинская, 3