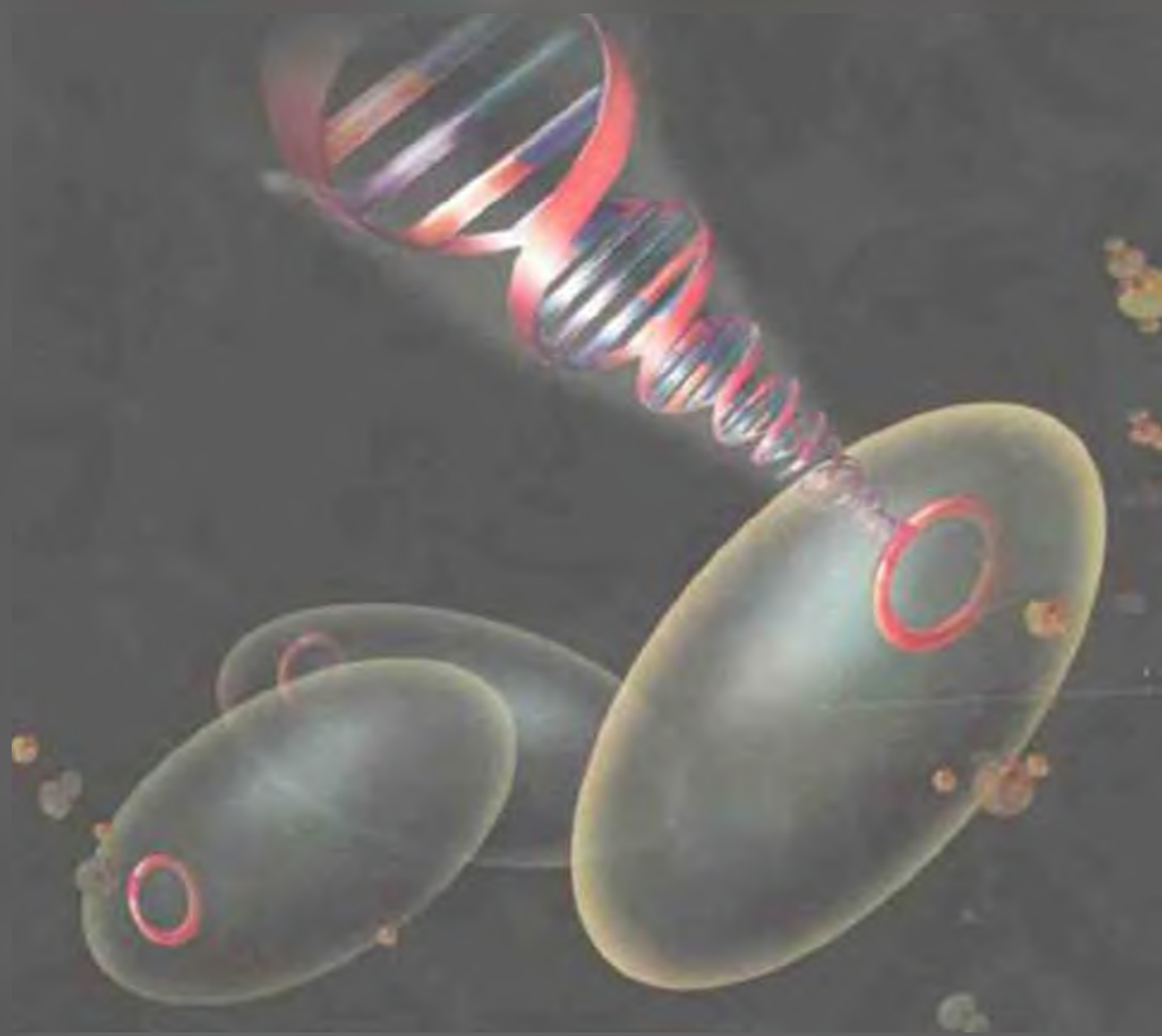


ЛУЧШИЙ
ЗАРУБЕЖНЫЙ
УЧЕБНИК

Б. Глик, Дж. Пастернак

Молекулярная биотехнология

Принципы и применение



Molecular Biotechnology

Principles and Applications of Recombinant DNA

SECOND EDITION

Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak

Department of Biology, University of Waterloo
Waterloo, Ontario, Canada

ASM PRESS
WASHINGTON, D.C.

Б. Глик, Дж. Пастернак

Молекулярная биотехнология

Принципы и применение

Перевод с английского

канд. мед. наук Н. В. Басильевой, О. А. Кидесниковой,

д-ра биол. наук Ю. М. Романовой, М. А. Серовой,

канд. мед. наук А. Л. Чухровой

под редакцией

д-ра биол. наук Н. К. Янковского



Москва «Мир» 2002

От редактора перевода

Книга, которую вы держите в руках, — это прекрасное руководство по молекулярной биотехнологии с подробным изложением ее принципов, методов и сфер применения. В ней собраны многолетний опыт чтения лекций по этому предмету студентам разных специальностей одного из ведущих университетов Канады. До сих пор в нашей стране не было ни собственных ни переводных изданий, которые одновременно охватывали бы все разделы биотехнологии и все объекты, к которым применимы биотехнологические методы: микроорганизмы, растения, животные, в том числе и человек. А между тем потребность в таком учебнике весьма велика, поскольку биотехнология входит в круг интересов представителей многих специальностей, имеющих разное базовое образование.

Учебник построен таким образом и написан таким языком, что им могут пользоваться студенты-биологи, химики и даже будущие врачи. По ходу книги даются ссылки на работы, в которых представлены оптимальные методики конструирования рекомбинантных организмов, не связанные их функционирования, определены качество и количество целевых продуктов. Текст прерывается таблицами, иллюстрирующими «Важная вещь» Они представляют собой рефераты научных статей, которые легко вытекают (или являются) частью в истории современной биотехнологии.

Книга состоит из четырех частей. В первой из них читки и ясно изложены основы молекулярной биологии, во второй речь идет о молекулярной биотехнологии микроорганизмов, в третьей — о биотехнологии эукариотических систем, в том числе человека (молекулярная диагностика человека и генная терапия). Особый интерес для русского читателя представляет четвертая часть, посвященная контролю и интенсификации в области молекулярной биотехнологии. Эти вопросы почти не затрагиваются ни в учебниках, ни в образовательных курсах в нашей стране, хотя в биотехнологии, как и в любой прикладной науке, новые разработки дают результаты только в том случае, когда они инициированы авторами. Авторы обсуждают законодательную базу использования генноинженерных продуктов в пищевой и фармацевтической промышленности, применении рекомбинантных организмов в сельском хозяйстве, нормативные акты, относящиеся к предварительным испытаниям этих организмов, требования, предъявляемые к ним при крупномасштабном применении. Детально рассматриваются правила патентования и способы секвениро-

юнная исследователю ДНК, а также результатов биотехнологических разработок в сфере цитоскелетных организмов. Заслуживающий внимания анализ критическим аспектам генной терапии как сельскохозяйских растений, так и клеток зародышевой линии, клонирования клеток органоидов, в том числе и человека. Очень ценной является также информация об особенностях патентной практики в разных странах, что исключительно важно для продвижения биотехнологических разработок на мировой рынок.

Книга чрезвычайно полезна как студентам разных специальностей, которым числится курс биотехнологии, так и специалистам-практикам

И. А. Ивашкин

*Мария – с благодарностью за то,
что она Мария*

Б. Р. Г.

*Лизы – с благодарностью за нее
Лиз Дж. П.*

Предисловие

За четыре года, прошедших со времени выхода в свет первого издания книги «Молекулярная биотехнология: принципы и применение», в области биотехнологии было сделано огромное количество открытий. На рынке появилось множество новых генноинженерных продуктов (например, вакцин и лекарственных препаратов). Рутинной практикой клинических лабораторий стало использование иммунологических методов диагностики и методов, основанных на применении полимеразной цепной реакции. Открыты и охарактеризованы многие гены, ассоциированные с различными заболеваниями человека, неизмеримо вырос объем клинических испытаний в области генной терапии. Построены подробные генетические и физические карты хромосом человека; впервые из дифференцированной соматической клетки клонировано жизнеспособное млекопитающее. Преподобство целого из трансгенных растений, свпы, поставлено на коммерческую основу.

В первом издании мы описали принципы и применение молекулярной биотехнологии в широком биологическом контексте – в той форме, которая представлялась нам наиболее интересной и информативной. С тех пор мы получили много ценных замечаний от наших коллег, аспирантов и студентов из разных стран. Стремясь сократить времяной разрыв и в то же время удовлетворить пожелания многих читателей, мы обновили, расширили и существенно переработали эту книгу. Мы надеемся, что вам удастся передать ту волнующую атмосферу, в которой совершаются открытия в молекулярной биотехнологии, и в то же время ясно изложить ее основы, разъяснить смысл современных открытий и то, как их можно использовать для «производства товаров и услуг». В книге появились новая глава, где рассмотрены микроорганизмы, обычно использующиеся в молекулярной биотехнологии. Кроме того, отдельная глава посвящена описанию основ молекулярной биологии. Значительно расширены главы по молекулярной генетике человека, генной терапии, биотехнологии растений, охватывающие самые последние достижения в этих областях. Пересмотрены главы, посвященные диагностическим системам и вакцинам. Кроме того, примерно в 1,5 раза увеличено число рисунков и таблиц, обновлен и расширен словарь терминов. Как мы надеемся, это поможет

лучше понять, как (и почему) эти явления и каковы теоретические концепции. Несмотря на все эти изменения мы постарались сохранить стиль изложения – свободный от лабораторности жаргона и «дружелюбный (но отнюдь не к читателю)» – сделавший первые издания книги столь популярными.

Мы очень признательны сотрудникам ASM Press, прежде всего Ken Aron, Susan Birch, Greg Rayor, Jeff Hoffmeier, за их постоянную помощь и поддержку, а также Susan Schmidt за превосходное, как всегда, оформление книги. Хотим также выразить благодарность Ken Aron за неизменное внимание в рукописи и сильное терпение в ожидании с вами.

*Бернард Р. Гилл
Джес Дж. Постерман*

Предисловие к первому изданию

Молекулярная биотехнология как новая область исследований сформировалась в конце 1970-х гг. на стыке технологий рекомбинантного ДНК и промышленной микробиологии. Современное общество постепенно осведомлено о проблемах молекулярной биотехнологии. Так или иначе об этой науке знают практически все. Кто-то видел фильм «Паря Юрекопу периода» с его патристическими, искусно маркированными, но совершенно несостоятельными с научной точки зрения «клонированными» лано шарами. Кто-то кричал в газетах о том, что на рынке появились новые, «биотехнологические» помидоры с большим сроком хранения. А кто-то слышал рассуждения критически настроенного читателя о страшных последствиях генной инженерии, ожидающих нас в будущем. В этой книге мы пытаемся объяснить, что собой представляет эта научная дисциплина на самом деле, как проводятся биотехнологические исследования и как они могут повлиять на нашу жизнь.

Книга «Молекулярная биотехнология: принципы и применение» написана как учебник для биотехнологов, технологов рекомбинантных ДНК и генной инженерии. В ее основу положен курс лекций по биотехнологии, который мы читали на протяжении 12 лет студентам старших курсов и аспирантам биологических и инженерных специальностей Уинчестерского университета. Книга предназначена для студентов, знакомых с основами биохимии, молекулярной генетики и микробиологии, хотя мы понимаем, что пока ни они не успели освоить все эти дисциплины до того, как начали заниматься биотехнологией. Поэтому, приступая к материалу этой или иной темы, мы сначала рассматриваем ее основы и лишь затем переходим к деталям.

Главное внимание в книге уделяется тому, как с помощью технологий рекомбинантного ДНК можно создавать нужные человеку продукты. Там, где это возможно, мы старались проиллюстрировать основные теоретические концепции конкретными результатами и примерами, уже примененными на практике. И) лавинообразного потока научных публикаций мы выбрали в качестве примеров те работы, которые не только наглядно иллюстрируют определенные биологические, но и формируют у читателя твердую научную базу, позволяющую ему ориентироваться в ужасающе большом количестве молекулярной биотехнологии. Конечно, мы понимаем, что эта область исследований расширяется чрезвычайно быстро и нескоро-

рые из наших примеров могут оказаться устаревшими к тому времени, когда книга выйдет в свет.

Очень часто научные публикации — неважно, в какой области науки идет речь, — в повседневном общении, на конференциях, в виде переписки используют специфическую терминологию, проше говоря, жаргон. Мы старались обйтись без него и во многих случаях намеренно давали словесные описания явления или процесса там, где, прибегая к латиничному жаргону, мы могли бы сэкономить немало слов. Для читателя важно и то же явление в любой области исследований существовать синонимы. Так, термины «рекомбинация рекомбинантных ДНК», «клонирование генов» и «генная инженерия» очень близки по смыслу. Когда в тексте впервые появляется новый термин, мы давали в скобках его синоним или наиболее типичное выражение. Особая терминология читателю поможет благодаря словарю терминов в конце книги.

Каждая глава излагается подробным образом и с полным описанием для интерпретации. Мы надеемся, что это поможет усвоить прочитанное. Все ключевые идеи иллюстрируются тщательно подобранными цветными рисунками (более 100 более 200); мы убеждены, что цветные рисунки делают статью больше, нежели тысячи слов. I издание читателя с основным текстом, первый биотехнологический и несколькими американскими аспектами, в следующие пять глав (гл. 2–6) — с ее методологией. Все вместе эти главы подготовят читателя к восприятию материала всех последующих глав. В гл. 7–12 части II рассмотрены способы получения ценных метаболитов, вакцин, лекарственных веществ и препаратов, жидкостных для диагностики, в том числе методы биодеградации удобрений и пестицидов. В гл. 13 описаны способы крупномасштабного культивирования генетически измененных микроорганизмов с целью получения коммерчески продуктов. Части III посвящена молекулярной биотехнологии растений и животных (гл. 14 и 15). Гл. 16 и 17 знакомят читателя с применением технологии рекомбинантных ДНК для диагностики и лечения человека, связанных со развитием некоторых заболеваний, и методами клонирования генов. В последние, IV части рассмотрены вопросы фундаментальных исследований в области молекулярной биотехнологии, формирования генов (то различные продукты и препараты).

В конце каждой главы есть список литературы. В нем могут содержаться ссылки, не упомянутые в самой главе. Иногда мы давали выдержки по статьям или представляли данные в существенных изменениях. Разумеется, мы несли полную ответственность за все неточности или не совсем корректные трактовки, которые при этом могли возникнуть, хотя и надеемся, что нам удалось этого избежать. Список литературы включает ссылки на работы более общего характера, систематизирующие лучшее знание материала.

Благодарности

Мы хотели бы поблагодарить всех, кто согласился прочитать различные варианты этой книги, когда она еще находилась в виде рукописи. Их советы и замечания очень полезны нам. Среди тех, кого нам хотелось бы упомянуть, — Arthur J. Allison, Purdue University; Ronald M. Adair, University

of Louisville; Fred Asuhel, Massachusetts General Hospital; David R. Benson, University of Connecticut; Jean E. Beuchley, Pennsylvania State University; A. M. Chakrabarty, University of Illinois at Chicago; Stan Gelvin, Purdue University; Janet H. Glaser, University of Illinois at Urbana-Champaign; David Graybiel, Cambridge Neuroscience; George D. Hegeman, Indiana University; James B. Kupel, University of Maryland at Baltimore; Donald K. Lightfoot, Eastern Washington University at Cheney and Spokane; Cynthia Moore, Washington University; William E. Newton, Virginia Polytechnic University; Danton H. O'Day, University of Toronto at Mississauga; Richard D. Palmiter, University of Washington; David H. Perling, Mayo Clinic; William S. Reznikoff, University of Wisconsin; Campbell W. Robinson, University of Waterloo; Marc Siegel, University of Waterloo; Adam J. Studkin, Center for Advanced Biotechnology and Medicine at Rutgers University; Jim Schwartz, Geneseech; Daniel C. Stern, University of Maryland at College Park; Dean A. Steller, University of Kansas; and Robert T. Vinnup, University of Connecticut.

Мы весьма признательны также сотрудникам ASM Press: Susan Birch, главному редактору; Ribi Siegel, менеджеру; Indi Simpson, литературному редактору; Susan Schindler, главному художнику; Peg Matkow из Ruffe, Shaw & Westcott, Inc., главному менеджеру проектов; художникам Norman Graphics; и наконец, Patrice Fitzgerald, директору ASM Press, который всеми доступными способами помог превратить наше дело в жизнь.

*Бернард Р. Глик
Дэвид Дж. Постернак*

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Молекулярная биотехнология — это увлекательнейшая область научных исследований, с появлением которой произошел настоящий переворот во взаимоотношениях человека с живой природой. В ее основе лежит перенос единицы наследственности (гена) из одного организма в другой, осуществляемый методами геновой инженерии (технология рекомбинантных ДНК). В большинстве случаев целью такого переноса является создание нового продукта или получение уже известного продукта в промышленных масштабах. И ч. I мы поздравим читателя с концепциями молекулярной биотехнологии и теми микроорганизмами, которые в ней используются, с основами молекулярной биологии и методологией рекомбинантных ДНК. Будут описаны такие методы, как химический синтез генов, полимеразная цепная реакция (ПЦР), определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК. Помимо успешного клонирования нужного гена очень важно обеспечить его правильное функционирование в организме нового хозяина, но этому мы обратимся также на способах оптимизации работы клонированных генов в про- и эукариотических системах. И наконец, мы рассмотрим, как можно улучшить свойства клонированных продуктов, модифицируя клонированные гены путем введения в них специфических нуклеотидных замен (мутация *in vitro*). В целом материал, изложенный в первой части, служит фундаментом, который позволяет понять различные аспекты конкретных применений молекулярной биотехнологии.

Молекулярно-биотехнологическая революция

Технология рекомбинантных ДНК

15 октября 1980 г. на Нью-Йоркской фондовой бирже произошла знаменательная событие: уже через 20 минут после начала торгов стоимость одной акции Биотехнологической компании Genentech поднялась с 35 до 89 долларов. Это был рекордный для того времени скачок цен на акции коммерческого предприятия. К моменту закрытия торгов в тот день цена одной акции Genentech составляла 71,25 доллара, а стоимость всех 528 тысяч акций была столь же баснословно высока, что мелкие инвесторы, собиравшиеся приобрести небольшой пакет акций, не имели никаких шансов.

По-настоящему, это был первый случай в истории, когда в начале волны биотехнологической революции возникла биржевая компания. В 1980 г., когда фирма Genentech впервые предложила обществу свои акции, это была небольшая компания в Калифорнии, в течение четырех лет успешно работающая над проблемой получения рекомбинантных ДНК. За два года до этого ученым компании удалось выделить фрагменты гена (последовательности ДНК), кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетически змеиные клетки (клетки змеиной железы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*Escherichia coli*). Эти бактериальные клетки работали как биотехнологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для больных диабетом, дающий аллергическую реакцию на свиной инсулин. Еще пять лет назад такое революционное событие предстали-

лось невероятным, им сродни все это стало вполне привычным.

Головокружительный взлет стоимости акций компании Genentech предопределился как результат острейшей потребности в технологии рекомбинантных ДНК, так и мечтами о будущей возможности. Многие думали, что новая технология станет тем роком и триумфом XX века, который изгонит и искоренит всех желающих. Эти мечты подпитывались энтузиазмом газетных и журнальных публикаций и телевизионных репортажей, повсюду раздавались восторженные крики и возгласы: «Вот это будущее биологии и биотехнологии — фантастическими способностями. Воспринимать будущее — это значит уметь видеть микробы, растения и животных, созданные человеком. Энтузиасты предсказали, что генноинженерные микробы вытеснят химические удобрения, будут уничтожать различные виды, появятся растения с передающимися по наследству устойчивостью к вредителям и исключительно высокой питательной ценностью; будут созданы сельскохозяйственные животные, более эффективно усваивающие пищу, быстро прибавляющие в весе и дающие нежирное мясо. Жалели, что роль таких конкретных биотехнологических свершений обуславливается одним или несколькими генами (единицами наследственности), созданные организмы с новым генетическим устройством не создают труда. И в самом деле, хотя ученые, поднятая задачу новой технологией, были не совсем адекватной, увлеченные этой идеей целая оживленная группа немцы были более преданных делу, и многие наиболее разумные проекты стали реальностью. Вспомните также мы рассказали о том, как это произошло и каковы перспективы применения технологии рекомбинантных ДНК.

Стратегия переноса функциональной слитницы наследственности (гена) из одного организма в другой была разработана экспериментальными учеными Стэнли Коэном и Гербертом Боуэром в 1973 г. И Коэну, и Боуэру, и многим другим было ясно, что технология рекомбинантных ДНК предоставляет огромные возможности. Как в то время отмечал Коэн, «... есть надежда, что удастся ввести в [бактериальную клетку] *E. coli* гены, жстцинированные с метаболическими или синтетическими функциями, присущими другим биологическим видам, например гены фотосинтеза или продуцирования антибиотиков».

Однако одним из первых открытий научному миру на создание новой технологии была мораторий на некоторые биотехнологические эксперименты, считавшиеся исключительным объектом Запрета на собственные исследования был провозглашен группой молекулярных биологов, включая Коэна и Боуэра. Они считали, что обилие слитных генов, происходящих из двух разных организмов, может случайно привести к созданию нового организма с нежелательными и опасными свойствами. Прошло несколько лет, у ученых накопился опыт работы с новой технологией, были согласованы инструкции по обеспечению безопасности этой работ, и страсти постепенно улеглись. Временное прекращение реализации некоторых научных проектов, связанных с рекомбинантными ДНК, не уменьшило энтузиазма ученых-микробов. Новая технология продолжает привлекать беспрецедентное внимание как со стороны общественности, так и со стороны ученых.

Весть о реинтеграции генов, осуществленную Коэном и Боуэром, облетела весь мир. Многие исследователи немедленно осознали все преимущества этой стратегии и создали огромное количество метаболитов, следуют когены, можно было с высокой эффективностью и относительно просто идентифицировать, выделить, характеризовать и использовать гены. Эти трансгенетические разработки внесли значительный вклад в развитие практически всех биологических дисциплин, включая науку о поведении животных, биологию растений, молекулярную биологию, клеточную биологию и генетику человека, однако наиболее глубоко изменения произошли в области биотехнологии.

Возникновение молекулярной биотехнологии

В начале 70-х годов традиционная биотехнология как таковая документально была не слишком известна, исследования в этой области в основном проводились в отпасах инженерной химии и энтомологии в рамках социальных микробологических программ. В широком смысле биотехнология занимается производством коммерческих продуктов, обращаемых микроорганизмами в результате их жизнедеятельности. Более формально биотехнология можно определять как «применение научных и инженерных принципов к переработке материалов живыми организмами с целью создания товаров и услуг». В историческом смысле биотехнология возникла тогда, когда продолжил быть впервые использованы при производстве пищи, в бактериях – для получения пива.

Термин «биотехнология» был введен в 1917 г. австрийским инженером Карлом Эрском для описания процесса крупномасштабного выращивания смеси с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эрски, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырья получают материалы с помощью живых организмов производятся (с или без промежуточных) продукты». Однако это совершенно точное определение не получило широкого распространения. Долгое время термин «биотехнология» отождествлялся с двумя очень разными дисциплинами. С одной стороны, это употребляли, говоря о промышленной ферментации, с другой – применительно к той области, которая сейчас называется эркономией. Такой двойственности пришел конец в 1961 г., когда шведский микробиолог Карл Герен Хеден предложил изменить название научного журнала "Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology" («Журнал микробиологической и биохимической инженерии и технологии»), официально утвердив его на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на "Biotechnology and Bioengineering" («Биотехнология и биоинженерия»). С этого момента биотехнология оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».



Рис. 1.0. Основные этапы биотехнологического процесса. Термин был введен Карлом Эркин и относится к крупномасштабному искусственно синтезируемому (искусственный продукт) с использованием дигестивной сахарной смеси (сырье) в качестве среды для синтеза (биотрансформации).

и если в том процессе (улучшения микробными, биохимия и химическая инженерия).

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческой продукции используются микроорганизмы, обычно состоит из трех ключевых этапов (рис. 1.0).

1. Исходная обработка: обработка сырья таким образом, чтобы его можно было использовать как источник питательных веществ для микроорганизмов-мишеней.
2. Ферментация и биотрансформация: рост микроорганизма-мишеня в большом (обычно более 100 л) биореакторе (ферментация) с последующим извлечением нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация).

3. Конечная обработка: очистка нужного вещества от компонентов культуральной среды или от клеточной массы.

Целью биотехнологического исследования является максимизация эффективности каждого из этих этапов и поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получать нужные вещества (питательные добавки, антибиотики и т.д.). В 60–70-е годы все эти исследования касались только исходной обработки, устройств биореакторов и получения конечного продукта. Благодаря этому был усовершенствован инструментальный контроль процесса ферментации и значительно расширены возможности крупномасштабного культивирования, что позволило повысить эффективность производства некоторых продуктов.

Наиболее трудным для оптимизации был этап биотрансформации. Когда использовались ферменты микробные штаммы, выход конечного продукта часто оказывался намного ниже оптимального. Поэтому предпринимались попытки изменить генетическую конституцию существующих штаммов-продуцентов с помощью химической мутагенеза или ультрафиолетового облучения. При таком подходе уровень повышения производства обычно лимитировался числом биохимическими факторами. Например, если мутантный штамм синтезировал слишком много того или иного вещества, часто это отрицательно влияло на протекание метаболических процессов и приводило к угнетению роста культуры при крупномасштабном культивировании. Несмотря на эти традиционные стратегии «индуцированного мутагенеза и селекции», направленные на усовершенствование штаммов-продуцентов, были исключительными инновациями для многих процессов, например для производства антибиотиков.

Генетические схемы генетически усовершенствованных бактерий включают скрининг, отбор и тестирование огромного количества клонов, поэтому такие схемы высококапитальны и занимают много времени. Более того, при этом можно рассчитывать только на усовершенствование уже существующих, переданных по наследству свойств штамма, а не на расширение его генетических возможностей. В последние годы таким образом были усовершенствованы производственные процессы получения нового ряда продуктов.

С развитием технологии рекомбинантных ДНК природа биотехнологии и биомедицины оказалась в беспрецедентно Понни-как возможность оптимально использовать биотрансформацию в качестве простого пути, создавать, а не просто отбирать эволюционно новые штаммы, делать ювенильные микроорганизмы и дугархиплексные клетки как «биологические фабрики» для производства вакцин, интерферона, гормонов роста, ниретилитипитонов и множества других белков. Технологии рекомбинантных ДНК позволяют изучать в больших количествах новые молекулярные вещества и микромолекулы, которые в естественных условиях синтезируются в минимальных количествах. Растения и животные стали естественными биореакторами, продуцирующими новые или изме-

ненные генные продукты, которые никогда не могли бы быть созданы естественными способами или селективными методами. Эти новые технологии способствуют развитию принципиально новых методов диагностики и лечения различных заболеваний.

На этапе технологии рекомбинантных ДНК и биотехнологии возникла новая область исследований, динамичная и высококонкурентная область – молекулярная биотехнология. Эта область включает в себя молекулярную биологию в период своего становления, весьма амбициозная, замысловатая с применением не всегда соответствующим реальным возможностям. Ее стратегия и генеративная была претерпевала быстрое изменение, одна порождая все время вытесняя

Таблица 1.1. Основные события в области биотехнологии

Год	Событие
1917	Карл Эрст и Макс Терман «Биотехнология»
1941	Чуанг-чунг (применение в промышленности ферментов)
1944	Уэвер, Мейлион и МакКарти показали что трансформация бактерий происходит с помощью ДНК
1947	Уотсон и Крик описали структуру молекулы ДНК
1961	Уорланд журнал "Biotechnology and Bioengineering"
1961-1966	Растения, которые способны к фиксации азота
1970	Выявлено первое рестриктазное ферментное вещество
1971	Кригер и Др. синтезировали полинуклеотид с помощью ДНК
1972	Белл и Билл описали метод клонирования рекомбинантных ДНК
1975	Келер и Миллштейн описали метод получения моноклональных антител
1976	Низкая первая рекомбинантная рекомбинантная работа с рекомбинантными ДНК
1976	Пурбинский метод определения структуры молекулы ДНК
1978	Ферри Селестини описали метод получения моноклональных антител с помощью <i>E. coli</i>
1980	Вершинский США описали метод получения рекомбинантных антител с помощью <i>E. coli</i> , что и позволило получить рекомбинантные антитела, которые были использованы
1981	Исследования в области генетической инженерии ДНК
1981	Гарретт и описали метод в США первый этап генетической инженерии с помощью рекомбинантных ДНК
1982	Пурбинский описали метод в Европе (серия «рекомбинант») в метод, получивший применение в рекомбинантных ДНК
1983	Два штамма рекомбинантных рекомбинантных гибридных штаммов <i>E. coli</i>
1983	Полли описали США метод получения рекомбинантных антител с помощью рекомбинантных ДНК с помощью рекомбинантных антител
1983	Создание метода генетической инженерии (GEP)
1984	В США описали метод в Европе первый этап генетической инженерии с помощью рекомбинантных ДНК
1985	Французские методы работы с рекомбинантными ДНК (серия «рекомбинант»)
1984-1993	Создание новых методов генетической инженерии с помощью рекомбинантных ДНК
1986	Создание метода генетической инженерии (серия «рекомбинант») в метод, получивший применение в рекомбинантных ДНК
1986	Создание метода генетической инженерии (серия «рекомбинант») в метод, получивший применение в рекомбинантных ДНК
1987	Клонирование человека методом генетической инженерии (серия «рекомбинант»)



Рис. 1.2. Молекулярная биотехнология объединяет различные научные области и интегрирует созданные научной деятельностью коммерческие продукты и методы

ются другими. Но несомненно одно: в будущем молекулярная биотехнология в своем развитии методом создания живых систем, обладающих новыми функциями и возможностями.

Очень редко новые научные дисциплины возникают «из пустого места»; как правило, их фундаментом служат различные области науки. Что касается молекулярной биотехнологии, то ее биотехнологическая составляющая относится к сфере промышленной микробиологии и химическому инженерии, а молекулярная — к областям молекулярной биологии, молекулярной генетики бактерий и эукариотных эукариотов (табл. 1.1). В широком смысле молекулярная биотехнология пользуется достижениями самых разных областей науки и применяет их для создания самых разных коммерческих продуктов (рис. 1.2).

Коммерциализация молекулярной биотехнологии

Конечной целью всех биотехнологических исследований является создание коммерческого продукта. Следовательно, молекулярная биотехнология тесно связана с жизнедеятельностью, Конечной,

осле чего ее развитие обуславливается не только экономическими факторами, sondern на первом этапе развития вокруг этой молодой науки был создан с целью получения прибыли. К вечеру 15 октября 1980 г. основные держатели акций фирмы Genentech стали обладателями миллионов долларов, и это побудило очень многих людей к энергичным действиям. В период с 1980 по 1983 гг. в Соединенных Штатах было создано около 200 мелких биотехнологических компаний, этому способствовали всевозможные льготы вывоза, высокие прибыли от операций с новыми бизнесами и заинтересованность частных владельцев. Выгодам Гербертом Бенером, который иначе был научным сотрудником Калифорнийского университета в Сан-Франциско, в этом деле видел президент фирмы Genentech, многие университетские профессора открыли собственные компании.

К 1985 г. в Соединенных Штатах было уже более 400 биотехнологических фирм, многие из них включили в свое название слово «ген», что бы свидетельствовало о принадлежности к генноинженерному «делу»: Biogen, Amgen, Caltan, Eucel, Genex, Cetus. На сегодняшний день в США свыше 1500 биотехнологических компаний, а во

всем мире их более 300. Кроме того, большой вклад в развитие молекулярной биотехнологии внесли все крупные международные химические и фармацевтические конгломераты, в том числе Monsanto, Du Pont, Upjohn, American Cyanamid, Eli Lilly, SmithKline Beecham, Merck, Novartis, Hoffmann-La Roche. В период бурного развития биотехнологического бизнеса в 80-е годы мелкие компании поглощались крупными, образовывались совместные предприятия. Например, в 1991 г. 60% акций компании Genentech было продано фирме Hoffmann-La Roche за 2,1 млрд. долларов. В то же время многие компании обанкротились. Такая мобильность — характерная особенность биотехнологической индустрии.

К середине 90-х годов на рынке появилось более десятка новых биотехнологических лекарственных препаратов, более 100 препаратов сейчас проходит клинические испытания, еще свыше 300 находится на стадии разработки. Создаются и выпускаются на рынок множество новых молекулярно-биотехнологических продуктов, повысилась урожайность сельскохозяйственных культур и продуктивность сельскохозяйственных животных. Ежегодный объем молекулярно-биотехнологической индустрии увеличился с 6 млн. долларов в 1986 г. до примерно 70 млрд в 1996 г. (Кто знает, а 2000 г. объем продаж продуктов, изготовленных с применением молекулярной биотехнологии, превысит 60 млрд. долларов в год). Хотя в целом доходность биотехнологического бизнеса оказалась не такой высокой, как ожидалось, тенденция инвесторов не ослабевает и свидетельствует о том, что молекулярная биотехнология — по крайней мере по их представлениям — имеет блестящие перспективы.

Все новые незаменимые молекулярно-биотехнологические компании ужасно спекулятивны, что часто находит отражение в их названиях. Например, вслед за компаниями, занимающимися клонированием овец, в США делал успех компания, выпускающая полученные генноинженерными методами анти-тела, которые предназначены для лечения инфекционных заболеваний, рака и других болезней человека Immunex, Immunologic, Immunocore, Immunoprotect, Medimmune, Immune Response.

Большая часть коммерческих разработок в области молекулярной биотехнологии происходит из Соединенных Штатов. В других странах, как инвестиционный климат не столь благоприятен и бизнес менее активен, главную роль в создании молекулярно-биотехнологических предприятий играют крупные корпорации и государство. Так, правительство Японии обычно финансирует биотехнологическую индустрию и национальным приоритетом. За дело взялись крупные японские корпорации. Вначале им не хватало собственных кадров, и первые исследования проводились в сотрудничестве с американскими университетами и компаниями. Сейчас эти корпорации приобрели необходимый опыт и сами начинают молекулярно-биотехнологические разработки и создают патентные инженерные продукты.

Европейская биотехнологическая индустрия тоже неуклонно развивается: к 1995 г. в странах Европы было создано более 600 биотехнологических компаний. В экономически менее развитых странах роль «покровителя» и развития индустрии взяла на себя государство. Стимулом здесь служило увеличение в том, что молекулярная биотехнология — «самая революционная из всех технологий XX века». Ни одна страна не хотела оказаться лишеной этой технологии, которая сулила ее развитие.

Сейчас, в конце второго десятилетия своего развития, молекулярная биотехнология фактически стала одной из отраслей промышленности, хотя вначале некоторые ученые считали ее чисто теоретическим упражнением. Без сомнения, в ближайшие десять лет коммерческую молекулярную биотехнологию ожидает бурный рост, но именно поэтому важно заранее контролировать притоки новых инвестиций.

Надежды и опасения

С молекулярной биотехнологией человечество сталкивается самые большие надежды:

- возможность точной диагностики, профилактики и лечения множества инфекционных и генетических заболеваний;
- исключительное повышение урожайности сельскохозяйственных культур путем создания

- Как повлияют ли приложения новых биомолекулярных методов прироста человека на неприкосновенность частной жизни?
- Следует ли патентовать животных, полученных генноинженерными методами?
- Не будет ли адекватное финансирование молекулярной биотехнологии свести к нулю другие важные технологии?
- Не приведет ли стремление к получению максимальной прибыли к тому, что преимущественно молекулярной биотехнологией смогут воспользоваться только состоятельные люди?
- Не нанесет ли молекулярная биотехнология ущерб традиционному сельскому хозяйству?
- Не нанесет ли удары по лечению, основанное на восстановлении молекулярной биотехнологией, традиционные, столь же эффективные методы лечения?
- Не помешает ли борьба за приоритеты свободному обмену идеями между учеными?

Эти и многие другие вопросы рассматривали участники заседания. Искусственно затормозив конференцию и в научные публикации ученые, о них глубоко мысленно раздумают авторы публикаций изысканий. На этой конференции также были определены темы соответствующих докладов и лекций, выданы рекомендации и выработаны политические решения. И тем не менее, участие и успехи, и общепризнанные, но некоторые противоречия все же остались.

За сравнительно короткий период молекулярная биотехнология превратилась в международную коммерческую предприятие, в значительной степени коммерциализированное. Его основатели сформировали множество научных и деловых публикаций, в университетах всего мира студентам и аспирантам читают учебные курсы по молекулярной биотехнологии (обратите внимание, с которым типично отстает отсюда по определению только СССР). В США в 1977 г., совместно существует следующее заявление: «Молекулярная биотехнология изменила (или) еще одну революцию науки, которая могла бы изменить жизнь в будущем... Являясь так же революцией, как и все остальные (Промышленная революция для науки науки и компьютерная революция в жизни людей). Возможность (использования) манипулирования генетическими материалами, обещает великие перспективы в нашей жизни».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1977 г. Стэнли Коэн и Герберт Боуэр с сотрудниками разработали способ переноса генетической информации из одного организма в другой. Этот метод, получивший название технологии рекомбинантных ДНК, позволял ученым выделять конкретные гены и вводить их в организмы нового хозяина. Технология рекомбинантных ДНК стимулировала развитие различных областей науки, но прежде всего она создала необычайные предпосылки для повышения биотехнологии.

Биотехнология в значительной мере зависит от получения с помощью микроорганизмов (грибов, дрожжей, животных комменсальных бактерий) во время рекомбинантных ДНК самым эффективным методом повышения продуктивности организмов был путеводителем последующей селекцией оптимального штамма микроорганизма. Это длительный, трудоемкий, дорогостоящий и небезопасный процесс, позволяющий улучшить лишь незначительную часть природных организмов. В то же время технология рекомбинантных ДНК — это быстроразвивающийся, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов с заранее заданными генетическими характеристиками. Кроме того, этот инструмент может работать не только с микроорганизмами, но так же с растениями и животными. Союз технологии рекомбинантных ДНК и биотехнологии породил очень динамичную, чрезвычайно интересную дисциплину — молекулярную биотехнологию.

Молекулярная биотехнология сразу изменила воображение общества. При этом частному мнению то бы не озадачил одного человека, но многочисленные гены, микроорганизмы (особенно рекомбинантные ДНК). Правда, на то, чтобы реализовать свою предельную реакцию, гены должны потребоваться времени несколько больше, чем им казалось, но уже сейчас множество биотехнологических продуктов имеется в продаже и они больше появились в банальном будущем.

Молекулярная биотехнология скрупулезно изучается на предмет возможных негативных последствий ее распространения для человечества, поскольку спектр ее воздействия неограниченно широк. Рассматривались также различные об-

целостности отрасли, как безопасность потребителей, негативное влияние на окружающую среду, патентованные организмы, научными генноинженерными методами

ЛИТЕРАТУРА

- Аматоров. 1987. *From Bacterium to Biotechnology: Background Paper: Public Perception of Biotechnology*. Office of Technology Assessment, U.S. Congress, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Boh R. 1991. Biotechnology in the twenty-first century. *Sci. Stud. Sci* 21: 413-457
- Hal R. 1993. *The Uses of Life: a History of Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Beck L., W.B. Lacy, J. Baskinet, L. R. Lacy. 1992. *Plato, Power, and Profit: Social, Economic and Ethical Consequences of the New Biotechnologies*. Blackwell Publishers, Cambridge, Mass.
- Cohen S., A.C.Y. Chang, H.W. Oyer, R.B. Hedberg. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3240-3244.
- Davis B.D. (ed.). 1991. *The Genetic Revolution: Scientific Progress and Public Perception*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Case F.S. 1997. *Biotechnology: Unleashed Promises and Perils*. Trifolium Press, Inc., Toronto, Canada.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Укажите недостатки методов «мутации» и «селекция» для получения штамма: коммерчески ценность организмов с улучшенными свойствами
2. В чем состоит революционность работы Коэна, Бофера и др., опубликованной в 1973 г.?
3. Какое отношение к биотехнологии имеет Кэри Эркин?
4. Опишите основные этапы биотехнологического процесса.
5. Сравните биотехнологию и молекулярную биотехнологию
6. Какие опасения связаны с развитием молекулярной биотехнологии?
7. Раскройте смысл утверждения, что «молекулярная биотехнология является многопрофильной наукой».
8. Назовите некоторые из потенциальных возможностей, предоставляемых молекулярной биотехнологией.
9. Опишите историю развития биотехнологической индустрии за последние 30 лет.
10. Прочтите рубрику «Новости» в последних номерах журнала "Nature Biotechnology", которую вы можете найти в научной библиотеке или в Интернете (<http://biotech.nature.com>) и напишите краткое резюме пары сообщений.

Биологические системы, использующиеся в молекулярной биотехнологии

Объектами молекулярной биотехнологии являются самые разнообразные биологические системы: микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, вирусы насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы (растения, мышь, домашние животные и т. д.) — выбор системы зависит от целей экспериментанта. Характер биологической системы исключительно важен для биотехнологического процесса. Во многих случаях имеются генетически модифицированные самокормящиеся биологические системы — микроорганизмы, вирусы, растения или животные — является конечным коммерческим продуктом. Среди объектов биотехнологических объектов, используемых в молекулярной биотехнологии, основными «работными лошадками» являются бактерии *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

В рассуждениях главы мы будем использовать различные высокоспециализированные биологические системы. В частности, в гл. 7 будет рассмотрена система «вирус насекомых — клетка насекомого», которая используется для производства рекомбинантных белков, кодируемых клонированными генами, а в гл. 19 — генетическая модификация домашних животных (баран, овца, свинья). В настоящей главе мы дадим краткое описание наиболее важных для молекулярной биотехнологии систем, которые также будут рассматриваться в последующих главах.

Прокариоты и эукариоты

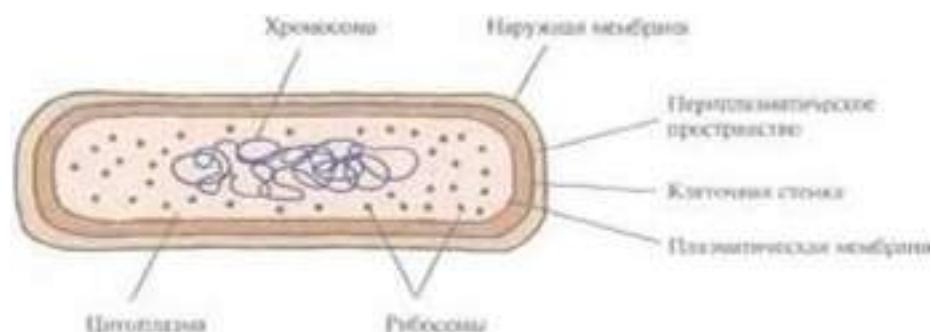
Все живые организмы можно разделить на две группы: прокариоты и эукариоты. В основе

классификации лежат многочисленные структурные различия, на которых мы остановимся более детально в последующих главах, а здесь укажем лишь основные из них: 1) наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК; 2) строение и химический состав клеточной стенки и 3) наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органов. В прокариотической клетке, например бактериальной, хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена риниальной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан, но не хитин или целлюлоза; в клетке нет субклеточных цитоплазматических органов. В эукариотической клетке имеются ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре; клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и в клетках растений) (рис. 2.1).

Escherichia coli

Бактерия *Escherichia coli* — одна из наиболее хорошо изученных организмов. За последние пятьдесят лет удалось получить несчетное количество информации о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Это граммотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Ее срезовой оберткой является клеточная стенка, но она также может высвободиться из поры и воды. Благодаря способности размножаться простыми делениями на средах, содержащих только ионы Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} и SO_4^{2-} , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E. coli* ста-

А



Б

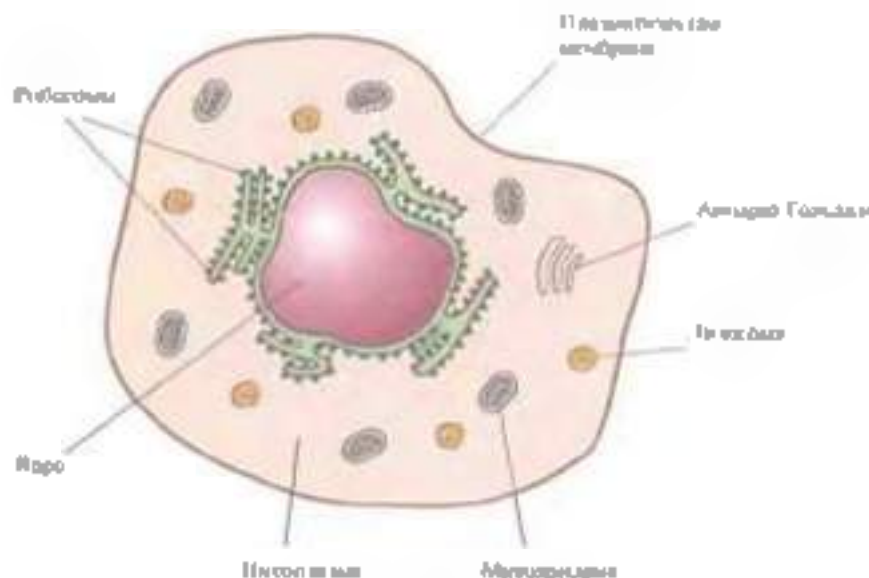


Рис. 2.1. Схематическое изображение (не пропорциональное) клетки (а) и эукариотической животной клетки (б).

ва излюбленным объектом научных исследований. При культивировании *E. coli* на питательной жидкой питательной среде, содержащей аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (с.с. время между образованиями бактерии и ее делением) в лагарфазической фазе роста при температуре 37 °С составляет примерно 22 мин.

Для каждого живого организма существует определенный температурный интервал, оптимальный для его роста и размножения. При слишком высоких температурах происходит денатурация белков и разрушение других важных клеточных компонентов, что ведет к гибели клет-

ки. При низких температурах биологические процессы существенно замедляются или останавливаются из-за структурных изменений, которые претерпевают белковые молекулы. Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их можно подразделить на термофилы (от 45 до 90 °С и выше), мезофилы (от 10 до 47 °С) и психрофилы, или психротрофы (от -5 до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, могут быть полезным инструментом для решения различных биотехнологических задач. Например, термофильная часто служит источником ферментов, кодирующих

Таблица 2.1. Исколюричные системы в микробиологии (по Вильямсу [19]).

<i>Actinomyces</i> <i>Streptomyces</i>
<i>Agaricus</i> <i>Aspergillus</i>
<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>
<i>Campylobacterium</i> <i>Chlamydomonas</i>
<i>Escherichia</i> <i>Haemophilus</i>
<i>Lactobacillus</i> <i>Leishmania</i>
<i>Mycobacterium</i> <i>Neisseria</i>
<i>Paracoccus</i> <i>Paramecium</i>
<i>Plasmodium</i> <i>Pyricularia</i>
<i>Rhizopus</i> <i>Saccharomyces</i>
<i>Trichomonas</i> <i>Trichosporon</i>
<i>Trichostema</i> <i>Trichostema</i>
<i>Trichostema</i> <i>Trichostema</i>

Почему *E. coli*, а исколюричные биологические системы используют множество других микробиологических (табл. 2.1). Их можно разделить на две группы: микробиологические как источники специфических генов и микробиологические, создающие генетические мутации для решения определенных задач. К специфическим темам относятся, например, ген, кодирующий термостабильную ДНК полимеразу, которая используется в широком применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот ген был выделен из термифильных бактерий *Thermococcus* и *E. coli*. Ко второй группе микробиологических относятся, например, различные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, которые были генетически модифицированы с целью идентификации различных промышленных важных аминокислот.

Saccharomyces cerevisiae

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – это незаменимые одноклеточные микроорганизмы с лямбда-геном, которые по своему составу являются примером *S. cerevisiae*, которые по своему составу являются примером дрожжевых клеток *E. coli*. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. *S. cerevisiae* размножается бинарно и хорошо растет на простой среде, как и *E. coli*. Их способность к превращению сахара в спирт и углекислый газ издавна использовалась для изготовления алкогольных напитков и хлеба. Известные штаммы используются для всего мира, растет все более

и более популярна *S. cerevisiae*. Дрожжи *S. cerevisiae* представляют собой такую большую часть интереса. В частности, они являются важным элементом культуры для исследования других организмов, в том числе человека, выходящую за пределы, ответственность за регуляцию клеточного цикла *S. cerevisiae*, связанная с выживанием у человека. Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Широко используются различные системы дрожжей (искусственно созданные) в качестве модельных участников всех исследований по изучению ДНК человека. В 1996 г. была определена полная «культуральная» последовательность всего генома дрожжей *S. cerevisiae*, что еще более увеличило ценность этих организмов для различных исследований. Такая работа по изучению была выполнена впервые.

Связь микробиологической биологии и дрожжевых клеток дрожжевой белок часто применяется в качестве ферментативной модификации, особенно для белковой модификации и модификации для правильного функционирования белка. К сожалению, *E. coli* и другие микроорганизмы не способны осуществлять эти модификации, поэтому для изучения модифицированных дрожжевых белков используют *S. cerevisiae*, а также другие штаммы дрожжей: *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces diastolicus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Glycophanopsis*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*. Наиболее эффективными промислами полициклическими белками являются *P. pastoris* и *H. polymorpha*.

Культуры дрожжевых клеток

При всех различиях между типами дрожжевых культур (по видам, к культурам дрожжевых клеток насекомых, растений и млекопитающих) имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек дрожжевой культуры сферической и обрабатывают его ферментативными ферментами, растительными (или белыми) межклеточными материалами (при работе с растительными клетками добавляются специфические ферменты, разрушающие клеточную стенку). Выстигившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, шпигулы, витамины, соли,

гликозу и факторы роста. В этих условиях клетки растут до тех пор, пока не станут емкостью с культурой не сформируется клеточный микробий. Если после того не перенести клетки в емкость со средой питательной среды, то рост прекратится. Обычно удается перенести (перемикать, субкультивировать) и поддерживать до 50–100 клеточных поколений (поколений (первоначальной) клеточной культуры, затем клеток дочерних поколений) стабильности к делению и синтезу. Культуральные клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, но по мере их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей.

Часто некоторые клетки (первичных первичных клеточных культур) претерпевают генетические изменения. В результате которых выделяется из рост культуры клеток, которые при этом приобретают селективные преимущества, позволяющие способными к неограниченному росту в чаше и напыляемых устойчивыми клеточными линиями. Среди клеточные линии (выделяют) основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются выделительные хромосомные изменения, в чашках их отмечается увеличение числа выделительных и потерь других. В молекулярной биологии часто используют устойчивые клеточные линии (используют) для различения вирусов и для выделения белков, которые кодируются хромосомными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабно производить вакцины и recombinant белки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В молекулярной биологии часто используются множества различных биологических систем как для осуществления генетических манипуля-

ций, так и для производства вакцин в коммерческом отношении продуктов. Наиболее важными из них являются бактерии *Escherichia coli*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и клеточные культуры млекопитающих, растений и микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Daniel A. I., N.A. Solomon (ed.). 1985. *Biology of Industrial Organisms*. Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, Calif.
- Dolan B. 1996. The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* 12: 263–270.
- Lodish H., D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell. 1995. *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. Scientific American Books, New York, N.Y.
- O'Leary W. M. (ed.) 1989. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Почему в молекулярной биологии часто применяются так много разных биологических систем?
2. Какие это организмы?
3. Кто такие эукариоты?
4. Перечислите основные свойства *Escherichia coli*.
5. Что такое термин «примитивный»?
6. Перечислите основные свойства *S. cerevisiae*.
7. Каковы основные компоненты простой жидкой питательной среды?
8. Каковы основные компоненты сложной жидкой питательной среды?
9. Что такое первичная клеточная культура?
10. Что такое устойчивая клеточная линия?

ДНК, РНК и синтез белка

Все информация и структура и функциональные свойства любого живого организма она содержится в высокоорганизованном виде в его генетическом материале, основу которого составляет дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). ДНК представляет собой полимер — это длинная двухцепочечная полимерная молекула. Последовательность нуклеотидных единиц (дезоксирибонуклеотидов) в одной ее цепи соответствует (комплементарна) последовательности дезоксирибонуклеотидов в другой. Принцип комплементарности обеспечивает идентичность вновь синтезированных молекул ДНК, образующихся при ее удвоении (репликация). Исходные молекулы информации являются генетическими элементами со строго определенной нуклеотидной последовательностью, кодирующими определенные продукты, являются гены. Одни из них кодируют белки, другие — только молекулы РНК. Информация, содержащаяся в генах, которые кодируют белки (структурных генов), расшифровывается в ходе двух последовательных процессов: синтез РНК (транскрипция) и синтез белка (трансляция). Сначала на определенном участке ДНК как на матрице синтезируется матричная РНК (мРНК). Затем в ходе сложившейся работы многокомпонентной системы при участии транспортных РНК (тРНК), мРНК, ферментов и различных белковых факторов осуществляется синтез белковой молекулы. Все эти процессы обеспечивают правильную передачу информации в ДНК генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот. Аминокислотная последовательность белковой молекулы определяет ее структуру и функцию.

Для получения ценных биотехнологических продуктов используют гены самых разнообразных организмов. Чтобы лучше понять, как работают биотехнологические системы, рассмотрим строение молекулы ДНК и процессы репликации, транскрипции и трансляции.

Структура ДНК

Первые данные о химических свойствах ДНК появились в 1868 г. К началу 40-х годов XX в.

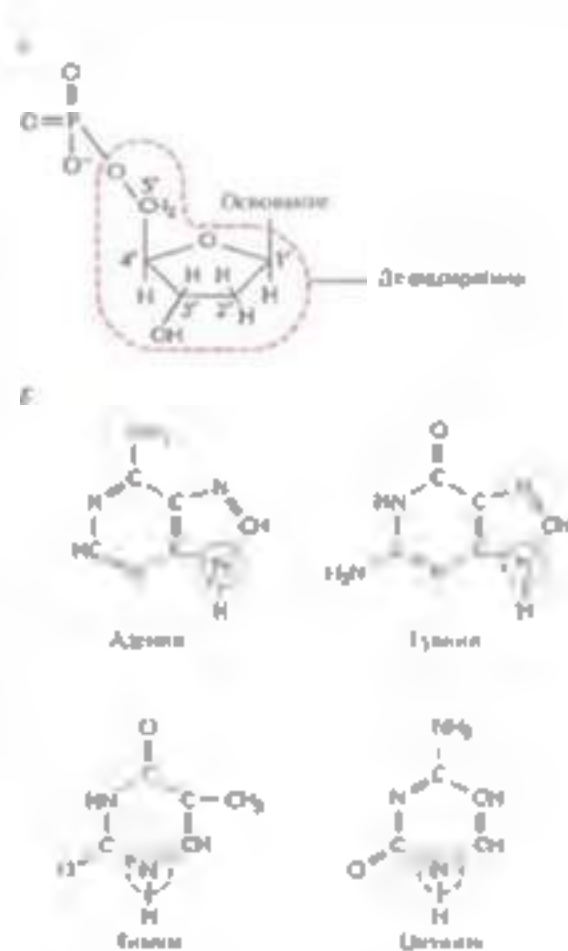


Рис. 3.1. Структурные формулы компонентов ДНК А. Нуклеотид. Окисленным может быть аденин, гуанин, цитозин или тимин. Цитозин и гуанин имеют амидную группу и азотный остаток (исходный в); пиридин различно его структурные элементы. Основания. Цитозин и гуанин имеют азотный остаток. Амидная группа и азотный остаток присоединяется дезоксирибозе

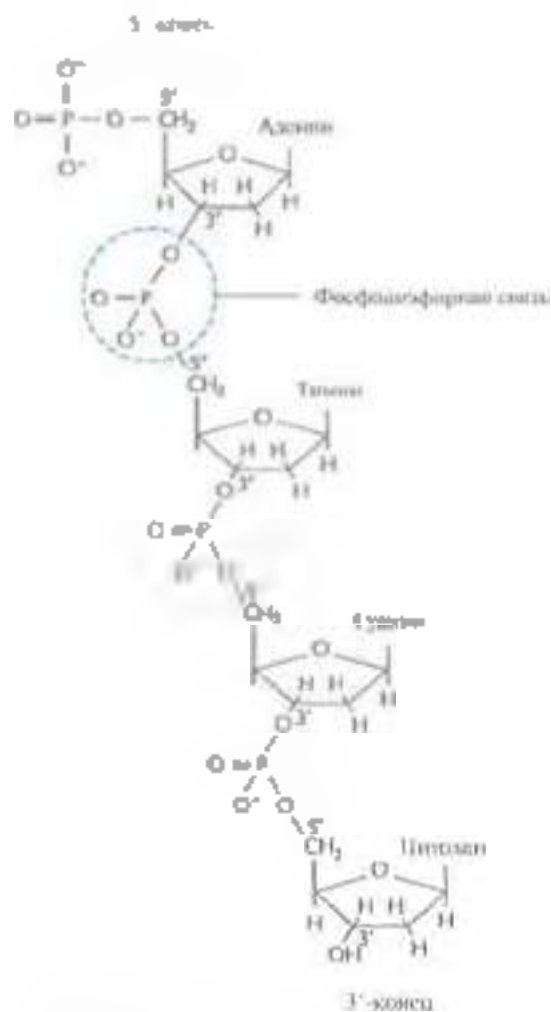


Рис. 3.2. Структурная формула участка ДНК.

было установлено, что молекула ДНК — это линейный полимер. Его мономерными единицами являются нуклеотиды, состоящие из азотистого основания, пятиуглеродного сахара (пентозы) и фосфатной группы (рис. 3.1, А). Фосфатная группа присоединена к 5' атому углерода многоатомного остатка, а азотистые основания — к 1 атому. Основания в ДНК бывают двух типов: пуриновые (аденин (А) и гуанин (Г)) и пиримидиновые (цитозин (С) и тимин (Т)) (рис. 3.1, Б). В ДНК моносахарид представляет 2-дезоксирибозид, содержащий только одну гидрок-



Рис. 3.3. Модель двойной спирали ДНК. Поперечные черточки — комплементарные пары оснований, «бечевки» — сахарофосфатный остов.

гидроксильную группу (ОН), а в РНК — выходящей для гидроксильные группы. Нуклеотиды соединены друг с другом фосфатами эфирами связей, при этом фосфатная группа 5' углеродного атома одного нуклеотида связана с 3' ОН группой следующего нуклеотида (рис. 3.2). На одном конце нуклеотидной цепи находится 3' ОН-группа (3' конец), а на другом — 5' фосфатная группа (5' конец).

В 1953 г. Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик, основываясь на данных рентгеноструктурного анализа кристаллов ДНК, пришли к выводу, что молекула ДНК состоит из двух полимерных цепей, образующих двойную спираль (рис. 3.3). Навстречу одна по другую полимерные цепи удерживаются вместе водородными связями, образующимися между комплементарными спариванными азотистыми основаниями (рис. 3.4). При этом аденин образует пару только с тиминем, а гуанин — с цитозином. Пары оснований А-Т стабилизируются двумя водородными свя-

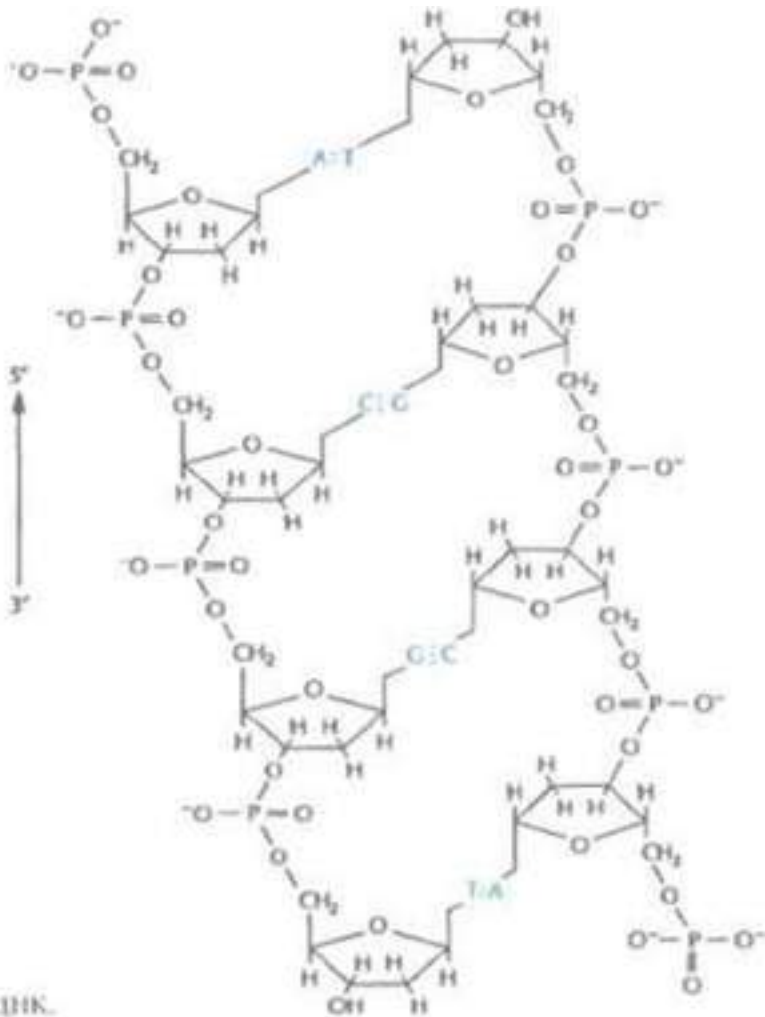


Рис. 3.4. Фрагмент двуцепочечной ДНК.

жии, а пары $G-C$ – тремя. Длина двуцепочечной ДНК обычно измеряется числом пар элементарных нуклеотидов (п.н.). Для молекул ДНК, состоящих из тысяч или миллионов пар нуклеотидов, единицы единицы т.е. п.н.п., соответственно. Например, ДНК хромосомы человека представляет собой одну длинную спираль длиной 163 м.п.п.

Структурно-функциональная часть молекулы, которая состоит из фосфатных групп и деоксирибозных остатков, соединенных 5'-3' фосфодиэфирными связями, образует как бы спинной хребтовой скелет, а пары оснований А-Т и G-C – ее ступеньки (рис. 3.4). Цепи молекулы ДНК ориентированы: одна из них имеет направление 5'→3', другая

3'→5' и соответствуют принципу комплементарности, если в одной из цепей имеется нуклеотидная последовательность 5'-TAGGCA-3', то в комплементарной цепи в этом месте выделены нуклеотидная последовательность 3'-ATCCGTA-5'. В этой статье для удобства чтения будет употребляться следующий образок:



В таком записи 5'-цепь всегда будет читать всегда располагается слева, а 3'-цепь – справа.

Нуклеотид, генетическая информация должен представлять двум основным требованиям: должен кодировать (реплицироваться) с высокой точностью и определять (интерпретировать) синтез

белковых молекул. Модель ДНК Уотсона–Крика тем самым отвечает всем требованиям Вилера–Шалера, согласно принципу комплементарности, каждая цепь ДНК может служить матрицей для образования новой комплементарной цепи. С началом работы, после одного цикла репликации образуются две дочерние молекулы, каждая из которых имеет такую же нуклеотидную последовательность, как исходная молекула ДНК. В итоге, нуклеотидная последовательность структуры (то есть цепь) всегда имеет комплементарную последовательность комплементарной ей белки.

Репликация

Согласно модели Уотсона–Крика, каждая цепь ДНК служит матрицей при синтезе новой комплементарной цепи, а последовательность осно-



Рис. 3.5. Структурная формула дезоксирибонуклеотидтрифосфата. Фосфатные группы обозначены буквами α, β, и γ. α-Фосфат связан с 5'-атомом углерода дезоксирибозы и при репликации участвует в образовании фосфоэфирной связи. β- и γ-фосфатные группы отщепляются в виде пирофосфата.

вание в синтезируемой (растущей) цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы. Каждая мономерная единица, присоединяющаяся в растущей цепи, находится в форме дезоксирибонуклеозид-5'.

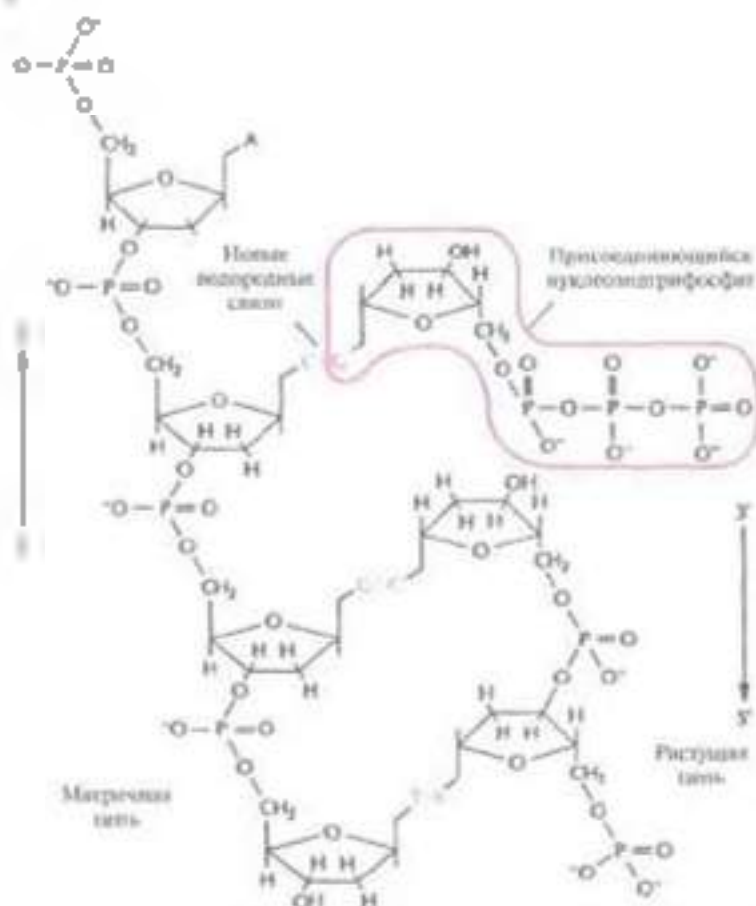


Рис. 3.6. Репликация ДНК. А (маркировка) очерчивает дезоксирибонуклеотидтрифосфат с комплементарным основанием ДНК-матрицы.

трифосфата (рис. 3.5); фосфатная группа, связанная с 5-углеродным атомом дезоксирибозы, обозначается буквой α, к ней присоединены β-фосфат и далее γ-фосфат. В ходе репликации β- и γ-фосфатные группы отщепляются в виде пирофосфата, а α-фосфатная группа связывается с 3'-ОН-группой соседнего нуклеотида растущей цепи (рис. 3.6). Синтез ДНК как у про-, так и у эукариот осуществляется при участии множества разных ферментов. Основную роль играет ДНК-полимераза, которая последовательно присоединяет нуклеотиды к растущей полинуклеотидной цепи и соответствует с принятыми конвенциями и катализирует образование фосфоэфирных связей.

У бактерий репликация ДНК начинается в одной точке молекулы, которая называется точкой начала (или сайтом инициации) репли-

кации (*ori*, от англ. origin). В ДНК эукариот имеется несколько таких сайтов, и репликация может начинаться нз каждого из них. Образующиеся при этом сегменты эукариотической ДНК сплетаются друг с другом с помощью особых ферментов. Кроме того, у эукариот есть специальный фермент теломераза, который дублирует концы (теломеры) хромосом.

Расшифровка и хранение информации: РНК в белке

Подобляющее большинство генов содержит в за кодированном виде информацию о синтезе белка. Белки – это биологические молекулы, участвующие практически во всех процессах протекающих в живых системах. Они служат катализаторами разнообразных биохимических ре-

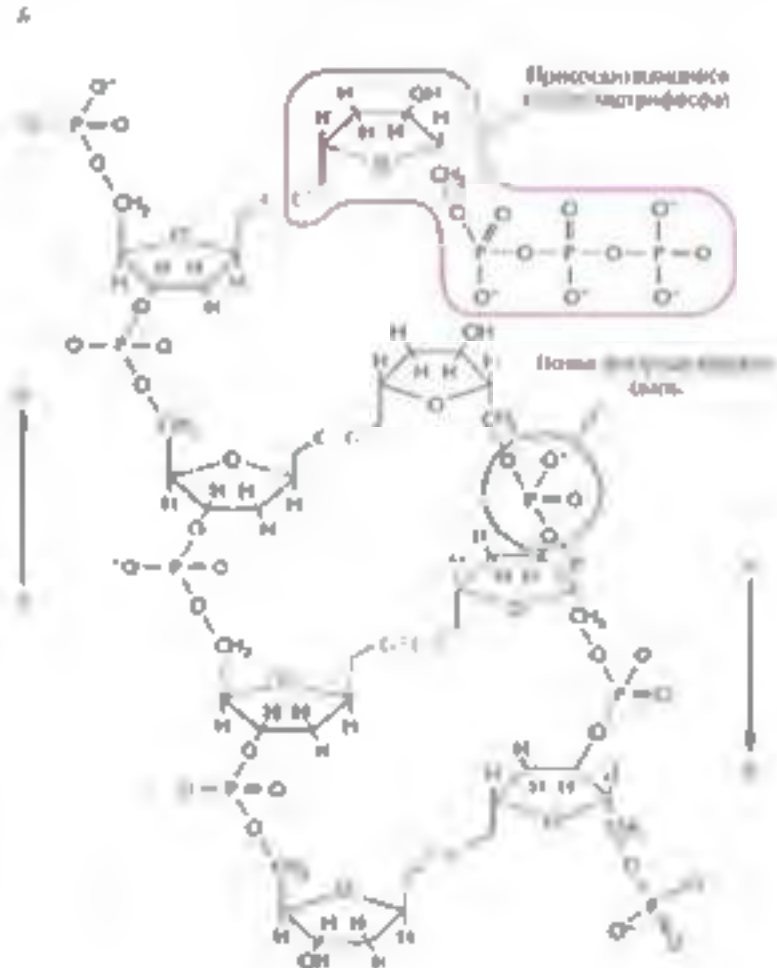


Рис. 3.6. (Продолжение) 6. Молекула фосфатной группой присоединяемого нуклеотида к 3'-гидроксильной группе растущей цепи образуется фосфоэфирная связь. К высвобождаемой спариванию отщепляется дезоксирибозу пирофосфат.

яний, осуществляя транспорт веществ во внутрь клеток и между клетками, регулируют проницаемость клеточной мембраны, также служат различными структурными элементами. Белки участвуют в осуществлении двигательных функций, обеспечивают защиту от инфекций и токсиков, регулируют синтез остальных генных продуктов. Основной структурной единицей белков являются аминокислоты. Все аминокислоты имеют сходное аминокислотное строение. К центральному атому углерода (α -углерод) присоединены атом водорода (H), аминогруппа (NH_2), карбоксильная группа (COO^-) и R-группа (боковая цепь) (рис. 3.7, А). Существует 20 разных боковых групп и следовательно 20 аминокислот. Например, в аминокислоте аланине R-группой является метильная группа (CH₃). В табл. 3.1 даны одно- и трехбуквенные обозначения аминокислот. Соединяясь друг с другом цепочными связями, аминокислоты образуют полипептидную цепь. Пептидная связь образуется между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой (рис. 3.7, Б). Первой аминокислотой белковой молекулы имеет свойство аминогруппа (N-конец), а последней – свободная карбоксильная группа (С-конец).

Для белковой молекулы варьирует от 40 до более 1000 аминокислотных остатков, при этом

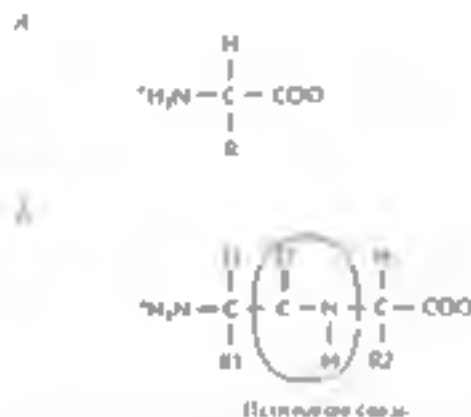


Рис. 3.7. Обобщенная структурная формула аминокислоты и обобщенное пептидное звено. А. Аминокислота R – боковая группа. Б. Образование пептидной связи между двумя аминокислотными остатками с боковыми группами R1 и R2

Таблица 3.1. Аминокислоты и их обозначения

Аминокислота	Трехбуквенные обозначения	Однобуквенные обозначения
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагин-сера метионин	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глютамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Триптофан	Trp	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

в зависимости от их последовательности и от аминокислотного состава молекулы белков принимают разную форму (конфигурацию, конформацию). Многие функционально активные белки состоят из двух и более полипептидных цепочек (субъединиц), как идентичных, так и несколько различающихся. Кроме того, многие белки, выполняя свое ключевое функционирование, образуют с белками сложные белковые комплексы, состоящие из множества разных субъединиц.

Важным «переводчиком кода» при передаче генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот являются рибонуклеотидные кислоты (РНК), которые синтезируются на определенных участках ДНК как на материнской, так и на дочерней молекуле. В совокупности с мРНК молекула РНК – это линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК в двух отношениях. Во-первых, мономерными в РНК являются рибозы, содержащие не одну, а две гидроксильные группы; они связаны с 2'- и 3- атомами углерода. Во-вторых, одним из четырех оснований в РНК является урацил (U), заменяющий место тимина. Благодаря этому молекулы РНК односторонние, хотя часто в них имеются вза-



Рис. 3.8. Вторичная структура глотетинической молекулы РНК. Климатический основной последовательности между собой водородными связями. Сахарофосфатный остов не изображен.

множественные участки, образующие различные структуры «шпильки» (рис. 3.8). Старинные оксиданты придают таким же образом, как и в ДНК, в исключительном том, что вместо пары А-Т образуются А-У.

Существуют три основных типа РНК: мРНК (мессенджер), рРНК (рибосомная) и тРНК (транспортная). Все они играют важную роль в процессе реализации генетической информации. Синтез РНК на ДНК впервые называ-

ется транскрипцией. У большинства прокариот транскрипция всей РНК осуществляется с помощью одной и той же РНК-полимеразы. У эукариот мРНК, рРНК и тРНК транскрибируются разными РНК-полимеразой.

Транскрипция по выводу сахара с рибозидной матрицей при синтезе РНК служит определенным участком одной из цепей ДНК. РНК-полимераза копирует этот участок, включив в себя соседние друг с другом с помощью 3'-5' фосфодиэфирных связей рибонуклеотиды, в соответствии с правилами комплементарности (рис. 3.9). В ходе транскрипции полимеризация нуклеотидов РНК осуществляется от ДНК, и движущаяся справа ДНК восстанавливается. Чтобы обеспечить транскрипцию участка определенной ДНК, должны существовать некие специфические последовательности, указывающие, где начинается (иницируется) транскрипция и где она останавливается (терминируется). Специальный сигнал обычно располагается перед кодирующей последовательностью, а сигнал терминации — после из нее. Участок ДНК, предшествующий транскрибируемому гену, называется 5'-флансирующей последовательностью, а расположенный за ним — 3'-флансирующей.

С молекулярной точки зрения ген представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность, транскрибируемую в РНК. Однако в более близком транскрибируемых последовательностей ДНК существуют так называемые структурные гены, на которых синтезируется мРНК. Конечным продуктом структурного гена является белок. У прокариот структурный ген представляет собой непрерывный участок молекулы ДНК. Транскрипция начинается со связывания РНК-полимеразы с промотором, и далее последовательно копируется весь структурный ген (кодирующая область) от первого нуклеотида до последнего с образованием функциональной мРНК (рис. 3.10). У эукари-



Рис. 3.9. Структурные и кодирующие транскрипции. Структурный участок с левой стороны

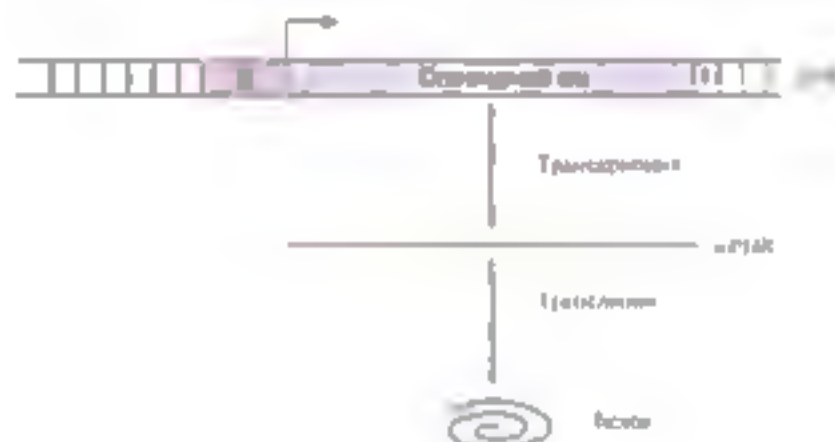


Рис. 3.10. Структурное и функциональное представление структурного гена. Указаны промотор (P), сайт иницииции транскрипции и ее направление (вертикальная стрелка), область терминации транскрипции, увеличенная РНК-полимеризом (I). Сначала на ДНК она не является сплайсуете мРНК (сплайсинг), а затем осуществляется синтез белковой цепи (трансляция)

от большинства структурных генов состоит из нескольких дискретных кодирующих областей (экзонов), разделенных некодирующими областями (интронами). По завершении транскрипции эукариотический структурный ген интронно вырезается из первичного продукта транскрипции с помощью ферментов, а экзоны соединяются друг с другом «торец в торец» (сплайсинг) с образованием функциональной мРНК (рис. 3.11 и 3.12). Обычно длина экзона составляет от 150 до 200 нуклеотидов, а длина интрона варьирует от 40 до 10 000 нуклеотидов. Очень не-

многие эукариотические структурные гены вообще не имеют интронов. Иногда сплайсинг мРНК может осуществляться альтернативным образом. Например, в мышечной ткани (сцистозомии) мРНК может образовываться в результате сплайсинга всех экзона (первичный) транскрипта, а в другой какой-то ткани будет интрон вместе с флуалсирующими его интронами и сформируется другая функциональная мРНК. Благодаря альтернативному сплайсингу в разных тканях могут образовываться разные продукты одного и того же структурного гена (рис. 3.12).

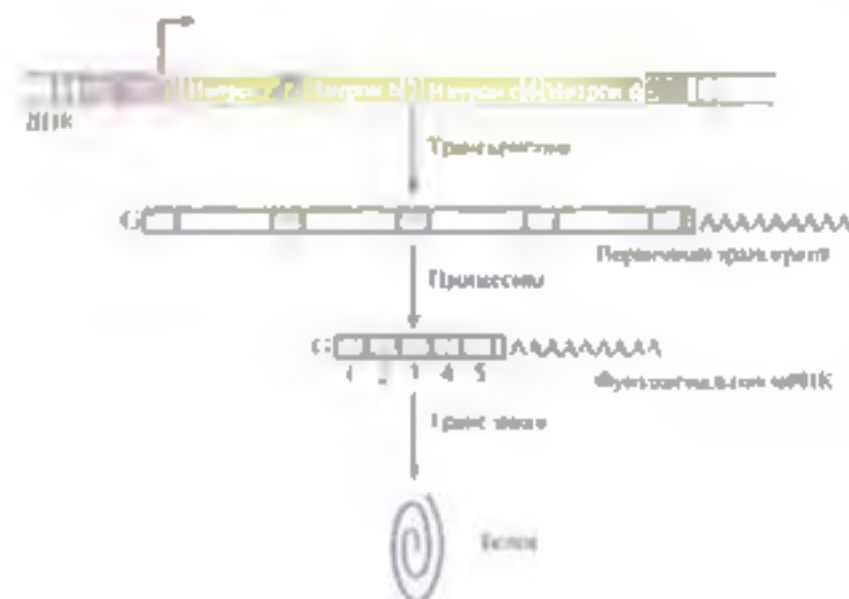


Рис. 3.11. Сchematic representation of a eukaryotic structural gene. Indicated promoter (P), 5' cap, initiation site of transcription and its direction (vertical arrow), termination region (horizontal arrow), enlarged RNA polymerase (I) 1-5 - exons, a-d - introns. Primary transcript splicing (pU(A)-cap) to 5' end of the primary transcript nucleotide G (cap) on 5' end. After transcription introns are removed from the primary transcript (splicing), and the resulting functional mRNA is translated into protein (translation)

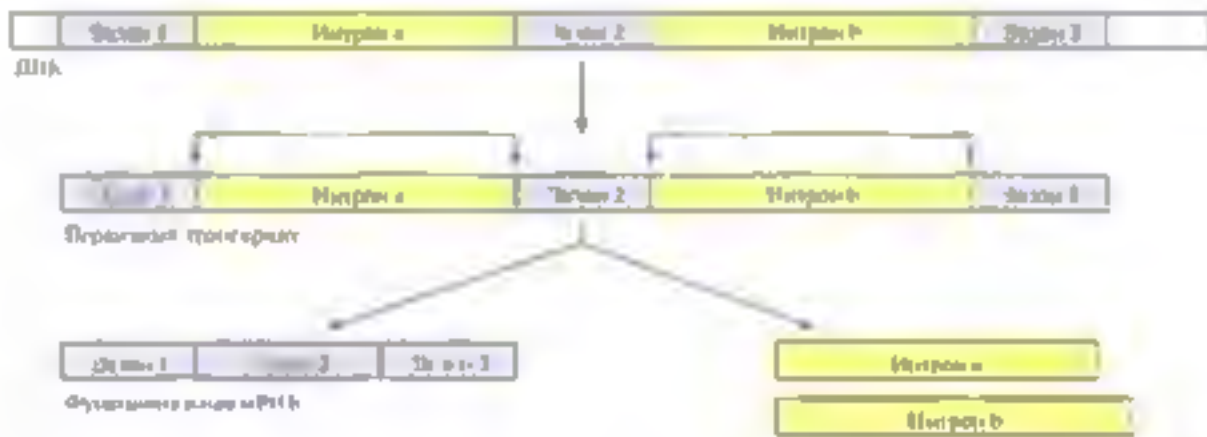


Рис. 3.12. Сплайсинг первичного транскрипта у эукариот. Угловыми стрелками указаны места соединения экзонов 1, 2 и 3 после удаления интронов а и б

В эукариот функционирование клетки (причем 3–5% суммарной РНК приходится на долю мРНК, 90% – на долю рРНК и 4% – на долю тРНК) мРНК может быть представлена разными различными типами молекул, в рРНК есть два типа более крупных рРНК образует с белками рибосом, контролируя размер, называемый большой рибосомной субъединицей, а рРНК меньшего размера – комплекс, называемый малой рибосомной субъединицей. Во время синтеза белком субъединицы объединяются с образующимся рибосо-

мой. У эукариот обе рибосомные субъединицы крупнее, чем у прокариот.

Пятью тысячью размером, в клетке, активно синтезирующей белки, содержится до 60 различных видов тРНК, рРНК – это рибонуклеиновые кислоты молекулы длиной от 75 до 93 нуклеотидов. И если известны (особенно плазмиды) и белки, то их учет, старинно ведется между собой (рис. 1.8), и их взаимодействие с белками в структуре и образовании структуры, (наконец, и в букву 1 (рис. 1.14) С помощью специфических ферментов (лигазы для рРНК-сплитинга) и 3'-хлора тРНК

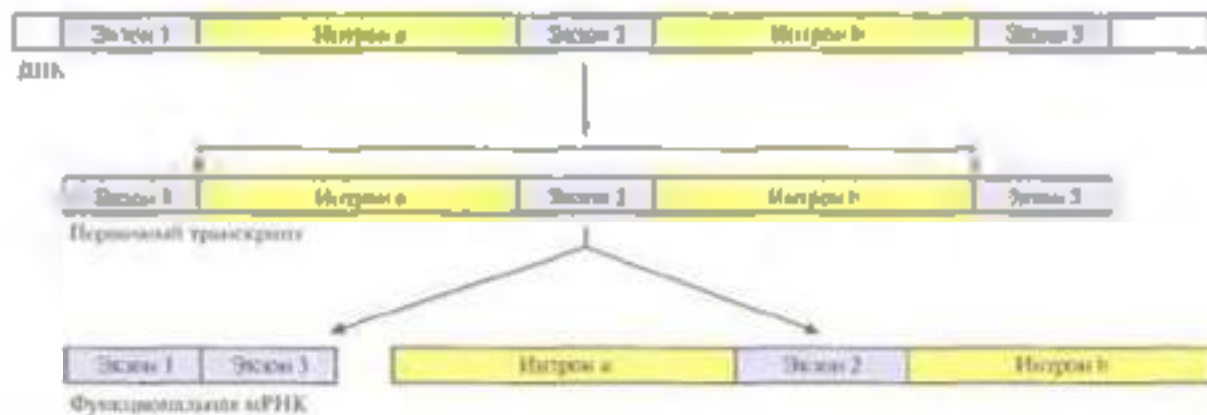


Рис. 3.13. Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта у эукариот. < (средняя угловая стрелка) указывает место соединения экзона 2 с экзонами 1 и 3 после удаления интронов. Экзон 2, функционирующий интроном 1 и 2, вырезается из первичного транскрипта, в экзонах 1 и 3 соединяются с образующимся функциональным эукариотической мРНК

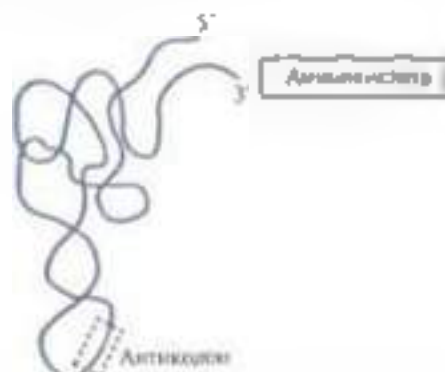


Рис. 3.14. Конформация тРНК, «шпурованной» аминокислотой. Шпуровой терминусацией – остатком.

применяются соответствующие аминокислоты. Так, фермент аргинил-тРНК-синтетазы присоединяет к молекуле тРНК^{Arg} аминокислоту аргинин. Для каждой из двадцати аминокислот, из которых состоит вся белок, существует по крайней мере одна специфическая тРНК. На другом конце молекулы тРНК размещены выходящие теломости из трех нуклеотидов, которые называются антикодоном. Они распознают специфический кодон в мРНК и определяют, какая именно аминокислота будет присоединена к растущей полипептидной цепи.

Трансляция

Трансляция осуществляется при участии мРНК, рибосом, тРНК, «шпурованных» соответствующими аминокислотами, рибосом и молекулами белковых факторов, обеспечивающих инициацию, элонгацию и терминацию синтеза полипептидной цепи. Трансляция в прокариотических клетках иницируется формилметиониновой тРНК, которая так и называется – тРНК^{Met} (Met – метионин). При участии белковых факторов антикодон 3'-UAC-5' инициаторной тРНК^{Met} (Met – метионин) связывается с кодоном 5'-AUG-3' мРНК, образуя комплекс с малой рибосомной субъединицей. Пиллакелл другая тРНК соединиться с этим комплексом не может. В свою очередь, связывание мРНК с малой рибосомной субъединицей осуществляется посредством образования гидрофобных связей между нукле-

отидными частями пиллакеллы (нуклеотиды аденин-Шпакелл-Дателарно), которая расположена между 5'-концом мРНК, и комплементарной 3'-концевой последовательностью рРНК, связанной с малой рибосомной субъединицей К комплексу Met-тРНК^{Met}-мРНК-малой

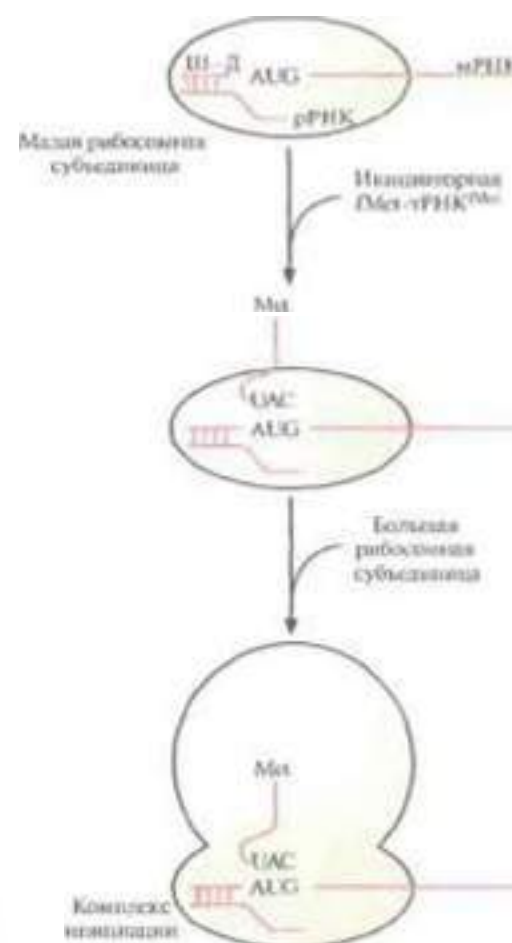


Рис. 3.15. Инициацию трансляции в прокариотической клетке. Последовательность Шпакелл-Дателарно (ШД), находящаяся между 5'-концом мРНК, связывается с комплементарной 3'-концевой последовательностью рРНК, образующей комплекс с малой рибосомной субъединицей Антикодон (UAC) инициаторной Met-тРНК^{Met} связывается со стартовым кодоном (AUG) мРНК. К образующемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации. Аминокислота метионина, связанная с инициаторной тРНК, формирует пиллакеллу (ПФ) (на рисунке не изображено). Пиллакелл трансляции формирует пиллакеллу и является ее белковой частью.

субъединиц присоединяется белком субъединицы, и образуется инициаторный комплекс (комплекс инициатора) (рис. 3.15).

У эукариот трансляция инициируется сложным специфическим «нагрузочным» инициаторным tРНК (Met-tРНК^{Met}) и фактором инициации с малой рибосомной субъединицей. Затем мРНК прикрепляется своим 5'-концом к комплексу tРНК-малая рибосомная субъединица, и комплекс присоединяется по мРНК до стартового кода (AUG). Далее инициаторный UAC инициаторной Met-tРНК^{Met} связывается с кодоном AUG мРНК. К комплексу присоединяется белком рибосомная субъединица, и образуется инициаторный комплекс (рис. 3.16).

Этапы инициации и терминации трансляции в эукариотах многоэтапны. Процесс инициации включает «нагрузочные» реакции синтеза между соседними аминокислотами, при этом очередность (последовательность) аминокислот определяется очередностью кодонов в мРНК (рис. 3.17). Рассмотрим процесс более подробно. После образования инициаторного комплекса кодон в молекуле мРНК, следующий за кодоном AUG, связывается с комплементарным ему антикодоном соответствующей tРНК, определяя таким образом, какой из нагруженных tРНК присоединится к рибозиме (ненагруженные tРНК не способны к рибозиму). Если вторым кодоном в мРНК оказывается CUC, то следующей в рибосомному комплексу прикрепляется несущая лейцин tРНК с антикодоном 3'-GAG-5'. Когда эта tРНК оказывается на месте, между карбоксильной группой аминокислоты и аминной группой аминокислоты ферментативной активностью, присущей белкам субъединицы, образуется пептидная связь, при этом лейцин отделяется от тРНК, и последняя отделяется от рибосомы. Комплекс метионин-лейцин-tРНК^{Met} «протискивается» через рибосому (рис. выше), так что следующей кодон мРНК может связаться с нагруженной tРНК, несущей соответствующий аминокислоты. Если третьим кодоном мРНК является UUU, то следующей аминокислотой в растущей пептидоцепочке будет фенилаланин, соответствующий рибозиме tРНК с антикодоном AAA. Когда эта tРНК окажется на месте, между карбоксильными группами лейцина и аминной

группой фенилаланина образуется пептидная связь. tРНК^{Met} отделяется от рибосомы, тРНК^{Met} также трансферация вестиды-tРНК^{Met} (tРНК с присоединенной к ней растущей пептидоцепочкой), и следующей кодон мРНК сможет связаться с антикодоном соответствующей нагруженной tРНК.

Эти события - самоначаемое нагружение tРНК с мРНК образуют комплексаторному стартовому

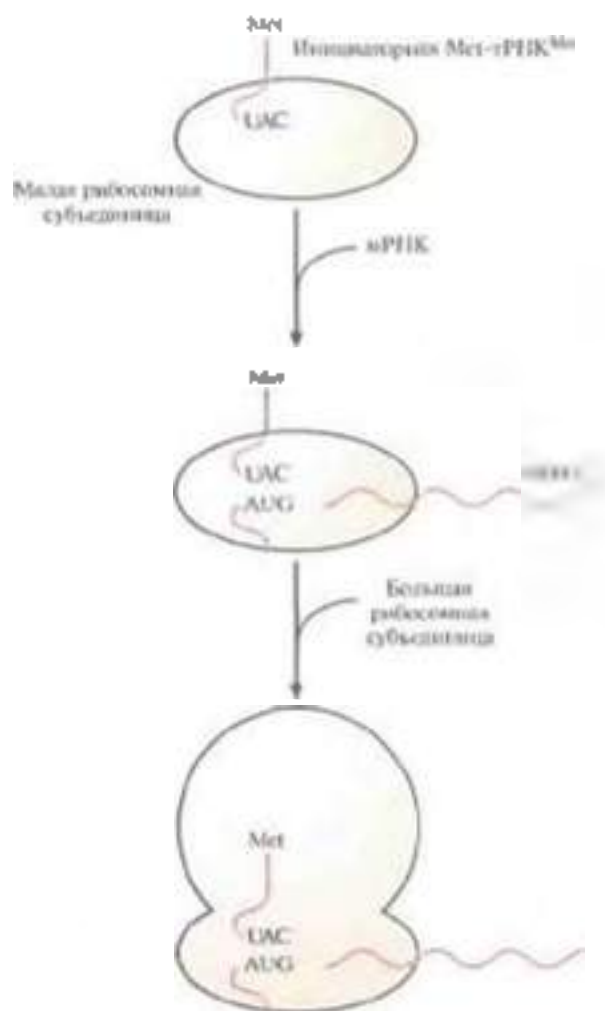


Рис. 3.16 Инициация трансляции в эукариотической клетке. Малая рибосомная субъединица связывается с инициаторной tРНК, «нагруженной» метионином (Met-tРНК^{Met}), комплекс присоединяется к мРНК, антикодон UAC инициаторной tРНК не связывается со стартовым кодом AUG мРНК. Далее к комплексу мРНК-tРНК-малая субъединица присоединяется большая субъединица и образуется комплекс инициатора.

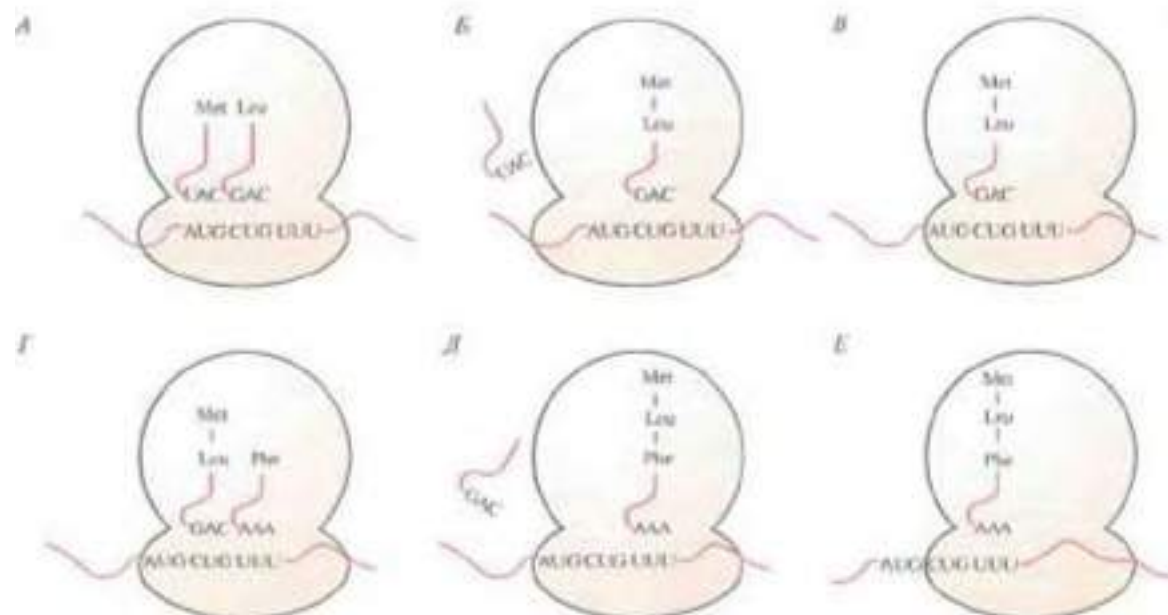


Рис. 2.17. Элонгация аминокислотной цепи. А. Первый элонг (СUG) в мРНК связывается с антикодином (СAC | Leu) тРНК^{Leu}. Б. Метилметион образует пептидную связь с лейцином, доставленным тРНК^{Leu}, освобождаясь от аминокислоты метилметионина (тРНК освобождается). В. Трансляция вымывает старую тРНК-мРНК с выходящим концом цепи, освобождая кодона (AUG). Г. Третий кодон (UUU) связывается с антикодом AAA Phe тРНК^{Phe}. Д. Лейцин образует пептидную связь с фенилаланином, доставленным тРНК^{Phe}, освобождаясь от тРНК^{Leu} с метилметионом от рибосомы. Е. Третий кодон вымывает старую тРНК-мРНК с метилметионином сходящим концом цепи.

тот же кодон с антикодином, образование пептидной связи, освобождение «разрушенной» тРНК. Трансляция — процесс длительный, пока не соединятся друг с другом все аминокислоты, закодированные в мРНК. Трансляция происходит в направлении 5—3' со скоростью примерно 15 аминокислот в секунду. Когда 5'-конец мРНК мы связываемся из рибосомы, она может связаться с другой такой же рибосомой, так что одна молекула мРНК может одновременно транслироваться несколькими рибосомами.

Элонгация прерывается до тех пор, пока рибосома не дойдет до кодона UAA, UAG или UGA (стоп-коды, терминирующие коды) (рис. 2.18). В клетке отсутствует тРНК с антикодином, комплементарным стоповым термину. Из-за этого белки-факторы (экзобластим) (терминация). При наличии фактора экзобластим с рибосомой взаимодействуют (факторы) стоп и между последней тРНК и аминокислотой, свободная тРНК, комплементарная стопу мРНК отцепляются от рибосомы. Рибосома высвобождает на субстрате, в котором могут вновь участвовать в трансляции.

После трансляции многие полипептиды подвержены различным модификациям. У большинства из них отщепляется N-концевой остаток, так что N-концевым остатком становится второй аминокислота. У эукариот (примочка) на N-конце (примочка) протрасли некоторых белков, когда интронизация цепи прекращается в определенных сайтах с образованием более коротких белковых молекул — неспецифических функций. В некоторых случаях, особенно в эукариотических клетках, в определенных аминокислотах (фенилаланином) путем присоединения фосфорной группы, аминокислоты, углерода или других низкомолекулярных соединений. В результате тех химических модификаций образуются белки, выполняющие в клетке специфические функции.

Генетический словарь состоит из 64 кодонов. Три из них — это стоп-коды, в один (AUG) — стартовый кодон (табл. 2.2), кодирующий еще и аминокислоту метионин. Когда кодон AUG находится на 5'-конце молекулы мРНК, то он связывается другой тРНК (Met-тРНК^{Met}), с которой взаимодействует

Таблица 3.2. Генетический код и частота использования разных аллилов в генном *t* код человека

Кодон	Алиловый аллель	Частота аллилов в аллилах		Кодон	Алиловый аллель	Частота аллилов в аллилах	
		<i>t</i> код	человек			<i>t</i> код	человек
GGG	Глицин	0,17	0,23	UAG	Стой	0,09	0,07
CGA	Гистидин	0,09	0,26	UAA	Стой	0,62	0,72
GGU	Глицин	0,38	0,18	UAG	Тирозин	0,51	0,42
GGC	Глицин	0,40	0,53	UAC	Тирозин	0,47	0,38
GAG	Глутаминовая кислота	0,33	0,39	ULU	Фенилаланин	0,31	0,41
GAA	Глутаминовая кислота	0,30	0,41	UIC	Фенилаланин	0,49	0,37
GAL	Аспарагиновая кислота	0,59	0,44	UCU	Серин	0,17	0,06
GAC	Аспарагиновая кислота	0,38	0,56	UCA	Серин	0,17	0,15
GUG	Валин	0,14	0,40	UCC	Серин	0,19	0,17
GUA	Валин	0,17	0,19	UCU	Серин	0,17	0,21
GUU	Валин	0,29	0,17	AGU	Серин	0,17	0,14
GUC	Валин	0,30	0,25	AUA	Серин	0,27	0,25
GCG	Аланин	0,34	0,19	CCG	Аргинин	0,06	0,19
GCA	Аланин	0,33	0,22	UCA	Аргинин	0,63	0,10
GCU	Аланин	0,19	0,28	CGU	Аргинин	0,43	0,40
GCC	Аланин	0,25	0,46	CCG	Аргинин	0,13	0,19
AAG	Лейцин	0,24	0,60	AGG	Аргинин	0,03	0,22
AAA	Лейцин	0,36	0,40	AGA	Аргинин	0,04	0,21
AAC	Аспарагин	0,19	0,44	CAC	Гистидин	0,69	0,15
AAT	Аспарагин	0,63	0,36	CAA	Гистидин	0,31	0,37
AUG	Метионин, старт	1,00	1,00	CAU	Гистидин	0,32	0,40
AUA	Изолейцин	0,07	0,14	CAC	Гистидин	0,48	0,36
AUA	Изолейцин	0,47	0,35	CUG	Лейцин	0,33	0,43
AUX	Изолейцин	0,46	0,51	CUA	Лейцин	0,01	0,40
ACG	Тирозин	0,23	0,17	CUU	Лейцин	0,10	0,12
AGA	Тирозин	0,12	0,27	CUA	Лейцин	0,10	0,20
AUU	Тирозин	0,21	0,23	ULG	Лейцин	0,11	0,12
AUX	Тирозин	0,43	0,38	ULA	Лейцин	0,11	0,46
UCG	Триптофан	1,00	1,00	UCU	Пролин	0,35	0,11
UCU	Цистеин	0,13	0,42	CUA	Пролин	0,20	0,27
UCU	Цистеин	0,57	0,58	CCU	Пролин	0,16	0,29
UCA	Стой	0,30	0,61	CCU	Пролин	0,30	0,13

факторизации) метионин. Аминокислота триптофан кодируется всего одним кодоном (UGG), остальные аминокислоты, за которыми состоят буквы, — по крайней мере двумя. Чаще четырьмя, а иногда и шестью кодонами. Например, для лейцина существует шесть кодонов UUA, UUG, CUU, CUC, CUA и CUG. Специфические кодоны используются различными организмами с разной частотой. Из четырех кодонов для лейцина GUA используется в структурных генах человека в 25% случаев, в *E. coli* — в 9%. Такая же ситуация наблюдается и для стоп-кодонов. Так, у человека частота использования кодонов UAA, UAG и UGA составляет 0,22, 0,17 и 0,61 соответственно, а у *E. coli* — 0,62, 0,09 и 0,30. Несмотря на все эти различия, ге-

нетичальки код у всех организмов, за редким исключением, одинаков.

Регуляция транскрипции у бактерий

Все процессы, происходящие в бактериальной клетке, — образование аминокислот, нуклеотидов и других важных метаболитов, репликация, транскрипция, трансляция, каталаза, циклолиз, образование энергии, реакции на окисление полезных веществ — требуют участия белков. Однако энергия и ресурсы клетки не хватает для одновременного осуществления транскрипции и трансляции (экспрессии) всех структурных генов. Поэтому активно экспрессируются толь-

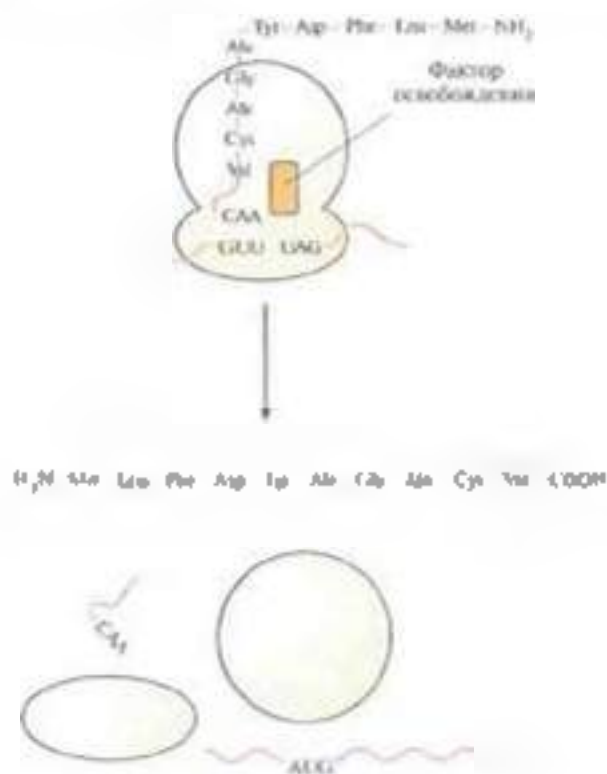


Рис. 3.18. Сравнение трансляции. Со стороны эукариот (CAA) это является фактор освобождения, и трансляция останавливается. Хищнически сам в явную последнюю тРНК и минирепликация (если разрываться, освобождая тРНК, мРНК и готовый пептид) это происходит в виде в рибосоме, и инкапсулирован высвобождается из субъединицы

но не гены, которые кодируют белки, поддерживающие основные клеточные функции, и транскрипция структурных генов регулируется. Когда у клетки возникает потребность в каком-то белке (белках), то инициируется (включается) транскрипция соответствующей структурной гены (гена), а когда такая потребность исчезает, транскрипция останавливается.

Часто у бактерий белки одного метаболического пути кодируются смежными структурными генами. Необходимость последовательности, в которой зашифрованы более поздних белков, называется опероном. Обычно оперон называется под названием единичного промотора, и при его транскрипции образуются одна длинная молекула мРНК, кодирующая несколько белков. При

присоединении тРНК, а второй стоп-кодон исключает последовательность, кодирующей один белок, соответствует со стартом-связи с тем последующий белок, также образуется набор дискретных белков.

В большинстве структурных генов E' со стороны для сайта связывания для РНК-полимеразы. Один из них обычно представляет собой нуклеотидную последовательность:

TATAAT

ATATTA

(TATA-бокс, или бокс Прибинова), а другой -

TTGAC

AACTG.

TATA-бокс и последовательность TTGAC располагаются на 10 (область -10) и 35 (область -35) нуклеотидов до сайта инициирования транскрипции соответственно (нуклеотид +1) (рис. 3.19). Обычно на участке между TATA-боксом и нуклеотидом +1 по меньшей мере, будет ли присутствовать транскрипция данного оперона. В зависимости от способа регуляции транскрипции оперона этот участок используется оператор или активатором.

Для включения и выключения работы оперона в ходе эволюции сформировались многочисленные регуляторные системы. Например, с операторной областью может быть связан регуляторный белок, так называемый репрессор; он может взаимодействовать с РНК-полимеразой или с молекулой ДНК, и транскрипция блокируется (рис. 3.20). Однако если с репрессором взаимодействует также индуктор, то его конформация изменится таким образом, что его связывание с операторной областью станет невозможным, и транскрипция возобновится. Обычно индуктор (или инактиватор клеточными ферментами). Когда его конформация стабилизируется, репрессор связывается с операторной областью, и транскрипция прекращается. Операторной областью специфичен для каждого оперона, а индуктор взаимодействует только с определенным репрессором.

В качестве иллюстрации рассмотрим такой пример. Предположим, что клетка способна использовать определенным сахар. Тогда синтез ферментов, расщепляющих этот сахар, будет бесполезной тратой клеточных ресурсов, если он отсутствует в среде. С другой стороны, если этот сахар имеется в достаточном количестве и является единственным источником углерода, то ферменты, отвечающие за его утилизацию

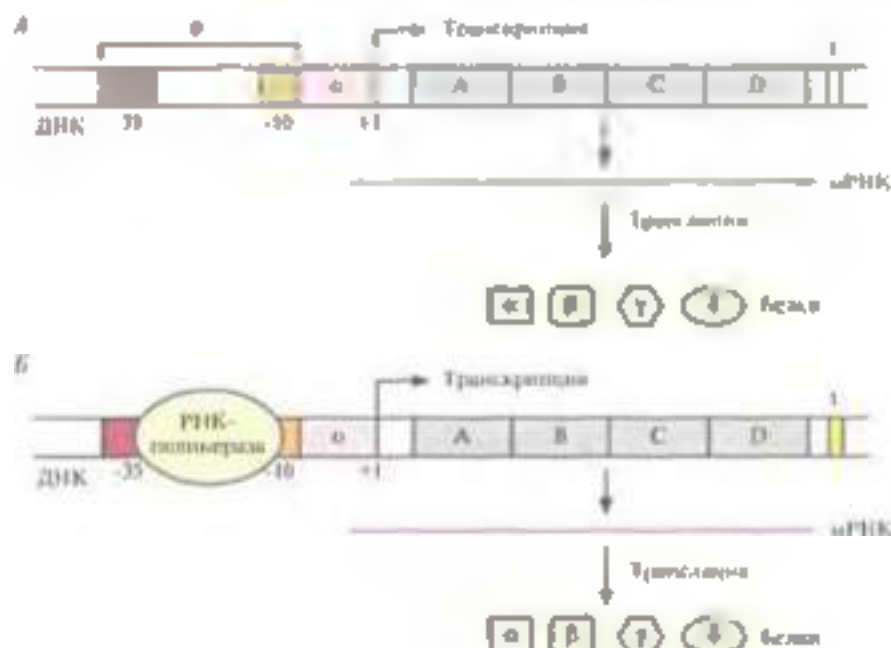


Рис. 3.19. Тренинг-оперон в бактериальной клетке: А Структурные гены (А, В, С и D) участка наследия или транскрипционного оператора (O) и промотора (P) РНК-полимераза связывается с участком, находящимся на расстоянии 10(-10) и 35(-35) нм от сайта инициации транскрипции (+1). Т – Стоп-сайт, ответственный за окончание транскрипции. α , β , γ и δ – белки, продукты генов А, В, С, D. В То же, что и на рис. А, но здесь уже связавшиеся РНК-полимераза с промоторной областью

клеткой, становится совершенно необходимыми В этом случае сайт действует как ингибитор, препятствуя связыванию репрессора с операторными участками и таким образом обеспечивая транскрипцию оперона и синтез ферментов.

При истощении запасов сахара в среде репрессор связывается с операторными участками, и транскрипция оперона прекращается.

Нормальным состоянием других оперонов может быть состояние, при котором ширинка

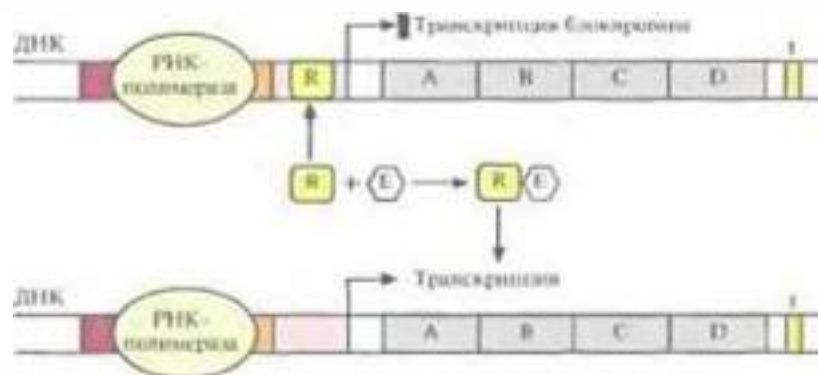


Рис. 3.20. В отсутствие транскрипция функции ферментов Репрессор (R) связывается с оператором и блокирует транскрипцию. Связывание ингибитора (E) с репрессором изменяет его конформацию, и фермент не может связаться с оператором РНК-полимераза беспрепятственно перемещается вдоль участка ДНК, осуществляя транскрипцию

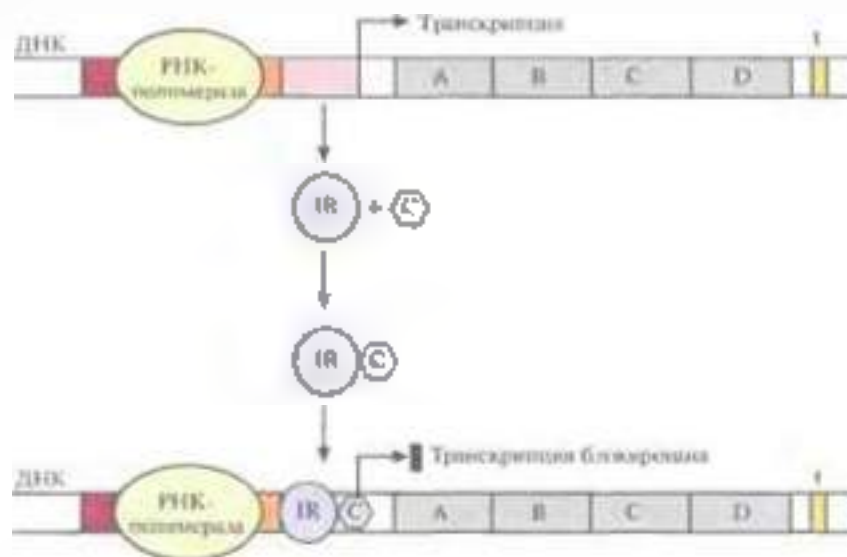


Рис. 3.21. Выключение транскрипции факторальному оператору С с помощью коррепрессора (С) с неактивным репрессором (IR) изменяет конформацию комплекса. Комплекс коррепрессор-репрессор (С-IR) связывается с оператором и блокирует транскрипцию

ластен из транскрипции, поскольку репрессорный белок неактивен. В том случае специфичекий индуктор (активатор), связываясь с неактивным репрессором, вызывает в нем такие конформационные изменения, которые обеспечивают связывание комплекса с операторным участком, и транскрипция оперона включается (рис. 3.22). Сам по себе репрессор не способен связываться с оператором, поэтому при

участии индуктора конформация коррепрессора транскрипция индуцируется.

Регуляция транскрипции с помощью репрессора называется ингибиторной. Если же система регуляции направлена на повышение скорости транскрипции, то это называется положительной. Рассмотрим теперь этот процесс. Белок-активатор связывается с участком между TATA-боксом и сайтом иницииции транскрипции. При этом он не

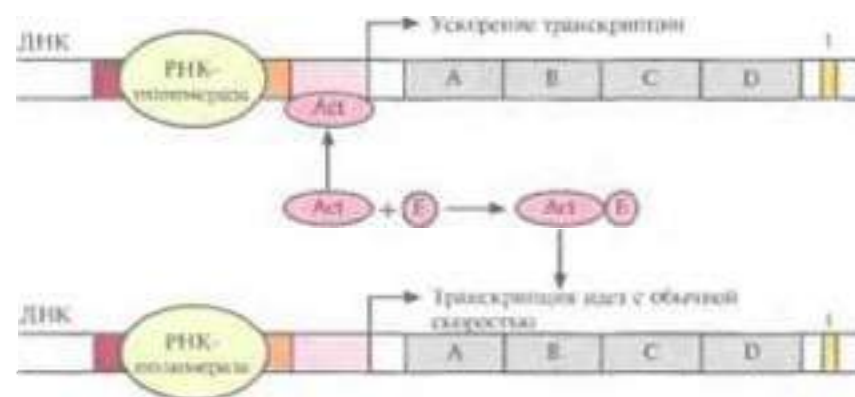


Рис. 3.22. Изменение скорости транскрипции. Активатор (Act) связан с участком между TATA-боксом и сайтом иницииции транскрипции, скорость транскрипции повышается. Индуктор (E) связывается с активатором и ассоциирует его с оператором с ДНК; скорость транскрипции увеличивается



Рис. 3.23. Регуляторные элементы структурного гена эукариот. Знаки — при чтении означают, что эти элементы находятся в молекуле ДНК слева от сайта инициации (транскрипции) (+1). Стрелка — направление транскрипции. Выделенные регуляторные элементы и их пример длины без учета точек запятой

специфично и происходит. Но так или иначе регуляция транскрипции у эукариот осуществляется с помощью специфических белков — факторов транскрипции. Многие из них связываются непосредственно с нуклеотидной последовательностью длиной менее 10 н. (обычно от 1 до 6 н.б.н.), являемой регуляторным элементом. В отличие от прокариот у эукариот от оперона и большинства его частей отсутствуют, т. е. каждый эукариотический структурный ген имеет свой собственный набор регуляторных элементов. Существенную роль в регуляции транскрипции у эукариот, помимо описанной выше, играют также белок-белковые взаимодействия.

Несмотря на индивидуальность набора регуляторных элементов у структурных генов эукариот, каждая из них имеет пропорциональный участок (TATA-бокс, или бокс Хинтесса) из определенной нуклеотидной последовательности: TATA; последовательность CCAAT (CAAT бокс); участок из повторяющихся динуклеотидов GC (GC-бокс). Эти элементы находятся на расстоянии 25, 75 и 90 п.н. от сайта инициации соответственно (рис. 3.23). Транскрипция структурного гена эукариот начинается со связывания с TATA-боксом фактора транскрипции II (TFII), который представляет собой комплекс по крайней мере из 14 белков. Затем с TFII и участками ДНК, прилегающими к TATA-боксу, связываются другие факторы транскрипции, т. е. факторы, со всем этим транскрипционным комплексом связывается РНК-полимераза II. Затем при участии дополнительных факторов происходит инициация транскрипции в точке +1 (рис. 3.24). Ясно, что если последовательность TATA отсутствует или существенно изменена,

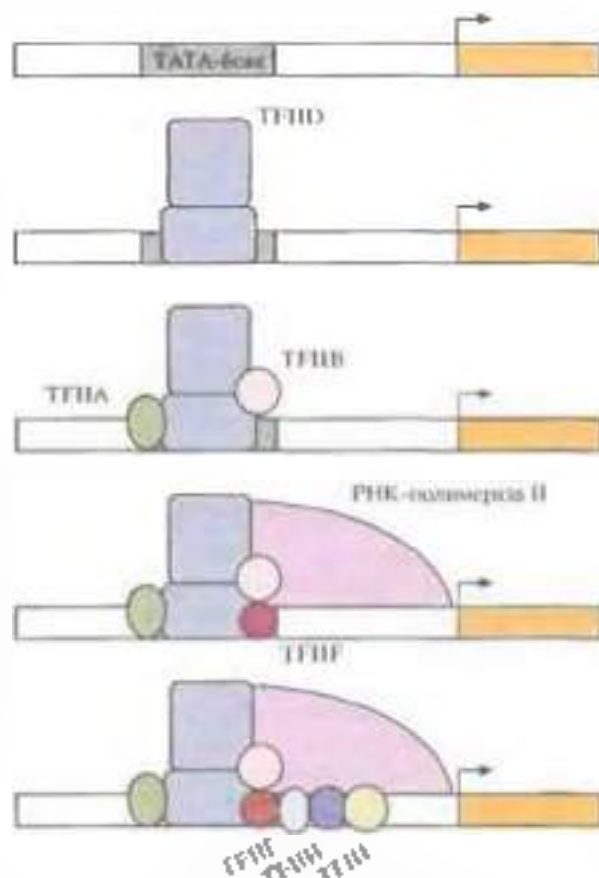


Рис. 3.24. Инициация транскрипции структурного гена эукариот. Сначала фактор транскрипции (TFII) связывается с TATA-боксом, затем происходит приопределение аркти фактора транскрипции и РНК-полимеразы II и, наконец, белков-сопутчиков фактора, инициирующих транскрипцию (стрелка — направление транскрипции).

то транскрипция структурного гена становится невозможной. Идентифицированы также факторы транскрипции, специфичные для регуляторных элементов CCAAT и GC, но пока неясно, как ДНК-белковые взаимодействия могут влиять в этом случае на эффективность транскрипции, если элементы расположены на расстоянии более 75 н.н. от сайта инициации. Кроме того, на расстоянии сотен и даже тысяч пар оснований от сайта инициации находится так называемая «железнодорожная» последовательность, которая многократно повышает скорость транскрипции структурных генов. По-видимому,

сближение удаленных регуляторных элементов и соответствующего структурного гена происходит при упаковке хромосомной ДНК. Кроме того, факторы транскрипции, которые связываются с определенными последовательностями регуляторных элементов, могут образовывать цепочки, соединяющую удаленные друг от друга сайты.

Некоторые репродуцируемые (некодирующие) гены активируются каждым сайтом, который функционирует как бы своеобразным «некодующим» сайтом, например полиинициатор температуры или синтезом гормона (гормон, инетрин и др.), связывается с рецепторами специфически клеток, облегчая этим его проникновение в клетку. Как правило в клетке, гормон не связывается с одним из ключевых белков и изменяет его конфигурацию. В таком измененном состоянии белок проникает в ядро и связывается со специфическим регуляторным элементом, который инициирует транскрипцию соответствующего гена.

Существуют также белки, которые, взаимодействуя с регуляторными элементами, блокируют транскрипцию. Например, известен класс белков подавляющих (примерно 18), активирующая транскрипция генов только в нервной клетке. Каждый из этих белков имеет регуляторный элемент из 24 п.н., называющийся «лесенка» (уровень) сайта +1; он обозначается NRSE (от англ. *neuron-responsive element*). Во всех клетках, кроме нервной, синтезируется NRSE-фактор (от англ. *neuron-responsive element factor*), который связывается с NRSE и блокирует транскрипцию соответствующего гена. В нервной NRSE не синтезируется, и упомянутые гены активно транскрибируются.

Итак, регуляция транскрипции у эукариот — это очень сложный процесс. Структурный ген может иметь множество регуляторных элементов, которые активируются специфическими стимулами в клетках разного типа и разных формах деятельности клетки. Однако некоторые структурные гены находятся под контролем уникального фактора транскрипции. Специфические белки могут взаимодействовать с определенными регуляторными элементами и блокировать транскрипцию или связываться со всем транскрипционным комплексом еще до инициации транскрипции или во время ее окончания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекула ДНК состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль. Из мономерной единицы является нуклеотид, который состоит из азотистого основания, дезоксирибозы и фосфатной группы. Соседние нуклеотиды в цепи связаны функцией «фишты» связями, а цепи удерживаются вместе с помощью водородных связей, образующихся между комплементарными основаниями. При этом каждая образует водородные связи только с одним, другим — только с цитозином. Процесс удаления ДНК называется репликацией. В нем участвуют множество различных белков, прежде всего ДНК-полимеразы. Каждая из цепей ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной цепи. Комплементарности оснований противоположных цепей гарантирует идентичность дочерних молекул ДНК.

Ключевую роль в осуществлении всей биологической функции играют белки. Белковая молекула — это полипептид, состоящий из аминокислот, которые соединены друг с другом пептидными связями. Последовательность аминокислот в белке определяется последовательностью нуклеотидов в ДНК. В синтезе белков участвуют молекулы РНК (мРНК, рРНК и тРНК), различные ферменты и белковые факторы. Все РНК синтезируются на ДНК как на матрице; этот процесс называется транскрипцией. Цепляемость транскрипции, т. е. ее начало и завершение в нужных местах, обеспечивается специфическими нуклеотидными последовательностями в ДНК и белковыми факторами. У эукариот большинство структурных генов состоит из кодирующих (экзонов) и некодирующих (интронов) участков. Первичные транскрипты содержат все это, так же, как и другие. Однако во многих случаях транскрипция интронов вырезается, и участки связываются с обратным транскрипционным мРНК. В мРНК содержится в кодированном виде информация о последовательности аминокислот в молекуле синтезируемого белка.

Синтез белка называется трансляцией. Важную роль в нем играют молекулы тРНК и рРНК. В клетке присутствует более 30 разных тРНК.

Каждая из этих строгих специфических связей осуществляется своим 3'-концом с одной из 20 аминокислот. На 5'-конце tРНК находится последовательность из трех нуклеотидов (лигиондин), обеспечивающая связывание tРНК с комплементарным участком tР (трех нуклеотидов в молекуле мРНК). Существует две основные разновидности рРНК малой и большой (они объединяются соответственно с малой и большой субъединицами рибосомы – ее основной структурой, в которой и протекает синтез белка). У прокариот молекулы рРНК имеют меньший размер, чем у эукариот.

У прокариот транскрипция начинается со связывания мРНК с малой рибосомной субъединицей. Затем происходит комплементарное старание первого кодона мРНК с антикодонном триплетной tРНК (Met-tРНК), в образующийся комплекс присоединяется большая рибосомная субъединица, и образуется комплекс инициации (инициаторный комплекс), способный к синтезу полипептидной цепи.

У эукариот трансляция начинается с присоединения инициаторной tРНК, которая несет остаток метионина (Met-tРНК^{Met}), к малой рибосомной субъединице: в этой же субъединице связывается своим 5'-концом мРНК. Малая субъединица перемещается вдоль мРНК до тех пор, пока не дойдет до первого AUG кодона. Этот кодон образует комплементарную пару с антикодонном UAC инициаторной tРНК. Далее в точку комплексу присоединяется большая субъединица, и образуется рибосома, готовая к синтезу белка.

Элонгация и терминация трансляции у прокариот во многом схожи. После образования инициаторного комплекса следующий кодон мРНК связывается с инициаторной tРНК, несущей соответствующую аминокислоту (обычно это АК2). Первая аминокислота в полипептидной цепи, четвёртым, отделяется от tРНК и соединяется с АК2 с помощью пептидной связи. Свободная tРНК^{Met} покидает рибосому. Рибосомный комплекс перемещается вдоль молекулы мРНК, и пептид-тРНК, т. е. комплекс Met-AК2-tРНК^{Met}, занимает место, освобожденное отделившейся tРНК. Следующий кодон мРНК связывается с соответствующим антикодонном tРНК, несущим аминокислоту АК3. АК2 отщепляется от своей tРНК и

соединяется с АК3 с помощью пептидной связи, образуя комплекс Met-AК2-AК3-tРНК^{Met}. Освобожденная от аминокислоты tРНК покидает рибосому. Рибосомный комплекс опять перемещается вдоль молекулы мРНК, и Met-AК2-AК3-tРНК^{Met} занимает вакантное место, вытесняемое прежде предыдущей пептид-тРНК. Эти события повторяются до тех пор, пока рибосома не дойдет до стоп-кодона Аггикадонна, который был бы комплементарен стоп-кодону, нет ни у одной из tРНК. Однако стоп-кодону распознается неким белковым фактором освобождения, после присоединения этого фактора к рибосоме связь между последней tРНК и синтезируемым полипептидом гидролизуется, tРНК, мРНК и полипептид выделяются, а рибосома диссоциирует на субъединицы.

Синтез мРНК и соответственно синтез белка должны строго регулироваться, поскольку у клетки недостаточно ресурсов для одновременной транскрипции и трансляции всех структурных генов. И про-, и эукариоты постоянно синтезируют только те мРНК, которые необходимы для выполнения основных клеточных функций. Такая строгая регуляция осуществляется с помощью регуляторных систем, регулирующих транскрипцию только в том случае, когда возникает потребность в определенных белках (белках). У прокариот транскрипция инициируется связыванием РНК-полимеразы с последовательностями ТАТА и ТТGAC промоторной области структурного гена или оперона. Взаимодействие только между некоторыми из них осуществляется при участии фактора, который изменяет конфигурацию белок-репрессора и препятствует блокированию транскрипции. При уменьшении концентрации фактора в клетке репрессор связывается с участком ДНК, примыкающим к сайту инициации транскрипции, и препятствует перемещению РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК, блокируя таким образом транскрипцию. В других случаях с участком ДНК, связывающимся с сайтом инициации транскрипции, связывается белок-активатор, который увеличивает скорость транскрипции. Связывание фактора с активатором может снижать скорость транскрипции. ДНК-белковые взаимодействия, ответственные за регуляцию транскрипции,

строю специфичны в отношении определенных структурных генов или интеронов. У эукариот РНК-полимераза II, которая транскрибирует структурные гены, связывается с целым набором белков — факторов транскрипции, которые последовательно присоединяются к TATA-последовательности промоторной области. За включение и выключение транскрипции отвечают дополнительные факторы транскрипции, которые связываются с соответствующими участками ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

- Baronick S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77: 1-3.
- Korak M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNA that regulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870.
- Isaiah H., D., Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsubara, J. Drenth. 1995. *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. Scientific American Books, Inc., New York, N.Y.
- Nakamura Y., K. Ito, L.A. Izakson. 1996. Emerging understanding of translation termination. *Cell* 87: 147-150.
- Schreibler C.J., D.J. Anderson. 1995. The neuron-specific enhancer factor (NRF1): a coordinate repressor of multiple neuron specific genes. *Science* 267: 1360-1363.
- Tate W.P., C.M. Brown. 1992. Translational termination: "stop" for protein synthesis or "pause" for regulation of gene expression. *Biochemistry* 31: 2443-2450.
- Цван К., I. Манник. 1994. Транскриптивная активация: в complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 3-8.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите в общих чертах процесс репликации ДНК.
2. Чем различаются ДНК и РНК?
3. Опишите сходства и различия структурных генов про- и эукариот.
4. Опишите процесс инициации транскрипции.
5. Какие наиболее вероятно нуклеотиды (клеточность, комплементарность) следующие аминокислоты последовательности: MAGCTWYQI FPRKMWYKISTI IIPFILPMNVAGI.
6. Какой аминокислотной последовательности отвечает следующая нуклеотидная последовательность: GCGAUCGACGAUGCUUCLAAAAGI AUCUCAUCGAAAUGAGGCGUICGUAAGGCGACCCGCGCGG.
7. Что такое TATA-бок?
8. Что такое оперон? В чем заключается его биологическая роль?
9. Расскажите о трех разных способах регуляции транскрипции у прокариот.
10. Опишите основные элементы ДНК, ответственные за транскрипцию эукариотических структурных генов.

Технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК (ее называют также молекулярным клонированием или генной инженерией) – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (вектора рекомбинантной ДНК) из одного организма в другой. Накадуть единого, универсального набора меток здесь не существует, но чаще всего эксперимент с рекомбинантной ДНК проводят по стандартной схеме (рис. 4.1).

1. Из организма – донора нужных генов экстрагируют плазмидную ДНК (экзипурицивая ДНК, плазмидасема ДНК, ДНК-минуса, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующей вектор) с образванием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонированной вектор-встроенная ДНК»).
2. Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиента). Там она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией.
3. Идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).
4. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Предпосылками к созданию технологии рекомбинантных ДНК послужили многие открытия в области молекулярной биологии, главным

образом нуклеиновых кислот и молекулярной генетикой бактериальных вирусов и плазмидосомных элементов бактерии (плазмиды). Конструирование рекомбинантных молекул осуществляется с помощью целого ряда ферментов: обязательного и незаменимого инструмента практически всех этапов этого сложнейшего процесса. Речь идет прежде всего о ферментах рестрикции (рестрицирующая эндонуклеаза, рестриктаза), которые узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двуцепной цепной молекуле ДНК.

Рестрицирующие эндонуклеазы

При молекулярном клонировании важно, чтобы расщепление донорской и векторной ДНК происходило в строго определенных участках (сайтах) с образованием дискретной и локализованной набора фрагментов. Если пропустить хромосомную ДНК через шприц с иглой малого диаметра или обработать ее ультразвуком, то мы получим фрагменты длиной от 0,3 до 5 т.п.н. К сожалению, в ходе этих простых операций разными двуцепочечными молекулами возникают случайным образом, так что при каждой обработке препарата ДНК получается совершенно новый набор фрагментов. Молекулярное клонирование стало возможным только после выделения высокоспецифичных бактериальных ферментов, которые узнают определенные последовательности оснований в двуцепочечной молекуле ДНК и расщепляют обе цепи. Эти ферменты называются рестрицирующими эндонуклеазами типа II.

Один из первых рестрицирующих эндонуклеаз типа II был выделен из бактерии *Escherichia coli*

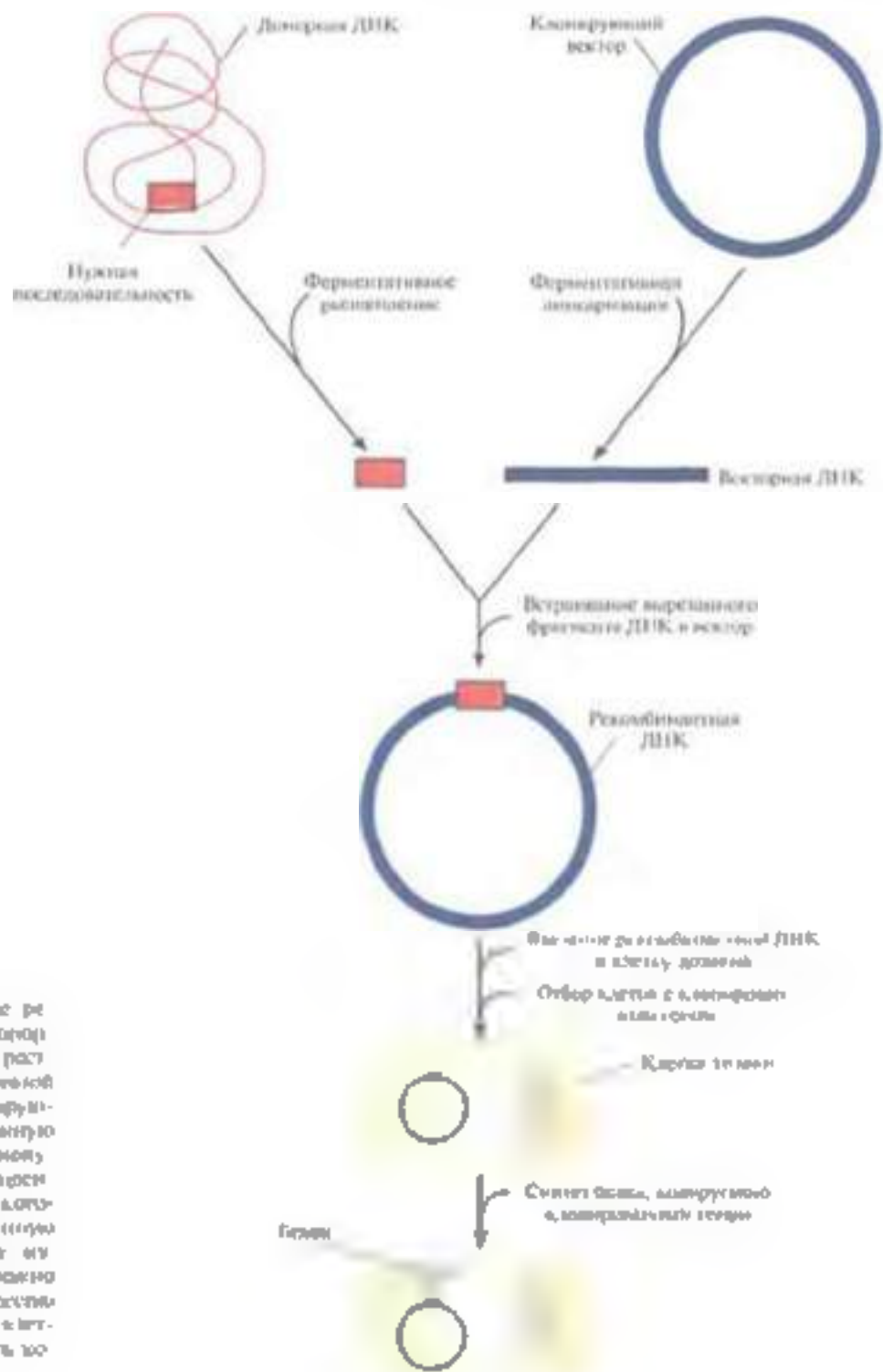


Рис. 4.1. Клонирование рекомбинантной ДНК. Донорная ДНК расщепляется рестриктазами, выделяется нужная последовательность и встраивается в клонированный вектор. Полученную конструкцию вносят в одну из клеток-хозяев (клетки-реципиенты). При использовании вектора-мишенного рекомбинантная ДНК встраивается в него. При использовании вектора-экспрессии рекомбинантная ДНК встраивается в него и клетка-хозяин производит белок.

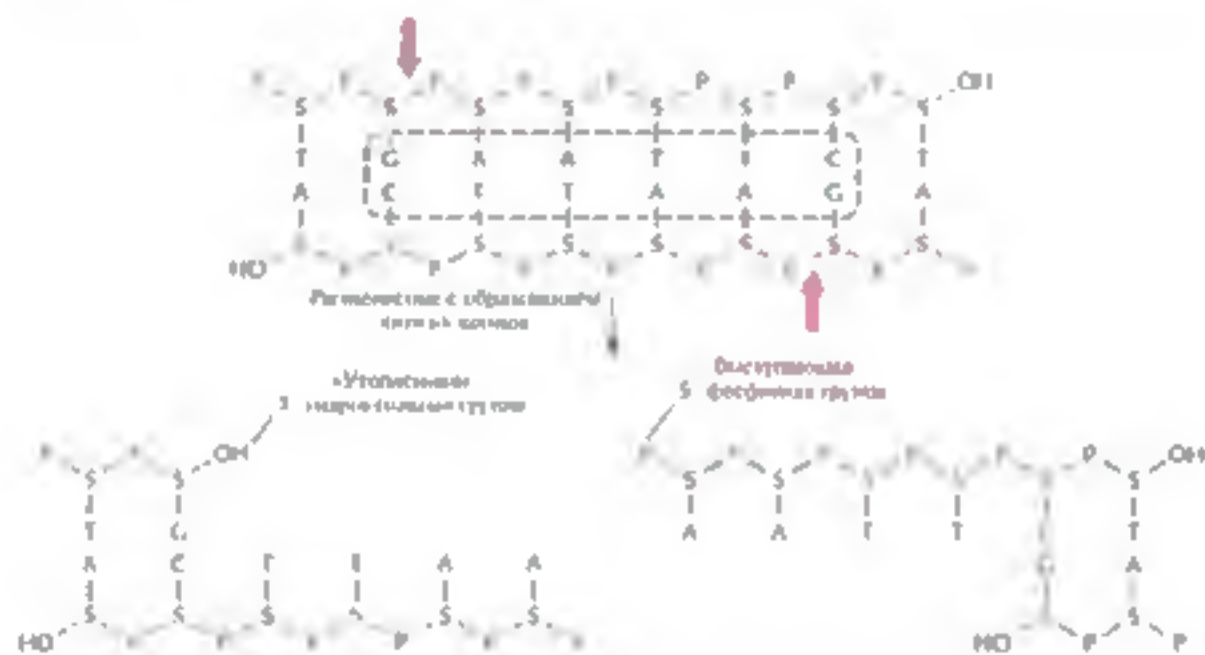


Рис. 4.2. Расщепление участка ДНК рестриктазой типа II *EcoRI* с образованием ступенчатых концов. Стрелки – сайты, по которым происходит расщепление в сахарофосфатном остове. S – дезоксирибозы, P – фосфинатная группа, OH – гидроксильная группа. Ниж. часть рисунка – сайт расщепления *EcoRI*, выделенный жирной линией.

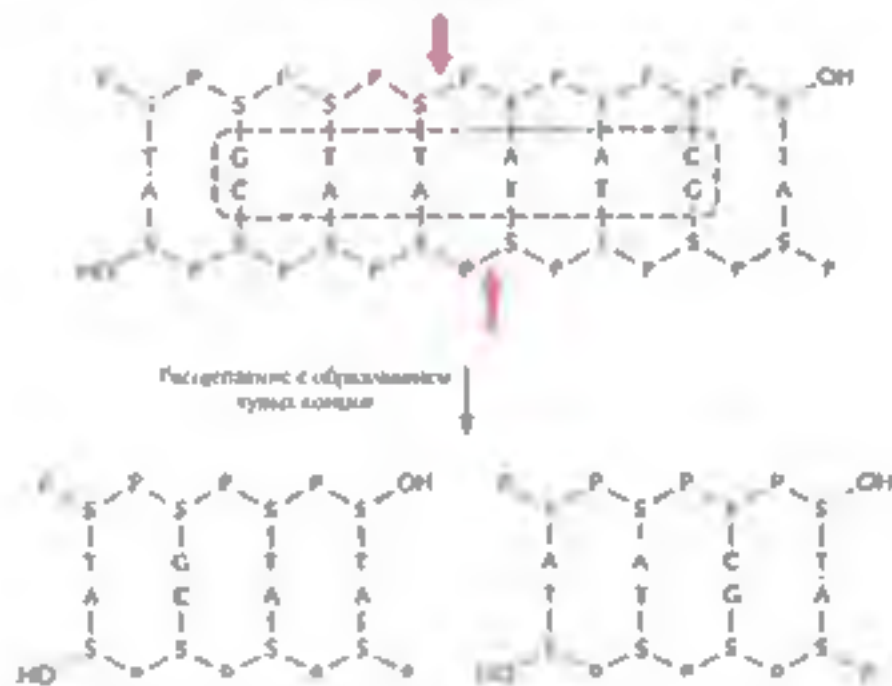


Рис. 4.3. Расщепление участка ДНК рестриктазой типа II *MspI* с образованием ступенчатых концов. Стрелки – сайты, по которым происходит расщепление в сахарофосфатном остове. Бузельные обозначения те же, что и на рис. 4.2. Последовательность расщепляющей рестриктазой *MspI*, выделена жирной линией.

и кодирует название *EcoRI*. Этот фермент узнает участок ДНК, состоящий из специфической (по-информационной последовательности) (последовательность нуклеотидов, идентичную и объема цепей при прочтении и интерпретации 5'-3') из мест связывания и имеет разрыв между остатками гуанина и аденина в каждой цепи (рис. 4.2), разделяя связь между атомом кислорода прима 3-атоме углерода сахарного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5-углеродному атому сахарного остатка соседнего нуклеотида. Разрывы в цепи ДНК выполняются так, как если бы они были в результате того, что образуются одноцепочечные нуклеотидные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом (хвосты концы). Каждая одноцепочечная «конец» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-ширикованная группа противоположной цепи как бы утолщена.

Полным *EcoRI*, из бактериальных клеток или полуклетки сотов рестрицирующей эндонуклеазы II. Но одним этим эндонуклеазой являются по своему же принципу, как и *EcoRI* рид микроорганизмов обозначается прописной буквой, а вид — латинскими строчными, латинским обычно не указывается. Римские цифры — прописными номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделяемых из данной микроорганизма. Например, *HpaI* и *HpaII* — это соответственно первая и вторая рестрицирующая эндонуклеаза типа II, выделенные из *Haemophilus parainfluenzae*.

Полноразмерные нуклеотидные участки, которые распознаются рестрицирующими эндонуклеазами типа II и в которых происходит расщепление молекул ДНК, называются сайтами узнавания. Помимо рестриктаз, нуклеиновых кислот (фосфодиэстераз) полинуклеотидную цепь с образующимися концами, существуют рестриктазы, которые вносят разрывы в цепи строю друг против друга с образующимися фрагментами ДНК с «хвостами» концами (рис. 4.3). Сайты узнавания могут состоять из четырех, пяти, шести, десяти или более пар нуклеотидов (табл. 4.1). От длины сайта узнавания зависит частота его распознавания в молекуле ДНК, в большинстве случаев используют рестриктазы, узнающие тетра- и гексануклеотиды.

Рестрицирующие эндонуклеазы типа II играют ключевую роль при генной инженерии.

Таблица 4.1. Узнавание нуклеотидных последовательностей рестрицирующими эндонуклеазами ферментов рестрикции

Фермент	Сайт узнавания	Характер образующихся концов
<i>EcoRI</i>	GAATTC CTAAGC	Выступившие концы с 5'-фосфатной группой
<i>BamHI</i>	GATC CTAGC	Выступившие концы с 5'-фосфатной группой
<i>AclI</i>	CTGCAG GACGTC	Выступившие концы с 5'-гидроксиловыми группами
<i>SmaI</i>	GATC CTAGC	Выступившие концы с 3'-фосфатными группами
<i>AclI</i>	CTGCAG GACGTC	Выступившие концы
<i>HpaI</i>	GTAAAC CATTTG	Утолщенные концы
<i>HaeIII</i>	GACG CTCG	Утолщенные концы
<i>AclI</i>	CTGCAGCTC GACGTCG	Выступившие концы с 5'-фосфатной группой

Обработка образцов ДНК определенной рестриктазой всегда даст один и тот же набор фрагментов — при условии, что расщепление произошло по всем сайтам узнавания. Если использовать несколько ферментов рестрикции и сначала обработать ДНК каждой из рестриктаз в отдельности, а затем их комбинациями, можно построить физическую карту данной ДНК, т.е. установить порядок следования сайтов рестрикции на молекуле. Определить размер полученных фрагментов с помощью геле-электрофореза, можно найти положение рестрицируемых сайтов (дополнение 4.1). На рис. 4.4, А указаны размеры фрагментов, полученных в результате расщепления ДНК разными рестриктазами и их смесью. Из этих данных следует, что данный участок ДНК имеет два сайта для *BamHI* и *EcoRI*.

Чтобы построить рестриционную карту, следует сравнить размеры фрагментов, полученных при редуплицированной рестрикции и при рестрикции смесью ферментов. Результат такого сравнения представлен на рис. 4.4, Б. Если при гидролизе ДНК каждой из двух рестриктаз (*EcoRI* и *BamHI*) образуются три фрагмента, значит, в исходном фрагменте ДНК было два сайта узнавания для каждой из используемых рестриктаз. Фрагмент размером 300 н. п., который образуется в результате гидролиза *EcoRI*, не существует

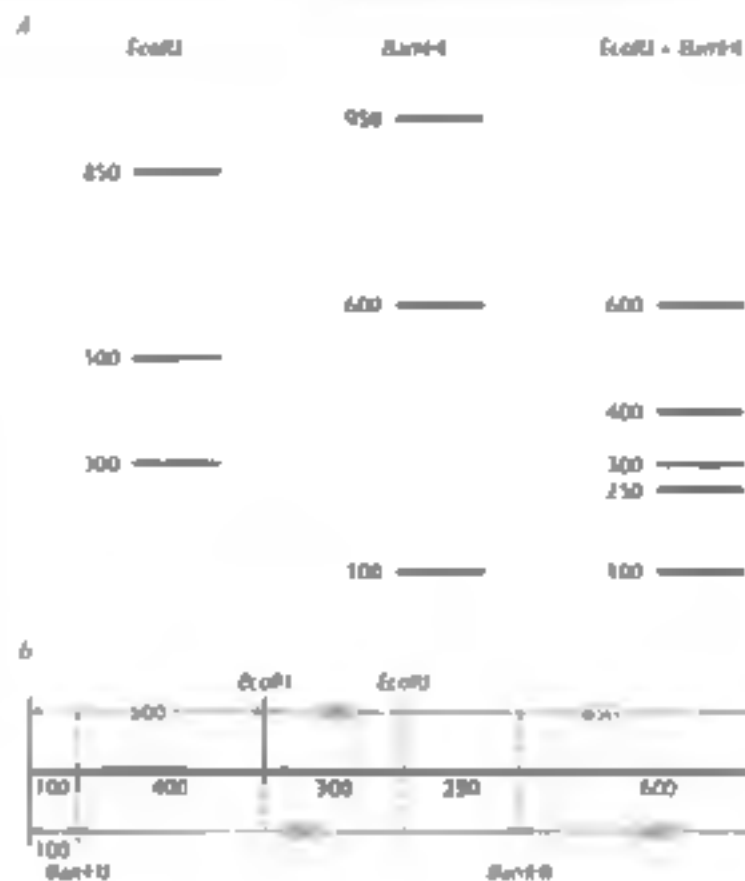


Рис. 4.4. Схематическое представление сайтов рестрикции. А. Результаты *SalI*-защелкивания фрагментов ДНК, полученных из расщепленного указанными ферментами *Staphylococcus* ДНК плазмиды. Сайты рестрикции *EcoRI* и *BamHI* размещены, в итоге на смысле, проводили *SalI*-защелкивание и выделены продукты окремления. Число сайтов (и ориентированных концов) фрагментов в паре оснований Б. Рестрикционный сайт, построенный по застрелкиванию сайтами. Число расстояния между сайтами увеличения соответствующими фрагментами.

должен содержать один из концов исходной молекулы ДНК. Далее, мы видим, что *BamHI* расщепляет *EcoRI* фрагмент длиной 300 п. н. на два фрагмента размером 100 и 400 п. н., и что один из *EcoRI* сайтов отделен от *BamHI* сайта 400 п. н.; значит, фрагмент длиной 100 п. н. должен содержать другой конец исходной молекулы. Карта (рис. 4.4, б) иллюстрирует четкое соответствие между положением сайтов рестрикции и размерами фрагментов, получаемых при каждом изарезе.

Расщепление рестрицирующими эндонуклеазами имеет еще одно применение. Когда два разных образца ДНК (образуемые одной и той же рестриктазой) с образующимся фрагментом с длинными концами, в итоге смешивают эти образцы, то благодаря комплементарному спариванию концов фрагментов разных образцов могут образовываться новые комбинации генетически рекомбинантных ДНК (рис. 4.5)

Для осуществления молекулярного клонирования необходимо иметь вольно ферментов рестрикции. Во-первых, водородные связи между теми четырьмя основаниями, которые образуют липкие концы, недостаточно прочны, чтобы удерживать два объединяющихся фрагмента ДНК. Необходим какой-то инструмент для устройства разрыва в сахарофосфатном остове молекулы, т. е. для восстановления связи между 3'-гидроксильной концевой группой одной цепи и 5'-фосфатной группой другой. Таким инструментом является ДНК-лигаза (бактериофита T4). Этот фермент катализирует образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей, которые уже удерживаются вместе благодаря спариванию липких концов. Кроме того, ДНК-лигаза T4 «сшивает» тугие концы, которые сближаются друг с другом после того, как объединяемые фрагменты связываются с ферментом (рис. 4.6). Во-вторых, объеди-

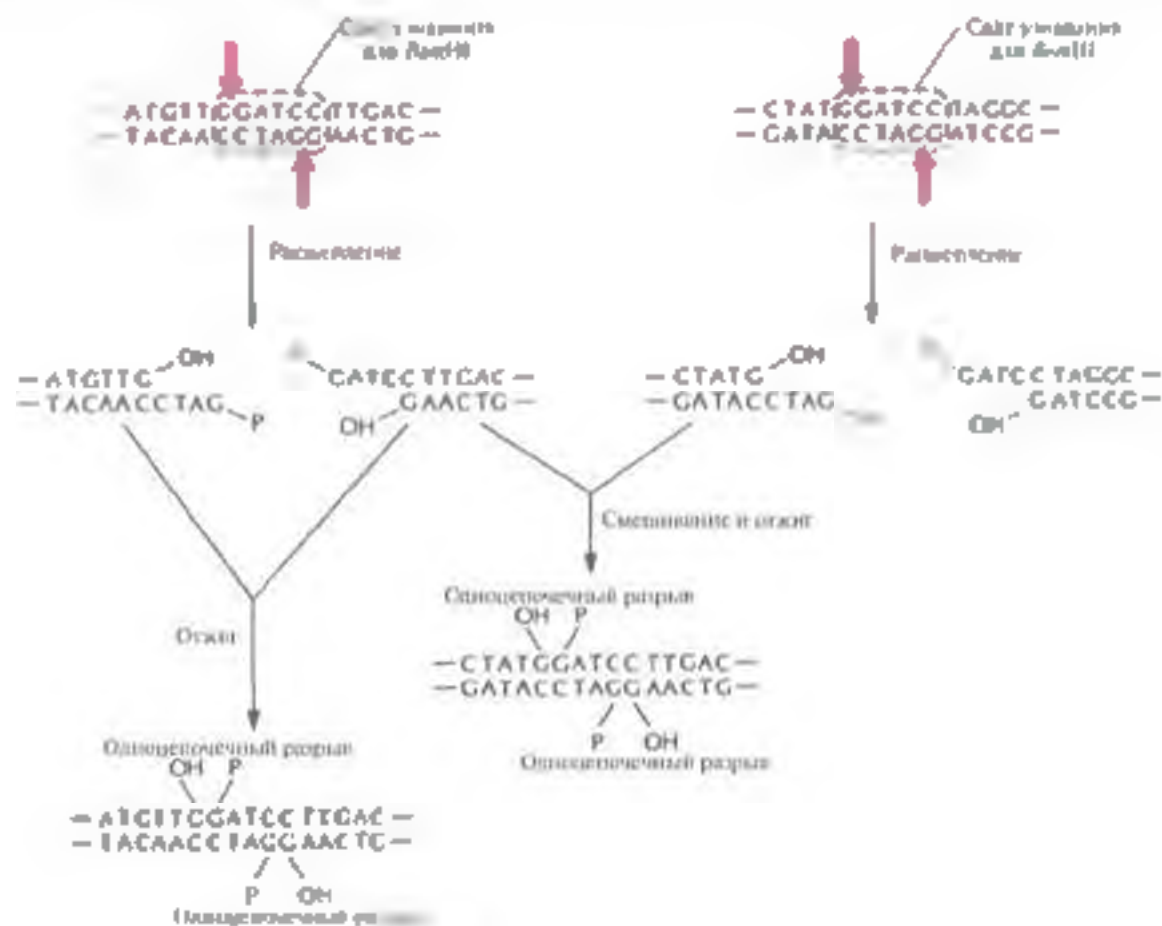


Рис. 4.5. Фрагменты ДНК с липкими концами образуются при рестрикции ДНК (в данном случае — при рестрикции с помощью ферментов EcoRI и BamHI). Четыре фрагмента, представленные на рисунке, могут соединиться друг с другом с образованием шести разных молекул ДНК (но не все возможные комбинации). Фрагменты удерживаются вместе водородными связями, образующимися между комплементарными базисами. Но эти связи неустойчивы, поэтому молекулы в растворе остаются свободными ДНК-молекулами.

ненте ривных молекул ДНК само по себе бесполезно, если только образованные комбинации (рекомбинантные ДНК) не будут рецилированы в клетке-хозяине. Таким образом, если одна часть рекомбинантной молекулы ДНК не содержит нужной гены, который предполагается клонировать, то другая должна содержать информацию, необходимую для репликации в клетке-рекомбинантной ДНК. Чтобы решить эту проблему, используют клонирующие векторы. Втретью, при рестрикции ДНК образуется смесь разнообразных фрагментов, и после их лигиро-

вания с векторной ДНК образуется множество различных комбинаций. Несмотря на то, что каждая молекула ДНК содержит нужную нуклеотидную последовательность. Для того чтобы узнать, какие из этих молекул являются теми, которые содержат нужную информацию, используют системы скрининга.

Плазмидные векторы

Плазмиды — это автономные, круговые молекулы ДНК, которые реплицируются независимо от хромосомной ДНК. Плазмиды есть практически у



Рис. 4.6. ДНК-лиаза 14 обрывает фосфодиэфирные связи между 5-фосфатными и 3'-гидроксильными группами в месте разрыва в остатке динуклеотидом ДНК А. Динуклеотиды этикетки концы В. Палиндромная палиндром

всех бактерий. Одни из них содержат информацию, обеспечивающую из собственной переноску одной клетки в другую (F-плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственные за утилизацию необычных метаболитов (плазмиды пестрализации). Есть плазмиды, в которых не обнаружены гены, выполняющие какую-то определенную функцию (криптические плазмиды; от англ. *cryptic* — скрытый, latentный). Размеры плазмид варьируют от менее 1 до более 500 п.н. Каждая из них содержит сайт начала репликации (*ori*), без которого репликация невозможна в клетке-хозяине (была бы невозможна).

Некоторые плазмиды представлены в клетке от 100 копиями, они называются высококопийными. Низкокопийные плазмиды присутствуют в клетке в числе 1–4 копии. Ну доли плазмидной ДНК обычно приходится 0,1–5,0% суммарной клеточной ДНК. Если две или более плазмиды не могут сосуществовать в одной и той же клетке, то говорят, что они принадлежат к одной группе несовместимости. Плазмиды, относящиеся к разным группам несовместимости, беспрепятственно существуют в одной клетке, независимо от числа копий. У некото-

рых микроорганизмов в одной клетке было обнаружено до 10 разных плазмид. При этом каждая из них выполняет свои функции, была представлена характерным для нее числом копий и отличалась и своей собственной группой несовместимости. Одни плазмиды несут специфичный сайт инициации репликации и могут реплицироваться только в клетках одного вида. У других плазмид этот сайт менее специфичен, и они реплицируются в самых разных бактериальных клетках. Соответственно различают плазмиды с узким и с широким спектром хозяев.

Как автономно реплицирующиеся генетические элементы плазмиды обладают всеми основными свойствами, которые позволяют использовать их в качестве вектора для клонирования ДНК. Но довольно часто природные (немодифицированные, неконструированные) плазмиды бывают лишены некоторых обязательных для «миссокачественного» вектора свойств. К таким важным свойствам относятся 1) небольшой размер, поскольку эффективность тиреоза жасенной ДНК в *E. coli* значительно снижается при длине плазмиды более 15 п. н.; 2) наличие уникального сайта рестрикции, в котором может быть осуществлена вставка; 3) наличие одного или более селективных генетиче-

ских маркеров для идентификации реципиента клеток, несущих рекомбинантную ДНК. Поэтому плазмидные векторы приходится создавать с помощью генной инженерии.

Плазмидный вектор pBR322

В 80-е годы плазмидный вектор pBR322 был одним из самых популярных универсальных векторов. Обычно обозначение плазмидного вектора включает строчную букву p (от англ. *plasmid*) и цифр несущихся букв, имеющих отношение к описанию вектора или к истории его создания. Так, буквы BR в обозначении плазмиды pBR322 указывают на авторство Ф. Боллиндера и Р. Роуригеса, сконструировавших эту плазмиду, а число 322 — индексное обозначение, взятое из последовательности протоколов Дании плазмиды pBR322 — 4361 и т.д. Она несет два гена устойчивости к антибиотикам (рис. 4.7), ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r), а также уникальные сайты для *Bam*HI, *Hind*III и *Sal*I в гене Tet^r, один сайт для *Pvu*II в гене Amp^r, один сайт для *Eco*RI, находящийся за пределами кодирующей последовательности (и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в *E. coli*). Плазмиды реплицируются с образованием большого числа копий, в другие бактериальные клетки переносятся с трубой.

Как работает клонирующий вектор pBR322? Если очистишь чужую конкретную плазмиду pBR322

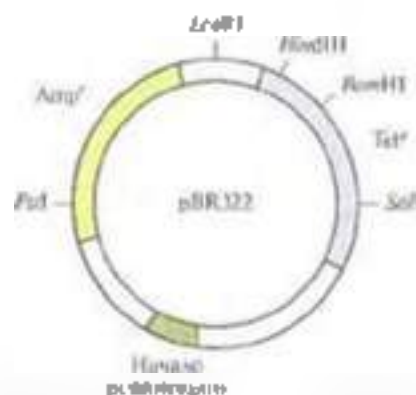


Рис. 4.7 Генетическая карта плазмидного вектора pBR322. Гены устойчивости к тетрациклину (Tet^r) и ампициллину (Amp^r) содержат уникальные сайты узнавания для *Hind*III, *Sal*I, *Bam*HI и *Pvu*II. *Eco*RI-сайт находится вне этих генов. Длина вектора — 4361 п.н.

обработать рестриктазой расщепляющей ее в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к тому или другому антибиотику, то образуется линейная молекула с липкими концами. Такие молекулы смешивают с донорной ДНК, содержащей нужный ген и предварительно обработанной такой же рестриктазой. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они старятся уже с образованием гибридных молекул. Далее смесь обрабатывают ДНК-лигазой фига T4 и присутствию АТФ — результате чего образуется множество разных комбинации фрагментов, а также нежелательные продукты, в частности объединившиеся между собой фрагменты донорной ДНК и исходная плазмидная ДНК. Чтобы уменьшить количество последней, обрабатывают рестрицированную клонируемую ДНК щелочной фосфатазой, отщепляющей от первичной молекулы 5 фосфатные группы ДНК — тогда не может сшить концы дефосфорилированной дивекции плазмидной ДНК (рис. 4.8). Что касается собственно рекомбинантных молекул ДНК, то хотя они и входят вна одновременно разрыве, ее фрагменты удерживаются вместе двумя фосфодиэфирными связями, образованными с помощью ДНК-лигазы между дефосфорилированными плазмидной ДНК и рестрицированной донорной ДНК (рис. 4.8). После репликации в трансформированной клетке одновременно разрывы устраняются системой аннигиляции клетки хозяина.

Трансформация и отбор

Теперь необходимо ввести рекомбинантную ДНК в клетку-хозяина. Этот процесс называется трансформацией. Для его осуществления используют специально разработанные приемы. Например подвергают клетки высокотемпературному воздействию и обрабатывают их хлоридом кальция (CaCl₂). Однако эффективность трансформации все же остается невысокой, обычно трансформируется не более одной клетки из тысячи. Таким образом, большинство клеток после проведения трансформации не содержат рекомбинантной ДНК. В некоторых из них появляется бесосадиившаяся кольцевая плазмидная ДНК, избежавшая дефосфорилирования щелочной фосфатазой, в других — неспаз-

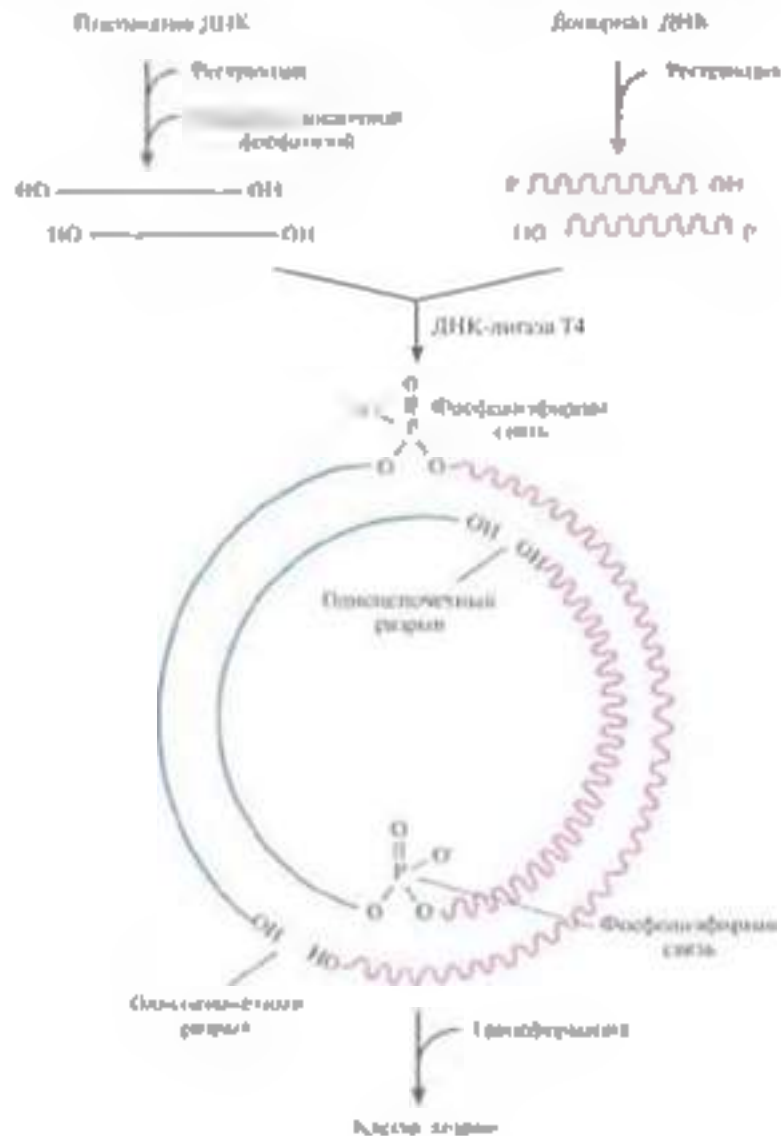


Рис. 4.8. Встраивание чужеродной ДНК в плазмидный вектор. Плазмидный ДНК «обрабатывают» рестриктазой и фосфатазой (фосфатаза удаляет часть с рестрицированными концами ДНК, создавая «липкие» концы), и добавляют donor ДНК-фрагмент. Два из четырех одноцепочечных рядов при этом удаляются, и конструкция оказывается стабильной благодаря образовавшимся фосфатам и фосфатам связей. После введения гибридной ДНК в клетку-хозяина происходит ее репликация и образуются новые молекулы уже без разрывов.

иная ДНК и лишь в некоторых – плазмиды со встроенным (фрагментом чужеродной ДНК (трансформантная плазмиды)

Как мы уже говорили, векторы-основатели ДНК, не содержащая точек начала репликации, не

может реплицироваться в бактериальной клетке. Таким образом, проникновение в клетку чужеродной ДНК еще не означает, что она будет «накапливаться» в хозяйской клетке. Далее, для сохранения рекомбинантной ДНК в клетке-хо-

знание в первоначальном виде необходимо, чтобы в клетке отсутствовали те же рестриктазы, которые могут привести к ее дегенерации, и чтобы клетка имела фенотип *KesA* (такие клетки неспособны в области рекомбинации, так что жикетонная ДНК не будет идентифицироваться в результате гомологичной рекомбинации).

Клетки необходимо идентифицировать клетки, содержащие рекомбинантную ДНК. Способ идентификации должен быть как можно более простым, поскольку приходится проверять огромное число клеток. В системе *pBR322*, в которой чужеродная ДНК встраивается в сайт *Bam*III, специфическая идентификация состоит из двух этапов. Сначала клетки после трансформации высевают на питательную среду, содержащую ампициллин. В таких условиях могут вырасти только те клетки, в которых присутствует интактный ген *Amp^r* — или в составе интактной плазмиды *pBR322*, или в составе гибридной плазмиды; не трансформированные клетки чувствительны к ампициллину. Сайт *Bam*III должен в гене *Tet^r* плазмиды *pBR322* (рис. 4.7); встроившись в этот ген фрагменты ДНК прерывают кодирующую последовательность, и устойчивость к тетрациклину утрачивается. Таким образом, клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину, а клетки, получившие интактную плазмиду *pBR322*, несут ген *Tet^r* и устойчивы как к ампициллину, так и к тетрациклину.

На втором этапе проводят разделение этих двух вариантов. Клетки, выросшие на среде с ампициллином, переносят на среду с тетрациклином методом пересевания. Клетки, образующие колонии на чашках с тетрациклином, содержат интактную плазмиду *pBR322*, поскольку, как мы уже говорили, они устойчивы и к ампициллину, и к тетрациклину. Клетки, не образующие ни чашках с тетрациклином, чувствительны к этому антибиотик; значит, они содержат гибридную плазмиду *pBR322*.

Среди колоний, выросших на среде с ампициллином, выделяют те, которые оказываются чувствительными к тетрациклину, и на каждой колонии получают индивидуальные чашечные культуры или (чаще делают именно так) объединяют все колонии, устойчивые к ампициллину и чувствительные к тетрациклину, и культивируют отделе-

те. Далее можно провести дополнительный скрининг и идентифицировать те клетки, которые несут гибридную плазмиду *pBR322* со специфическим вставкой. Присутствие сайтов *Hind*III и *Xba*I в гене *Tet^r* и сайты *Pst*I и *Sal*I в гене *Amp^r* плазмиды *pBR322* позволяет изменить локализацию кодирующей функции чужеродной ДНК. Если для встраивания используется сайт *Pst*I, то отбор проводится по тем же схемам, но в другом порядке, т. е. сначала высевают клетки на среду с тетрациклином, а затем — с ампициллином.

Другие плазмидные векторы

Идея использовать *pBR322* как вектор для клонирования была вполне удачной, но эта плазмидная система лишь несколько сайтов рестрикции, в отбор трансформированных клеток занимает много времени. Это привело к необходимости разработки альтернативных систем клонирования. Например, плазмида *pUC19* длиной 2686 в. н, содержит: ген устойчивости к ампициллину; регулируемый сегмент гена β -галактозидазы (*lacZ'*) лактозного оперона *E. coli*; ген *lacI*, кодирующий репрессор, который контролирует экспрессию гена *lacZ'*; множитель — короткую последовательность с множеством уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз (*Eco*RI, *Nar*I, *Apa*I, *Xba*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I, *Hind*III, *Acl*I, *Bsp*RI, *Pst*I, *Sph*I и *Hind*III); также торчат регуляторная плазмиды *pBR322* (рис. 4.9).

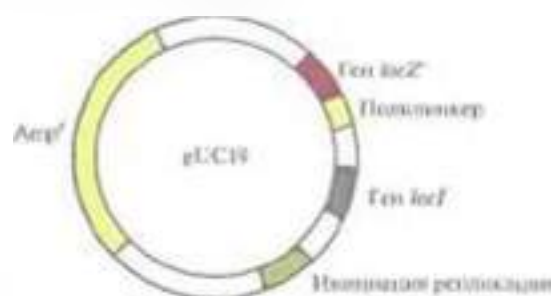


Рис. 4.9. Генетическая карта единичного вектора *pUC19*. Плазмиды состоит из 2686 пар нуклеотидов и содержит следующие сайты узнавания для *Eco*RI, *Sma*I, *Apa*I, *Xba*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Apa*I, *Sal*I, *Hind*III, *Acl*I, *Pst*I, *Bsp*RI, *Sph*I и *Hind*III (каждый из них в отдельности, ген устойчивости к ампициллину); сайт иницииции репликации, функционалирующий в *E. coli*; ген *lacI*, кодирующий синтез репрессора, который блокирует транскрипцию гена *lacZ'* в отсутствие субстрата IPTG.

ВАЖНАЯ ВЕЩА

При расщеплении ДНК рестриктазой R1 образуются фрагменты с липкими концами

J. E. Merz, R. W. Dooly

Proc. Natl. Acad. Sci. (США) 74: 3376, 1977

Тщательным исследованием ДНК выяснено составное вещество «липкости» адонированной ДНК, специфическое вещество имеет в цепи эти ДНК с образованием характерной конформации, введение рестрикции в область голых и адонифицированных цепей, доступна рекомбинация ДНК. Незаменимым рабочим инструментом в этих манипуляциях является рестрицирующая эндонуклеаза тип II. На практике она, при создании «артифактальной» структуры. Волков и др. (Gene 2: 95-113, 1977), так и при рестрикции в цепях адонифицированной ДНК. Меленсон и др. (Science 217: 1110-1114) показали, что способность одного из штаммов E. coli ферментативным способом

присоединять к концу (область адонифицированной) субстратами различия в области фермента, который расщепляет фрагменты ДНК. Позже Merz и Dooly установили, что этот фермент, рестриктаза R1 (присоединяющая нуклеотиды EcoRI), расщепляет молекулу ДНК в специфическом месте с образованием комплементарных («липких») концов. Липкие концы молекулы, образующиеся при расщеплении водной ДНК рестриктазой EcoRI, часто имеют химическую вольную область сфинктерной комплементарной концы. Обширившись фрагментом удерживаются вместе водородными связями, их концы водной ковалентно связаны, подобно ферменту ДНК

липазу, и результате чего получают липкие концы, конформацию цепей по цепи Y всех молекул ДНК, расщепленных одной эндонуклеазой, имеются одинаковые концы из 4-6 нуклеотидов, в сайт удержания составной из цепей нуклеотидов при Merz и Dooly созданы выводы, что «липкость» (только адонифицированной) рестриктазы R1 и ДНК-липазы, имеют «перекрестное взаимодействие» для быстрой молекулы ДНК с R1-связями в водной среде, что позволяет «липкости» в результате (только адонифицированной) рекомбинантных ДНК, поскольку, по словам этих же ученых, укладку «простой путь», созданный специфическим рекомбинантным молекулу ДНК «липкой».

При отборе трансформированных клеток руководствуются следующими соображениями. Если клетки, содержащие неадаптированную плазмиду рUC19, выращиваны в присутствии изопропанол-β-D-тиогалактозидазы (ИПТГ), который является индуктором *lac*-оперона, то продукт гена *lacZ* не сможет связаться с промоторно-операторной областью гена *lacZ*, и как следствие будут происходить транскрипция и трансляция плазмидного фрагмента гена *lacZ*. Продукт этого фрагмента свяжется с белком, кодируемым хромосомной ДНК, и в результате образуется активная β-галактозидаза. Последовательность с множественными сайтами рестрикции (полилинкер) расположена в генах *lacZ* так, что она не влияет на продукцию функциональной β-галактозидазы, и если в среде присутствует ее субстрат 3 бром-4-хлор-5-индиканол-β-D-галактозидаза (X-Gal), то он будет индикативно использоваться под действием этого фермента с образованием продукта синтетической, окрашивающей колонии клеток, со-

держащих неадаптированную плазмиду рUC19.

Для клонирования в рUC19 донорную ДНК расщепляют одной из рестриктаз, чей сайт находится в полилинкере; плазмиду ДНК гидролизуют такой же рестриктазой, а затем обрабатывают щелочной фосфатазой. Обе ДНК смешивают и присутствуют ДНК-лигаза T4 и используют субстрат, который может стабилизировать ту часть β-галактозидазы (*LacZ*), которая соединяется с продуктом гена *lacZ* с образующим активную ферментативную. Обработанные клетки инкубируют на питательную среду с аминизалином, ИПТГ и субстратом для β-галактозидазы. Непротрансформированные клетки не могут расти в присутствии аминизалина, а клетки, несущие индикаторную плазмиду, образуют на среде с аминизалином колонии синего цвета. Клетки-хозяева, несущие гибридную плазмиду, образуют на той же среде белые колонии, поскольку обычно при использовании в плазмидкер двухцепочечной ДНК

последовательности ДНК. Эту проблему можно решить, используя другую рестриктазу.

Следующий после создания библиотеки этап — это поиск клонов (клеток), несущего искомого последовательность ДНК. Для этого используют при широком диапазоне методов: гибридизацию с меченым ДНК-зондом с последующим радиографическим выявлением, иммунологический скрининг и скрининг по активности белка, кодируемого тем же участком.

Скрининг с помощью гибридизации

Нулевую нуклеотидную последовательность в образце ДНК можно обнаружить с помощью ДНК-зонда, сформированного в лаборатории с известной последовательностью. Для этого ДНК зонда переводят в одноцепочечную форму, подвергают ее тепловой обработке или воздействию щелочи. В этих условиях водородные связи между основаниями разрываются и цепи расходятся

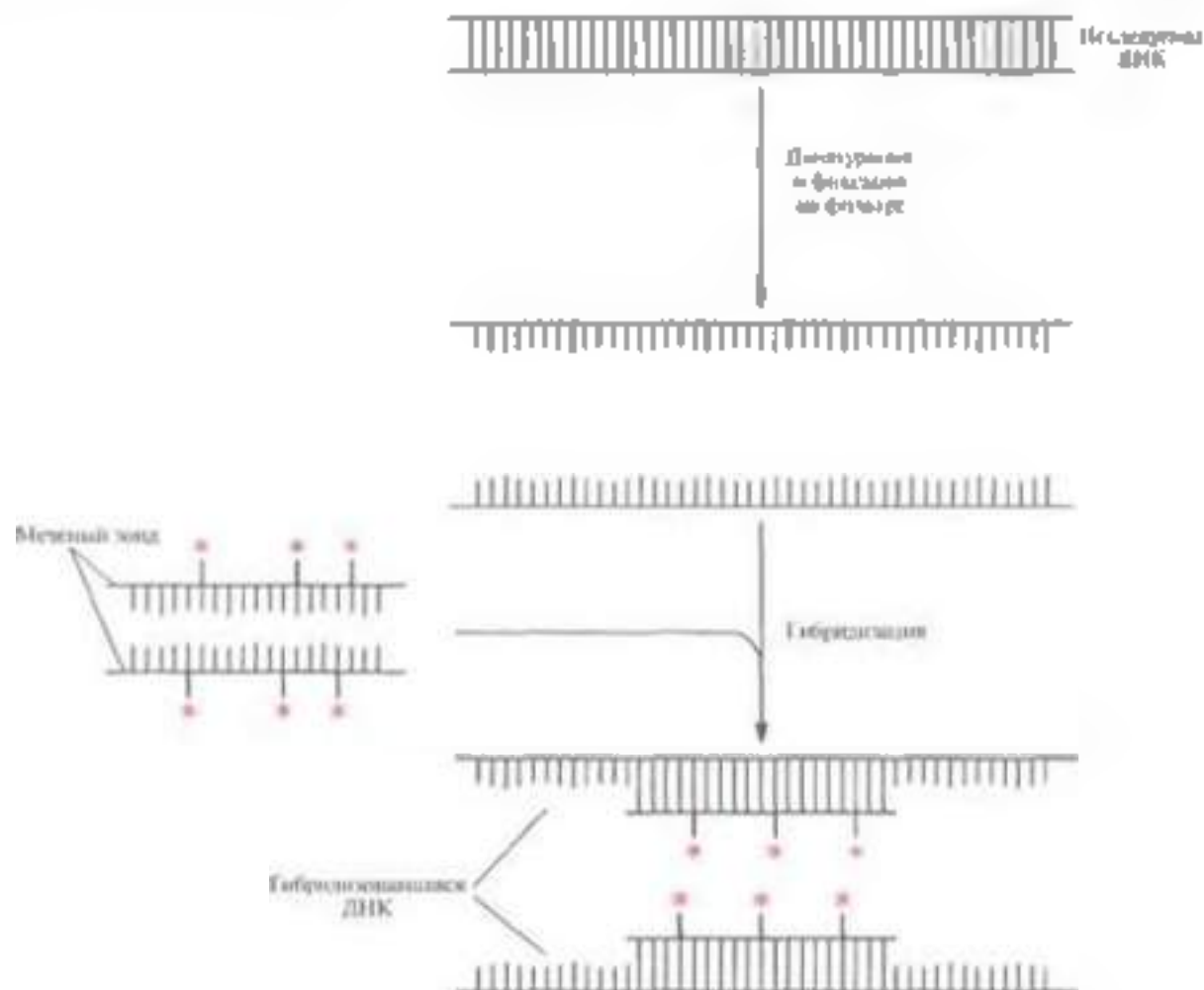


Рис. 4.11. ДНК-гибридизация (Исходный ДНК подвергают денатурации и фиксируют на твердой подложке, например на нитроцеллюлозной или поливиниловом фильтре. Меченый ДНК-зонд (обычно длиной от 100 до 1000 п. н.) затем денатурируют, добавляют на фильтр с исследуемой ДНК и приводят их контакт. Для выявления гибридообразующихся ДНК-зонда фильтр промывают и визуализируют зонки. Если гибридизация между зондом и исследуемой ДНК не произошла, то меченый зонд на фильтре не обнаруживается. (Метки на рисунке обозначены на меченой зондочной))

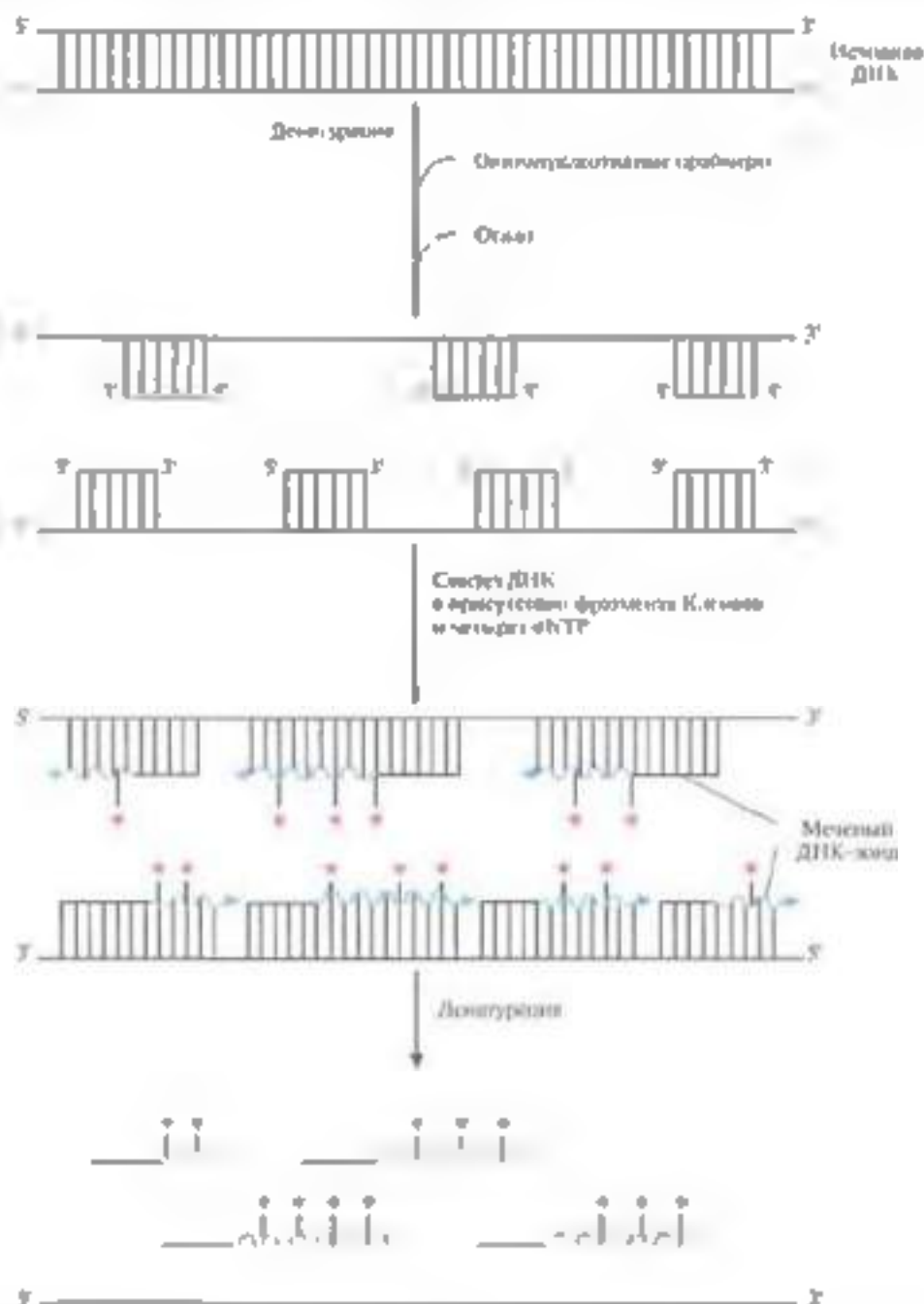


Рис. 4.12. Получение меченого ДНК-зонда методом случайных праймеров в активированной выщелоченной ДНК, содержащей глицероцидную расщепляемость, которую применяется в качестве зонда для выявления гексануclidиды (смесь всех возможных комбинаций 10) протект нуклеотидов) и отнелател селес. Некоторые из олигонуклеотидов гибридируются с меченой активированной ДНК, и в присутствии фрагмента Кэпмана и четырёх dNTP (одни из которых мечены ^{32}P) служат шаблоном для синтеза комплементарной цепи. После денатурации синтезированной ДНК получают смесь меченых фрагментов ДНК, которые вместе составляют практически полностью истощенную ДНК-матрицу.

ны и гибриды являются, если ДНК предварительно денатурирована (рис. 4.12). После скрининга с помощью скрининга с денатурированной ДНК или рибосомальной смеси добавляются четыре декарибонуклеотида (декарбонуклеозидтрифосфаты; dNTP), один из них меченый, и формирует ДНК-полимераза I E. coli (фрагмент Кларна). Фрагмент Кларна обладает ДНК-полимеразной и 3'-экзонуклеазной активностями, но не 5'-экзонуклеазной активностью, присутней ДНК-полимераза I E. coli, которая могла бы расщепить неровные гидрофильные молекулы ДНК (линейные цепи ДНК-лиганды служат матрицей для синтеза новых цепей ДНК, а соединяющие с ними случайным образом слитую цепочку «сшивки») (рис. 4.12). При скрининге искомый фрагмент цепи из dNTP содержит α - 32 P, так что 32 P-меченная цепочка мечается и сам хвост. Радиодетектируемую метку выявляют с помощью радиоавтографии.

Известно, что радиоактивный метки часто используются биотин, который превращается в форму из четырех dNTP. Для выявления гибридных комплексов биотинизированного зонда на фильтр наклеивают стрептавидин с соответствующим ферментом (например, щелочной фосфатазой). Стрептавидин образует комплекс с биотином, который обнаруживается благодаря тому, что под действием фермента образуется окрашенное или люминисцирующее вещество – продукт превращения субстрата на фильтр-субстрате.

Зонты для скрининга геномной библиотеки можно получить по крайней мере двумя способами. Во-первых, можно использовать клональную ДНК близкородственного организма (гетерологичный зонд). В этом случае условия гибридизации нужно подбирать таким образом, чтобы они могли трансформировать при существенном расхождении между нуклеотидными последовательностями зонда и искомым ДНК; это позволяет решить проблемы, связанные с щелочным расхождением между ДНК-источником зонда и исследуемой ДНК. Во-вторых, зонд можно получить методом химического синтеза, основанного на известной аминокислотной последовательности белкового продукта искомого гена.

Скрининг библиотеки геномных ДНК обычно проводят по следующей схеме. После трансформации выселяют клетки на чашки с питательной

средой и переносят выросшие колонии на твердую подложку (например, на микропланшетный или чайную подложку); проливают лизис клеток, затем депрессивными и денатурируют ДНК, фиксируют ДНК на подложке. Наносится фильтр меченый зонд и проводят ожиг, а затем радиоавтографию. Колонии на нижней чашке, которые содержат гибриды выделенной ДНК, выделяются и культивируются (рис. 4.13). Поскольку большинство библиотек создается в результате численного гидрида, незначительный гибридационный сигнал может быть получен для нескольких колоний (клеток). Поэтому необходимо осредлить, какой именно клон (если таковой имеется) содержит искомого ген (клеткам С помощью геле-электрофореза и картирования определяют размер каждого фрагмента (состав) и идентифицируют идентичные фрагменты или фрагменты с перекрывающимися последовательностями. Можно также провести дополнительное клонирование с тем, чтобы составить полный ген из перекрывающихся фрагментов. Или, если зонды в эластичной или клонированной зонде велики и плохо может содержать весь ген, провести ее секвенирование и убедиться в наличии стартового и стоп-кодона и полинуклеотидной нуклеотидной последовательности, кодирующей искомого белка.

К сожалению, никто не может дать гарантии, что в библиотеке представлена вся нужная информация. Если пока полноразмерный ген оказался безрезультатным, можно создать другую библиотеку используя другую рестриктазу, и провести скрининг с помощью известного зонда (или зондов созданных на основе предыдущей библиотеки). Чтобы повысить вероятность присутствия в библиотеке копии нужной информации искомого гена, можно также создать библиотеку, содержащую фрагменты ДНК несколько большего размера, чем средний размер рестриктазы генома (этот вариант мы рассмотрим в данной главе позже).

Иммунологический скрининг

В отсутствие ДНК-зонда для скрининга геномной библиотеки можно использовать другие методы. Например, если клонированный ген экспрессируется, то его продукт – весь белок или его часть – можно обнаружить иммунологичес-

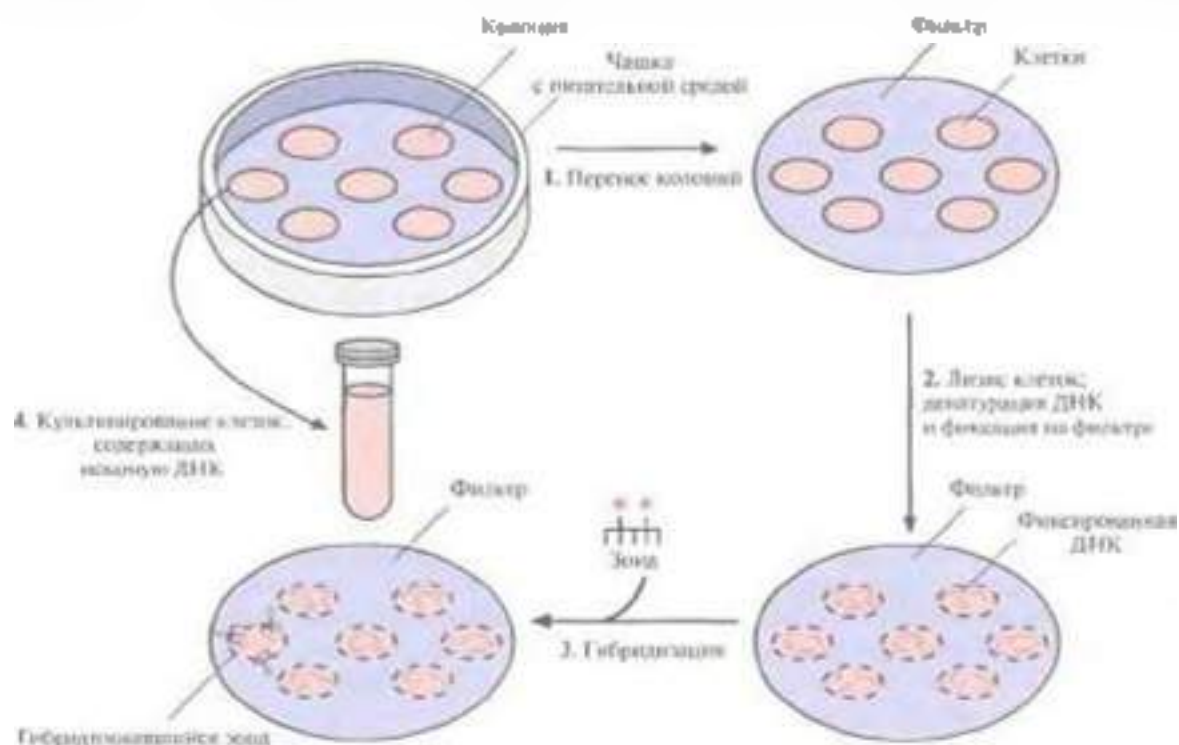


Рис. 4.13. Скрининг библиотек с помощью ДНК с применением меченой зонды. Клетки после трансформации высевают на твердую питательную среду, обеспечивающую рост только трансформированных клеток. После роста клеток из каждой выросшей колонии на твердую среду (агар) (испринтер, интринсически-индуцибельный или туберкулиновый фильтр) так, чтобы на нее поместится соответствующая зонда (зонды). 2. Клетки лизируют, высвобождают ДНК под действием денатурирующих и диспергирующих и фиксируют на фильтре. 3. На фильтр наносят меченый ДНК-зонд и проводят гибридизацию. Смыывают с фильтра негибридизованные зонды и проводят ре-анализ гибридов с тем чтобы определить, какие клетки содержат меченый ДНК-зонд. 4. Идентифицируют по чашке «донора», содержащий искомого ДНК (показана зона гибрида зонда и зонда). Гибриды и зонды элиминируют и культивируют.

с таким методом. Технически эта процедура имеет много общего с гибридной. Все клеточные ядра (клетки) библиотек высевают на чашки с питательной средой. Выросшие колонии переносят на фильтр, клетки лизируют, и высвобождающиеся белки фиксируют на фильтре. Затем на фильтр наносят соответствующие зонды (антитела), которые специфически связываются с данным белком (антигеном), несущим меченый зонд. Антитела удаляют, а фильтр помещают в раствор меченого антитела, специфичных в отношении меченого антитела. Во многих тест-системах используют конъюгаты меченого антитела с ферментом, например с щелочной фосфатазой. После отмытия

фильтра добавляют бесцветный субстрат. Если антитела антитела связываются с первыми, в месте действия фермента происходит окисление субстрата с образованием окрашенного вещества в том месте, где идет реакция (рис. 4.14).

Те клетки на чашке, которые соответствуют окрашенным пятнам на фильтре, содержат или полиморфный (или или достаточно прототипный его участок), обеспечивающий синтез белкового продукта, указанного первыми антителами. По окончании визуального скрининга можно библиотекы исследовать, какой именно из отобранных клонов содержит полиморфный белок.

Если искомым ген кодирует продукт, без которого мутантная клетка жизни не может расти на минимальной среде то библиотеку можно создать методами трансформации мутантных клеток. Кстати, муреном в отсутствие необходимого субстрата на минимальной среде, если ш-теломер содержит функциональный искомым ген, инкапсулированный в клетку в составе плазмидного вектора. В разных вариантах этот подход используют для выделения мутантов вытесненных, и ш-стелерти клеток, ответственных за синтез антимбиотиков и образование аллеликаротиноидов клубничными корнями некоторых растений.

Клонирование структурных генов эукариот

Для клонирования эукариотических структурных генов необходимы специальные методики. Прокариоты не способны удалять интроны из транскриптов РНК-транскриптов, поэтому при клонировании транскриптов эукариотических мРНК в бактериальной клетке невозможно. Кроме того, матричные эукариотические ДНК может существовать только при наличии прокарриотической синциальной исследователю, регулирующая транскрипцию и трансляция. Концевые участки эукариотических мРНК способны образовывать модифицированы: из 5'-концы эукариотическим (содержат «кап» из остатков 5', часто метилированной), и 3'-концы полиаденилированы (содержат poly(A)-«хвост» из примерно 200 остатков аденина).

Наличие poly(A)-хвоста позволяет отделить мРНК от рибосомной и транспортную РНК для того суммарно эукариотическую РНК продуцирует через клетку, зависящую от культуры. К другой «примитив» короткие аденозинуклеотидные «хвосты» из полиадениловых остатков длиной примерно 15 азотистых, oligo(dT). Poly(A) хвосты клеток мРНК спариваются с oligo(dT) и захватываются в колонию, в которую в РНК и рРНК свободно проточат через нее. Затем колонию прищипывают буфером, в котором происходит разрыв полимерных связей между А и Т. и мРНК высвобождается.

Сразу мРНК целыми встроены в ДНК-вектор, начиная на ней необходимо синтезировать дупликационную ДНК. Для этого последовательно

используют для разных полимеризации: обратную транскрипцию и фрагмент Кленова ДНК полимеразы I (рис. 4.15). Сначала в реакционную смесь с «мешательной» мРНК добавляют короткое oligo(dT), обратную транскрипцию и четыре dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Poly(A) хвост мРНК спаривается с oligo(dT), несущим свободную 3'-ОН-группу, которая иницирует синтез комплементарной цепи. Матрицей в этом синтезе служит матрица мРНК, а катализирует его обратная транскриптаза, продуцируемая некоторыми РНК-вирусами. Она последовательно присоединяет к растущей цепи остатки T, C, G или A, комплементарные A, G, C или T мРНК. In vivo синтез ДНК идет не до конца, при этом обратная транскриптаза переносит часть своей обратной «информации» вправо и при этом синтез останавливается нуклеотидом в обратном направлении (рис. 4.15), так что в результате образуется «голова».

В реакционную смесь добавляют фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (K_{len}), который встроивается в новую цепь ДНК, используя первую цепь как матрицу. Он присоединяет дезоксирибонуклеотиды к растущей цепи, начиная с 3'-ОН-конца «голова». Во втором этапе синтез превращают обрабатывают ферментом РНКase H, который разрушает молекулы мРНК, и нуклеотидом 5', отщепляя от полиаденилированных концов ДНК. Полученный продукт представляет собой смесь частично и полностью дупликационную комплементарных ДНК-копии (кДНК) мРНК, преобладающей в основном форме.

Разные кДНК можно встроить в плазмидный вектор и выделить кДНК-библиотеку. Для скрининга кДНК-библиотеки с целью идентификации клонов, несущих специфические ибридные плазмиды, можно применять метод гибридного или иммунологического методов. В последнем случае кДНК должны быть встроены в сайт, находящийся под контролем бактериального промотора, обеспечивающего транскрипцию. Однако практически ни один вектор не гарантирует, что во встраивании кДНК сохранится правильная рамка считывания и синтезируется правильная полипептидная цепь. Тем не менее все необходимые клоны, выделенные тем или иным методом, необходимо проверить дальнейшей проверкой и идентифицировать те из них, ко-

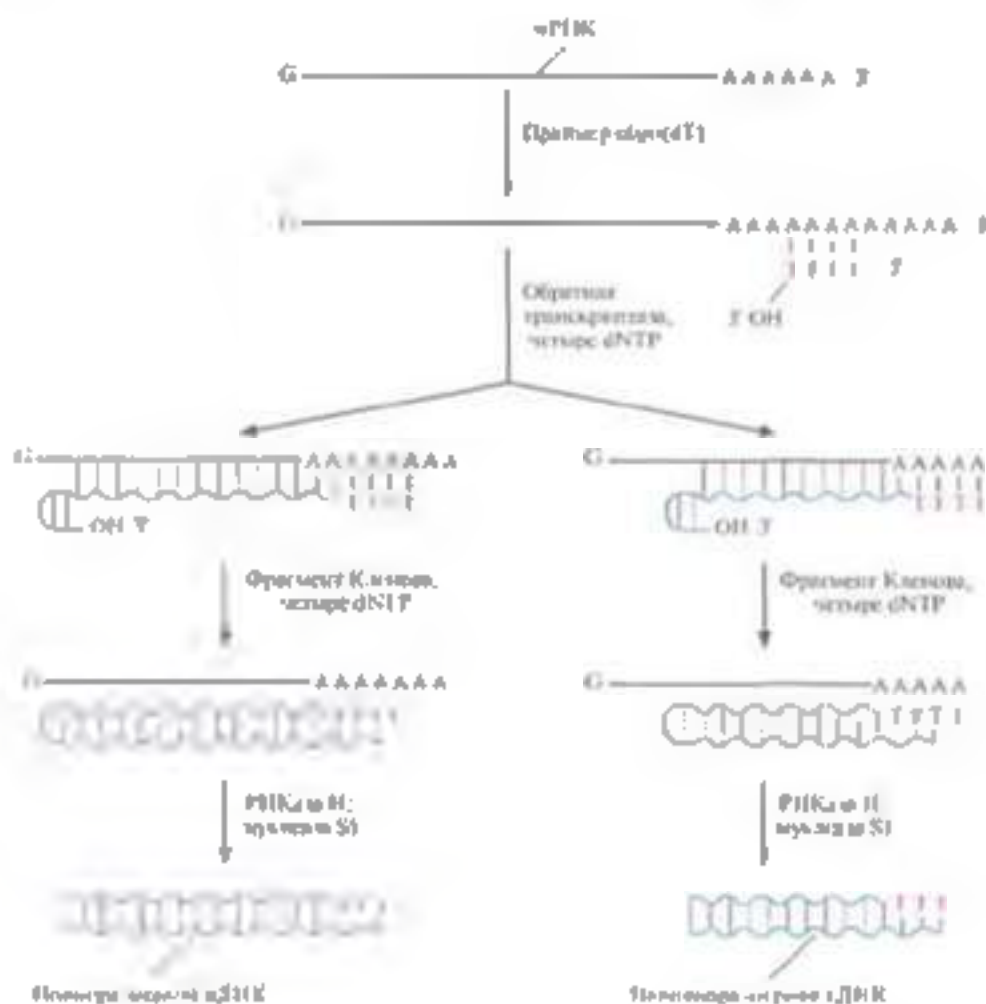


Рис. 4.15. Синтез cДНК. К протаргету мРНК добавляем фермент обратн. транскриптазы. Для синтеза ДНК на РНК мы можем использовать фермент обратную транскриптазу и четыре dNTP. In vitro обратная транскрипция и так обеспечивает синтез полноразмерных cДНК, но они не всецело интактны и образуют некие фрагменты (если взаимодействовать со свободной 3'-ОН-группой). Эта группа инициирует синтез второй цепи ДНК при участии фермента Кнзев. После завершения синтеза молекулы мРНК гидролизуют РНКазой H, а ДНК обрабатывают нуклеазой S1 в результате чего образуются линейные молекулы ДНК с тупыми концами без штилей.

терие могут полиморфизмную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-инициатор.

Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК

Векторы на основе бактериофага λ

С помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК длиной до 10 т. п. н. Однако при создании генетических библиотек час-

то приходится работать с более крупными фрагментами. Для этого были разработаны векторы на основе бактериофага λ ϕ ϕ .

После провозникновения фага λ в клетку *E. coli* события могут развиваться по двум сценариям. Если реплика идет литическим путем, то фаг начинает интенсивно размножаться и примерно через 20 минут клетка разрушается (лизисует) с высвобождением до 100 новых фаговых частиц. При альтернативном варианте развития события и фаговая

ДНК включается в хромосому *E. coli* как профет и реиницируется в клетке вместе с хроматидным бактериальным геномом (состояние лизогения). Однако при недостатке питательных веществ или иных неблагоприятных обстоятельствах интегрированный фаговый ДНК высвобождается, и запускается личностный цикл развития. Размер ДНК флага λ составляет примерно 50 т. п. н., причем значительная ее часть (около 30 т. п. н.) недоступна для реинициации флага и отвечает за его встроенность в хромосому ДНК. В связи с этим существуют идеи, что ее можно заменить фрагментами другой ДНК: «замещающего» размера. Образуется «рекомбинантная» молекула будет реиницироваться в клетке как ДНК «рекомбинантного» флага λ , «встраиваясь» на личностный путь развития.

Чтобы понять, как функционирует пекторная система на основе флага λ , необходимо рассмотреть молекулярные аспекты лизогенного цикла развития. Инфекционная фаговая частица имеет головку, в которой заключена плотно упакованная ДНК длиной примерно 50 т. п. н., и отросток с отходящими от него (такими же бесцветными) сегментами (фибриллами). Сторона головки и отросток и упаковка ДНК четко сфокусированы. ДНК флага λ — это линейная двуцепочечная молекула длиной 50 т. п. н. с односторонними 5'-концами — из 12 нуклеотидов. Их называют лизогенными (cos) концами, поскольку они взаимно комплементарны и могут скручиваться друг с другом. После того как фаговая ДНК проходит через отросток и попадает в *E. coli*, cos-концы соединяются с образующим кольцевую молекулу. На раннем этапе лизогенного цикла в результате репликации кольцевой молекулы ДНК образуется линейная молекула, состоящая из нескольких сегментов длиной 51 т. п. н. (рис. 4.16, А). Каждый из этих сегментов упаковывается в близкую головку, а лизогенный присоединяется уже собранной головке и образуется новая фаговая частица (рис. 4.16, Б). При упаковке молекулы ДНК длиной менее 18 т. п. н. получается неинфекционная фаговая частица, а фрагменты длиной более 32 т. п. н. не упаковываются в головку. Сегменты длиной 50 т. п. н. в линейной молекуле ДНК разделяются cos-сайтами, и именно по этим сайтам разделяется молекула, когда очередной сегмент упаковывается в головку. Разделение осуществляет фермент, называемый у южков в головке

В результате исследований по изучению сборки флага λ были разработаны системы упаковки молекул ДНК *in vitro* с образующим инфекционные флагами частицы. Сметав в пробирке очищенные пустые головки, фаговую ДНК и собранные отростки, можно получить инфекционные флагами частицы.

Один из множества λ -векторов для клонирования имеет два BamHI-сайты, фланкирующие участок длиной 20 т. п. н. При гидролизе очищенной флагой ДНК рестриктазой BamHI образует-

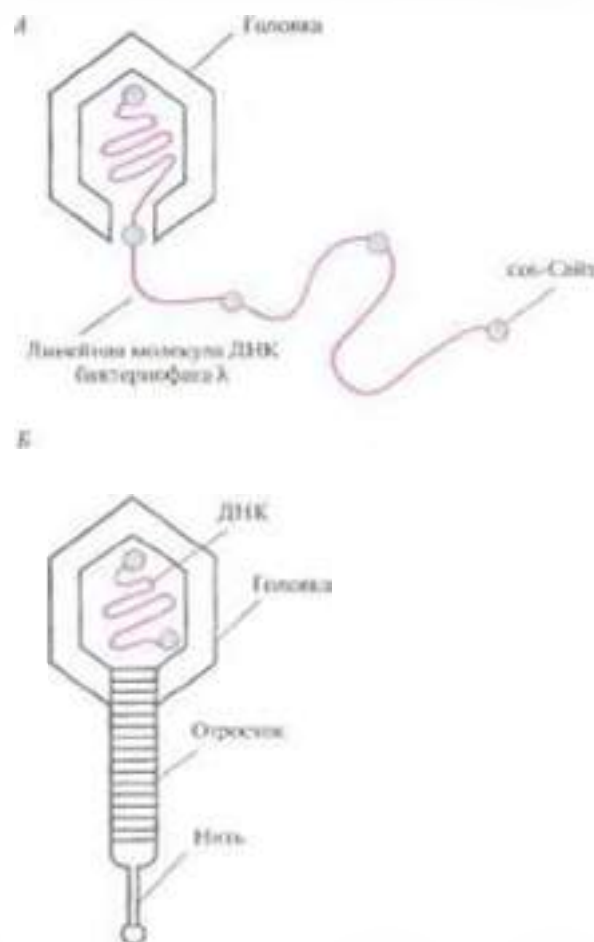


Рис. 4.16. Лизогенный путь развития бактериофлага λ . А) При репликации кольцевой ДНК бактериофлага λ образуется линейная молекула, состоящая из нескольких сегментов длиной примерно 50 т. п. н. Каждый из этих сегментов представляет собой полноразмерную фаговую ДНК. Б) Флаговая головка упаковывает один такой сегмент, а затем в головку присоединяется уже собранный отросток.

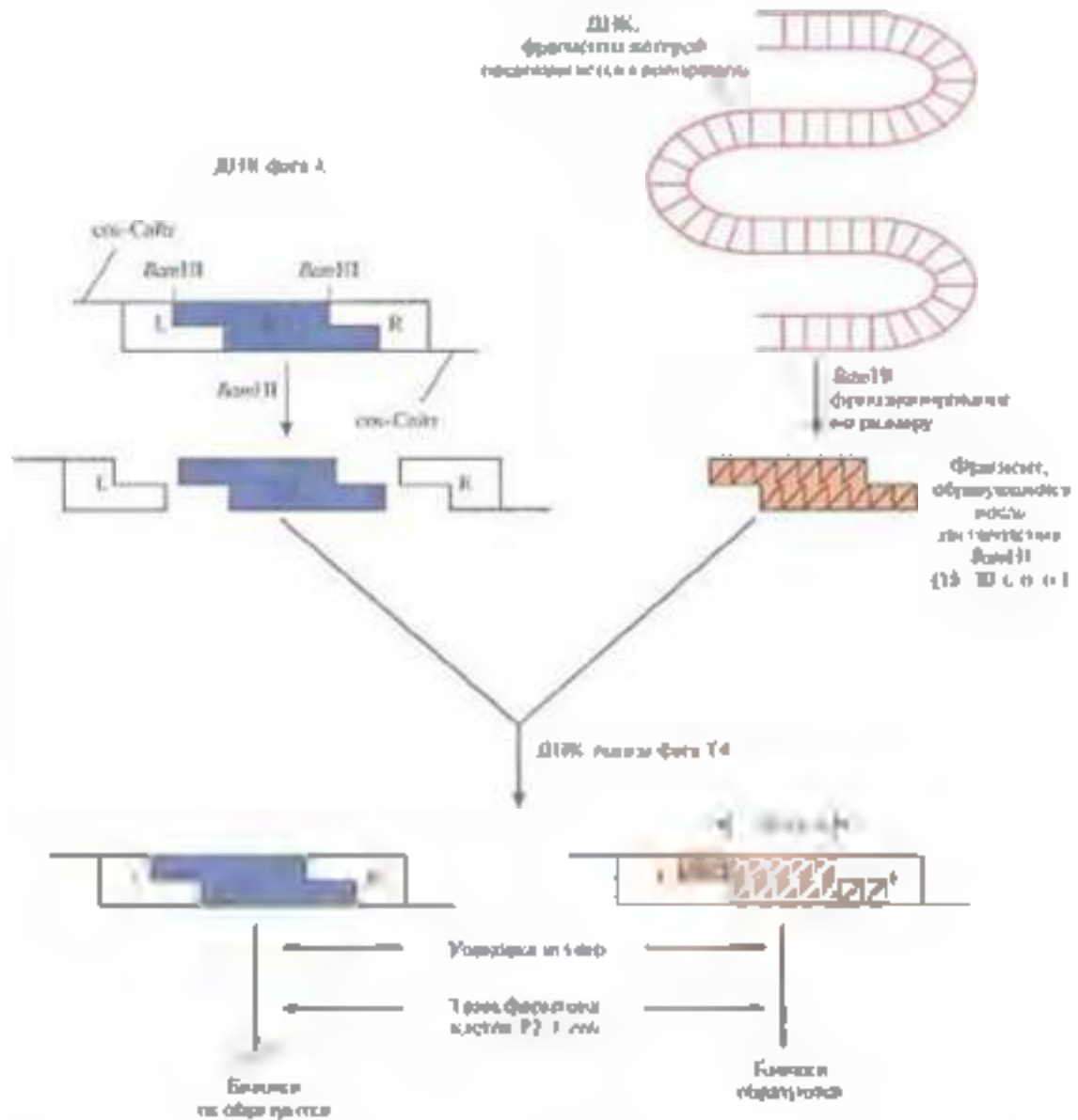


Рис. 4.17. Клонированная система на основе вектора-фенотипа. Фенотипная ДНК имеет две BamHI-сайты. Фрагментация ее I/B-сайтами. Клонированная ДНК рестрицирована с помощью BamHI, фрагментированная полученная фрагментация по размеру и эндонуклеотидных, которые имеют размер от 15 до 20 п. н. Фенотипная ДНК обработанная теми же ферментами. Оба препарата ДНК смешиваются и обрабатываются ДНК возбудителем T4. Лабораторная смесь содержит самые разные комбинации ДНК, в том числе 1) носителями ДНК фенотипа и 2) рекомбинантными молекулами, содержащими R- и I-область фенотипной ДНК в составе клонированной ДНК размером 20 п. н. смешивают в области I/E-сайтов. Рекомбинантные молекулы укладываются в колонии бактерий E. coli, и после инкубации отросшая культура (трансформанты) отбирается. В инфицированной рекомбинантными фрагментами E. coli, в процессе которой интегрирована ДНК вектора-фенотипа P?, могут размножиться и обработанные инфекционными частями только молекулы ДНК, состоящие из R- и I-областей фенотипной ДНК и клонированной системы размером 20 п. н.

ся три фрагмента. Левый извлеченное левое плечо (область I) содержит (энергетическую) информацию в головке и отростке флага, правое плечо (область II) несет реплицируемую ДНК и доминирующую среднюю систему инициации, ответственные за процессы инициации и поддержания (система I/E, от лат. *initiation/establishment*) задачи исследования состоит в том, чтобы заменить этот центральный участок нуклеотидными (наследственными) для (или примерно 20 к. п. н. (рис. 4.17) нулевой ДНК. ДНК, предельно иницирующая для амплификации, также взаимодействует с комплексом *SamIII* и выделяют фрагменты размером от 15 до 20 к. п. н. Обычные свертки - филозные и чужеродную ДНК объединяют и добавляют ДНК ленту флага T4, а затем пустые головки и уже собранные отростки фрагменты ДНК длиной 50 к. п. н. упаковываются в головки. К ним приближаются отростки и образуются инфекционные филозные частицы. Фрагменты большого (>52 к. п. н.) или меньшего (<38 к. п. н.) диаметра упаковываются не могут. Реконбионтный филам может размножаться только в тех штаммах *E. coli*, которые обеспечивают равноденствие флага с интактной областью I/E. Для создания реконбионтного флага λ его первоначально пересаживают на штамм культуры *E. coli*.

Для скрининга библиотек на основе флага λ можно использовать ДНК-зонды или иммунологические методы. Зонды делятся (блишки) переносит на филам и соответствующим образом тестируют. Если используется ДНК-библиотека, то вначале удаляют филозные белки, затем ДНК денатурируют и фиксируют на филам. При тестировании иммунологическими методами белки, кодируемые клонированными генами

переносит и фиксируют на филам вместе с белками. Соответственно эти на филам, доминирующая (популярная) реакция с белками на исходной шапке, отбирают позитивные блишки и проводят субкультивирование. Субкультуры служат источником реконбионтных бактериофилов, которые можно по отдельности культивировать в *E. coli*.

Космиды

Бактерио-, плазмидные космиды, могут включать до 40 к. п. н. чужеродной ДНК и при этом активно амплифицируются в *E. coli* как плазмиды. Космиды объединяют в себе свойства плазмидных векторов и векторов на основе флага λ . Например, широко применяемая космида *p118.5* (приблизительно 6 к. п. н.) имеет два суб-сайта флага λ , инделетная ленточная рестриктаза для *NotI*, полилинкер с шестью уникальными сайтами рестрикции (*HindIII*, *PstI*, *SacI*, *BamIII*, *XbaI* и *EcoRI*), тандем начала репликации ДНК (*ori*) и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet^r*). Эта космида может интегрировать чужеродную ДНК длиной до 40 к. п. н. (рис. 4.18). Предпочтительные для клонирования фрагменты ДНК длиной около 40 к. п. н. формируют центрифугированные в градиенте плотности осадки от продуктов частичного гидролиза донорной ДНК рестриктазой *BamIII* (рис. 4.18), а *p118.5* смешивают и инкубируют с помощью *NotI*, а затем *BamIII*. Прелазная ДНК смешивают и амплируют. Те продукты лигирования, которые содержат вставку длиной 40 к. п. н., имеют суммарный размер, близкий к 50 к. п. н., и следовательно, могут упаковываться *in vitro* в головки флага λ . Реконбионтные комплексы *p118.5*,

Рис. 4.18. Клонирование с помощью космидного вектора. Космида имеет тандем начала репликации (*ori*), обеспечивающий ее существование в *E. coli* в виде плазмиды; два интактных сайта уникальных сайтов для *NotI*, *BamIII* сайт вблизки одного из суб-сайтов и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet^r*) ДНК, которую хотят в клонировать, рестриктазой рестриктазой *BamIII* и фрагментируют по размеру, чтобы выделить молекулы длиной примерно 40 к. п. н. Прикладную ДНК рестриктируют с помощью *NotI* и *BamIII*. Эти препараты ДНК смешивают и обрабатывают ДНК-лигазой флага T4. Незакрепленные фрагменты молекулы, образуются как не интегрированные, содержат вставку размером около 40 к. п. н. так что их суммарная длина соответствует примерно 50 к. п. н. Эти комплексы упаковываются *in vitro* в головки бактериофита λ , затем в головках приближаются отростки, и образуются инфекционные частицы. При инфицировании штамм «филам» *E. coli* в бактериофильной клетке способность выживать молекулы ДНК с суб-сайтами, которые связываются при с другим ДНК ленточной клеткой головка является одноцепочечным рибонуклеином и образованная комплекс молекула сразу сворачивается в форму, которая реплицируется с помощью трансформированного участка можно интегрироваться по принципу устойчивости к тетрациклину.

не содержащие вставки, утвояваны не будут. После сборки ———— части инфицируют ими *E. coli* (рис. 4.13).

Они ———— пась в бактериальной клетке, линейная молекула рLTR-5 со вставкой взаимодействует с кольцом благодаря спариванию сек-сайтов. В такой стабильной конфигурации она может долгое время существовать в клетке и реплицироваться как гибридная плазма, поскольку содержит все необходимые для него элементы. Более того, ген устойчивости к тетрациклину обеспечивает рост колоний, неущит лангум космиду, за среде с этим антибиотиком; нетрансформированные клетки при этом ингибируются. Существуют и другие космидные векторы на основе фига λ .

Космиды имеют большое преимущество по сравнению с плазмидами: в них можно встраивать более продолженные фрагменты ДНК, а это означает, что для создания геномной библиотеки нужно меньшее число λ -клонов и потребуются меньшие времена на их скрининг.

Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК

Векторные системы, способные интегрировать крупные вставки (>100 г п. н.), имеют большую ценность при анализе сложных (эукариотических) геномов без таких методов, как риботизация, например, при картировании генома человека или при идентификации отдельных генов. В отличие от библиотек с гибридными вставками, в геномной библиотеке с крупными вставками скорее всего будет представлен весь геномный материал организма. Кроме того, в этом случае увеличивается число клонов, которые можно поддерживать, и увеличивается вероятность того, что каждый из генов будет присутствовать в «своем» клоне. Для клонирования фрагментов ДНК размером от 100 до 300 г п. н. был сконструирован низкокопийный плазмидный вектор на основе бактериофига P1 — тизерная конструкция, называемая искусственной дрожью на основе фига P1. Был создан также очень стабильный вектор, способный интегрировать вставки длиной от 150 до 300 г п. н. на основе F-плазмиды (F-фактора, или фактора фертильности) *E. coli*, которая представляет в клетке одной или двумя копиями, с селекционной системой *lacZ* векторов рLС. Эта конструкция

для возможности бактериальной искусственной дрожью (ИАС, по аналу *bacterial artificial chromosome*).

Генетическая трансформация прокариот

Перенос ДНК в E. coli

Трансформация — это процесс введения свободной ДНК в бактериальную клетку. *E. coli* не является в качестве клетки естественной при работе со многими рекомбинантными ДНК, и чтобы обеспечить проникновение в клетку плазмидной ДНК, она обрабатывается лезвием раствора СаCl₂, а затем выдерживают при 42 °С в течение 1,5 мин. По-видимому, в результате такой обработки происходит локальное нарушение клеточной стенки. Этот метод дает максимальную частоту трансформации, примерно 10⁷, т. е. на каждый 1000 клеток приходится один трансформированный. Инфекциозность трансформации, которая определяется как число трансформантов на 1 мкг добавленной ДНК, составляет примерно 10⁷–10⁸. Частота трансформации никогда не бывает 100-процентной, но этот недостаток компенсируется применением схем отбора, позволяющих быстро идентифицировать трансформированные клетки.

Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК, называются компетентными. Компетентность *E. coli* невозможно индуцировать, а некоторые другие бактерии обладают этим свойством естественно. Доля компетентных клеток можно повысить, используя специальную питательную среду или условия культивирования. Для бактерий, устойчивых к химическим индукторам компетентности или не обладающих природной компетентностью, применяются другие системы доставки ДНК.

Электротрансфекция

Для увеличения проницаемости клеточной мембраны на них оказывают электрическим током. Эта процедура называется электротрансфекцией. Условия ее проведения различаются для разных видов бактерий. При работе с *E. coli* клеточную суспензию (1–50 мкл) и ДНК помещают в сосуд с погруженными в него электродами и подают единичный импульс тока длительностью $\cdot 4,5$ мс (емкость конденсатора 25 мкФ,

напряжение 2,5 кВ, сопротивление 200 Ом). После такой обработки эффективность трансформации повышается до 10^8 для коротких плазмид (примерно 1 т. п. н.) и до 10^6 для больших (примерно 135 т. п. н.) Аналогичные условия можно использовать для введения в *E. coli* векторы ВАС. Таким образом, электропорация является эффективным методом трансформации *E. coli* плазмидами, стабилизирующими плазмиды длиной 100 т. п. н. Есть основания полагать, что подобные условия «электропорации» будут разработаны для всех видов бактерий, так что этот процедура может стать стандартным методом трансформации.

У механизма проникновения в клетку ДНК в процессе электропорации известно очень мало. По-видимому, как и при химически индуцированной трансформации, в результате электропораки в клеточной стенке образуются временные поры, через которые ДНК и проникает в клетку.

Активация

Рекомбинантная ДНК проникает в клетки бактерий, характеризуется низкой частотой трансформации, таким же образом, как плазмиды ДНК из донорской клетки в реципиентную в естественных условиях. Некоторые плазмиды обладают способностью создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной клетки в другую. Образуемые контакты между донорской и реципиентной клетками обеспечиваются конъюгационными структурами плазмид, а сам перенос ДНК мобилизационными факторами плазмид, которые используются в работе с рекомбинантными ДНК, не обладают конъюгационными функциями и поэтому не могут переходить в реципиентные клетки путем конъюгации. Однако проникновение в клетку некоторых плазмидных векторов все таки происходит при наличии в этой клетке другой плазмиды, обладающей конъюгационными свойствами. Таким образом, попадая в клетку, несущую мобилизационный плазмидный вектор, плазмиду с конъюгационными функциями, можно трансформировать клетки-реципиенты, с трудом поддающиеся трансформации другими способами.

Следует в общем чертах использовать для этой стандартную экспериментальную проце-

дуру. Смесивают клетки трех разных штаммов. Когда клетки оказываются в непосредственной близости друг от друга, конъюгационная плазмиды, которая в данном случае обладает также мобилизационными свойствами, сама переходит в клетку, содержащую мобилизационный плазмидный вектор, и затем обеспечивает перенос векторной ДНК в реципиентную клетку. В такой системе реализуются все возможные пути переноса, но подобные штаммы и плазмиды обладают такими генетическими свойствами, чтобы можно было подобрать реципиентную клетку, получившую данной плазмидной вектор. Предположим, что мы имеем три штамма: 1) штамм А, который несет конъюгационную мобилизационную плазмиду, но не может расти на минимальной питательной среде и чувствителен к антибиотикам X; 2) штамм В, который также не может расти на минимальной питательной среде и несет немобилизационный плазмидный вектор, который имеет ген резистентности к антибиотикам X; 3) штамм С - реципиентная клетка-мишень, которая может расти на минимальной среде, не имеет совместимых плазмид и чувствительна к антибиотикам X. После конъюгации клетки непрерывательное время выращивают на полноценной среде без антибиотика X, а затем переносят на минимальную среду с антибиотиком. В этих условиях могут расти только реципиентные клетки-мишени, которые приобрели плазмидный вектор. Иногда клетка-мишень получает обе плазмиды, однако этот редкий случай можно вызвать, если перенести клетки путем переноса на минимальную среду и отобрать трансконъюганты, которые способны расти в присутствии антибиотика X, но не могут расти при наличии теми резистентности к другому антибиотику (например, к антибиотикам Y), который несутся в конъюгационной плазмиде штамма А. Поскольку для переноса плазмидной ДНК во время конъюгации необходима связь между терминальными штаммами, эта процедура получила название тройного скрещивания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология рекомбинантных ДНК включает целый набор «терминальных» процедур, благо-

этим способом удается выделить (клонировать) фрагменты ДНК, содержащие специфические гены. Успех клонирования зависит от уникальности вектора и/или от размера молекулы ДНК на фрагменты определенной длины. Для точного расщепления ДНК используют рестрицирующие эндонуклеазы типа II. Эти ферменты узнают специфические нуклеотидные последовательности и симметрично разрезают фосфоэфирные связи в кластер цепи.

Типичный эксперимент по клонированию генов включает следующие этапы: 1) Рестриктазное расщепление ДНК, выделенной из организма, который содержит искомым ген. 2) Обработка вектора для клонирования (обычно плазмидного), который может ретрансформироваться в клетке-хозяина, теми же рестриктазами, которыми использовались для расщепления донорной ДНК. 3) Смешивание этих двух образцов ДНК и создание фрагментов ДНК внахлест T4. 4) Трансформация смеси этих молекул в клетку хозяина. Амплификация рекомбинантной ДНК в трансформированной клетке.

Для сбора клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, используют специальные приемы. Чтобы увеличить количество мишеньных плазмидных молекул, образующихся при введении фрагментов ДНК внахлест T4, рестрицированную или нидкую ДНК обрабатывают щелочной фосфатазой, удаляющей 5'-концевые фосфатные группы. Для сбора трансформированных клеток, содержащих гибридные плазмиды, применяют: 1) тестирование на резистентность к определенным антибиотикам или селективно-структурной резистенции; 2) иммунологические тесты или выявление специфического белка — продукта клонированного гена; 3) гибридную с зондом, комплементарным какому-либо участку искомого гена.

Чтобы иметь возможность клонировать только ген, донорную ДНК расщепляют лишь частично. При этом получаются фрагменты различной длины, из которых затем создают генетическую библиотеку. Для клонирования крупных фрагментов ДНК были сконструированы векторы на основе бактериофагов λ и P1, а также плазмиды F.

Для получения фрагментов ДНК, интегрированных нуклеотидически в хромосому, их очищают от ДНК как на матрице синтетической комплементарной цепи

ДНК с помощью обратной транскриптазы, и цепь и свою очередь остаются в качестве матрицы для синтеза второй цепи. После ферментативной обработки эту дуплетную цепь комплементарную ДНК встраивают в вектор.

Независимо от того, какой именно стратегией клонирования занимается, после идентификации клонированной последовательности искомого гена есть еще один обязательный этап — идентификация структурной цепи.

ЛИТЕРАТУРА

- Beatty S. L., A. H. Kessel (ed.) 1982 *Methods in Enzymology*, vol. 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Garfin D. L. 1995. Electroporation methods, p. 53-109. In J. A. Gillet and M. P. Deutscher (ed.), *Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Grimstead J., P. M. Brunet (ed.) 1990 *Methods in Microbiology*, vol. 21, *Plasmid Technology*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Imanaka A. P., C. T. Amstutz, J. Gomez, P. M. Knobel, H. Shizuya, C. Chen, M. A. Battee, P. J. de Jong, 1994. A new bacteriophage-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Anal. Genet* 6: 84-89.
- Kim U.-J., B. W. Peterson, I. Niyogi, Y. Mizuno, C. Boyer, H.-L. Kang, M. T. Strain, H. Shizuya, 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 36: 213-218.
- Lorenzo E. D., J. M. Sedhy, 1990. A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *BioTechnology* 8: 841-844.
- Martin C., L. Bresnick, R. H. Liu, J. C. Venter, I. Vovchik 1991. Improved chemically-mediated DNA sequencing. *BioTechniques* 11: 110-114.
- Old R. W., S. B. Primrose, 1985 *Principles of Gene Manipulation*, 3rd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Sambrook J., E. F. Fritsch, T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Sigman J. L., K. F. O'Brook, P. P. Clee, 1993 Construction of λ clone banks, p. 121-146 In B. R. Glick and J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL
- Southern E. 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis *J Mol Biol* 98: 503-507
- Wingels E.-J. 1987. *From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology*. VCH, New York, N.Y

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое «понижаемая рестрикция типа II» и почему они так важны для создания рекомбинантных ДНК?
2. При обработке кольцевой двуцепочечной плазмиды рCEL1 различными рестриктазами в заданных количествах получаются следующие фрагменты (примеры указаны в заре-курсиве): *EcoRI* – 6,0; *BamHI* – 6,0; *HindIII* – 6,0; *HaeIII* – 3,0; 2,0 и 1,0; *EcoRI* и *HaeIII* – 2,0 и 1,0; *EcoRI* и *HindIII* – 3,5 и 2,5; *EcoRI* и *BamHI* – 4,5 и 1,5; *BamHI* и *HindIII* – 5,0 и 1,0; *BamHI* и *HaeIII* – 3,0; 1,5 и 0,5; *HindIII* и *HaeIII* – 3,0; 1,5; 1,0 и 0,5. Используйте эти данные, чтобы построить рестрикционную карту рCEL1.
3. Опишите применение плазмиды рHJ22 и качество вектора. Какими особенностями она обладает?
4. Опишите основные свойства системы клонирования рUC.
5. Объясните, как клон создан интегрированным плазмидного вектора, подвергнутому исчерпывающему гидролизу с помощью *BamHI*, с хромосомной ДНК, частично гидролизованной рестриктазой *Sau3A1*.
 - а. Почему в этом эксперименте используется два разных фермента?
 - б. Что такое «частичный гидролиз» и как это проводят?
 - в. Почему к нему часто прибегают для создания банков клонов?
6. Зачем рестрицированную плазмидную ДНК перед интегрированием «хотят обработать» азидной фосфатазой?
7. Опишите способы введения рекомбинантных плазмид в трансформателюки бактерии, например в *E. coli*.

Химический синтез, определение нуклеотидной последовательности и амплификация ДНК

Технологический прогресс в любой области науки всегда стимулирует ее дальнейшее развитие. С появлением новых технологий повышается возможность создать новые эксперименты и облегчается проведение старых. Становление молекулярной биотехнологии как науки обязано целому ряду технологических разработок; многие из них ныне широко применяются как в крупных исследовательских центрах, так и небольшими научными коллективами. Теперь не составляет особого труда химически синтезировать одну молекулу ДНК, определить нуклеотидную последовательность другой и амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции третью. Все это стало возможным благодаря той информации, которая была получена в ходе основополагающих исследований как самой ДНК, так и механизмов ее репликации. Эти экспериментальные данные стали неотъемлемой частью молекулярной клонирования процедуры, позволившей выделять из ДНК нужные фрагменты, характеризовать их и производить с ними разнообразные манипуляции.

Химический синтез ДНК

С разработкой быстрых и недорогих методов химического синтеза олигонуклеотидных ДНК-фрагментов с заданной нуклеотидной последовательностью методология молекулярного клонирования и характеристики ДНК существенно изменилась. Химически синтезированные олигонуклеотиды можно использовать для конструирования целых генов или их фрагментов, для амплификации специфических фрагментов

ДНК, для направленных мутаций и полимеризации ДНК, а также в качестве зондов при гибридизации и в качестве линкеры, абсорбирующего клонирование.

С появлением прибора для автоматического химического синтеза ДНК (ДНК-синтезаторов) получение олигонуклеотидов длиной <50 нуклеотидов стало более или менее рутинной процедурой. Основным компонентом любого ДНК-синтезатора является система капилляров и насосов, с помощью которых в реакционную смесь по строго заданной программе вводятся нуклеотиды и реагенты, обеспечивающие присоединение нужных мономерных единиц в растущей цепи. В отличие от биологического, в ходе химического синтеза ДНК на каждый новый нуклеотид можно присоединять к 5'-гидроксильному концу цепи. Так же как и биологически, последовательность в одной реакционной емкости, а продолжительность каждой из них и время отмыкания контролируются с помощью компьютера.

Фосфорамидитный метод

В настоящее время наиболее распространенным методом химического синтеза ДНК являются строгими блоками в нем являются амплифицированные дезоксирибонуклеотиды. Модификация состоит в присоединении в одной группе дезоксирибозы и дезоксириbose-3'-гидроксильной группы, в другой группе дезоксирибозы – гидроксида (3'-OH), который отсутствует в одной группе, не модифицируется. Такая модификация необходима для защиты нуклеотидов от нежелательных побочных реакций при росте цепи. Синтез осуществляется в

торой фазе (растущая цепь ДНК фиксируется на первом носителе), что позволяет проводить по реакции в одной емкости, легко отливать после каждого этапа ненужные реагенты и добавлять новые в количестве, обеспечивающем максимум возможное протекание реакции.

Этапы многоступенчатого синтеза представлены на рис. 5.1. Первый нуклеотид (клеточное основание + сахар) фиксируют на твердом носителе, обычно это пористые силикагелевые шары с порами диаметром примерно 3'-гидроксильная группа первого нуклеотида,

вторым будет 3'-концевым нуклеотидом симметричной цепи, прикрепляется в свободной молекуле, ковалентно связанной с носителем. Чтобы предотвратить неспецифическое взаимодействие 5'-гидроксильной группы первого нуклеотида до добавления в реакционную смесь второго нуклеотида, ее защищают с помощью диметокситриметиновой (ДМТ) группы (рис. 5.2). Такую группу содержат каждый присоединенный к растущей цепи нуклеотид, в конце того, он несет динитрофенильную группу, приведенную к 3'-фосфитной группе, которая в

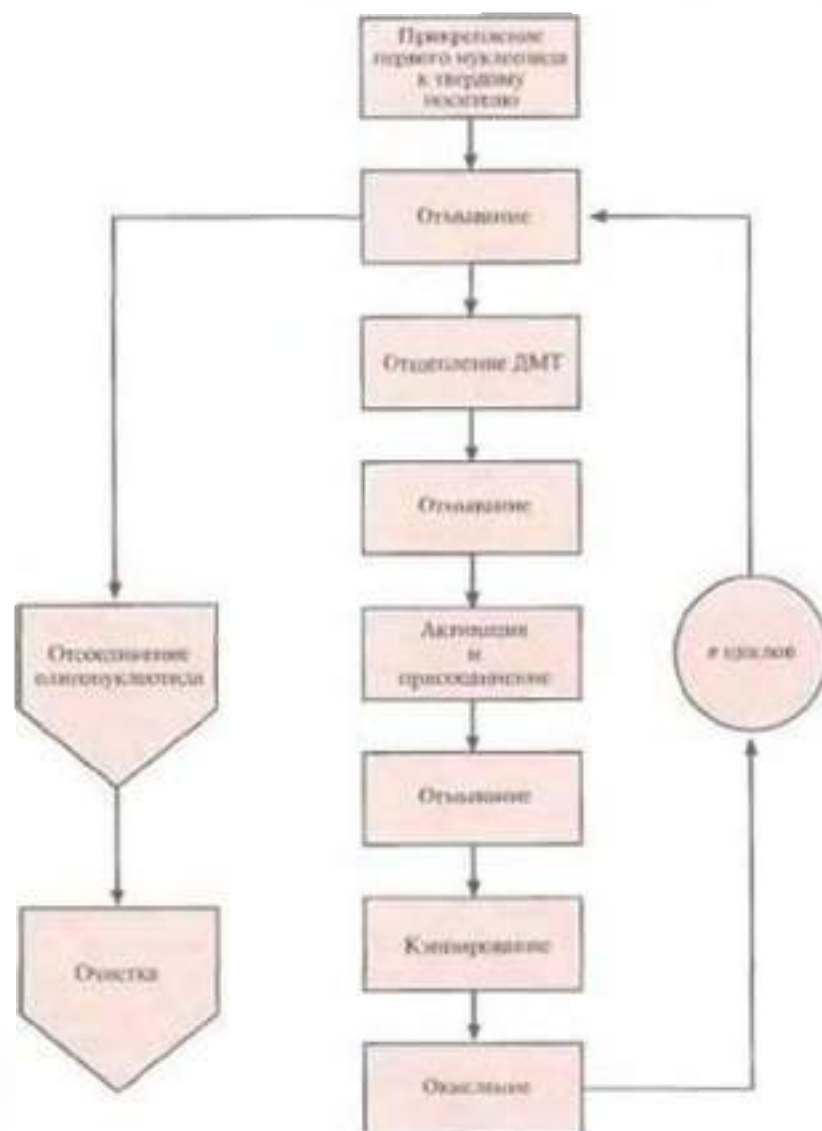


Рис. 5.1. Химический синтез олигонуклеотидов. После каждого этапа образуется олигонуклеотидный фрагмент ДНК на $n + 1$ нуклеотиде.

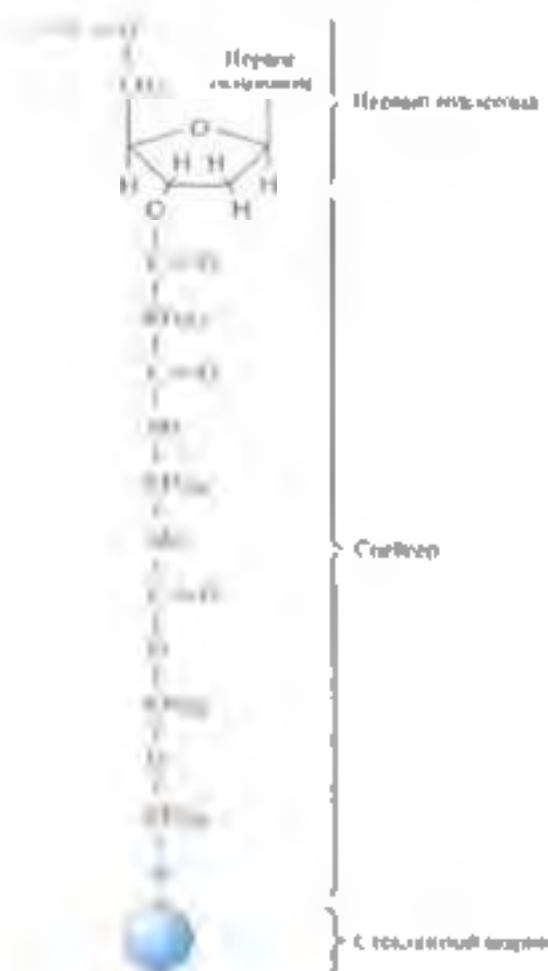


Рис. 5.2. Комплекс, в котором находится значительный синтез цепи ДНК в 5'-гидроксильной группе. Величина прироста нуклеотида-нуклеотида присоединены динуклеотидостриптин (ДНТ) (рис. 5.3) - гидроксильной группе - циклическая молекула. Последняя в своем очередь связана с первым нуклеотидом (нуклеотидом-стенной шариком)

своей очереди защищена метильным остатком (рис. 5.3). Такая дисексуальная конфигурация и называется фосфорамидит.

Цепь начинается после присоединения первого нуклеотида в стержневому шарик. Для ее концы обычно формируют каким-либо безвредным веществом (например, ацетиламином), чтобы удалить воду и другие нуклеофильные вещества, и производят через нес арсен для вытеснения динуклеотида. Затем с помощью трифос-

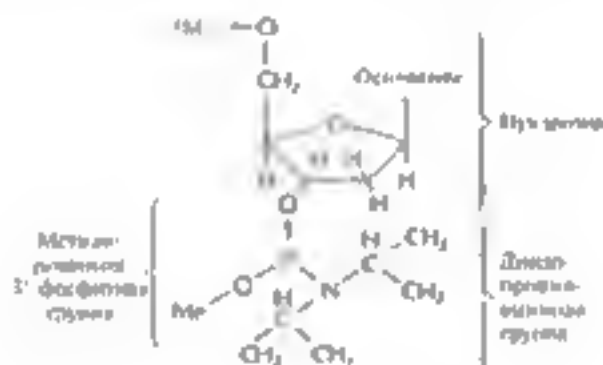


Рис. 5.3. Структурная формула фосфорамидита. Такие производные всех четырех оснований - А, Т, С и Г - используются для синтеза цепи ДНК. ДНТ динуклеотид. Me - метильная группа

фосфорной кислоты (ТФУ) специализирует 5'-ДНТ (ацетиламиномидит) на присоединенного нуклеотида, с тем чтобы высвободить (экспонировать) реакционноспособную 5'-гидроксильную группу (рис. 5.4). Ключевую роль играют восточный для удаления ТФУ и производят через нес арсен для удаления динуклеотида. Процесс динуклеотида таким образом, чтобы на первом этапе в концы одновременно включаются следующие нуклеотиды (в виде фосфорамидита) и тетрафосфата (активация и присоединение). Тетрафосфат активирует фосфорамидит, так что 3'-фосфитная группа образует комплексную связь с 5'-гидроксильной группой первого нуклеотида (рис. 5.5). Непосредственно фосфорамидит и тетрафосфат удаляют производимых арсени.

После этого по окончании первого этапа все активированные на месте нуклеотиды образуются связанными с фосфорамидитом, необходимо преобразовать их в нуклеотиды, добавленным на втором этапе. Для этого перереагировать 5'-гидроксильную группу активирует с помощью искусственной динуклеотида и динуклеотида (активирование) (рис. 5.6). Если этого не сделать, то уже после нескольких циклов синтезируемые динуклеотиды будут различаться как по длине, так и по нуклеотидной последовательности.

Фосфорамидитная связь, образованная на втором этапе между нуклеотидами, нестабильна и может различаться в присутствии кис-

Рис. 9.4 Дестритилирование — отщепление 5'-дифосфорильной (ДДФ) группы с помощью фтороуксусной кислоты (ТХУ)

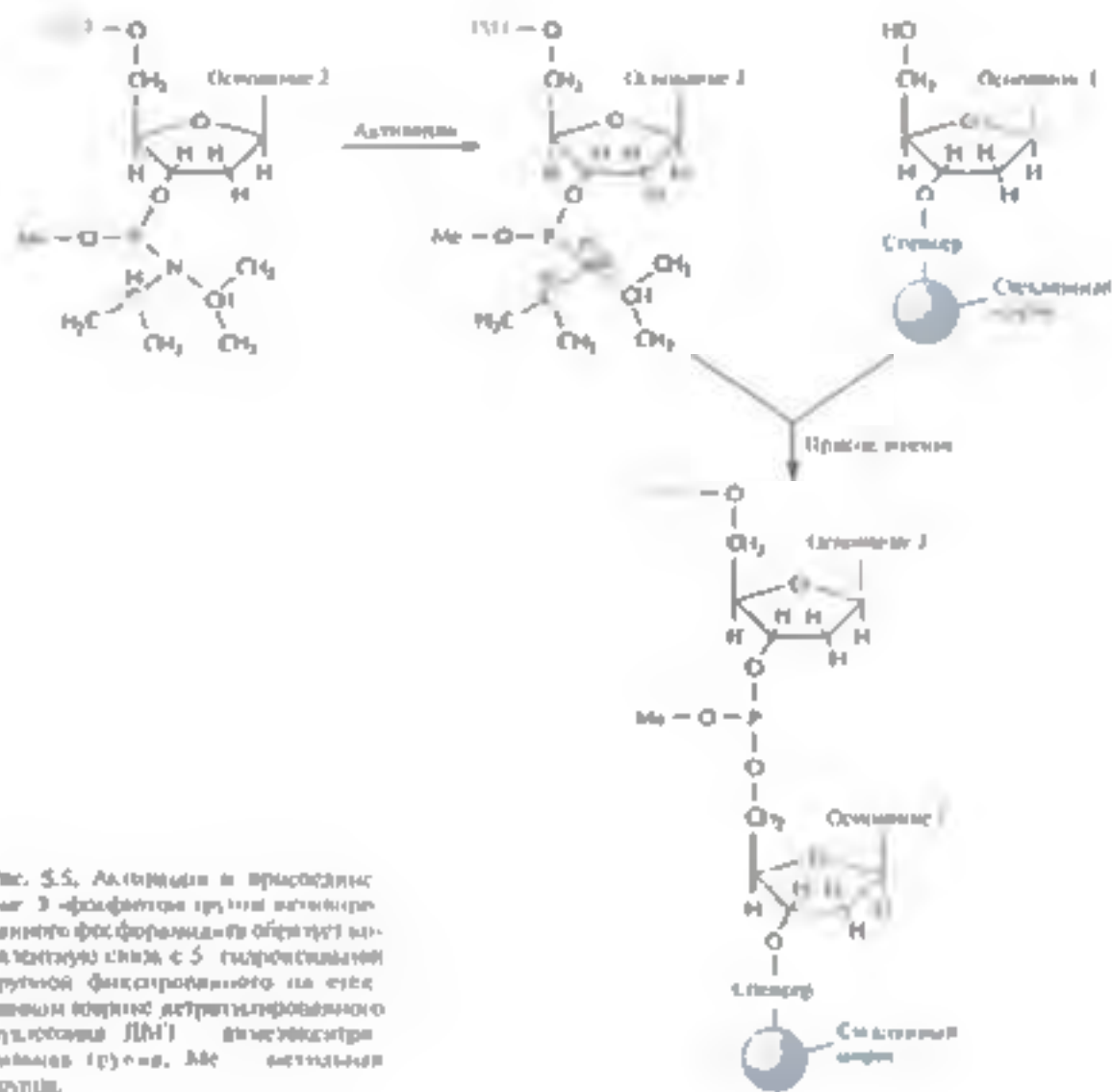
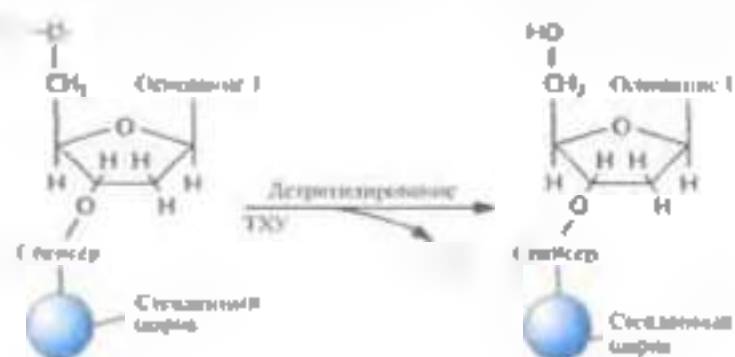


Рис. 9.5 Активация и включение с помощью 3'-фосфорильной группы активирующего фосфорильного объекта (или метильную группу с 5'-гидроксилированной группой) фиксированного на еще одном объекте дестритилированного нуклеотида (ДН) амплификационной смеси (группа Me — метильная группа).

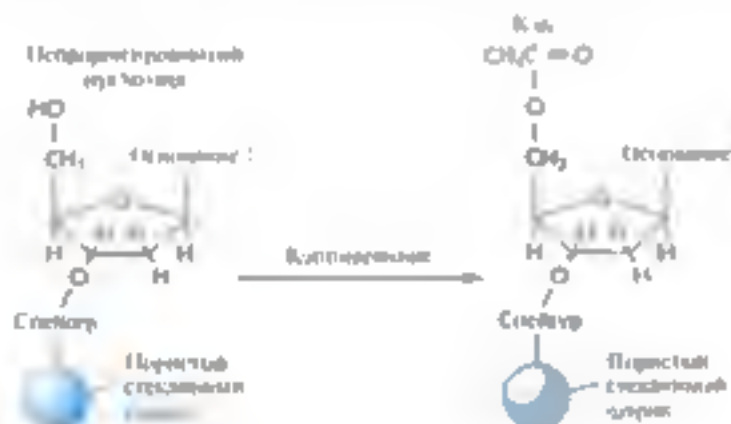


Рис. 5.6 Кэпирование. Свободные 5-гидроксильные группы нуклеотидов фосфорилируются в стрелы ниже с целью предотвращения их участия в соединении с нуклеотидом.

лочи или щелочи. Поэтому фосфаттриэфир окисляют с помощью иодной смеси во более стабильного пятивалентного фосфаттриэфира (рис. 5.7). Затем применяют щелочку и контролируют весь цикл (детриптеризацию, активацию и фосфорилирование, кэпирование, окисление; рис. 5.1). Все описанные операции проводят до тех пор, пока к растущей цепи в соответствии с программой не присоединится последний нуклеотид. Синтезируемые олигонуклеотиды связывают с силикатными шариками; каждый фосфаттриэфир несет метильную группу, являясь группой,

находясь в цепи, содержит замещенную аминную группу, а на 5' конце последнего нуклеотида находится ДМТ-группа.

Метильные группы удаляют с помощью химической обработки непосредственно в реакционной колонке. Затем присоединяют олигонуклеотиды от спейсерной молекулы вместе с 3'-гидроксильными концами и элиминируют колонкой, далее последовательно удаляют бензоильные, изобутиральные и ДМТ-группы. 5-конец цепи фосфорилируют фермициплатином (пшеничнокислоткиназой T4+ATP) или химиче-

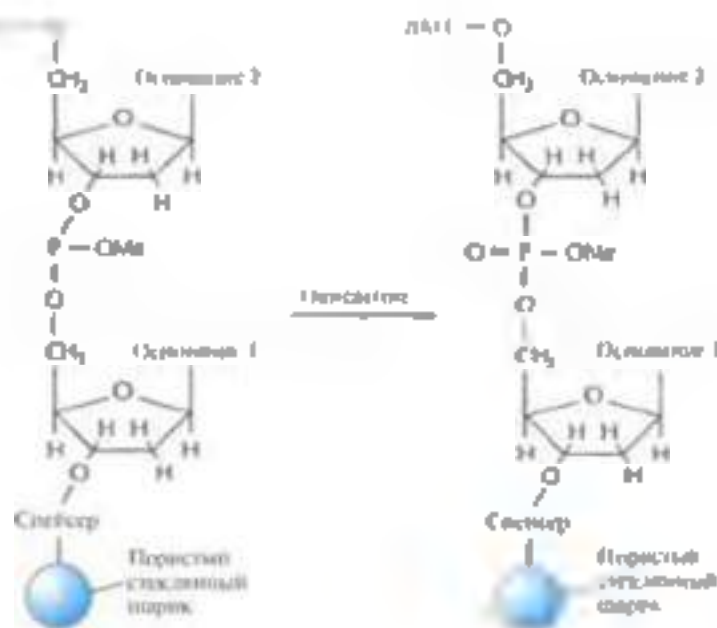


Рис. 5.7 Окисление. Фосфаттриэфир окисляется во пятивалентного фосфаттриэфира. Это приводит к стабилизации фосфорилированной цепи и делает ее более устойчивой к действию кислот и щелочей. ДМТ - диметилсульфонильная группа, Me - метильная группа.

ским методом. Эту реакцию можно проводить и тогда, когда олигонуклеотид еще связан с носителем, но после дезпротектирования.

Чтобы выход продукта был достаточно высоким, эффективность присоединения нуклеотида под каждым звеном должна быть не ниже 98%. Эффективности контролируют спектрофотометрическими методами, измеряя количество удаляемых трифенильных групп. Если, например, при синтезе 20-мерного олигонуклеотида эффективность каждого звена равна 99%, то 82% (т. е. $0,99^{20} \cdot 100$) олигонуклеотидов будут иметь именно такую длину. Если же синтез осуществляется с помощью олигонуклеотида, то при той же эффективности только 45% олигонуклеотидов будут содержать по 60 нуклеотидов. А если средняя эффективность звена не превышает 98%, то доля олигонуклеотидов такой длины будет гораздо ниже (табл. 3.1). Фирмы-производители коммерческих ДНК синтезоров обычно стандартизируют среднее значение эффективности приблизительно 98%. Но для этого необходимо использовать реагенты и материалы очень высокой степени чистоты, что не всегда удается выполнить. Как правило, реальная эффективность приблизительно составляет 95%, хотя иногда у некоторых достигают и 99%-ной эффективности. Чтобы получить олигонуклеотиды заданной длины, неочищенные продукты биохимической синтетической необходимо очистить с помощью либо высокоэффективной жидкостной хроматографии либо высокой давлением с обращенной фазой, либо электрофореза в полиакриламидном геле. Поскольку все неучтенные последовательности короче, чем тот олигонуклеотид, который хотят получить, сделать это не трудно.

Таблица 3.1 Средний выход олигонуклеотидов заданной длины (n) при разных значениях средней эффективности звена (%)

Эффективность, %	Число звеньев, %				
	n = 20	n = 40	n = 60	n = 80	n = 100
90	37	1,5	0,18	0,02	0,003
95	46	11	4,8	1,7	0,6
98	67	41	20	20	11
99	82	67	55	45	37
99,5	90	82	74	67	61

Прицепные синтезированные олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды, синтезированные смешанным методом, находят широкое применение в молекулярной биотехнологии. Их используют в качестве зондов при ДНК-гибридизации, лигировании, соединивших разных молекул ДНК в экспериментах по клонированию, например при секвенировании ДНК или осуществления сайт-специфической мутагенной клонированных генов-мишеней.

1. Нуклеотидную последовательность специфически олигонуклеотидных зондов (длиной 20-40 звеньев) навешивают на звено с определенной последовательности сайт-специфичных белков.
2. Для получения лигированных олигомеров, которые представляют собой разнородные олионеполеченные нуклеотидные последовательности, старинной метод (гибридизация) между собой. Лигируют содержат сайты узнавания для рестрицирующих эндонуклеаз, что позволяет осуществлять с их помощью контролируемые фрагментации ДНК (рис. 3.к, А и Б). Короткие лупы длиной 4-12 пар нуклеотидов интегрируют в трюм канавки с ДНК-мишенем (обычно кДНК). Разрезают такую молекулу нужной рестрицирующей эндонуклеазой и получают фрагменты с выступающими олионеполеченными концами (поплыми концами), с помощью которых остранивают ДНК-мишень в соответствующий вектор. Прежде чем проводить остранивание, рестрицированную смесь фракционируют для отсеивания ДНК с длинными концами от длинных олионеполеченных молекул. Вектор тоже обработывают рестриктазой, отщипывают его с фрагментами ДНК с длинными концами и соединяют с помощью ДНК-лигазы типа T4. ДНК-мишень не должна содержать сайтов рестрикции, присутствующих в лигированной последовательности, в противном случае она также будет расщепляться ферментом.
3. Олионеполеченный лигированный последовательности, так называемые «длиннораз», час

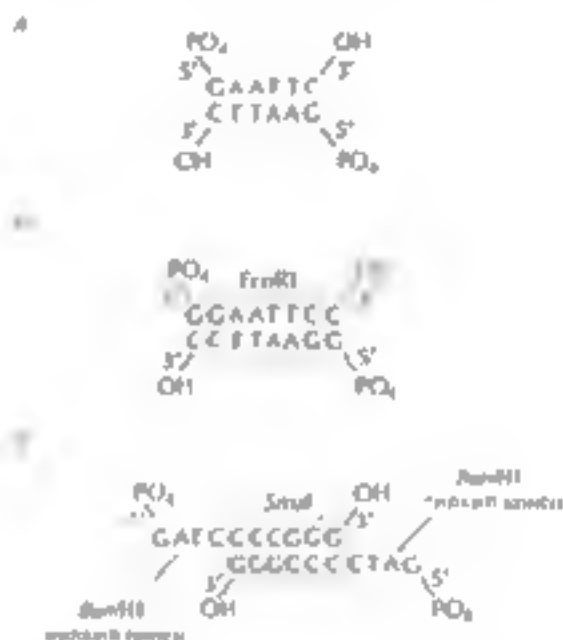


Рис. 5.8. Типовые векторы и сайты. *A.* EcoRI сайт, расположенный на 6 пар нуклеотидов. *B.* PstI сайт на 5 пар нуклеотидов. *B.* BamHI/SmaI сайты с 11 парными концами и сайтом узнавания для SmaI.

то содержит сайты для двух и более рестриктаз (рис. 5.8). С их помощью можно встраивать κДНК в вектор независимо на любых концах, а затем вырезать, используя другую рестриктазу. Адаптер, изображенный на рис. 5.8, B, встраивают в BamHI сайт вектора перед введением κДНК-вставки в SmaI-сайт на тугой конец. После клонирования κДНК вырезают из вектора с помощью рестриктазы BamHI. В этом случае вектор не должен содержать SmaI-сайтов, и ни вектор, ни κДНК не должны нести BamHI сайты.

1. Одноцепочечные олигонуклеотиды из 17–24 нуклеотидов используют в качестве примеров при амплификации ДНК в процессе ПЦР.
2. Одноцепочечные олигонуклеотиды используют в качестве примеров для сайт-специфического мутагенеза *in vitro*.

6. Необходимость в химическом синтезе нуклеотидной последовательности, кодирующей конкретный белок, может возникнуть тогда, когда клонирование соответствующего гена затруднено. При этом нуклеотидную последовательность гена находят из данных об аминокислотной последовательности белка. К химическому синтезу прибегают и тогда, когда копии, из которых состоит данный ген, плохо считаются органами животного, и уровень транскрипции оказывается очень низким. В таком случае можно синтезировать ген с таким набором кодонов (оптимизация кодонов), при котором аминокислотная последовательность кодируемого белка остается прежней, а кодоны считаются химическим организмом более эффективными.

Синтез генов

Если химический синтез проводить двухцепочечную ДНК предлагается использовать в качестве гена или генофрагмента, то каждую из цепей синтезируют отдельно. Получить короткие гены (60 п. н.) химически несложно: для этого синтезируют комплементарные цепи и затем отщипывают их. В случае крупных генов (>300 п. н.) приходится применять специальные стратегии, поскольку дифференциальное выделение химического синтеза невозможно достигают 100%. Например, если ген состоит из 999 пар нуклеотидов, а эффективность каждого нуклеотида равна 99%, то доля полинуклеотидных олигонуклеотидов по окончании процесса составит не более 0,009%. Чтобы решить эту проблему, синтетические (искусственные) гены собирают из модулей — (одноцепочечных) фрагментов длиной от 20 до 100 нуклеотидов.

Один из способов конструирования синтетического гена заключается в получении набора олигонуклеотидов длиной 20–60 нуклеотидов каждой с трехкратным избытком в кончиках. Нуклеотидные последовательности цепей делают так, чтобы после отщипа концевые сегменты генов имели ту же концы, каковы внутреннему сегмент имеет выступающие 3'- и 5'-концы. Комплементарные таким соседним сегментам (рис. 5.9). После сборки гена остается только ал-

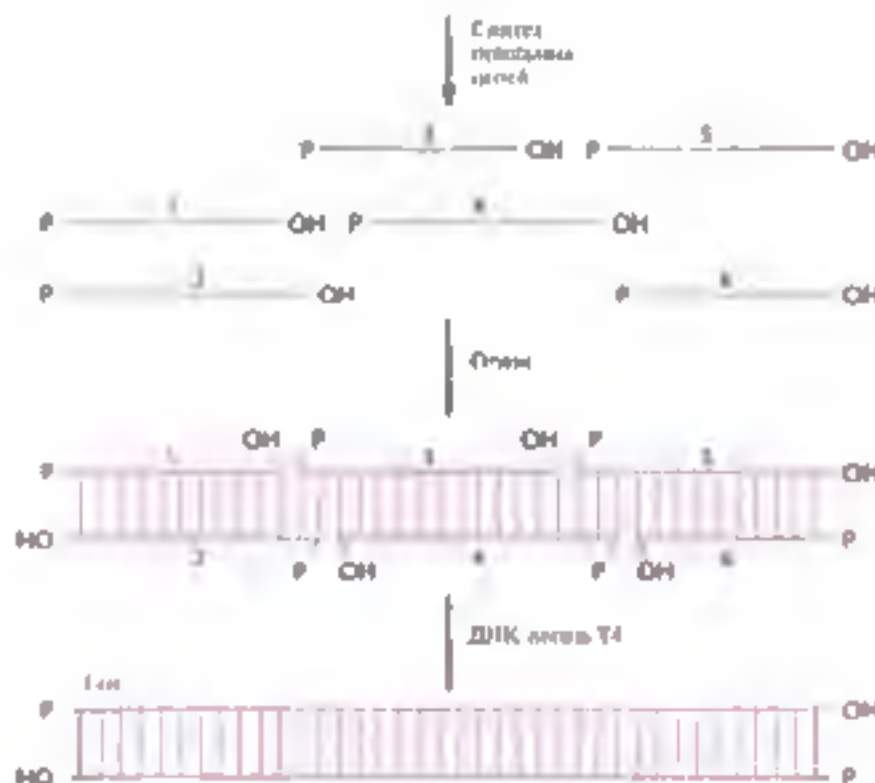


Рис. 5.9. 4 формы синтетически генов из олигонуклеотидов. Синтезируют олигонуклеотиды длиной от 20 до 40 нуклеотидов с известной нуклеотидной последовательностью, чтобы при отщеплении образовалась двуцепочечная молекула. Остаются одноцепочечные разрывы, связывают с помощью ДНК-лигазы T4.

нуклеотидные разрывы с помощью ДНК-лигазы T4. Синтетические гены могут быть сконструированы так, чтобы помимо белок-кодирующей последовательности они содержали кодовые участки, обеспечивающие их правильное и контролируемое вставку (сайты для рестризирующих эндонуклеаз), а также, если это необходимо, сигнальные последовательности для эффективной инициации и терминации транскрипции и трансляции.

Для получения клональной библиотеки другим способом тоже обычно синтезируют специфический набор перекрывающихся олигонуклеотидов длиной от 40 до 100 нуклеотидов. При их отщеплении происходит спаривание 3'- и 5'-концевых комплементарных нуклеотидов, а между ними остаются флагирующие брейки. Протяженность спаренных участков достаточно велика,

чтобы стабилизировать всю структуру. Брейки заполняют ферментативным путем с помощью ДНК-лигазы I *Escherichia coli*, используя 3'-нуклеотидные группы для инициации репликации и одноцепочечные участки в качестве матрицы. Остающиеся одноцепочечные разрывы связывают с помощью ДНК-лигазы T4 (рис. 5.10).

Более протяженные гены (>1000 п. н.) обычно собирают из двухцепочечных фрагментов, каждый из которых по свою очередь состоит из 4-х перекрывающихся олигонуклеотидов (от 20 до 40 п. н. каждый). Если после синтеза определить достаточное количество фрагментов, то их просто соединяют друг с другом. В противном случае каждый фрагмент клонируют и амплифицируют. Двухцепочечные фрагменты последовательно соединяют друг с другом до образования полноразмерного гена. Чтобы гарантировать,

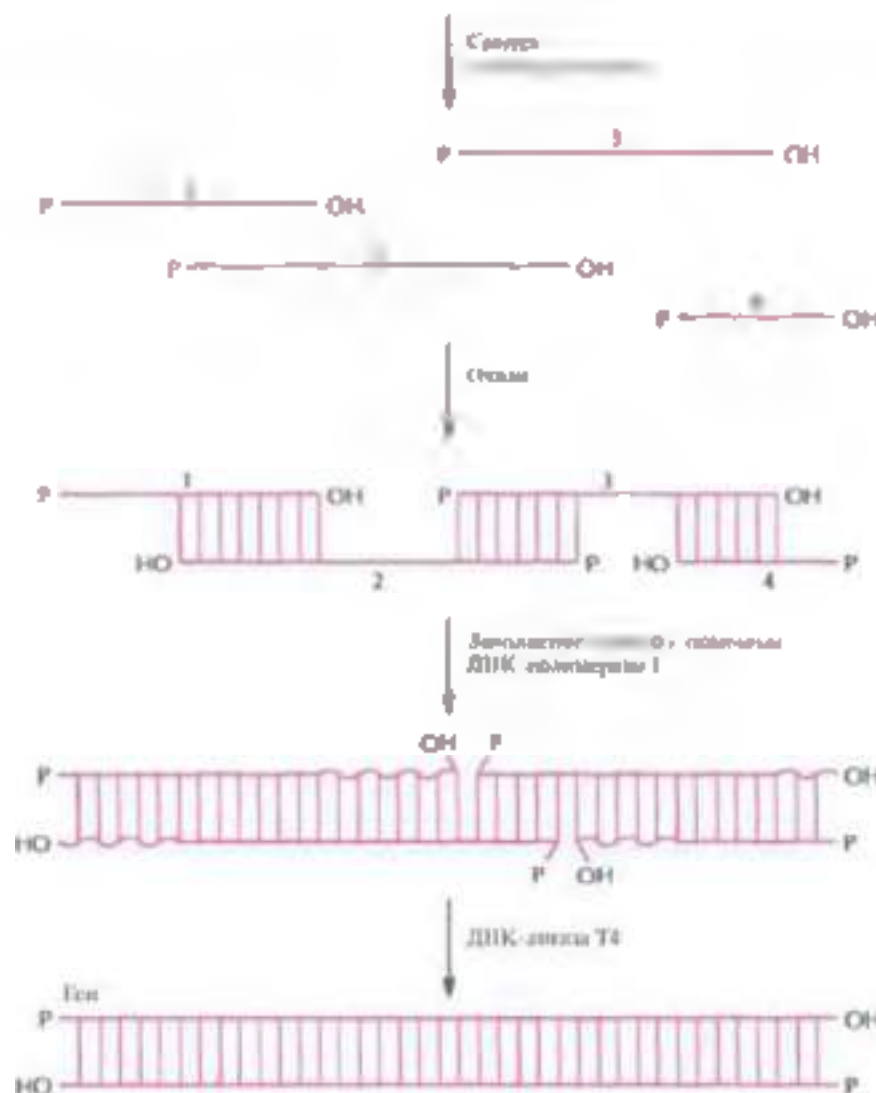


Рис. 5.10. Сборка синтетического гена *in vitro* с участием ферментов. Вначале лимитированной длиной синтезируют отдельные олигонуклеотиды с заданной нуклеотидной последовательностью, чтобы при встрече между ними образовывались спаренные участки длиной 6–10 пар нуклеотидов. Оставшиеся между ними фрагменты соединяет с помощью ДНК-полимеразы I (1–2), а окончательно фрагменты соединяет ДНК-лигаза T4.

(правильности нуклеотидной последовательности) химическим путем с помощью метода, основанного на каждой динуклеотидной фрагмент, а затем и весь ген).

Методы секвенирования ДНК

Исторически самым информативным методом получения, вплоть до недавних лет, нуклеотидную последовательность. Так, секвенирование

гена, часто удается установить его функцию, сравнить его нуклеотидную последовательность с таковыми для генов, функция которых уже известна. Без данных о нуклеотидной последовательности невозможно проводить исследования по молекулярной клонированию. Секвенирование или для одного фрагмента ДНК можно провести либо химическим методом, разработанным А. Максамом и В. Гилбертом, либо ферментативным, предложенным Ф. Сэнгером, но и

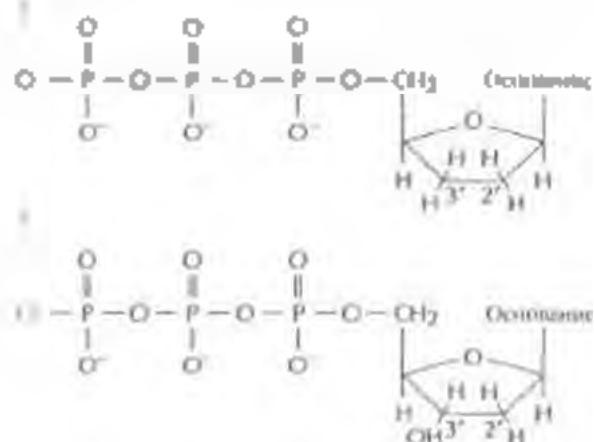


Рис. 3.11. *А* Нуклеотидная единица (отсутствуют 2- и 3'-гидроксильные группы в кольце). *Б* Дезоксирибонуклеотид (присутствует только 2-гидроксильная группа)

не посвященного нуклеотида растущей цепи (рис. 3.12). И если таким очередным присоединяемым звеном является дезоксирибонуклеотид, то синтез ДНК останавливается, поскольку следующий нуклеотид не может образовать фосфоэфирную связь (рис. 3.13). Остановка синтеза ДНК — это ключевой этап дивергенции, но чтобы осуществиться ее необходимо выполнить целый ряд условий.

Первый этап стандартной процедуры выделения-секвенирования состоит в гибридизации синтетического олигонуклеотида длиной (7–20 звеньев со специфическим участком одной из дочерей копирующей цепи, соседствующим со оставкой. Этот олигонуклеотид называется праймером, предоставляющим 3'-гидроксильную группу для иницииции синтеза. Раствор с праймером распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находится четыре дезоксирибонуклеотида: dATP, dCTP, dGTP и dTTP (одни из них временно меченные), и один из четырех реагентов дезоксирибонуклеотидов (ddATP, ddCTP, ddGTP или ddTTP). Концентрацию каждого дезоксирибонуклеотида плавно снижают таким образом, чтобы он оказался включенным во все поименно в свои растущие цепи, а не только в первую встретившейся ему потянутой. (Напомним, что после присоединения деоксирибонуклеотида рост цепи сразу останавливается,

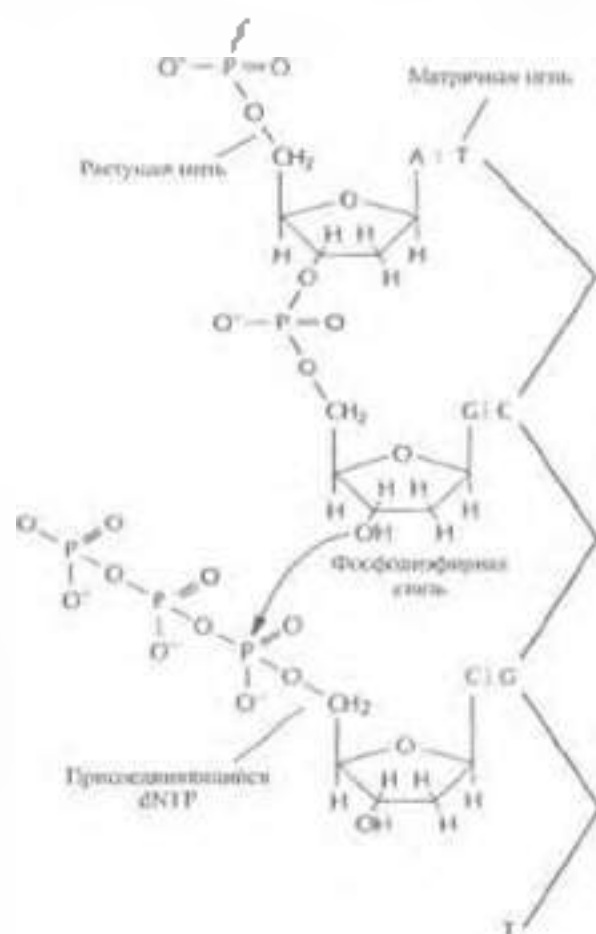


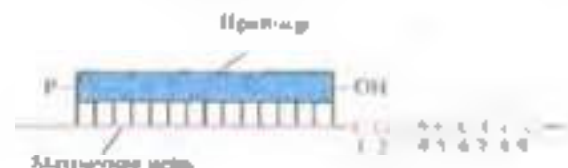
Рис. 3.12. Синтез ДНК в обычных условиях. Очередной дезоксирибонуклеотид (дезоксидрибонуклеосид трифосфат: dNTP) соединяется с комплементарным нуклеотидом матричной цепи. Между 3'-гидроксильной группой последнего нуклеотида в растущей цепи и 5-фосфорной группой присоединяемого нуклеотида образуется фосфоэфирная связь.

потому каждая цепь оказывается 3'-деоксирибонуклеотидом.) Но поименно ферментативного синтеза при участии ДНК-полимеразы в каждой пробирке оказывается уникальным набор олигонуклеотидов, каждый из которых содержит праймерную последовательность (рис. 3.14).

Далее в пробирки добавляют формамид, чтобы обеспечить разномолекулярность, и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках (по числу пробирок). Это так



Рис. 5.13. Остаток - сфинтис ДНК все же принадлежит гидроксильной группе в конце р-группы или фосфатной группе связи между спинами двух соседних нуклеотидов и следующим нуклеотидом не имеет ничего общего с 3'-OH группой того же нуклеотида.



Примеры-тип (dNTP)	Примеры в длину дистрибутивной последовательности	Примеры и выстраивание последовательности
dATP + тип dNTP	Пример +3 Пример +3 Пример +3	Пример dTCCdA Пример-dTTCdAdTCCdAdA Пример dGdCAdTCCdAdA
dCTP + тип dNTP	Пример +2 Пример +3	Пример dTCC Пример-dTCCdAdTCC
dGTP + тип dNTP	Пример +1 Пример +6	Пример dAT Пример dGdCAdAdTCCdAT
dTTP + тип dNTP	Пример +4 Пример +9	Пример dTCCdAT Пример dTCCdAdTCCdAdAdAdAT

можно разделить одноцепочечные фрагменты ДНК, даже если они различаются по длине всего на один нуклеотид. На радиоавтографе обнаруживается набор полос, отвечающих меченым фрагментам ДНК, сопоставление которых позволяет прямо «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК. В примере, приведенном на рис. 5.15, первые шесть нуклеотидов левого сегмента, начиная с 5'-конца, это АССТГС. Самая «быстрая» полоса (радиоактивно меченый фрагмент в самом низу геля) соответствует такому короткому фрагменту и находится в дорожке ddATP, следующие полосы располагаются соответственно в дорожках как ddCTP, ddGTP, ddTTP и т.д. На большинстве радиоавтографов четко различается от 250 до 350 полос. Примерная последовательность находится на фиксированном расстоянии (10-20 нуклеотидов) от 3'-OH сайта, по которому встроены в цепь нуклеотиды ДНК, что позволяет легко распознать начало клонированного фрагмента.

Секвенирование ДНК с помощью вектора на основе флага M13

Для определения нуклеотидной последовательности клонированных ДНК используются разные подходы. Среди них первым основывался на

Рис. 5.14. Удлинение примеров при синтезе с использованием дидезоксирибонуклеотидов. В каждой из четырех дорожек образуется 3'-гидроксильный набор синтетических нуклеотидов разной длины, соответствующий примерному последовательности. При этом образуется и в каждой дорожке молекула ДНК dNTP = дезоксирибонуклеотидтрифосфат

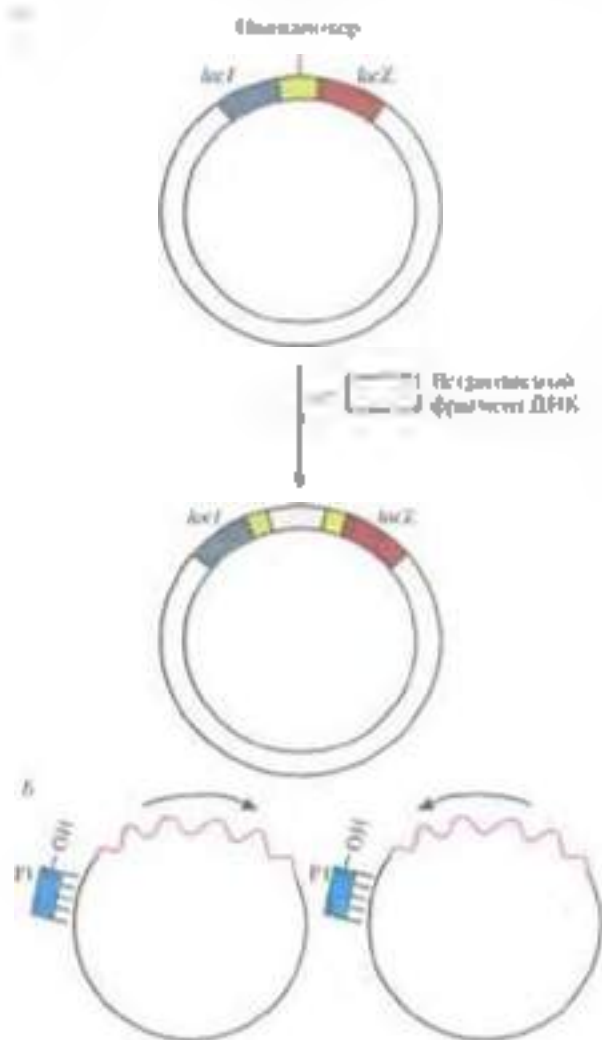


Рис. 9.16. **А** Внеклеточный МД-кислородный и селективный **А** Внеклеточный фрагмент ДНК в двухцепочечную репликационную форму ДНК МД. **Б** Селективное амплифицирование с использованием фрагментов ДНК с линейной формой и тем же праймером (P1) в реальном времени показывая ориентацию вставки в векторе

ориентации. В результате в первом случае праймер будет инициировать синтез первой цепи, а в другом — второй

Праймер-опосредованная промывка («Блуждающая затравка»)

Для селективного очень длинных фрагментов ДНК (>5000 п. н.) описанный выше подход уже не может быть использован, поскольку число

МД-векторов, содержащих перестроившиеся субклонированные последовательности, не только увеличивается. Чтобы решить эту задачу, были разработаны методы селективного двухцепочечных плазмидных ДНК, не требующие субклонирования плазмидных ДНК, содержащую нуклеотидную вставку, позволяющую идентифицировать первые 250–350 нуклеотидов вставки. Методы эти даны в синтезируемой второй или третьей цепочкой праймера, который гибридуется с последовательностью в вставку из первой цепи ДНК, находясь в области вставки. Затем осуществляется шаг доконтрастирования, позволяющий идентифицировать первые 250–350 нуклеотидов вставки. Методы эти даны в синтезируемой второй или третьей цепочкой праймера, который гибридуется с последовательностью в вставку из первой цепи ДНК, находясь в области вставки. Затем осуществляется шаг доконтрастирования, позволяющий идентифицировать первые 250–350 нуклеотидов вставки. Методы эти даны в синтезируемой второй или третьей цепочкой праймера, который гибридуется с последовательностью в вставку из первой цепи ДНК, находясь в области вставки.

К сожалению, в результате ошибочного старания праймера меньшей длины с более чем одним участком внутри цепи могут быть получены неоднородные результаты. Чтобы избежать этого, используют праймеры длиной не менее 24 нуклеотидов и стараются строго соблюдать условия старания. Именно таким образом были селективированы фрагменты ДНК, клонированные в бактериофаге λ (~20 т. п. н.) или в космидном векторе (~40 т. п. н.).

Некоторые этапы этого процесса недавно были автоматизированы. Это позволило проводить рутинное селективное фрагментирование нескольких десятков тысяч пар нуклеотидов. Во многих случаях праймеры, добавляемые в реакцию, имеют разные промывки, метод различиями флуоресценции или красителями с разной длиной волны флуоресценции. Затем соединяют все четыре пробирки соединяют и проводят электрофорез на одной дорожке. Дорожку сканируют в луче лазера и регистрируют

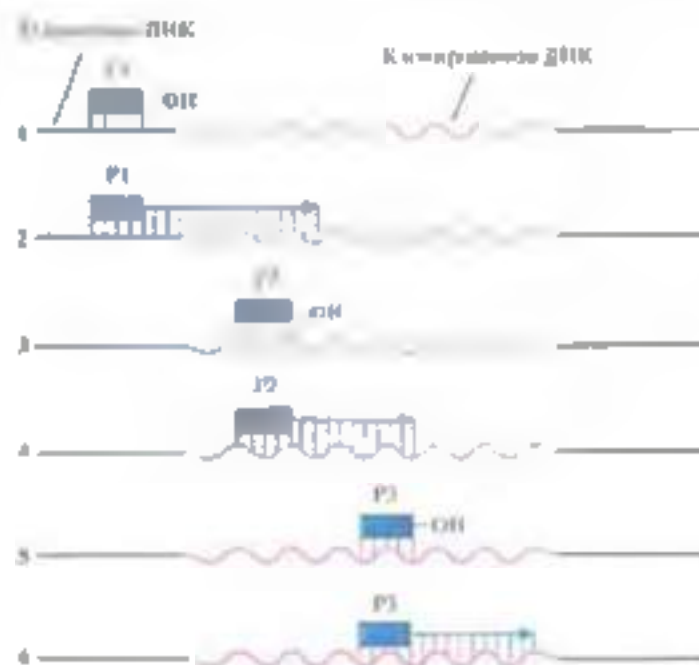


Рис. 5.17. Схематическое ДНК-полимеразное расширение цепей ДНК. 1. Цепи ДНК (цепи ДНК с полимером (P1), комплементарный участку матрицы, комплементарный участку матрицы). 2. Селективное (специфическое) расширение ДНК полимером (P2) 3. Цепь ДНК (цепь ДНК с полимером (P2) уже от матрицы) последовательности длиной примерно 20 нуклеотидов. 4. Селективное расширение цепи ДНК с полимером (P2) 5. Цепь ДНК (цепь ДНК с полимером (P3) уже от матрицы) последовательности длиной примерно 20 нуклеотидов. 6. Цепь ДНК (цепь ДНК с полимером (P3) уже от матрицы) последовательности длиной примерно 20 нуклеотидов.

позволяет каждой флуоресцирующей этикетке ДНК-цепи входить в комплементар, который состоит из нуклеотидов в ДНК-цепи последовательности.

Полумерация цепей реакции

Полумерация цепей реакции (ПЦР) - это эффективный способ получения in vitro большого числа копий специфически нуклеотидной последовательности. Из амплификации - иногда в миллионы раз - осуществляется в ходе реакции инао цинк-медиоля протекса. Для ПЦР необходимы: 1) два селективных олигонуклеотидных праймера (длина праймера до 20 нук. оснований), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, флуоресцирующая нуклеотидами (используемые нуклеотиды) на 3'-гидроксильных концы (используемые нуклеотиды) быть ориентированы навстречу друг другу; 2) ДНК-матрица (длина от 100 до 25 000 н.к.); 3) термостабильная ДНК-полимераза, которая не теряет своей активности при температуре 95° и выше; 4) четыре деоксирибонуклеотида.

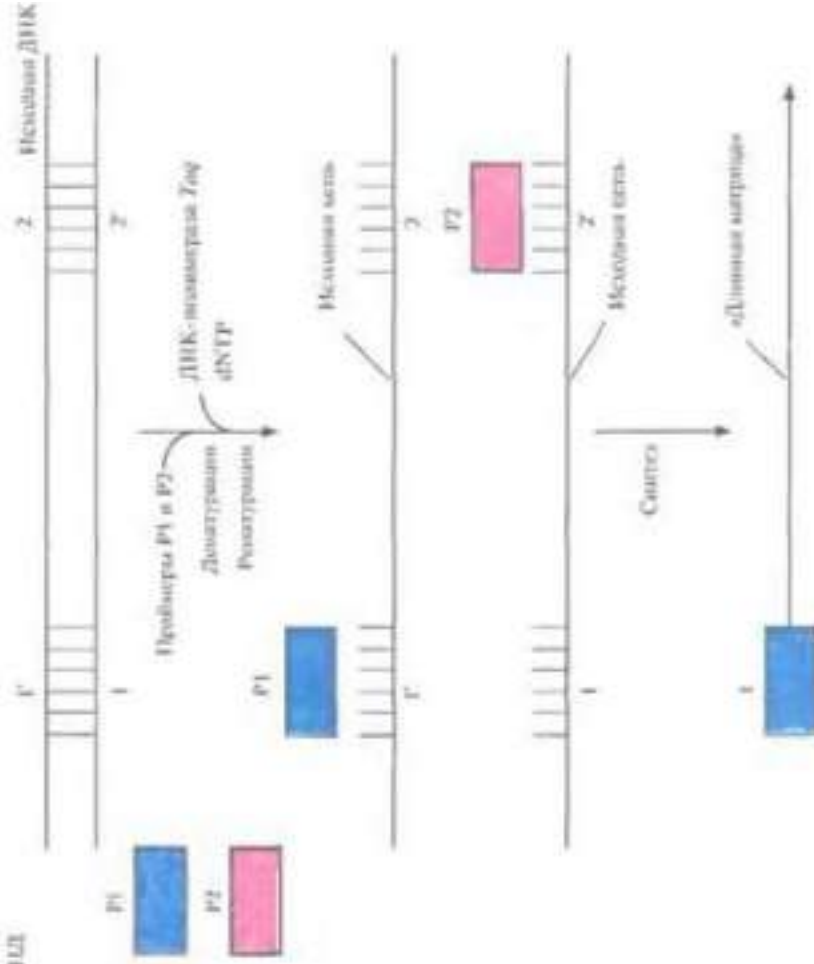
Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном (обычно 25-35) циклах реакции

1. **Денатурация** Первым этапом ПЦР является денатурация образцов ДНК, осуществляемая при температуре 95°С в течение от 1 до 3 мин. Помимо ДНК, в реакционную смесь добавляются в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза Taq, выделяемая из бактерии *Thermus aquaticus*, и четыре деоксирибонуклеотида.
2. **Аннеaling** Температуру смеси медленно понижают до 55°С, при этом праймеры связываются с комплементарными последовательностями ДНК.
3. **Синтез** Температуру снижают до 75°С - температура, оптимальная для ДНК-полимеразы Taq. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, инициируемый 3'-гидроксильной группой праймера (рис. 5.18).

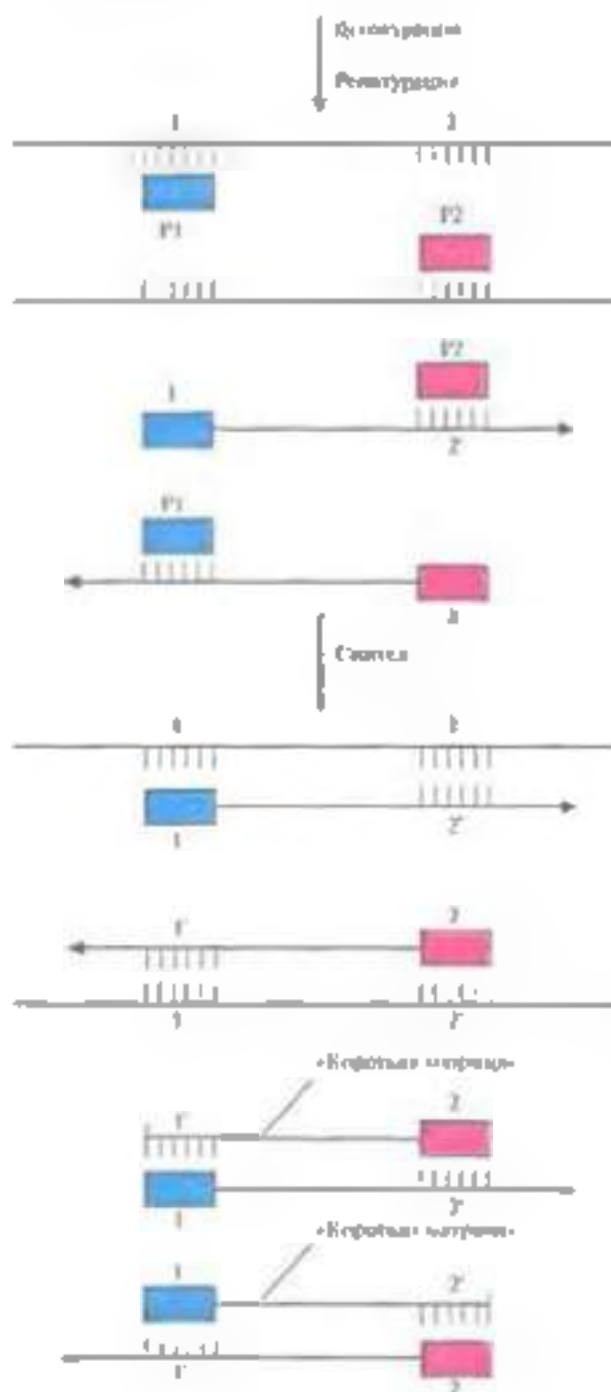
Все реакции протекают в пробирке, температура которой поддерживается автоматически с помощью устройства автоматического контроля. Каждый цикл обычно длится 1-5 мин.

Чтобы понять, как именно происходит амплификация определенного участка ДНК в ходе ПЦР, нужно четко представлять нуклеотидную последовательность и комплементарность нуклеотидов

ПЕРВЫЙ ЭТАП



Второй раунд



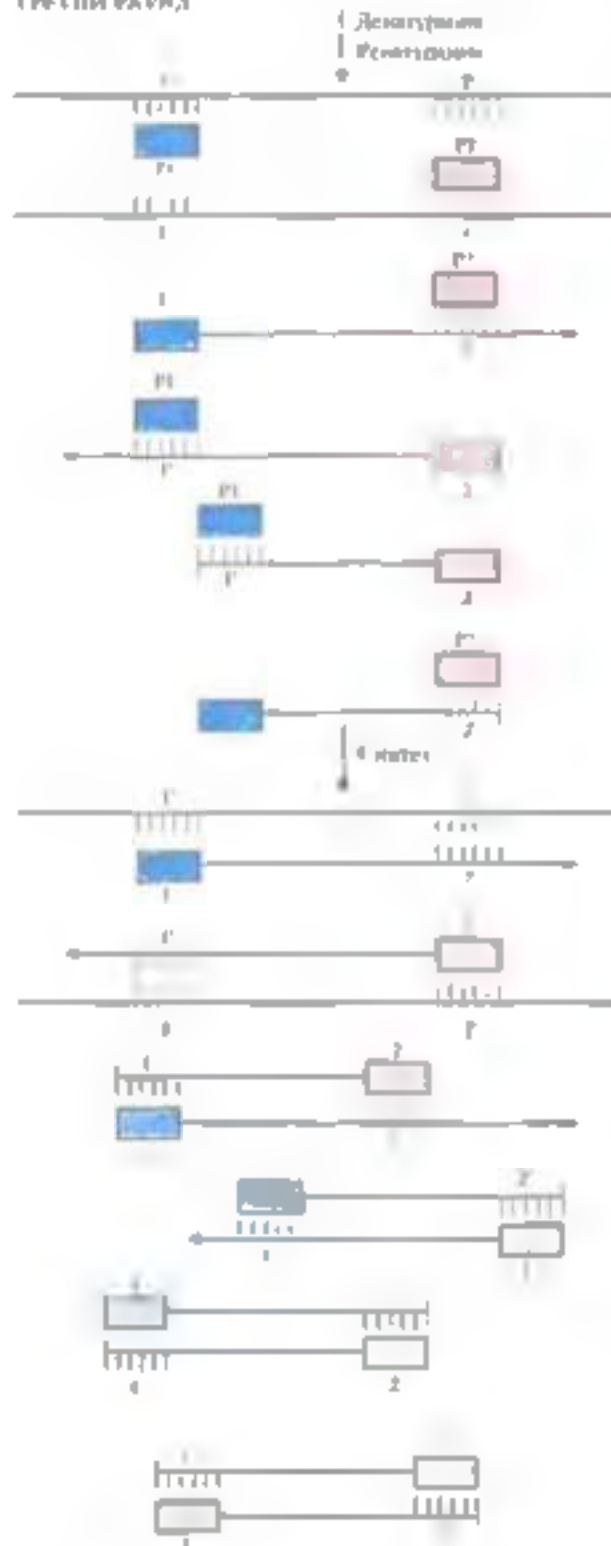
Во втором раунде двухцепочечную ДНК, состоящую из исходной и новоиспеченной («длинной матрицы») цепей, снова подвергают денатурации, а затем отжигают с праймерами. Во время синтеза в этом раунде вновь синтезируются «длинные матрицы», в таком количестве цепей с праймером на одном конце и с последовательностью, комплементарной второму праймеру, на другом («короткая матрица») (рис. 5.19). Во время третьего раунда все сгенерированные, образованные ранее, одинаково подвержены денатурации и отжигу с праймерами, а затем реплицируются (рис. 5.20). В последующих раундах «короткая матрица» становится все больше, и к 30-му раунду их число уже в 10^9 раз превышает число исходных цепей или «длинных» матриц (рис. 5.21).

Метод ПЦР получил широкое распространение. Разнообразные случаи его применения мы рассмотрим в последующих главах. Здесь упомянем лишь некоторые из них. Один из вариантов — идентификация патогенных микроорганизмов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений. С появлением ПЦР отпала необходимость в выделении и учете ДНК-матрицы; для анализа можно использовать очень небольшое количество исходного материала. Для синтеза праймеров, специфичных к определенной нуклеотидной последовательности ДНК предполагаемого патогенного микроорганизма. В этом случае в ходе ПЦР будет амплифицироваться только фрагмент ДНК, длина которого равна сумме длин двух праймеров и фрагмента ДНК между ними.

ПЦР — высокочувствительный метод, однако при наличии исследуемого образца даже незначительное количество ДНК, случайно попавшей

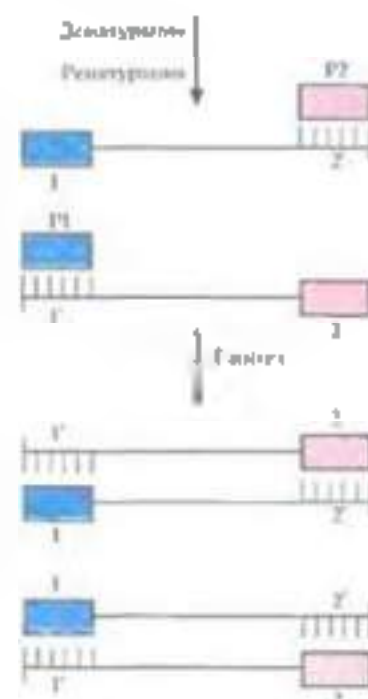
Рис. 5.19. Второй раунд ПЦР. Исходным материалом в этом случае является смесь исходной ДНК, образовавшейся в первом раунде (рис. 5.16). При отжиге праймеры аннотируются с комплементарными им участками на свободных цепях, так и «длинных» матриц, синтезированных в первом раунде. В результате ферментативного синтеза на этих же участках вновь синтезируются «длинные» матрицы, в том «длинная матрица» «вырастает». Последнее аннотируется с одним праймером, а тем аннотируется несколько тысяч раз, комплементарной второму праймеру.

ПЕРВЫЙ РАЗЫД



При первом разыде ПЦР (при первом разыде) амплифицируются с комплементарными участками матрицы цепей, в то же «длинные» и «короткие» матрицы. При ферментативном синтезе на «длинной» цепи синтезируются «длинные» матрицы, а на «короткой» и «короткие» матрицы - только «короткие» матрицы.

ВТОРОЙ РАЗЫД



При втором разыде ПЦР (на этом этапе в реакционной смеси в совокупности образуются только «короткие» матрицы).

из одной реакционной смеси в другую, могут быть получены ложноположительные результаты. Это значит, что необходимо контролировать все используемые для ПЦР реактивы и посуду.

Метод ПЦР применяется также для выявления спонтанных мутаций, внесения специфических мутаций (например, сборки плавучих мутаций) из синтезируемых олигонуклеотидов, секвенирования ДНК. Во многих случаях не является необходимостью амплификация ПЦР-продукта (например, при амплификации в полимеразной цепи реакции по тунным каналам), но-

схемку праймера *Taq* присоединяет к 3'-концу синтетической цепи инициатора, тогда, чем сильнее эффективность аннигирования. Но если вектор для клонирования обработать рестрицирующей нуклеазой с образующимися на концах тупых концов и затем протинсутировать с синтетической *Taq* и присутствии dNTP, то в обоих 3'-концах фрагменту добавится по одному нуклеотиду инициатора. Взаимной комплементарности концевых участков вектора и ПЦР-продукта протинсутируется в один единичный нук-

леотид, оказывается достаточно для стартовой молекулы и их последующего аннигирования.

Получение с помощью ПЦР клонированных концов молекул мРНК

С помощью ПЦР можно получать комплементарные ДНК (кДНК), отсчитывая 3' или 5'-концевым участкам специфических информационных РНК (мРНК). Для обозначения этого метода используется сокращение RACE - от англ. *rapid amplification of cDNA ends* (быстрая

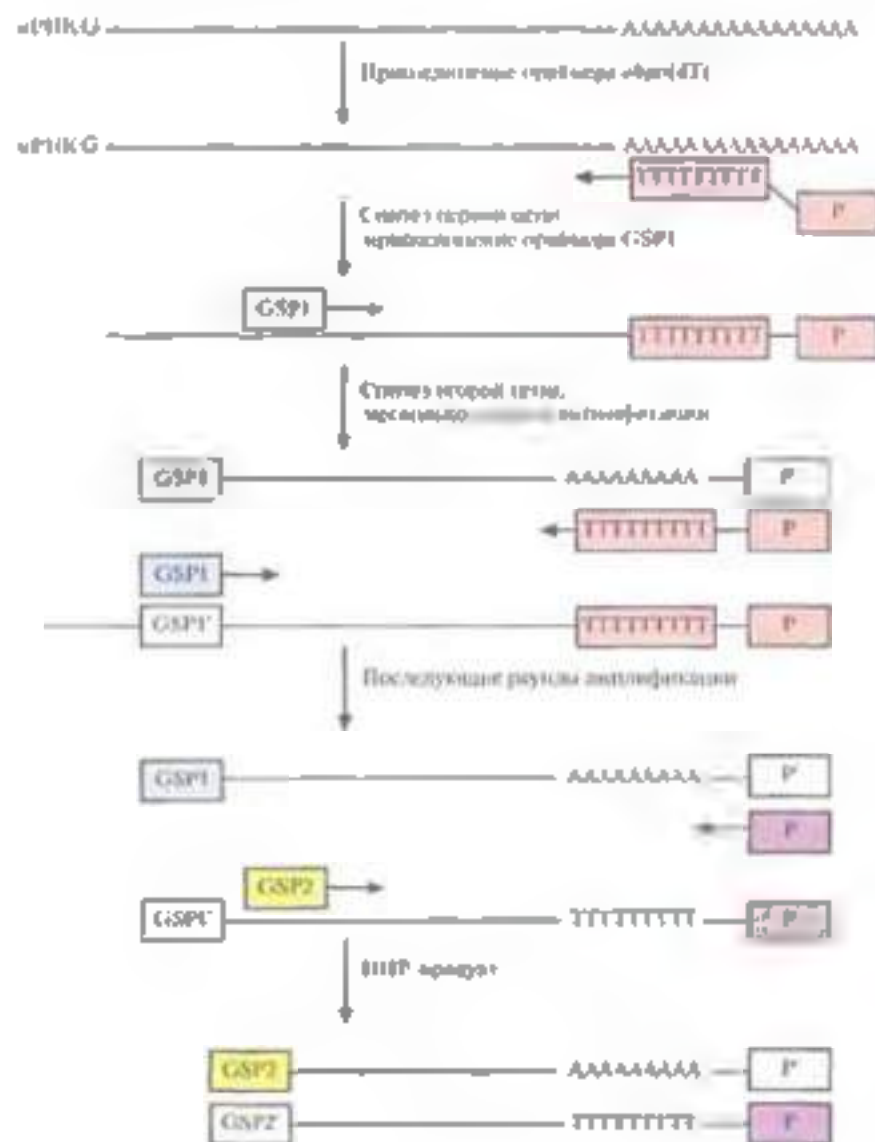


Рис. 5.22. ПЦР-амплификацией кДНК, аннелирующей 3'-концевым участкам мРНК. Первоначальную кДНК образуется в результате обратного транскрипирования мРНК при участии обратной транскриптазы (ФунгТ) в качестве праймера. Вторую цепь синтезируется на второй цепи как на матрице с помощью инициатора *Taq* в присутствии нуклеотидов праймера (GSP1). В последующих rounds ПЦР используется праймер GSP2 и P.

амплификации концов кДНК). Обозначения 3' RACE и 5' RACE относятся к амплификации кДНК, отвечающих соответствующим концам мРНК. В обоих случаях для проведения ПЦП амплификации нужно иметь нуклеотидную последовательность кодирующей области мРНК-матрицы, чтобы синтезировать генспецифичный праймер (GSP). В случае 3' RACE праймеры

для синтеза первой цепи кДНК служат oligo(dT) с присоединенным к нему торым праймером (P) (рис. 5.22). Oligo(dT) спаривается с poly(A) хвостом мРНК, и обратная транскриптаза синтезирует цепь, комплементарную мРНК. Вторая цепь кДНК синтезируется на второй при участии GSP, комплементарно кодирующей области данной мРНК, с помощью полимеразы

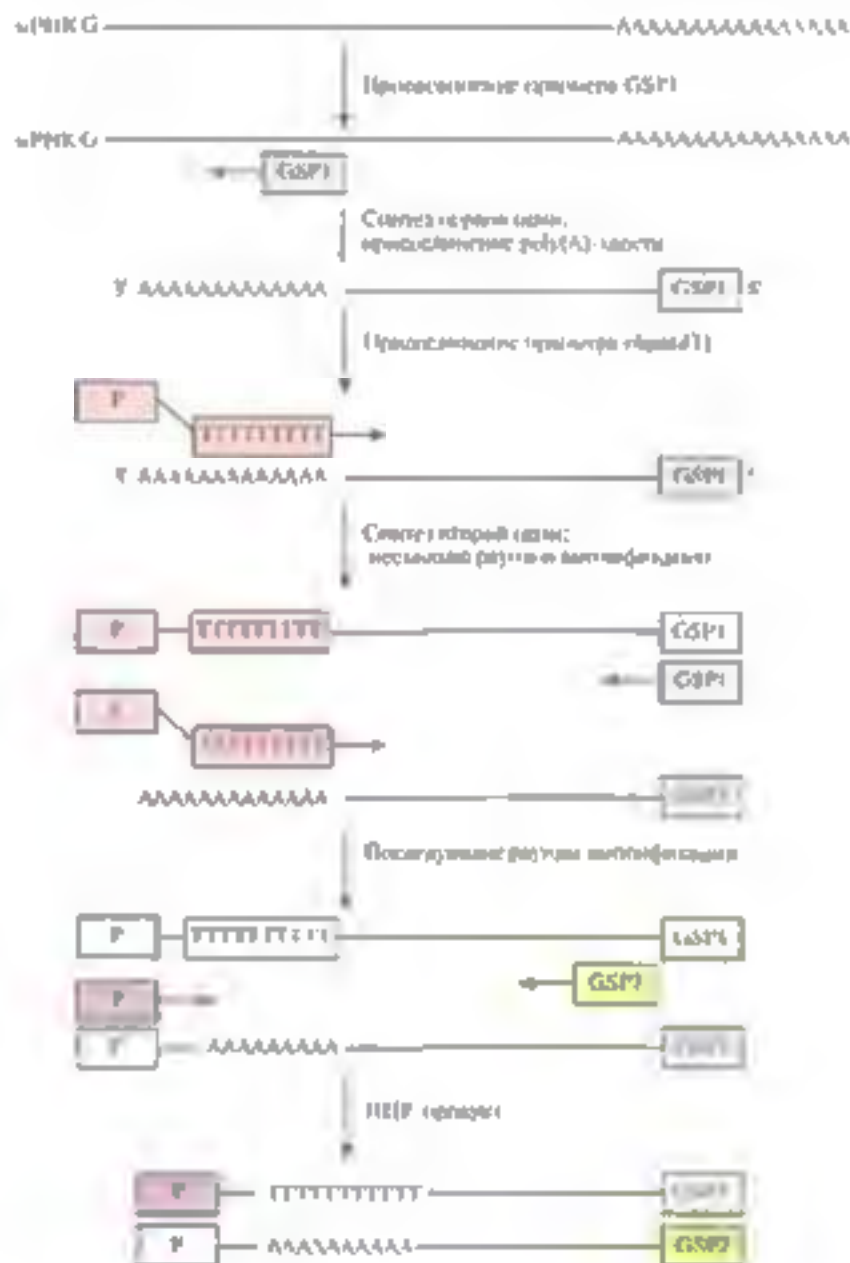


Рис. 5.22. ПЦП амплификации кДНК, комплементарной 5' концевой части мРНК первой цепи, осуществляемая обратной транскриптазой, инициируется праймером GSP. Затем к этой цепи с помощью обратной транскриптазы при соединении poly(A)-хвоста. Для синтеза второй цепи в качестве праймера используется oligo(dT). Проведя несколько циклов амплификации, получают кДНК, отвечающую 5' концу мРНК

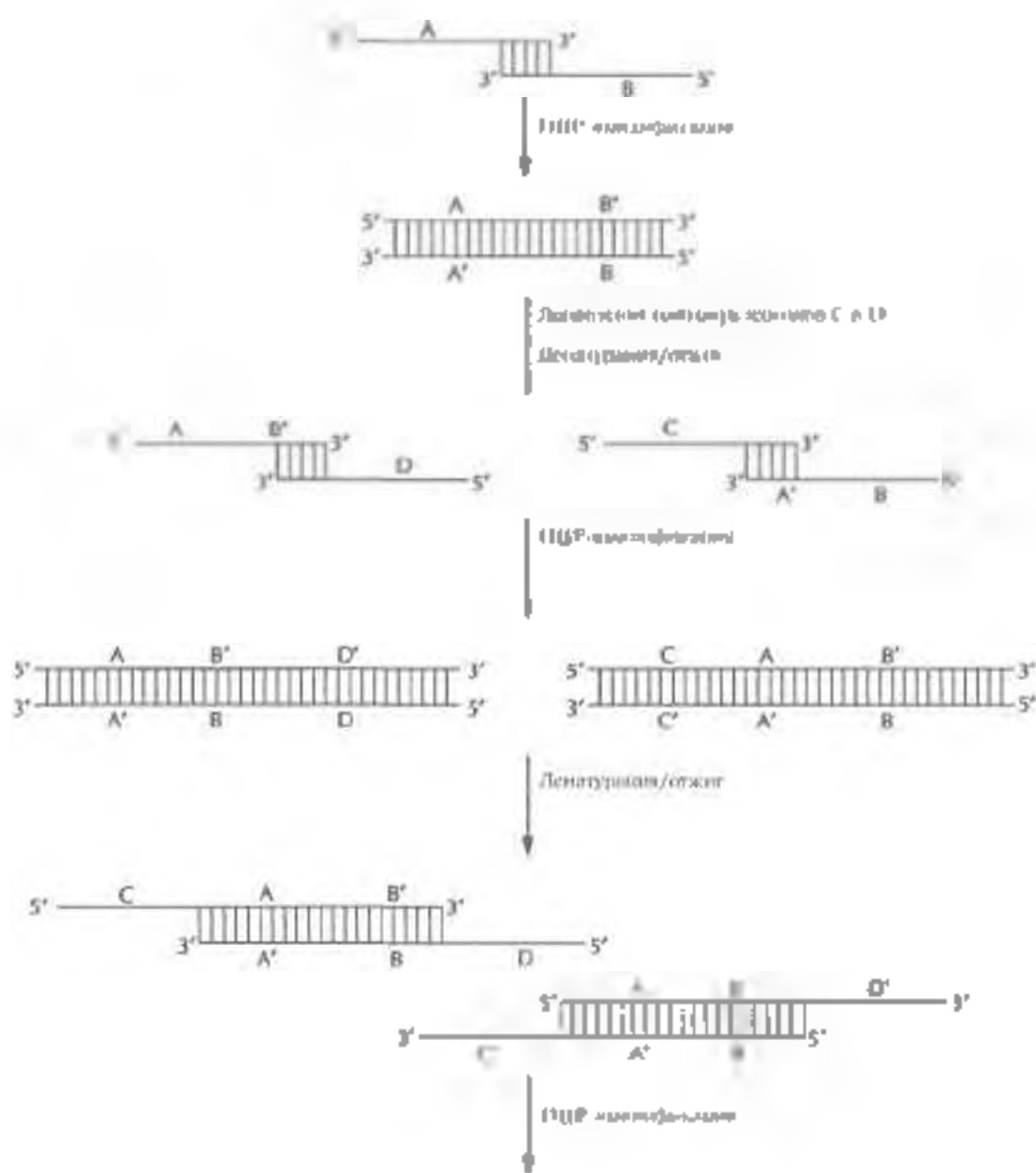


Рис. 9.24 Синтез цепи с помощью ПЦП. Непрерывно синтезируются олигонуклеотиды (A и B) от 5'-конца и достроиваются сформированным ранее «затрубчатным» 3'-гидроксиловым концом. Двухцепочечные молекулы всесторонне гибкаты и в зависимости от смеси ионной пары олигонуклеотидов (I и II), перекрываются с продуктами первого этапа ПЦП и отпадают. Осуществляя второй этап ПЦП, гибкаты «сперматозоидную» цепочку олигонуклеотидов (I и B), осуществляющую третий этап ПЦП и A и B результате «сворачивания» «затрубчатной» ДНК, включаются в общую цепь. Если олигонуклеотиды на первом этапе имеют A и A' B и B' в 3'-конце, то олигонуклеотиды на втором этапе имеют C и C' A' B и B' в 3'-конце. Нуклеотидная последовательность 1, 2, 3, 4, 5, 6 олигонуклеотидов соответствует таковой «предельных» сегментам ДНК.

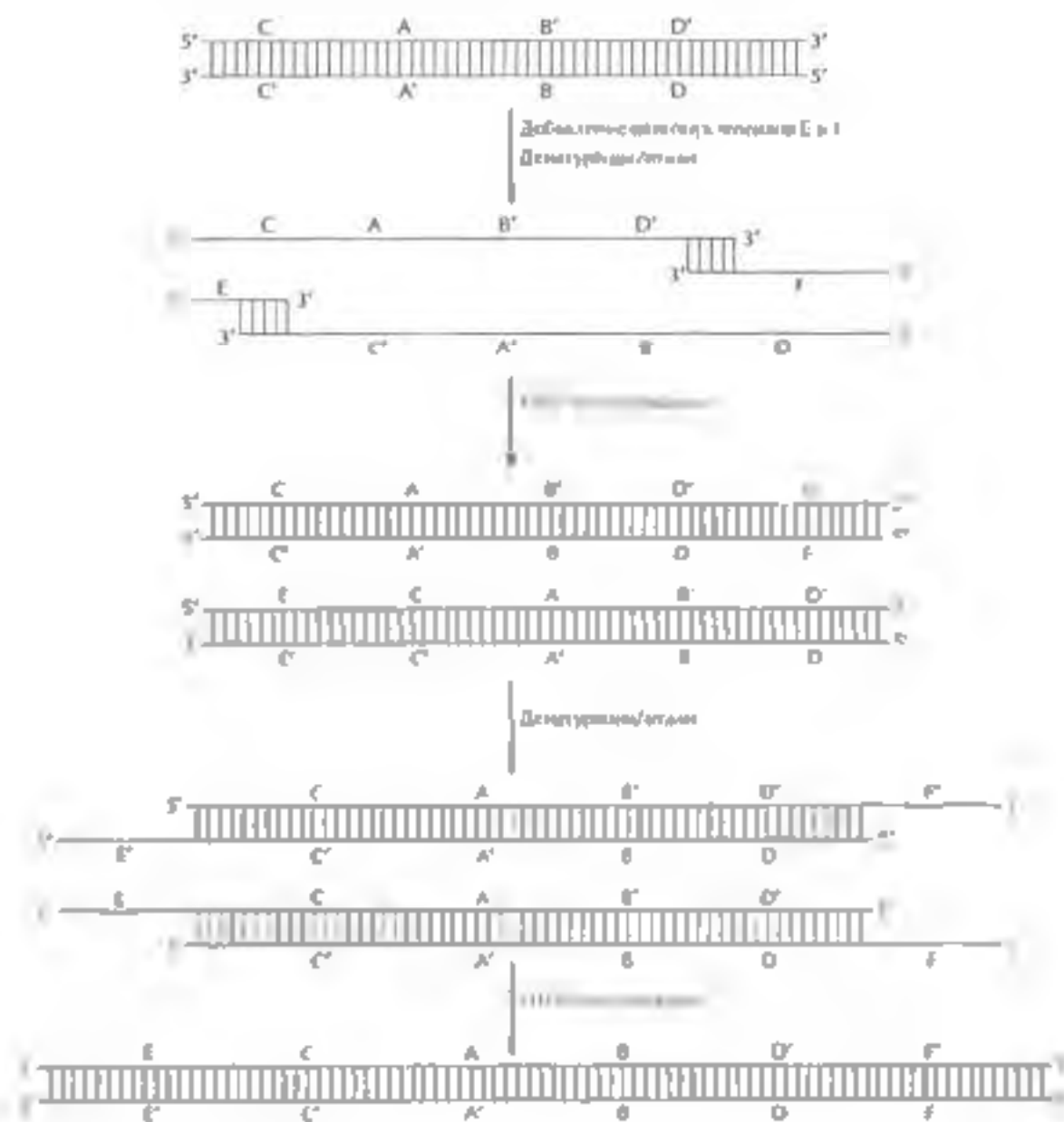


Рис. 5.24. (Продолжение)

Таб По амплификации нескольких регионов ПЦР, в которой использовались указанные выше праймеры, добавляем вторую пару праймеров, которые связываются по соседству с двумя внутренними таковыми только расположенными праймерами (таблица ниже). Вторую пару праймеров необходимо, поскольку без них нельзя амплифицировать

полноразмерную молекулу целиком. Конечным ПЦР-продуктом является ДНК, соответствующая 3' концу искомого мРНК.

В случае 5'RACE праймером для синтеза первой цепи ДНК служит GSP (рис. 5.25). Новозатраченную цепь обрабатывают азидомидатом и фосфоритом в присут-

нии dATP. Этот фермент случайным образом присоединяет дезоксирибонуклеотиды к 3'-концу цепи. Поскольку в данном случае в реакционной смеси присутствует только dATP, на этом конце накапливается цепочка адениновых остатков рибу(А)-кислот. С ними связывается праймер Р (ribodT), нонансированной стороной цепи. Проводите сравнительное число реакций ПЦР с указанными праймерами, а затем дефинируйте термы праймеры и амплифицируют кДНК, от начальной 5'-конца мРНК.

RACE-метод широко применяется по ряду причин. Обычно бывает очень трудно обнаружить кДНК, синтезируемую мРНК, которая присутствует в данной ткани в малой или средней концентрации. С помощью RACE-метода можно быстро получить кДНК, отвечающие конкретным участкам этой мРНК, и при необходимости амплифицировать их в качестве материала для скрининга кДНК и генотипа. Кроме того, поскольку транскриптеринг 3' концевые фрагменты кДНК зачастую преобладают над полноразмерными, 5'RACE может восполнить недостающие 5'-концевые сегменты.

Синтез цепи с помощью ПЦР

Получение цепи с помощью ПЦР – гораздо более быстрый и экономичный метод, чем тот, который основан на отапливании олигонуклеотидов с перекрывающимися концами, двойными брэнчами с помощью ДНК-полимеразы и сшивания фрагментов ДНК-лигазой. В первом из методов конструирование цепи начинается с отапливания перекрывающихся олигонуклеотидов (А и В), связывания центральной части цепи (рис. 5.24). После отапливания образуется дуплекс с углубленным 3' гидроксильными группами, служащими точками инициации синтеза комплементарных цепей при ПЦР. Затем в реакционную смесь добавляют еще два олигонуклеотида. С 3' 3'-конца олигонуклеотида С (левый) и 5'-конца олигонуклеотида А, в сам этот олигонуклеотид отсечает участок конструируемой цепи, непосредственно примыкающему к его центральной части цепи. Аналогично, 3'-конца олигонуклеотида D (правый) и 5'-конца олигонуклеотида В и отсечает участок цепи, примыкающему к его центральной части цепи. После денатурирования смеси и отапливания образуется

дуплекс с протяженными выступившими односторонними сегментами, двусторонними с 3'-конца В (левый) и 5'-конца А (правый) ПЦР образуется двуклеточный продукт, состоящий из указанных выше сегментов, расположенных в порядке САНД. Молекула ДНК с углубленным 5'-концом не ингибируется.

На следующем этапе в реакционную смесь добавляют еще два олигонуклеотида, Е и F. 3'-конца олигонуклеотида Е (левый) и 5'-конца олигонуклеотида С, в сам он отсечает участок реконструируемой цепи, примыкающему слева к сегменту С. Аналогичными свойствами обладает олигонуклеотид F, если его комплементарность олигонуклеотидом D. После денатурирования и реинкубации смеси образующиеся дуплексы с выступившими односторонними участками ингибируются с 3' гидроксильными концами. В итоге последующим этапом ПЦР образуется двуклеточный продукт ЕСАНДФ.

Следующие пары олигонуклеотидов «одно-двусторонними» тем способом, другим способом – индексируемые добавляя в смесь до тех пор, пока не будет синтезирована вся цепь. Длина олигонуклеотидов обычно бывает равна 50 нуклеотидов. Каждый «блок» ПЦР состоит из пяти-шести 4-минутных циклов. Для синтеза в цепи длиной 1000 п нуклеотидов III «блоков», так что тем можно получить в течение одного дня. При этом, как и в случае синтеза цепей другими методами, исследованию могут подвергаться (т. е. 3'- и 5'-концы) можно установить двуклеточными последовательностями, фиксирующими кодирующую область и обеспечивающими последующее восстановление цепи в скляр.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К числу наиболее важных для молекулярной биологии методов, помимо клонирования, относят методы химического синтеза ДНК – синтезирование ДНК и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Целью химического синтеза является получение односторонних молекул ДНК и цепи. Успех здесь можно достичь только при высокой эффективности образования фосфорилируемых концов. В противном случае по оптимальным

процесса будет получено около небольшого числа молекул нужного размера. Данный синтезированный *in vitro* молекул обычно составляет 20–30 нуклеотидов и редко превышает 100 нуклеотидов. Для получения двучастичных молекул комплементарные цепи синтезируют по отдельности и затем пришивают отаки. Полученную таким способом ДНК используют в качестве матрицы для скрининга темплатных библиотек, в качестве лигандов и адаптеров при клонировании генов; для муtagenesis *in vitro*, для конструирования генов с целью последующего клонирования.

Синтез часто для решения биотехнологических и некоторых других задач бывает необходимо *in vitro* посылку нуклеотидную последовательность клонированного гена. Для селективного синтеза используют несколько методов, один из них — дитерминация, разработанный Саитером и др. В его основе лежит четкая связь между цепью после прищипки к ней нуклеотид нуклеотид. У каждого нуклеотида существует 3-циарная группа, и дальнейший рост цепи становится невозможным. Для селективного в разных пробах (платформы) проводить четыре реакции синтеза ДНК, каждая — в присутствии одного из четырех дитерминационных. Продукты реакции разделяют с помощью геля-электрофореза, фиксируют радиационно и считывают с помощью рафа нуклеотидную последовательность синтезированной фрагмента ДНК.

Для селективного используют также систему на основе фазы М13. В ДНК фазы встраивают фрагмент ДНК длиной до 300 нуклеотидов, который может селективировать. эту рекомбинантную ДНК легко получить в односторонней форме и использовать ее в качестве матрицы для селективного вставки. Можно использовать также двучастичные плазмиды, содержащие клонированную ДНК.

Для определения нуклеотидной последовательности приложенных клонированных систем (от начала (лигируют синтетический (или естественный) примысел, комплементарный участку, отсутствующему со вставкой), и с помощью дитерминации селекционируют свыше 250–300 нуклеотидов. Затем по результатам селективного синтезируют второй примысел и определяют последовательность следующих 250–350 нуклеоти-

дов клонированного участка, и т. д. Этот метод, называемый «стрейпер-определенной проволкой» (или «булавочной стрелкой»), позволяет селекционировать приложенные фрагменты ДНК без их субклонирования, как в случае системы на основе фазы М13.

Метод ПЦР (полимеразная реакция) в биотехнологии. Он позволяет в различных фазах идентифицировать *in vitro* нужные сегменты ДНК. Процедура состоит в следующем. Выбирают два примысела, гибридуемых с участками ДНК, которые фиксируют искомым последовательностью. Денатурируют ДНК, отщипывают селективные молекулы с примыслом, добавленным в избытке, и существующим сегмент ДНК *in vitro*. Для облегчения синтеза используют термостабильную ДНК-полимеразу, которая не разрушается при температуре денатурации (95 °C). Затем смесь переводят денатурируют, от нее с примыслом и синтез, и т. д. до примерно 30-го цикла. К этому времени в реакционной смеси преобладают фрагменты, на концах которых находится одна примысловая последовательность, а на другом — селективная, комплементарная другому примыселу ПЦР можно использовать для выделения определенных фрагментов или в том или ином биотехнологическом материале; получение больших количеств специфических фрагментов ДНК с целью клонирования; амплификации 5'- и 3'-концов специфических мРНК, синтеза генов, выделение доплемента или отаки, и т. д.; идентификация и т. д. или как последствие обитания.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen E. Y., P. H. Newburg, 1985. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 163–170.
- Chiriac S., D. V. Santi, 1990. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 633–637.
- Di Donato A., M. de Nigris, R. Russo, S. Di Biase, G. D'Alesio, 1993. A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 212: 9–19.
- Erlich H. A., D. Gelfand, J. J. Solnick, 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643–1651.

- Fox D. A., B. Westhoff, M. Nathan, A. J. Hughes, Jr., A. Rashchikov, D. M. Schuster. 1996. Striding new distances with 5'RACE: long 5'RACE of human APC and ISC 2 cDNA. *Focus* 18: 33-37.
- Hobart K., J. J. Rossi, R. B. Wallace. 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323-356.
- Mullis K. B., F. Ferré, R. A. Gibbs (ed.). 1994. *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser, Boston, Mass.
- Saiki R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sanger F., S. Nicklen, A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3463-3467.
- Schuster D. M., G. W. Buchanan, A. Rashchikov. 1992. A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5'RACE. *Focus* 14: 46-52.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Предполагая, что вы ищете новые ДНК-сигналы, какой метод наиболее эффективен при поиске новых нуклеотидов? 98,5%. Какой будет успех

при этом, если вы синтезируете гибриды митохондриальной ДНК с нуклеотидом?

2. Какие две стратегии химического синтеза верны длиной 0,5 п. н. вы можете предложить? Какую из них вы предпочтете?
3. Что такое линкер? Где его используют?
4. Что такое дидеоксирибонуклеотиды? Как с их помощью «определяют нуклеотидную последовательность ДНК»?
5. Линкер можно синтезировать непосредственно, только с помощью ДНК?
6. Как определяют нуклеотидную последовательность клонированной ДНК с помощью векторной системы на основе фен. МД?
7. На месте преступления собраны следы единственной копия предполагаемого преступника. В нем содержится 10-20 пиктограмм (10^{-11} г) ДНК. Чтобы «характеризовать» следы малое количество ДНК и определить, является ли ее нуклеотидная последовательность такой же ДНК подозреваемого, нужно 10^8 или 10^9 (г) ДНК. Как получить ее? Какую информацию вам нужно собрать, прежде чем предпринять какие-то действия?
8. Что такое «случайная матрица», «короткая матрица», как меняется соотношение между ними с увеличением числа ЦДР-фрагментов?
9. Как синтезируют гены с помощью ЦДР?
10. Как «препаратить» концы нуклеотиды мРНК в ДНК?

Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах

Основная цель экспериментов по клонированию генов, клонирование предназначено использовать в биотехнологиях, — выбор условий для эффективной экспрессии в ту или иную систему хозяина. К сожалению, если факт успешности (того или иного) гена в клонировании объект еще не означает что этот ген будет экспрессирован. В то же время, чтобы получение коммерческого продукта было экономически оправданным, уровень его синтеза должен быть достаточно высоким. Для достижения эффективной экспрессии уже давно структурными элементами специфических векторов: как правило применяются минипутероны с целым рядом генетических элементов, контролирующих процессы трансляции и трансляции, стабильности белков, секретии продукта из эукариотической клетки и т. д. Среди эукариотично-биологических систем систем экспрессии наиболее известны следующие: 1) тип промотора и терминатора транскрипции; 2) прочность связывания мРНК с рибосомой; 3) частота инициации транскрипции гена и его продолжительность (в эукариотических эукариотической клетке); 4) наличие дополнительных сайтов регуляции трансляции; 5) эффективность трансляции в организме хозяина; 6) стабильность продукта в эукариотической клетке.

Понимая универсальными стратегиями повышения экспрессии клонированных генов не существует. Экспрессия таких генов имеет уникальные биологические свойства, и оптимальные системы экспрессии для каждого из них подбираются эмпирически. Однако для повышения эффективности экспрессии любого репортерного гена существуют также и общие подходы с организмом-хозяином. Необходимо не только что многие представители как про- так эукариотических организмов способны

к экспрессии репортерных генов, для получения биологически значимых продуктов с помощью транскрипции рекомбинантных ДНК используются в основном *Escherichia coli*. Эти системы прежде всего с тем, что генетические, молекулярно-биологические, биохимические и физикохимические свойства этой микроорганизмы хорошо изучены. Кроме того, это наиболее легкий и быстрый способ получения многих белков. Но для экспрессии некоторых клонированных генов используются и другие организмы: дрожжи *S. cerevisiae*, дрожжи *Yeast*, бактерии, растения и т. д., свои стратегии, регуляторные и т. д. системы, а принципы применимы и в этих случаях.

Экспрессия генов при участии сильных регулируемых промоторов

Для эффективной экспрессии любого гена необходимо необходимо наличие сильного регулируемого промотора, расположенного перед инициальным геном. Такой промотор имеет высокие свойства к РНК-полимеразе, поэтому привлечение к нему последовательности эффективны (с высокой частотой) транскрибируются. Регулируемость промотора достигается путем (в последующем) осуществлении строгой регуляции транскрипции. Для экспрессии в эукариотической системе широко используется промотор *lac* (лактозаиндуцируемый) — геном *E. coli*. Однако есть и другие промоторы, обладающие свойствами для контроля экспрессии свойством. Для их идентификации перед тем как использовать геном репортерным, кодирующим легко регистрируемый продукт, но внешним

проявления, истинными случайными фрагментами ДНК (рис. 6.1). Если в результате такой активации ген-репортер эффективно экспрессируется, то делая вывод, что активированный фрагмент содержит функциональный промотор, белкодующий ген или ген-репортер кодирует либо продукт, обуславливающий устойчивость к антибиотикам, либо фермент, который идентифицируется с помощью доступных проклеточных биохимических тестов.

Может показаться, что наиболее подходящим способом идентификации экспрессии клони-

рованных (таш видется активирован) в плазмиду так, чтобы они находились под контролем активного функционирующего сильного промотора. Однако непрерывная экспрессия чужеродных генов может оказаться губительной для клетки-хозяина, поскольку приводит к истощению ее энергетических ресурсов и нарушению метаболизма. Кроме того, плазмиды, несущие постоянно (конститутивно) экспрессирующиеся гены, нередко утрачиваются после нескольких клеточных делений, поскольку не содержатшие их клетки растут быстрее и со временем становятся

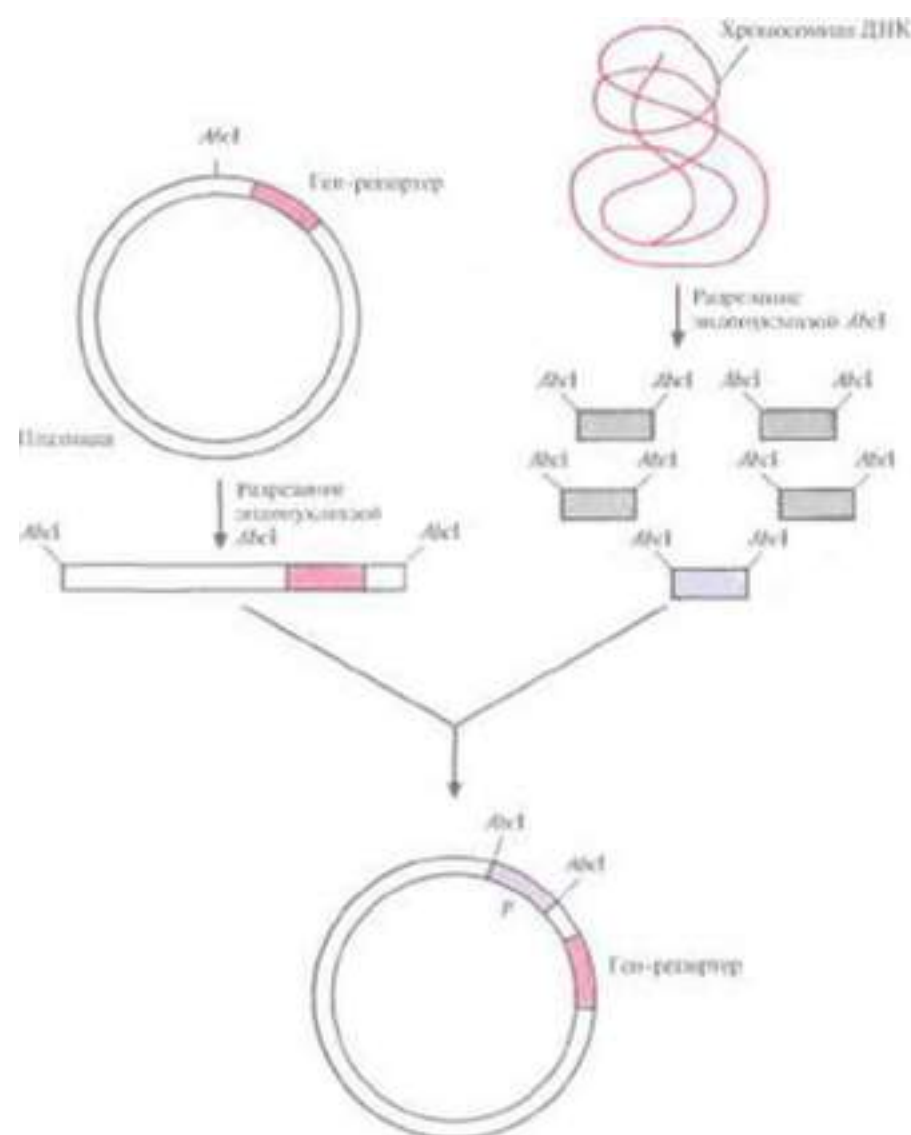


Рис. 6.1. Идентификация сильных регулируемых промоторов. В плазмиду активирован ген репортер без промотора. Хромосомную ДНК разрезают рестриктазой эндонуклеазой AclI и встраивают фрагменты с плазмидой. Если ген-репортер эффективно экспрессируется, значит, активированный фрагмент содержит функциональный промотор.

в культуре преобладающими. Нетщательность плазмы – это основная проблема, мешающая получению продукта фермента. Значительного в плазме, в промышленных масштабах. Для ее решения нужно научиться контролировать экспрессию таким образом, чтобы минимизировать ее экспрессию в определенных фазах клеточного цикла и только в течение определенного времени, а для этого нужно использовать сложные регулируемые промоторы. Плазмы, сконструированные для этих целей, называются индуцируемыми векторами.

Регулируемые промоторы

Наиболее широко используются следующие сильные регулируемые промоторы: промоторы *lac* и *ara*-опероны *E. coli*, специально сконструированный *lac* промотор, включающий 10 объектов *lac*-промотора и -35 -область *ara*-промотора (участки, включающиеся на расстоянии 10 и 35 п. н. до сайта инициации транскрипции); белок *nan* β , промотор бактериофага λ ; промотор *tetO* бактериофага T7. С каждым из них связываются соответствующие репрессоры, которые индуцируют выключение и выключение транскрипции специфических генов. Кроме то-

го, каждый из этих промоторов усиливает экспрессию РНК-полимеразой *E. coli*, в которой полнот основной sigma-фактор, присутствующий в клетке в значительных количествах, чем другие, индуцирует sigma-факторы. Благодаря тому транскрипция не останавливается по причине отсутствия соответствующего фактора.

В отсутствие индукции в среде *lac*-промотор *E. coli* находится в репрессированном состоянии, т. е. он выключен белком-репрессором, блокирующим транскрипцию *lac*-оперона. Индукция или ее отсутствие *lac*-оперона происходит при добавлении в среду пептида или тетрациклина- β -D-галактозид (ИПТГ). Оба эти соединения предотвращают связывание репрессора с *lac*-оператором, и транскрипция активизируется.

Транскрипция, индуцируемая *lac*-промотором, регулируется также с помощью белка индуктора тетрациклина (САР) (рис. 6.2). При связывании САР с промотором инициируется синтез мРНК-полимеразы и усиливается экспрессия применяющих в этом случае в качестве средства САР к промотору. При этом происходит при его связывании с индукци-



Рис. 6.2. Влияние единичной индукции и САР на транскрипцию регулируемого *lac*-промотора *E. coli*. Сетка показывает индукцию транскрипции (По данным работы Abulaj et al., 1992 *Biotechnology* p. 183, Jones and Bartlett Publishers, Boston, Mass.)

связи АМР (сАМР), уровень которого повышается при снижении концентрации глюкозы в среде. Таким образом, если репрессор не связан с оператором, то в присутствии индуктора или повышенной внутримитохондриальной концентрации сАМР может произойти усиление транскрипции гена, регулируемого *lac*-промотором.

На самом деле и планидных λ -репрессорных белков могут использоваться один из вариантов *lac*-промотора *lac*-U₁ с плюсовыми 10-миследовательными, будет сильнее чем *lac*-промотор другого типа. Транскрипция с промотора *lac* также индуцируется *lac*-репрессором и индуцируется при добавлении в среду лактозы или IPTG.

Промотор *pr* индуцируется под действием вымысла транскрипции — *pr*-репрессор, который связывается с *pr*-оператором и предотвращает транскрипцию *pr*-оператора. Активаторы (включены) *pr* активируют процессива либо при увеличении из среды триптофана, либо при добавлении 3-индолпропионовои кислоты.

Работа промотора *p^l* регулируется репрессорным белком λ бактериофага λ . На самом деле для регуляции транскрипции с *p^l*-промотора обычно используется термочувствительная мутантная форма репрессора λ белок λ_{c1} . Клетки, синтезирующие этот репрессор, сначала инкубируют при температуре 28–30 °C; в этих условиях репрессор блокирует транскрипцию с *p^l*-промотора. Когда культура достигает нужной фазы (как правило, стрептоидной фазы), температуру повышают до 42 °C (при этом λ_{c1} -репрессор инактивируется и инициирует транскрипцию).

Для транскрипции с промотора бактериофага T7 нужна соответствующая РНК-полимераза. Чтобы можно было использовать этот промотор для РНК-полимеразы фазы T7 инкубируют и инкубируют *l* *col* (система орифог: λ), помещают его под контроль *lac*-промотора. Затем клетки трансформируют плазмидой, содержащей регуляторную митриксис T7-промотора, и добавляют в среду IPTG. В этих условиях происходит индукция РНК-полимеразы T7, синтезируется РНК-полимераза и происходит транскрипция и трансляция кодируемого гена. Число между временем индукции (или РНК-полимеразы T7 в начале транскрипции гена

ишемно превышает более часа. Для транскрипции с связанной T7-полимеразой создан желая серия плазмид, получившая название pET-векторы.

Эффективность индукции *lac*-репрессора и соответственно активации транскрипции зависит от соотношения между числом молекул репрессора и числом копий промотора. Если концентрация репрессора слишком велика, то транскрипция не индуцируется, и наоборот, если молекул репрессора очень мало (даже при том, что их больше, чем копий промотора) то транскрипция может идти и в отсутствие индукции. При таких промоторах говорят, что они «текут». Чтобы осуществить строгий контроль (включи регулируемых систем, разработаны разные системы. Например, *ten* репрессоры и соответствующий промотор помещают в две разные плазмиды, присутствующие в клетке в разных числе копий; это позволяет поддерживать нужное соотношение между числом молекул репрессора и числом копий промотора. Обычно *ten*-репрессоры находятся в многократном избытке, число их копий в клетке не превышает 8, а промотор — в мультископичной плазмиде с 30–100 копиями на клетку. *ten*-репрессоры могут быть локальными и в хромосомной ДНК, начиная с ней в единственном числе, что позволяет поддерживать низкую концентрацию репрессора. В частности, в качестве *lac*-промотор, можно получить *lac*-репрессор в значительно большем количестве, если ввести *lacI*-ген его мутантной формой *lacI^P*, что приводит к уменьшению «протеканию» промотора, т. е. к снижению уровня транскрипции кодируемого гена без индуктора.

Индукция больших количеств белковых продуктов

Для получения больших количеств умеренно белком с высокой рекомбинантностью плазмидой *F* *col* была сконструирована плазмиды pF1 c2033. Она содержит сильный промотор, естественный вышеренный ген в коротком участке с несколькими регуляторными сайтами для рестрицирующей ферментов (наказатель, служащий непосредственно промотором). Эффективность этой λ -репрессорной системы и осуществлении синтеза умеренных белков в *F* *col* можно еще

Таблица 6 / Зависимость массы белка при 100 мг общего экспрессирующего вещества от температуры¹

Плазмид	Усреднённый белок		Пример р
	30 °С	34 °С	
pKN402	82	521	Нс
pPC2833	38	42	Дс
рСР3	88	713	Дс

¹ Данные взяты из [14] (том II, 30) [11]

большее количество, однако свой температурный диапазон плазмиды pKN402. Это приводит к увеличению числа эвклидических плазмиды в 5–10 раз при температуре 42 °С (табл. 6.1). Полученная эвклидическая плазмиды pCP3 содержит р-промотор и ген β-галактозид (ген устачивается к амидолазину) из pPC2833, в сайт инициации репликации из pKN402 (рис. 6.3). Несущие белки плазмиды реплицируются при температуре 28 °С,

а и при 42 °С. При низкой температуре ген α1 репрессора, интегрированный в ДНК E. coli, не репрессируется, р-промотор не формирует и образуется белок копий плазмиды (табл. 6.1). При повышенной температуре α1 репрессор инактивируется, р-промотор переключается в активное состояние, и число копий плазмиды увеличивается. Все это и делает плазмиду pCP3 эффективным экспрессирующим вектором. Когда ген ДНК-плазмиды 14 был встроена в плазмиды pCP3, то масса его продукта составила примерно 20% от общего количества белка, синтезируемого E. coli при 42 °С. При этом на массу белков, синтезируемых плазмидой, влияют также белки E. coli, например факторы инициации EF-1α, количество примерно 2%.
Круглая плазмидная система

Круглая плазмидная система

При культивировании в небольшом объеме (от 1 до 5 л) культуры экспрессионных существующих плазмид и изменением температуры, либо добавлением

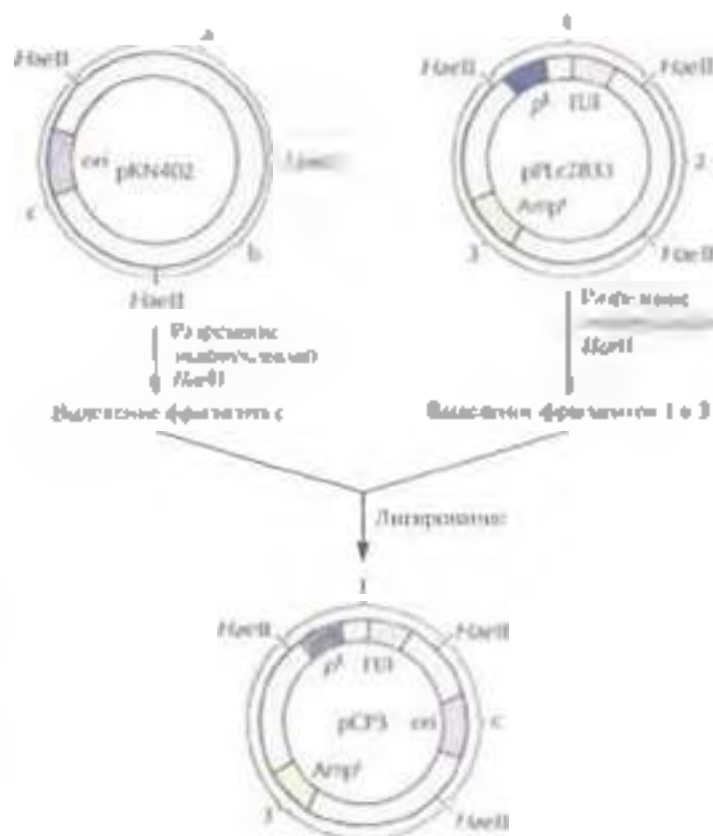


Рис. 6.3. Создание плазмиды pCP3. Из плазмиды pKN402 с помощью рестриктаз рупиной модификации HindIII и BamHI фрагмент с, содержащий температурно-чувствительный сайт инициации репликации (ori), а также ген lacZ, в сайт инициации репликации (ori) плазмиды pPC2833. Фрагмент 1 содержит р-промотор и полярность (pTII), а фрагмент 2 содержит ген амидолазы (lacZ).
Создание плазмиды pCP3

тем значительно индуктируется. Однако в чашечках установках (20–100 л) и в промышленных бродильных реакторах (>200 л) температуру нельзя изменить мгновенно, для этого требуется время от 30 до 60 мин; кроме того, на подъем температуры нужна энергия. И время, и энергия стоят дорого. Столь же дорого обходится и изменение химического индуктора, например ИПТ. Все это может сделать процесс неэкономичным. Для преодоления некоторых проблем, связанных с использованием p^b -промотора для крупномасштабного производства белковых продуктов, была разработана двухлампная система. Ген репрессора cI поместили под контроль νr -промотора и ввели в млекопитающую плазмиду (рис. 6.4), что обеспечило невысокий уровень синтеза репрессора. Вторая плазмида содержала клонированный ген, находящийся под контро-

лем p^b -промотора. Как видно из рис. 6.4, cI в отсутствие триптофана индуктируется νr -фактором и синтезируется репрессор cI , индуктирующий p^b -промотор. И наоборот, как видно из рис. 6.4, B , при наличии триптофана νr -промотор индуктируется, репрессор не синтезируется, а p^b -промотор активно работает.

Культуры с такими двухлампными системами можно выращивать на бедных средах на основе гидролизатов меласы или казеина, содержащих незначительное количество свободного триптофана, и индуцировать экспрессию клонированного гена добавлением в среду триптофана. Последний содержит свободный триптофан в количестве, достаточном для эффективной индукции транскрипции. Пробные испытания этой системы показали, что на долю продуктов клонированных генов β -лактамазы и цитратде-



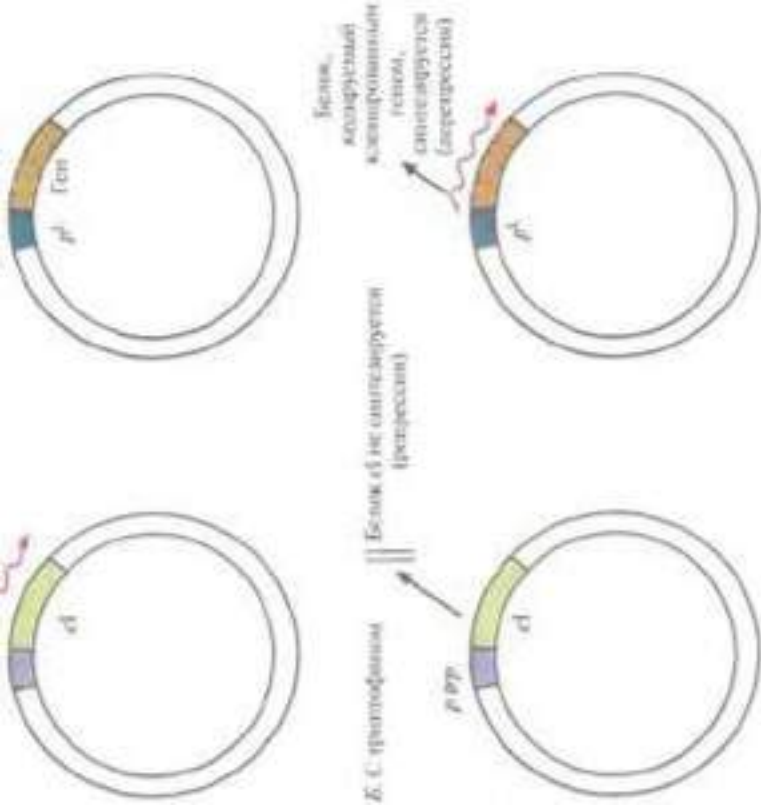


Рис. 6.4. Двухкомпонентная система, позволяющая контролировать работу p^L -промотора факта λ путем регуляции синтеза cI -репрессора с помощью триптофана. Ген репрессора cI вместе с триптофаном промотором (p^L) находится в одной плазмиде, а p^L -промотор и кодируемый им ген — в другой. Стрелками указано направление транскрипции. А. В отсутствие триптофана в среде ген cI транскрибируется и транслируется, репрессор cI связывается с p^L -промотором и блокирует транскрипцию кодируемого гена. Б. В присутствии триптофана ген cI экспрессируется, его продукт не синтезируется, поэтому кодируемый им транскрибируется

такой мере индукции транскрипции лобактериальными триптоны принадлежат сподруге к группе 21 и 24% от общего количества синтезируемого белка. Таким образом, двухплазмидные системы позволяют получать большие количества продукции с помощью штаммов бактерий микроразмножения в промисциотельных системах и оптимальных условиях.

Использование для экспрессии других микроорганизмов

E. coli не единственный микроорганизм, который используется для синтеза ружеродных белков. К сожалению, генетические и молекулярно-биохимические свойства большинства других микроорганизмов изучены не так хорошо. Кроме того, нет ни одной вектора или даже промисциотельно-репрессивной системы, которая обеспечивала бы оптимальный уровень экспрессии в клетках всех или хотя бы только транскрипционно-активных бактерий. К счастью, многие стратегии, разработанные для *E. coli*, пригодны и для экспрессии других микроорганизмов, что позволяет применить различные принципы их усовершенствования. транскрипцию в других промисциотельных бактериях. Так, в первом из последующих был сконструирован набор плазмидных экспрессирующих векторов, содержащих промоторы *lac*, *trc*, *Nm* (гена устойчивости к тетрациклину) и *S1* (гена рибосомного белка *S1* *Mycobacterium tuberculosis*), и определен уровень экспрессии гена β -галактозиды под контролем каждого из них (табл. 6.2). Обнаружилось, что: 1) указанные промоторы обеспечивают или низкую или высокую активность в микроразмножительных системах; 2) промотор *lac* наиболее активен в *E. coli* и менее активен в других бактериях;

3) *Nm* – отличный проактивный промотор в *E. coli* и самый активный в других бактериях. Промисциотельные участки 3 всех транскрипционных векторов имеют сходную структуру и последовательность, однако это не означает, что самым эффективным промотором для того или иного организма будет тот, который наиболее эффективен в *E. coli*. Тем не менее *E. coli*-промоторы могут являться вполне приемлемыми для регуляции экспрессии в микроразмножительных и в других транскрипционных бактериях.

Попытки создания «универсальных» экспрессирующих векторов для промисциотельных бактерий были весьма многочисленными. В конце концов бы и выбраны следующие стратегии. Фрагмент ДНК размером 70 п. н., примерно длиной от одного из концов микроразмножительных промоторов в триптоны 5 (Tn5), встроили вместе с соответствующим промотором в плазмидный вектор млекопитающей плазмиды pRK290 с широким спектром хозяев и получили плазмиду pLV10 (рис. 6.3). Клонированный сегмент ДНК от Tn5 содержит два некодирующих, но перекрывающихся промотора, каждый из которых подходит для транскрипции одного из элементов Tn5-гена. Поскольку Tn5 эффективен экспрессируется в разных бактериях, эти промоторы можно использовать для транскрипции различных генов. Чтобы проверить это, в наши опыты сразу же включены следующие промоторы: Tn5 встроили гены эластазы и β -галактозиды. Их эффективность продемонстрировали в клетках *Mycobacterium sp.*, *E. coli*, *Halobacter salinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* и *Serratia marcescens*. Таким образом, есть резуль-

Таблица 6.2 Активность β -галактозиды в промисциотельных бактериях, выращенных на минимальной среде с геном *lacZ* *E. coli* и (стерильными) промотором¹⁾

Промотор	Активность β -га по оптическому КД			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium leprae-parvum</i>	<i>Halobacterium rubrum</i>
Отсутствует	16	110	170	130
<i>lac</i>	1400	21000	11000	16000
<i>trc</i>	2000	9000	6200	9000
<i>Nm</i>	12000	1800	1100	1900
<i>S1</i>	40	1300	1200	1000

¹⁾ По данным Lohs et al. 1988, Gene 89 (7–8)

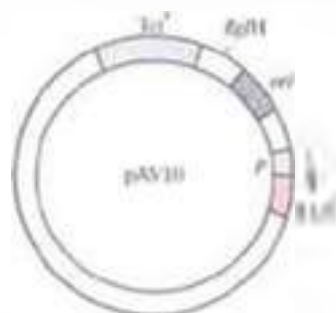


Рис. 6.5. Клонирование гена (ор РЛ) ДНК (без оболочки иori) в вектор. Показано положение гена (участок вставки) в тетрациклину (Tet^r), сайт рестриктазы для вставки (ori), сайт копирования (репликация) (ori), промотор (р) и кодирующая (СД) Петровского. Клонирование гена в плазмидный вектор сori иori иori промотор TetS (р) (стрелка указывает направление транскрипции)

или возможность использовать TetS-ориентир для ингибирования транскрипции чужеродных генов в клетках различных биосерий.

Химерные белки

Очень часто чужеродные белки, особенно не большие, обнаруживаются в гетерологичных клетках в виде их чужих и минимальных количеств. Таким образом некий уровень экспрессии кодирующей их генов во многих случаях объясняется деградацией чужеродных белков в хостах клеток. Один из способов решения этой проблемы состоит в ковалентном присоединении продукта клонированного гена к какому-нибудь стабильному белку хоста-хозяина. В качестве примера рассмотрим получение выделенного белка, продукт клонированного гена оказывается инцидентом от фиксации протеинами хоста-хозяина, чем было показано в ряде исследований.

Слияние белков производится на уровне ДНК при помощи клонирования участка соответствующего гена. В своем простом виде векторная система слияния предусматривает включение гена-мишени или его фрагмента в кодирующей участок клонированного гена хоста. Связать шпиль, чтобы ДНК, транскрибируемая с клонированного гена хоста, имела правильную последовательность

«соединяющей» (соединение продукта клонирования) (рис. 6.6). Если при образовании сегмента ДНК присутствуют и соответствующие сайты связывания, т. е. последовательность аминокислотной цепи функциональный или неструктурный трансляционный продукт, то не сможет образоваться в функциональную активную форму белка. Убедиться в правильности рамки считывания можно разными способами. Как правило, для этого необходимо ввести генную пуассонизацию последовательности амплируемых фрагментов ДНК.

Разделение химерных белков

В минимуме от предназначения белкового продукта, клонированный ген он может включать в себя как кодирующий или в сегменте химерного белка, причем последний вариант встречается нечасто. Например, в присутствии фрагмента хоста-хозяина белки-близнецы химерных белков (соединенных) (использованы для применения в хосте), а сам продукт клонированного гена может оказаться неактивным. Кроме того, для химерных белков применяется более сложная процедура рестрикции, клонирования (сначала) (применяется) (чтобы получить разрешение к применению) (соответствующим образом). Все это делается только с целью удаления лишней информации о последовательности и количестве получаемого продукта. Один из таких способов основан на присоединении белка, кодируемого геном-мишенью, к белку хоста-хозяина, содержащему короткую пептидную последовательность специфический протеин (небактериальный) (применяется). Такое присоединение также производится на уровне ДНК. Олигонуклеотидные анкера, несущие сайты для протеза, можно привнести в клонированный ген за счет, как такая конструкция будет введена в экспрессирующую векторную систему слияния. Линкером может служить, например, сегмент гена клонирования гена Не-Sly-Gly Asp. После слияния и отщипывания химерного белка для отделения белкового продукта, кодируемого клонированным геном, можно использовать фактор специфичности (фактор X₂), который является специфическим протеинами, разрушающей пептидные связи исключительно по C-конец (использованы) (использованы) (рис. 6.6). Более того, поскольку таким пептидом

Таблица 6.3. Основные маркеры белков, продуцируемые *E. coli*

Классификация диаметра бел. моц, относительная с. молекулярная масса	Функция	Антиген	Условия экспозиции*
ZZ	14 кДа	Ag	Н-чашки pH
Гистонимитный «капсул»	6–10 кДа	Ag ²	Н-чашки pH
Энтер-149	10 кДа	С-эритроцитам	Н-чашки pH
Энтер-149	13 кДа	С-эритроцитам	Н-чашки pH
МНР	40 кДа	Антиген	Малыш
Р-Липопротеин	27 кДа	Ф-антиген	Сывя
ССТ	21 кДа	С-антиген	Вакциногенный (только)
Frp	8 кДа	С-антигенное молекулярное антиген	Н-чашки pH, антигенная вакцина

* По данным (ссылка) [Morgan et al. 1991. *Genet. Microbiol.* 12].

ZZ — белок Z, Зеро-инфекционный белок; Энтер-149 — белок с 149 аминокислотами с молекулярной массой 14 кДа; МНР — маркерный белок; Р-Липопротеин — белок с молекулярной массой 27 кДа; ССТ — белок с молекулярной массой 21 кДа; Frp — белок с молекулярной массой 8 кДа.

смысл кодирующей цепи, и функционально активной С-концевой частью β -галактозидазы. Он может использоваться как индикатор для выделения клеток, дающих перекрестную реакцию с белком клинической изолята, или как инструмент для изучения экспонирования специфических белков.

Химерные белки используются не только для стабилизации экспонентов, но и для упрощения процедуры очистки recombinantных белков (табл. 6.3). Так, плазмидная конструкция *Saccharomyces cerevisiae*, содержащая ген человеческого интерферона-2 с присоединенным к нему сегментом ДНК, кодирующим маркерный пептид Asp-Tyr (13х-Asp-Asp-Asp-Asp-13х) (он кодируется геном *Flag*), маркирует двойную формулу: обеспечивает стабильность продукта сепарацией 2 и облегчает его очистку. Интерферон 2 — это биологический фактор стимулирующий рост Т-клеток и синтез В-клеточных антител. Химерный белок, образующийся после экспрессии этой генетической конструкции в дрожжевых клетках, может быть очищен за один прием с помощью иммуноаффинной хроматографии. Для того минимизировать взаимодействие маркерного пептида функционировать полипропиленовом носителе и пропускать через колонку химерный белок, который связывается с этими антигенами (рис. 6.4). Маркерный пептид — белковая молекула, которая собирается экспонировать часть клеточных ре-

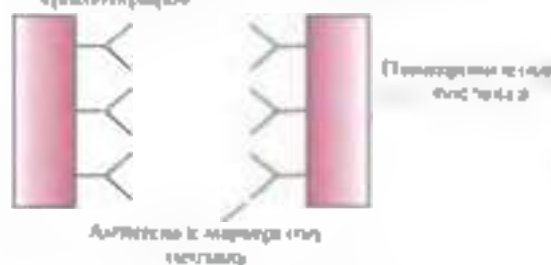
сурсов. Химерный белок обладает такой же биологической активностью, что и нативный интерферон-2. Однако если он полезен только для очистки в лаборатории, то маркерный пептид необходимо удалить. Такую операцию осуществляют с помощью ферментов, разрушающих ковалентные химические связи. Для этого можно использовать быстрое и эффективное

Мини-белки, продуцируемые *E. coli*, вымываются в клетках в форме пера, формируя биологически неактивные белки. Если из такой структуры часто удается получить и не большие количества биологически активной белки, для этого приходится применять продолжительную селекцию. Проблема растворимости белков *in vivo* часто обуславливается из-за неправильной укладки, и эту проблему можно решить различными способами. Так, известно, что химерные белки, синтезированные в культуре являются нерастворимыми, белки с массой 11,7 кДа, остаются в растворе, даже если на их долю приходится 40% суммарного клеточного белка. И все это в виду, тем не менее, варинги и ингибитор сразу после за счет ин-серединки, так чтобы оба гена попали под контроль ρ -промптера и плазмиды векторе *E. coli* (рис. 6.9). В хромосоме химерных клеток *E. coli*, используются в той системе, присутствует генетическая конструкция, детерминирующая образование репрессора *cI* — копии гена *cI* кодирующая под транскрипционным контро-

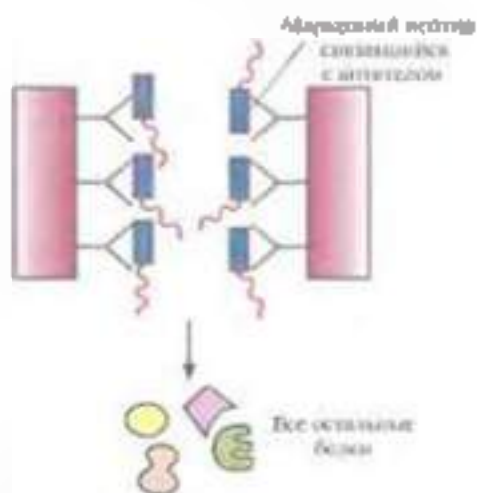
1. Синтез химерного матричного белка



2. Подготовка - выделение для иммуноэлектрофореза



3. Иммуноэлектрофорез химерных белков



4. Иммуноэлектрофорез химерного белка

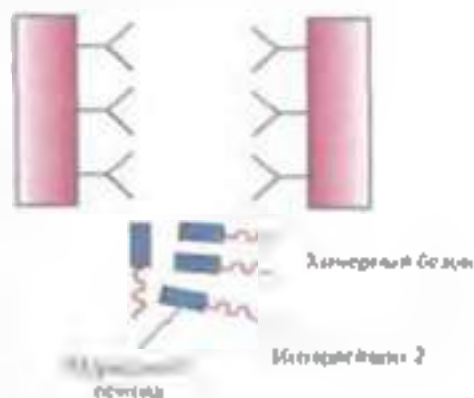


Рис. 6.8. Синтез химерного белка с помощью матричного белка промотора. Антигены и антитела к белку химерного белка формируются на твердой носительнице и фиксируются частицами химерного белка. Химерный белок, выделенный в состав химерного белка, связывается с антителом, а все остальные белки свободно проходят через колонку. Иммуноэлектрофорез химерного белка осуществляется в колоноде.

лем промотора *trp* в отсутствие триптофана (рис. 6.9, А) репрессор образует в количестве, достаточном для блокирования транскрипции с *P*-примкиции, и химерный белок не синтезируется. Когда в среду добавили триптофан (рис. 6.9, Б), *trp*-промотор выключается и белок-репрессор не синтезируется, а гены химерного белка транскрибируются с помощью *P*-промотора. Синтезируемый химерный белок, состоящий из тиреоредуктазы и белка-мицелии, концентрируется в основном в особых областях с внутренней стороны ультратонкой мембраны *E. coli*, образуя микрочастицы, и высвобождается в клеточную среду осмотическим путем. Далее белок можно очистить от химерного белка с помощью итероконтактности. Химерный белок, содержащий тиреоредуктазу, можно очистить еще одним способом (если белок мицелии остается стабильным при повышенной температуре), т.е. поставкой тиреоредуктазы не разрушается при нагревании вплоть до 80 °С, химерный белок можно инкубировать при высокой температуре и осадить его количеством других клеточных белков, разрушающихся при низких температурах.

Включение белков в полимерные структуры

Для синтеза обширных (10^5-10^6 клонств) библиотек комплементарных ДНК (кДНК), кодирующих редко встречающиеся белки, были разработаны специальные системы скрининга. Обычно кДНК встраивают в гены поверхностных белков (белков филаментов или илей) патогенных бактерий (например, М13) или фагов и после транскрипции и трансляции получают химерные белки, входящие в состав поверхностных структур этих микроорганизмов. Здесь их идентифицируют иммунологическими методами. Часто для скрининга используют ген поверхностного белка рIII фага М13, который связывается с Р-филином *E. coli* и минимизирует инфицирование. Для клонирования кДНК и других

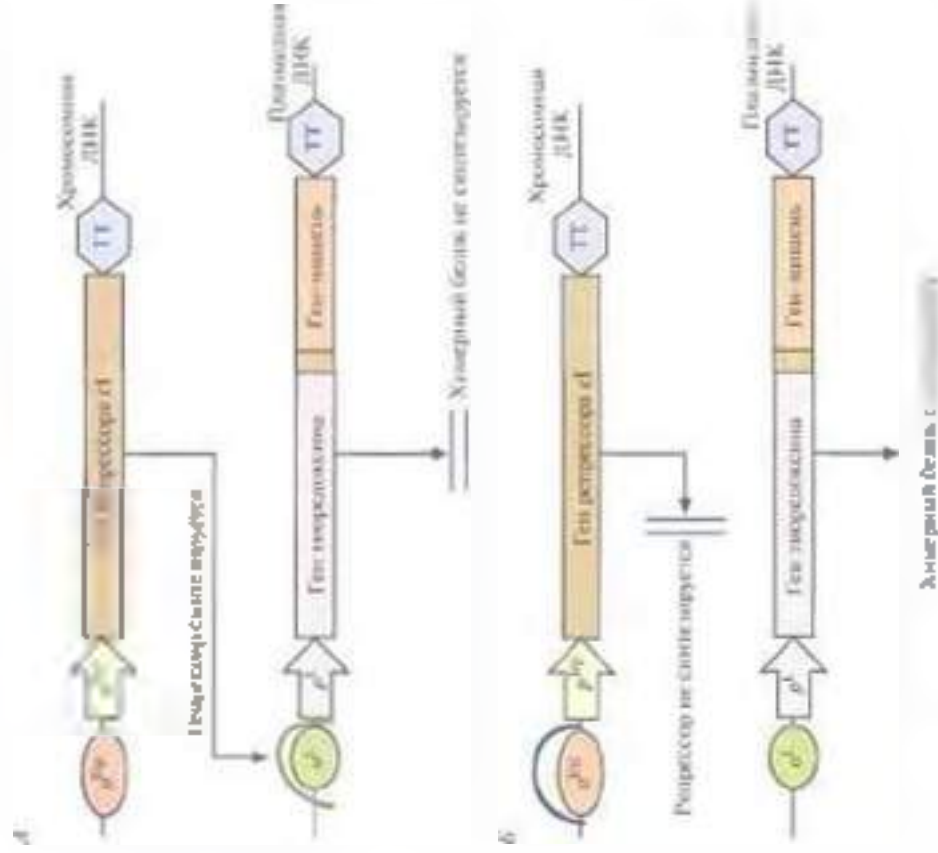


Рис. 9.6. Экспрессия генов в бактериальной клетке. В процессе транскрипции гены ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A транскрибируются в мРНК. С помощью рибосом синтезируются белки репрессора ρ^R , индуктора ρ^I , регулятора ρ^S и белка ρ^A . Репрессор ρ^R связывается с оператором ρ^O , индуктор ρ^I связывается с регулятором ρ^S , регулятор ρ^S связывается с оператором ρ^O . Белок ρ^A связывается с оператором ρ^O и индуктором ρ^I . В результате взаимодействия репрессора ρ^R с оператором ρ^O происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A . В результате взаимодействия индуктора ρ^I с регулятором ρ^S происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A . В результате взаимодействия регулятора ρ^S с оператором ρ^O происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A . В результате взаимодействия белка ρ^A с оператором ρ^O и индуктором ρ^I происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A .

Важной особенностью бактериальных генов является то, что они могут быть экспрессированы как в виде отдельных генов, так и в виде полицистронных оперонов. В оперонах гены расположены последовательно, и они транскрибируются в единую мРНК, которая затем транслируется в несколько белков. Это позволяет координировать экспрессию генов, участвующих в одном биологическом процессе. Например, в опероне λ гены ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A участвуют в регуляции транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A .

Бактериальные опероны гены (поверхности) генов бактерий или белков можно использовать в качестве регуляторов экспрессии генов. Например, в опероне λ гены ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A участвуют в регуляции транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A . В результате взаимодействия репрессора ρ^R с оператором ρ^O происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A . В результате взаимодействия индуктора ρ^I с регулятором ρ^S происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A . В результате взаимодействия регулятора ρ^S с оператором ρ^O происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A . В результате взаимодействия белка ρ^A с оператором ρ^O и индуктором ρ^I происходит подавление транскрипции генов ρ^R , ρ^I , ρ^S и ρ^A .

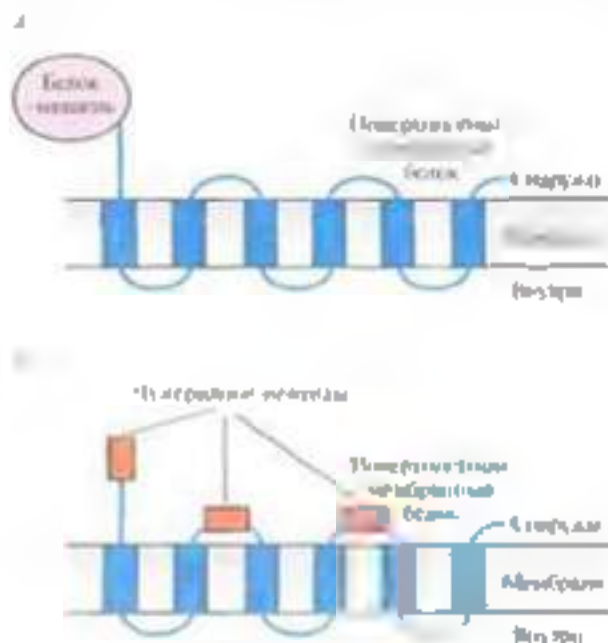


Рис. 6.10. Трансмембранные белки. Существуют (а) интегральные бактериальные белки и (б) трансмембранные белки. В первом случае белки пронизывают всю N или C часть (или обе) мембраны и экспонируются с обеих сторон (а). В втором случае трансмембранные белки пронизывают мембрану на определенном участке (б).

Системы доставки с помощью белков на поверхность бактериальных клеток можно использовать также для суперэкспрессии некоторых белков и пептидов. Так, в одной из работ в институте «Адвансид» основанной на мембране *Agrobacterium tumefaciens* (АТ), был встроены ген внешнего детерминанта побудителя малины *Plasmidium factorum* бактериальные клетки, синтезирующие соответствующий трансмембранный белок, давая положительную реакцию с антителами к *P factorum*. Следовательно, поверхность мембранных белков можно использовать в качестве вакцины (та. 11).

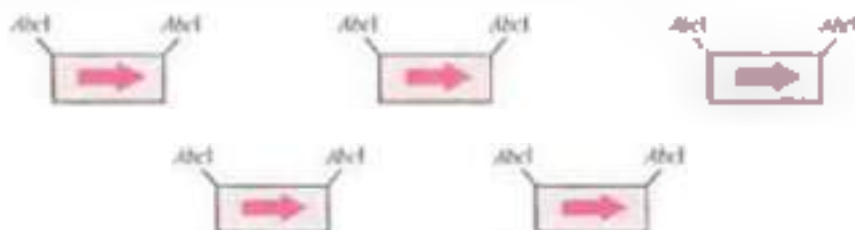
Однонаправленное гомологичное расщепление генов

Обычно уровень генов экспрессии пропорционален числу копий транскрибируемого гена в хромосомах в клетке. Однако следует, что с увели-

чением числа копий плазмиды можно увеличить и количество продуцируемых белков в эту плазмиду гена. Однако приемы клонального гена плазмиды сопряжены с другими транскрипционными последовательностями, например генов устойчивости к антибиотикам, и по мере увеличения их количества истощаются ресурсы клетки будут все большее количество энергии тратиться на образование белков, кодируемых этой плазмидой, и метаболическая активность такой клетки упадет. Выходом из этой ситуации могли бы стать векторы, встраиваемые в хромосомную плазмиду посредством копий интересующего исследователя гена. Однако при этом возникает одна техническая проблема: расположение генов в хромосоме ориентировано, чтобы все они могли правильно транскрибироваться и транслироваться. Простое встраивание «конца в конец» приводит к случайной ориентации генов, так что одни из них экспрессируются, а другие, наоборот, в противоположной ориентации, не (рис. 6.11).

Чтобы решить эту проблему можно использовать рестрицирующий фермент *AclI*, который узнает последовательность 5'-CTCCGGAATTC-3' в районе ДНК с 5' концы от остатка T. Процедура состоит в следующем. Плазмиду, содержащую эту последовательность, разрезаем с помощью *AclI* и, используя «ДНК-полимеразу», диспершируем лямбда-копии. Затем в наборе с другим концом прицеливаем *EcoRI* линкер (GAATTC), вновь диметил хлорид. Получившиеся плазмиды содержат сегмент ДНК с двумя *AclI* сайтами, функционирующими *EcoRI*-сайт и инвертированной с тем (рис. 6.12. А и Б), т.е. последовательность 5'-CTCCGGAATTCGGAATTC-3' (здесь штриховые обозначены сайты узнавания для *AclI*). Нужный ген вставляем с транскрипционным стартом с помощью рестриктазы *EcoRI*-сайт и затем пишем из плазмиды с помощью *AclI* (рис. 6.12. В). Такие фрагменты имеют открытые концы, и поэтому при последующем соединении соединятся в одной ориентации. Подобный набор однонаправленных фрагментов можно гены также быть встраиваемыми в вектор. При этом важным преимуществом является то, что при этом можно избежать проблем, связанных с ориентацией генов относительно промотора, так как все экспрессируемые гены встраиваются только в 5'3' случае.

А. Векторы с геном



Б. Тетрамерные векторы образуются при димеризации

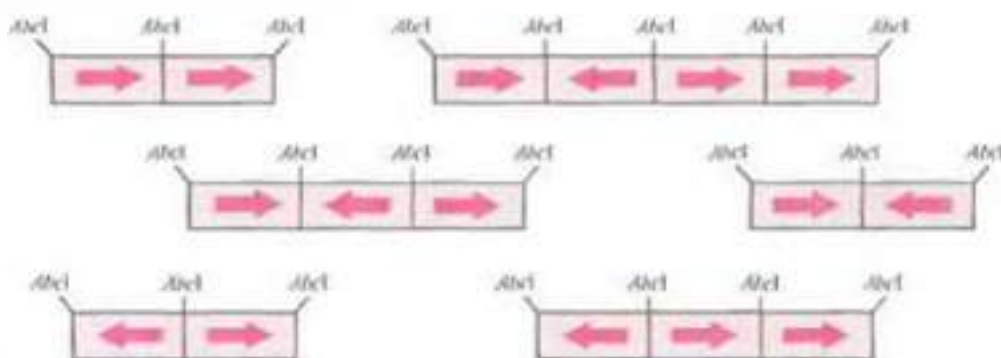


Рис. 6.11. Образование случайно ориентированных тетрамерных векторов. а) Клонирование генов вращением из клонирующего вектора с помощью рестриктирующей нуклеазы *AclI* и встраивание их векторной ДНК. б) Стадия димеризации, при которой происходит соединение линейных генов. Поскольку нуклеотидные последовательности обеих встраиваемых концов одной ориентации, последние могут соединиться в любой ориентации. В результате образуются тетрамерные векторы не случайно ориентированными последовательностями

Другой подход основан на использовании синтетических ориентированных аддиторов — коротких олигонуклеотидов, присоединенных к концам линейизованной плазмидной ДНК и к концам фрагмента ДНК с клонируемым геном. При инкубации эти фрагменты взаимодействуют только в одной ориентации. Описанная процедура технически значительно более проста, чем та, в которой используется рестриктирующая нуклеаза *AclI*; кроме того она не требует, чтобы в гене-мишене отсутствовали *AclI* и *EcoRI* сайты.

Уже только лишь экспериментально, что уровень экспрессии генов интерферона α в клетках увеличивается пропорционально числу введенных копий гена, но крайней мере до четырех копий на клетку. Однако таковыми векторы никогда оказываются стабильными и со временем векторы из них или даже все утрачиваются клеткой.

Транскрипционные жетпрессирующие векторы

Наличие сильного регулируемого промотора — это очень важное, но недостаточное условие максимизации количества продукта клонированного гена. Большую роль играют также эффективность транскрипции и стабильность самого продукта. В прокариотических клетках разные мРНК не всегда транскрибируются с одинаковой эффективностью. Различные сайты (составляющие сайт инициации *rib*), в результате в клетке будут присутствовать сотни или даже тысячи копий одной молекулы и лишь несколько копий другой.

Различия в транскрипции сайта — во крайней мере частично — из-за различий, имеющихся в транскрибирующей РНК сайта инициации *rib* (называемого сайтом связывания рибосомы). Сайт связывания рибосомы — это

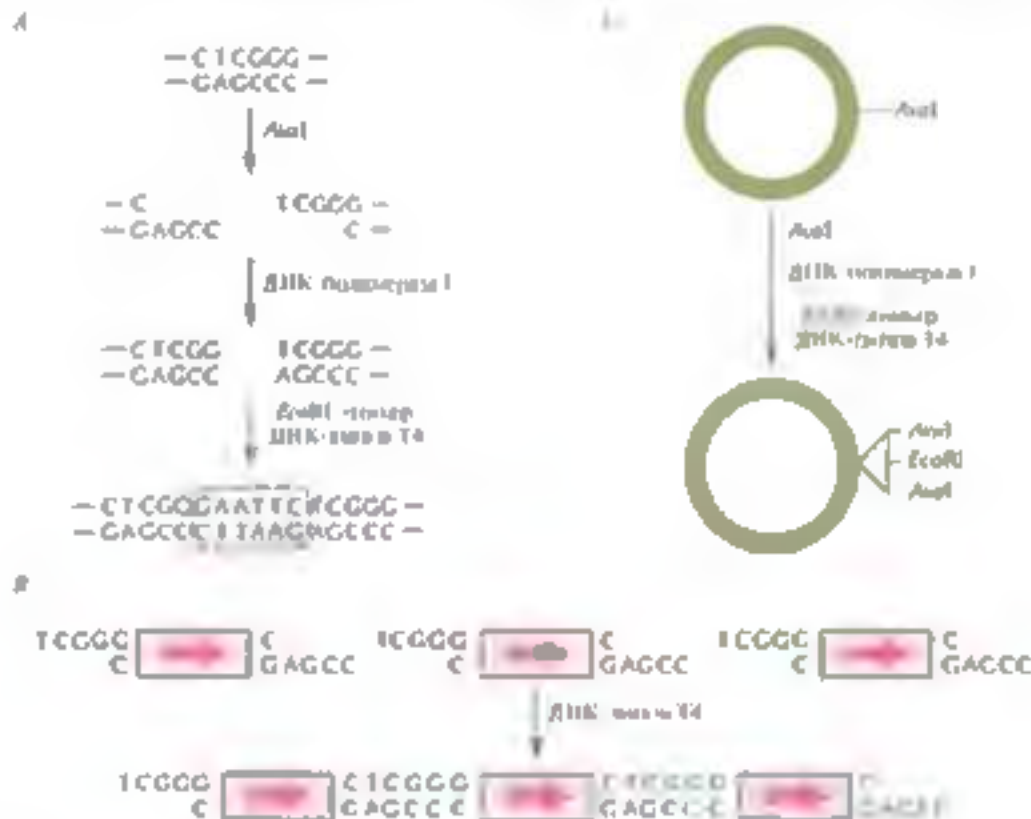


Рис. 6.12. Конструирование несимметричной вектора (только в одной ориентации) **A**. Соединение вектора (плазмиду) полученной из AclI-сайта и образование несимметричных концов достигается с помощью ДНК-полимеразы I и EcoRI. К туловищу вектора присоединяется EcoRI-линкер, синтезируемый сайтом EcoRI. Встраивание EcoRI-линкера в AclI-сайт и плазмиды **B**. Обратное действие достигается с помощью EcoRI-лигазы

Рис. 6.13. Внутримолекулярное спаривание в молекуле мРНК, ориентированной вправо (направление транскрипции). GGGGG сайт начальной рибосомы, AUG (красные буквы) – инициирующий шаблон. CAG-CAU-CAU-UUA UUU – несколько первых кодонов. Обратите внимание, что такие обычно для мРНК пары A-U и G-C иногда образуют пары G-C:



ВАЖНАЯ ВЕЩА

lacZ-Промотор: функциональный гифрил, полученный из *trp*- и *lac*-промоторов

H. A. DeVos, I. J. Cantowick, M. Yvinec
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 71-75, 1989

Присутствие в конструируемом промоторе, не биер и не аналитический элемент, способный создавать на оставшихся участках естественных регуляторных промоторов еще более сильного промотора, способного обеспечить высокий уровень экспрессии мутерал или белков. Когда они включили свои исследования, функциональные последовательности белочности (схематический промотор, в котором вместо *5' cap*, были уже упомянуты, отныне концентрические элементы, объединяющиеся в дуплетность, оказались неэффективными были признаны, что почти все мутации, возникающие в *5' cap* промотора, локализованы в 10 или в 35 областях (находящихся на расстоянии 10 или соответственно 35 нм от точки инициации транскрипции). Бл

же 2010 сайт промотора удерживал (или не удерживал, в зависимости от того, какой последовательности участка) общий приблизительный консенсусный *5'-TATAAT'* для 10 и *5' TTTGACA'* для 35 областей. Эти две последовательности были получены путем сравнения функциональных последовательностей всех идентифицированных промоторов и идентификации наиболее часто встречающихся нуклеотидов. Не было известно, что у промотора *lacZ* 3, более сильное парамиты *lac* промотора, - 10-область имеет консенсусную нуклеотидную последовательность, а 35-область - нет, а у *trp*-промотора, в норме концентрируется транскрипция (*5' cap*, которое отмечено в библиотечной информации, situated

как промотор) близким к естественной конструируемой конструируемой промотору, у которого 10 областей (расстояние 10 нм от промотора, и 35 от промотора *trp* для промотора *lac* промотор был проверен на способность концентрировать элемент (фрагмент) последовательности *5' cap* (в сравнении с *lac* и *trp* промоторами и теми же участками *lac* и *trp* промотора) более сильными - примером в 3 раз (в сравнении с промотором *trp* и в 10 - по сравнению с *lac*). Кроме того, *lac* промотор, как и *lac*, регулировал на *lac*-репрессор и активировался под действием M111 таким образом, что промотор был не только более сильным, но и регулируемым

последовательность из шести-восьми нуклеотидов (например, UAA(G)A(G)C), связывающаяся с комплементарной последовательностью (в данном случае AUCCUCC) рРНК-компонента (рРНК) малой субъединицы рибосомы. Обычно чем прочнее связывание между мРНК и рРНК, тем выше эффективность инициации трансляции. Именно поэтому большинство экспрессируемых *E. coli*-векторов конструируют таким образом, чтобы мРНК клонированного гена обязательно содержала сильный сайт связывания рибосомы. Это необходимо условие трансляции (терминационных про- и эукариотических генов в *E. coli* (хотя бы должны соблюдаться и некоторые другие условия. Во-первых, нуклеотидная последовательность, связывающаяся с рРНК, должна находиться на определенном расстоянии от стартового кодона клонированного гена (в рРНК стартовым кодом является AUG; в ДНК ему соответствует кодон ATG). Во-вторых, участок ДНК, содержащий сайт связыва-

ния рибосомы и несколько первых кодонов клонированного гена, не должен иметь такую нуклеотидную последовательность, при которой после транскрипции может произойти внутримолекулярное спаривание (рис. 6.13), нарушающее спаривание мРНК с рибосомой. Именно локальная вторичная структура мРНК, обеспечивающая формирование или, наоборот, же, блокирование сайта связывания рибосомы, и определяет прочность спаривания мРНК с комплементарной рРНК. Таким образом, при клонировании любого гена важно убедиться в том, что сайт связывания рибосомы расположен на нужном расстоянии от этого гена и что вторичная структура мРНК не помешает его присоединению к рибосоме.

Уже создано большое количество векторных систем, которые включают как транскрипционный, так и трансляционный элементы, обеспечивающие экспрессию клонированного рекуррентно-генератора *E. coli*. Одной из таких систем

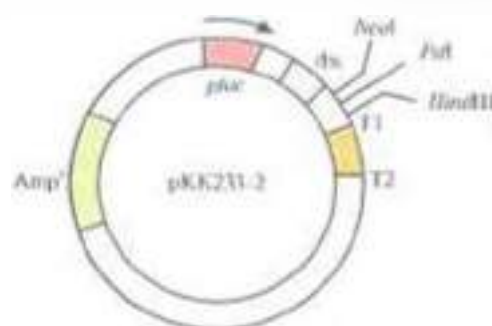


Рис. 6.14. Экспрессирующий вектор на основе плазмиды pKK233-2 (без кодирующей части гена). Он содержит ген устойчивости к ампициллину (Amp^r), индукцибельный селенцином маркер *lacZ* (применяется для скрининга) и участок связывания рибосомы (*lacZ*), три сайта для рестриктирующих нуклеотидов (*AclI*, *PstI* и *HindIII*) и два сайта терминации транскрипции (T1 и T2). Стрелка — направление транскрипции.

является экспрессирующим вектор pKK233-2 (содержащий следующие элементы (рис. 6.14):

- селективный маркер устойчивости к ампициллину;
- *lacZ*-промотор;
- *lacZ* участок связывания рибосомы;
- сайт-кодон ATG, расположенный на расстоянии восьми нуклеотидов от сайта связывания рибосомы;
- сайты терминации транскрипции T1 и T2 (на 12).

Клонированный ген встраивают в *AclI*-, *PstI* или *HindIII* сайт, расположенный между сайтом связывания рибосомы и сайтом терминации транскрипции. Если сайт ранка синтеза не попадает «в ногу» с кодоном ATG, то необходимо привести минимальную коррекцию. В этом случае после индукции в транскрипции транскрипция достаточно эффективно транслируется клонированным геном. Однако следует иметь в виду, что поскольку нуклеотидная последовательность, кодирующая N-концеом участок белка-мишеня, у разных клонированных генов различна, нельзя создавать универсальный вектор, исключивший ориентационное соответствие с РНК при любых обстоятельствах. По тому же опыту на участках индукции трансляции как бы они ни были оптимальными, не может за-

рантировать эффективность трансляции всех клонированных генов. Таким образом, опытные ученые чаще экспрессируют векторы не только основой для создания оптимальной системы трансляции.

Эффективность трансляции может зависеть во многом от «несовместимости» клеток, используемых для того, что в клонированном гене находится кодон, редко встречающийся в геноме организма хозяина. В таких случаях в кодонной области может не присутствовать РНК (с РНК), используемая редко используемые кодоны, что приводит к выводу при изучении клонированного гена. Как решить эту проблему? Несмотря на то, что если продукт клонированного гена очень ценен, можно попытаться осуществить синтез белка в такой партии клонированного гена, который состоит из колоний, обычно используемых количеством организмов (состоянии) и/или колоний.

С табелизация белков

События жизни полипептида белков осуществляется за несколько минут до нескольких часов. Такая краткость обуславливается количеством в числе дисульфидных связей в белковых молекулах и наличием или отсутствием на 5-конце от разделенных аминокислот. Например, если к N-концу β -галактозидазы присоединить разные аминокислоты, то время жизни молифицированной белка in vitro может варьировать от двух минут до более 24 часов (табл. 6.4). Аминокислоты, увеличивающие время жизни белков, можно включать в белки (синтезируемыми методами). Часто для стабилизации белка-мишеня достаточно присоединить к N-концу всего

Таблица 6.4. Время производства галактозидазы в *E. coli* при контроле присоединения разных аминокислот¹⁾

Присоединенная аминокислота	Время жизни белка
Met, Ser, Ala	> 20 ч
Phe, Val, Gly	> 20 ч
Leu, Ile	> 20 мин
Ileu, Gly	10 мин
Phe	7 мин
Met, Phe, Arg, I le	3 мин
...	2 мин

¹⁾ По данным работы Gatzmanis et al., 1996, Science, 274, 179-181

ошибки аминокислотными остатками. Долголетние исследования показали, что увеличение мутационной нагрузки приводит к этому характерно как для *ye-*, так и для прокариот.

Одним из стабилизирующих белков может не только помышаться. Так, включение некоторых аминокислотных последовательностей во внутреннюю часть белковой молекулы делает ее более чувствительной к протосолитическому расщеплению. Такие последовательности обнаружены остатками пролина (P), глутаминовой кислоты (G), серина (S) и треонина (T), отсюда и их название P1-S1-последовательности. Они часто бывают флюктуирующими: таскеромы не обладают широкого спектра аминокислот и, возможно, служат маркерами для протей. Стабильность белков, содержащих такие последовательности, можно было бы повысить путем изменения в соответствующих генах. При этом, однако, необходимо обращаться с юм, чтобы не произошло нарушения функции белка-мишеня.

Рост в условиях недостатка кислорода

E. coli и многие другие микроорганизмы, которые используются для экспрессии чужеродных белков, обычно растут только в присутствии кислорода. К сожалению, растворимость кислорода в водной среде ограничена, а по мере увеличения плотности культуры содержание растворенного кислорода в культуральной среде быстро падает. Более того, поскольку кислород растворяется очень медленно, трудно достичь простым продуванием через среду воздуха или кислорода даже при интенсивном перемешивании. При уменьшении концентрации кислорода интенсивность роста замедляется и культура медленно переходит в стационарную фазу, характеризующуюся другим метаболическим статусом. Одним из последствий этого является образование в клетках протейназ, которые могут расщеплять белок-мишень. Проблему выращивания культуральной среды пытаются решить разными способами: и снижением концентрации кислорода, и увеличением интенсивности продуцирования воздуха и перемешивания, добавлением в среду веществ, увеличивающих растворимость кислорода. Все это, однако, не привело ни к каким существенным результатам.

Применение хлоридов натрия с дефицитом протейназ

Одним из возможных подходов стабилизации чужеродных белков, синтезируемых *E. coli*, состоит в использовании хлоридов натрия с дефицитом протосолитических ферментов. Однако здесь есть свои трудности. В клетках *E. coli* синтезируется по крайней мере 25 разных протейназ, и только некоторые из них изучены на генетическом уровне. Кроме того, протейназы различаются в клетке своим назначением, различиями чувствительности или дефектными белками и естественной темпами их неспецифичности клеток. И если бы не было самоустранения ингибиторов, несущих мутации в одном или даже нескольких протейназных генах, и чем более выражен был структурный дефицит по протейназам, тем хуже результаты. Таким образом, снижение протейназной активности приводит к истощению клеточных ресурсов. И все же удалось создать штаммы *E. coli*, несущие мутации в гене синтеза фактора РНК-полимеразы, ответственного за синтез белков тем нового гена (*prfB*), и в гене протейназы, несоблюдимой для роста клеток при высоких температурах (*abrB*), у которых удельная активность секретурных белков была в 16 раз выше, чем у штаммов дикого типа. Это кажущееся увеличение было обусловлено снижением ингибиционности протосолитического расщепления белков.

Бактериальный «гемоглобин»

Местомобитанием микробных штаммов трихостригательными облигатными аэробными бактериями *Citrobacter* является галлий объединенные кислородом непроточные условия. Чтобы получить нужное количество кислорода для роста и метаболизма, они синтезируют гемоглобиноподобное вещество, способное связывать кислород из окружающей среды и увеличивающее концентрацию доступного кислорода в клетке. Когда ген, кодирующий этот белок, был введен в клетки *E. coli*, в клетках сразу проявились серьезные и внезапные повышения уровня синтеза и точности и регулируемых белков, возросла эффективность протонных насосов, увеличилась количество образующегося АТФ и его концентрация, особенно при низком содержании кислорода в среде. Чтобы такая стратегия могла быть использована

использовать применительно к другим млекопитающим клеткам, необходимо, чтобы эти клетки не только эффективно «адресировали» гемоглобиновый ген *β-globin*, но и синтезировали гемоглобиновый белок. Это позволяет улучшить рост таких важных и коммерчески перспективных бактерий, как *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum* и *Haemophilus influenzae*, а также осуществлять в них экспрессию чужеродных генов.

Интеграция чужеродной ДНК в хромосому хозяина

При наличии в клетке плазмиды часть генетических ресурсов расходуется на ее репликацию, прикрепление к синтез-белкам, которые она кодирует. При этом, как правило, многоклеточные плазмиды требуют больше жертв, чем митохондриальные, и в результате часть клеток в процессе роста популяции утрачивает плазмиду. Клетки, лишившиеся своих плазмид, обычно растут быстрее тех, в которых они сохранились, и в конечном счете оказываются в культуре преобладающими. По истечении нескольких генераций эта ситуация приводит к количественному снижению продукта клонированного гена. Работоспособно и обратное мерцание плазмиды к реципиенту или реципиента. В лабораторных условиях для сохранения плазмиды клетки выживают и размножаются инкубацией или стабилизацией, обеспечивающая рост только тех клеток, в которых есть плазмиды. Стабилизационные антибиотики и канцерогены могут помочь в культуре, выживаемые в больших объемах, или в промышленные ферментеры приводят к значительному удорожанию конечного продукта. Особенно важно, чтобы клонированные гены сохранялись, не утрачиваясь и не передаваясь другим микроорганизмам, в том случае, когда клонированный микроорганизм предназначен для использования вне стен лаборатории. Он должен не только оставаться эффективным, но и быть экологически безопасным. Включение клонированной ДНК в хромосомную ДНК хозяинского организма позволяет обойти все эти проблемы и избежать утраты плазмидных генов.

При встраивании нужного гена в хромосомную ДНК хозяина нужно побояться о том,

чтобы сайт интеграции не находился внутри гена, кодирующего важную клеточную функцию. Для этого чужеродный ген встраивают в заранее несущественный сайт. Кроме того, для обеспечения эффективной экспрессии его помещают под контроль регулируемого промотора. Для интеграции в нужный сайт плазмидный ген должен содержать нуклеотидную последовательность длиной не менее 40 нуклеотидов, складируемую с таковыми в хромосомной ДНК, в пределах которой и должен произойти физический обмен (рекомбинация) между двумя молекулами ДНК. Параметр процесса интеграции состоит в следующем:

1. Идентификация подходящего сайта интеграции в сегменте хромосомной ДНК, посредством которой может быть прервана без ущерба для физиологической клетки.
2. Выделение и клонирование всего хромосомного сайта интеграции или его части.
3. Встраивание нужного гена вместе с регулируемым промотором в клонированный сайт интеграции (рис. 6.15, А) или обходного (рис. 6.15, Б).
4. Перенос полученной генетической конструкции «хромосомный сайт интеграции/клонированный ген» в хозяинскую клетку в составе плазмиды, не способной к автономной репликации в клетках этого хозяина.
5. Сортировка и сортирование тех хозяинских клеток, которые экспрессируют клонированный ген. Исследование клонированного гена возможно только в случае его интеграции в хромосому клетки хозяина.

Если клетка трансформирована инкрементальной плазмидой, несущей кодируемый ген в середине клонированного фрагмента с хромосомным сайтом интеграции, то может произойти сшивание между гомологичными нуклеотидными последовательностями плазмиды и хромосомной ДНК (рис. 6.15, А) и далее интеграция в результате двойного кроссинговера, осуществляемого ферментами. Клетки-хозяин Альтернативный вариант интеграция всей плазмидной ДНК в хромосому хозяина в результате одиночного кроссинговера (на рисунке не показано). Интеграция всей плазмиды может произойти и в том случае, если клонированный

важные транскрипционные элементы и присутствие элазифериназы в высшей концентрации. В таких условиях выживали только те клетки, в которых происходила спонтанная дупликация интратрифоничной пшеницы Клетка, отбираемые по признаку жизнеспособности и элазифериназу, проверяли на активность α -амилазы (табл. 6.5). После каждой процедуры были изменены условия, отбиравшие до 9 клеток гены α -амилазы. Урожен ферментативной активности в клетках, содержащих α -амилазные гены в составе хромосомы, был выше, чем в тех случаях, когда эти гены находились в митохондриальной ДНК (от 20 до 40 единиц на клетку) [9].

В одном из исследований несколько линий чужеродного гена были встроены в разные ориентации выбранные сайты в хромосоме *S. cerevisiae*, при этом для каждой из линий использовалась следующая процедура (рис. 6.16). На первом этапе

Таблица 6.5 Сравнение между числом копий гена α -амилазы в отношении ее активности и выходов *S. cerevisiae*¹

Число копий на клетку	Активность, ЕД на культуру, выходящую в течение 24 часов после посева
2	300
5	1300
7	1100
8	1400
9	400
Митохондриальная ДНК	100

¹ ЕД (единица) — это количество ЕД, выходящее в течение 24 ч (6 л).

выбирали селективный маркерный ген (например, ген устойчивости к какому-либо антибиотику) и встраивали его в середину митохондриального, или искусственно вносимого фрагмента хромосомной ДНК *S. cerevisiae* в составе плазмиды

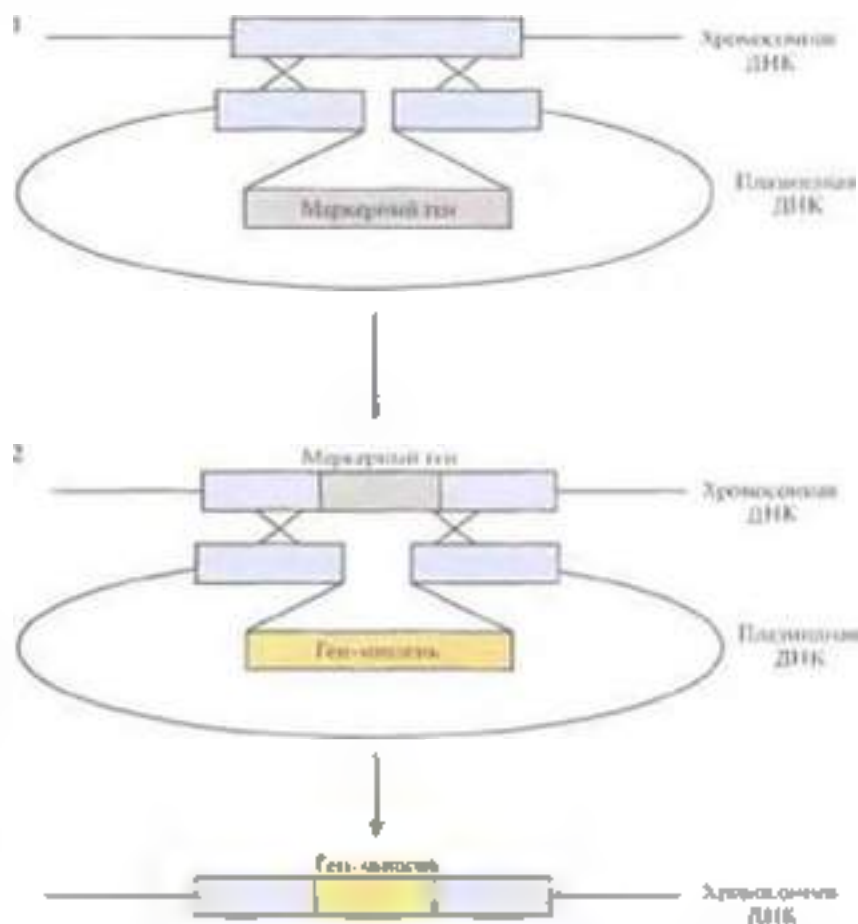


Рис. 6.16. Встраивание чужеродного гена в выделенный сайт в хромосоме *S. cerevisiae*. На этапе 1 маркер (генная ДНК) вносился в клетку в плазмиды, содержающие селективный антибиотик. Маркерный ген. На этапе 2 маркерный ген вносился в хромосому микробной Аминокислотная инверсия нового сайта для других сайтов.

нцы вектора, не способного реплицироваться в эукариотических клетках. Выбирали клетки, экспрессирующие маркерный ген, т. е. клетки, у которых этот ген встроился в хромосому ДНК. На втором этапе ген-маркер был с соответствующими сигналами инципирован трансляции и транскрипции, введенный в середину того же, как и выше, искусственного фрагмента хромосомы ДНК *E. coli* в составе плазмиды, включающей критическую ДНК с индикатором рекомбинации, а затем им маркерный ген. Выбирали клетки, которые уже не экспрессировали маркерный ген т. е. перешли вместе с тем геном, интегрированным в хромосому ДНК. Для интересующих других клеток ген-маркер в хромосому ДНК хламидий клетки повторяли эту процедуру, используя другие искусственные образцы ДНК.

Повышение эффективности секреции

С таблицах белков кодируемых клонированными генами, зависит от их клеточной локализации. Например, рекомбинантный инсулин оказывается примерно в 10 раз более стабильным, если он секретруется (экспрессируется) в периплазм (пространство между мембраной цитоплазматической и наружной мембраной), а не остается в цитоплазме. Кроме того, белки, секретующиеся в периплазму ions в среду, легче очистить.

Обычно транспорт белков через клеточную мембрану обеспечивается N -концевыми аминокислотными последовательностями, называемые сигнальными пептидами (сигнальными последовательностями, лидерными пептидами). Иногда удается сделать белок секретующимся, присоединив к кодирующему его гену нуклеотидную последовательность, ответственную за синтез сигнального пептида. Однако простое наличие сигнала *in vitro* не обеспечивает эффективной секреции. Кроме того, *E. coli* и другие граммотрицательные микроорганизмы обычно не могут секретировать белки в окружающую среду из-за наличия наружной мембраны. Есть по крайней мере два способа решения этой проблемы. Первым является введение трансформированных клеток дурантов, лишенных наружной мембраны, которые способны секретировать белки в среду. С помощью второй стратегии

Если сливние ген-маркер с фрагментом ДНК, кодирующим сигнальный пептид, не привели к эффективной секреции белкового продукта, приходится использовать другие стратегические приемы. Одним из таких приемов, с успехом примененных в отношении интерлейкина-2, оказывается на сливнии гена, кодирующего интерлейкин-2, с геном, кодирующим полиоразмерный предшественник мультисвязывающего белка, а не только его сигнальную последовательность, и разделении этих генов сегментом ДНК, кодирующим сайт узнавания для фактора X_1 . Когда такой маркерный ген встроили в плазмидный вектор и использовали его для трансформации *E. coli*, в периплазме хламидийской клетки обнаружили в большом количестве маркерный белок. Обработка его фактором X_1 получала функциональный интерлейкин-2.

По данным одной из работ, секретория мультисвязывающего белка в *E. coli* зависит от уровня экспрессии соответствующего гена. Чужеродные белки, синтезируемые наиболее активно, не обязательно столь же активно секретируются. Иногда нелинейный синтез чужеродного белка снижает скорость секреторного аппарата и его контролирует. Таким образом, если нужно, чтобы данный белок неизменно секретировался, то можно попытаться уменьшить уровень экспрессии соответствующего гена.

Некоторые граммотрицательные бактерии секретируют в среду белок, называемый бактеринином. Он активирует фосфолипазу А, фосфолипазу (липазу) во внутренней мембране бактериальной клетки, в результате чего в наружной мембране становится проницаемыми, и не только шти- и периплазматические белки высвобождаются в культуральную среду. Таким образом, можно ввести ген бактеринина в плазмиду так, чтобы он находился под контролем стабильно регулируемого промотора, трансформировать клетки *E. coli* этой плазмидой и сделать их проницаемыми. Если же *E. coli* уже несут ген бактеринина, то можно трансформировать другой штамм, который содержит ген регуляторного белка, связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид. Если оба гена находятся под контролем одного промотора, то их можно индуцировать одномо-

можно, и белок климатрипозина будет селиться преимущественно в среде.

Когда секреторные чужеродные белки образуются в *E. coli* в слишком большом количестве, очень часто процесс их экспорта не все белки-рецепторы являются; например половина секреторных белков сохраняет пиверную гидролизостойкость, а другая половина полностью протектируется с образованием зрелой формы. Это может быть связано с недостатком каких-то белков, участвующих в секрете. В такой ситуации, чтобы увеличить долю протектированных белков, можно попытаться повысить уровень экспорта белка, ответственного за синтез мембранной компоненты секреторной системы. Для проверки этого предположения были поставлены следующие эксперименты. Плазмиды, кодирующие гены *rfbA* и *secE*, которые кодируют основные компоненты молекулярного механизма, ответственного за физическое перемещение белков через мембрану, были введены в клетки *E. coli*. После такого введения секреторного аппарата штиркой в среду для *комбинированного* была (штаммом *interleukin 6*), секреторными в *in vitro* в зрелой форме, увеличивался с 50 до более чем 90%.

Грибы *Aspergillus* секретируют в среду большое количество ферментов и широко используются для их промышленного производства. Возникла идея использовать для этого гены человека, кодирующие интерферон с геном штамма *Aspergillus niger*, ответственно за секреторную систему, и разместить эту конструкцию под контролем эндоплазматического ретикулума *Aspergillus nidulans*, индуцируемого арабином. После добавления пептида в среду с трикаторицидином клетками *Aspergillus nidulans* метод секреторного человеческого интерферона *in vitro* [1, 2], что значительно превышает 50% от секреторной клеточной массы. Эта работа показала, что секреторная система *Aspergillus niger* способна экспортировать в среду с трикаторицидином белки человека.

Метаболическая перегрузка

Введение в клетку чужеродной ДНК и ее экспрессия часто приводит к нарушению клеточного метаболизма. Это нарушение весьма раз-

нообразно и обусловлено давлением, которое оказывает чужеродная ДНК на все клеточные процессы. Метаболическая перегрузка может возникать по разным причинам:

- Увеличение числа копий *in vitro* размера генов и связанных с этим увеличение количества жертвы, необходимых для их репликации и сохранения.
- Недостаток рибонуклеотинов, аминокислот и энергии и невозможность обеспечения им и всех необходимых реакций, и процесса экспорта плазмидных генов.
- Гиперпродукция чужеродных белков, приводящая к истощению пула секторных аминокислот (или для некоторых аминокислот) и/или энергетических ресурсов (в виде АТФ и GTP).
- Перегрузка системы экспорта и нарушение правильной локализации или ингибирования белков хостской клетки в клеточном «перепроизводстве» чужеродного белка, экспортируемого из эндоплазмы и клеточной мембраны или в периплазматическое пространство.
- Наличие у организмов-хозяев необычных метаболических свойств (например, высокая энзиматическая активность у *Aspergillus niger*), что делает его более чувствительным к различным токсинам, чем обычные клетки.
- Непригодные влияния чужеродных белков на функционирование хостской клетки (например, взаимодействие с *in vitro* важным неименным предшественником в перепроизводстве, а иногда и токсичные соединения).

Метаболическая перегрузка может приводить к различным изменениям в физиологии и функционировании хостской клетки. Одно из наиболее типичных изменений скорости роста клеток после введения чужеродной ДНК. Так, клетки, содержащие плазмиду, растут медленнее, чем нетрансформированные, не содержащие плазмиды (табл. 6), что часто сопровождается утратой рекомбинационной плазмиды. Иногда метаболическая перегрузка приводит к тому, что под давлением отбора на плазмиды детектируется рекомбинантный ген или его часть.

Таблица 6.4. Изменение числа копий плазмиды на единицу роста дрожжевых клеток¹¹

Плотность опресованных клеток $\times 10^6$ (OD ₆₀₀) ²	Число копий плазмиды	Изменение числа копий на клетку
Исходная популяция	0	1,00
A	11	0,92
B	24	0,91
C	60	0,87
D	177	0,83
E	408	0,77

¹ Исходная популяция была OD₆₀₀ 0,05, а конечная OD₆₀₀ 20,000 (2000-кратное увеличение).

² Плотность OD₆₀₀ определялась по формуле A₆₀₀ = 0,434 OD₆₀₀, адаптированной отсюда из публикации по определению OD₆₀₀ для дрожжей.

Поскольку клеткам, растущим в условиях метаболической перегрузки, не хватает энергии для осуществления фактинотриптонина, затрачиваются ресурсы всего тела на поддержание метаболических процессов, как функция или синтез белков. Могу и уменьшить также размер и форму клеток, образуются спящие формы (экскистозы) или оптимизация, с которыми имеют дело с зрелыми и стареющими микроорганизмами.

Как следствие метаболической перегрузки, обусловленной избыточными питательными веществами и повышенной плотностью клеток или стрессовыми блоками, может возникнуть запуск стрессовых механизмов, в частности индуцироваться синтез клеточных протекторов, под действием которых происходит быстрая реорганизация рекомбинантного белка. Существует путь, который может стать результатом дифференциальной экспрессии не только кодируемых генов-мишеней, но и генов самого вектора, кодирующих маркеры устойчивости к антибиотикам.

Вероятность транзакционных ошибок для *1 cod* составляет $2 \cdot 10^{-4}$ – $2 \cdot 10^{-5}$ на клетку за генерацию. Однако в условиях скелетной опресовки (синтез аминокислот tRNA), что часто случается при сверхпродукции чужеродных белков, вероятность возникновения белковой молекулы непосредственно аминокислоты вместо недостающей сильно увеличивается. Кроме того, точность присоединения еще больше снижается из-за деградации GTP, который является необходимым компонентом корректирующего аппарата. В одной из работ было показано, что в условиях индукции фактора роста индуцируется мутация в клетках *1 cod* частота ошибокных включений аминокислот в рекомбинантный белок 30-крат-

но увеличивается. Это не позволяет эксплуатировать соответствующий белок в качестве лекарственного средства, поскольку: 1) увеличение активности и стабильности белка могут быть гораздо более ожидаемыми; 2) наличие в молекуле «неправильных» аминокислот может вызвать нежелательную иммунологическую реакцию при введении белка в организм человека.

К счастью, прикладывая столетнюю жестокость, можно минимизировать влияние метаболической перегрузки, индукции стрессовых реакций комбинацией белка и плотности стабильности трансформированных дрожжевых клеток. На пример, нагрузку можно снизить, если использовать малокопийные плазмидные векторы. А еще лучше избежать отдаления от вектора и отщипнуть чужеродную ДНК в хромосомную ДНК, ориентируя вектор в том случае, когда не нужно бороться с обеспечением стабильности плазмиды. Кроме того, клетке не придется расходуя свои ресурсы на синтез ненужных продуктов, контролируемых генами устойчивости к антибиотикам. Синтез привнесших (своей) в состав плазмидных векторов маркера генов-мишеней, являясь одной из основных причин метаболической перегрузки. Интеграция в хромосому особенно важна в тех случаях, когда используется сам рекомбинантный микроорганизм, а не синтез чужеродного продукта. Уменьшению метаболической перегрузки помогает также применение сильных, но регулируемых промоторов. В таких случаях ферментативно проведут в две стадии. В первой из них, во время роста, промотор, контролирующей трансскрипцию себя-копии, выключен, а на второй, во время индукции, включен.

Если частота использования шифрования у туземного гена отличается от таковой у организмов-хозяина, то проблему экзотичности специфических аминокислот (PAC) можно решить, синтезировав часть генов-мишеней или даже весь ген с более близким к хозяинскому организму набором кодонов. Так, в одном из исследований было показано, что количество стрептавангина, образующегося при экспрессии синтетического гена с GC-содержанием 54%, было в 10 раз больше, чем при экспрессии «природного» гена с GC-содержанием 69%. Однако этот подход довольно сложен и может применяться лишь в редких случаях.

Как по ни парамиды-но, по сути это способ увеличения количества чужеродного белка, синтетического регуляционного компонента или, наоборот, в подавлении уровня экспрессии гена на среднем уровне (так, чтобы на долю продукта приходилось примерно 5% суммарной клеточной биомассы), но это в максимальной степени увеличивает плотность культуры. Микробиологические системы с 5%-ным уровнем экспрессии чужеродного белка и низкой метаболической нагрузкой, в которой плотность может достигать 40 г/л (масса сухого вещества), она является более

эффективной, чем системы с 15%-ным уровнем экспрессии и плотностью 10 г/л.

Достичь одновременно и высокого уровня синтеза чужеродного белка, и высокой плотности культуры часто не удается из-за накопления вредных побочных продуктов (в первую очередь ацетата), ингибирующих рост клеток и синтез белка. Чтобы уменьшить накопление ацетата в богатой среде, не нарушая роста клеток, можно снизить скорость поглощения глюкозы, вводя в среду ос-диазол, метил-α-глюкозил. Альтернативным методом состоит в использовании клеток *E. coli*, lacking мутацию в гене *ptsI*, который кодирует фермент II глюкозофосфотрансферазной системы. Максимальная плотность культуры *E. coli* данного типа составила примерно 10 г/л, а культуры *E. coli* с мутацией в гене *ptsI* – 15 г/л. Кроме того, уровень синтеза β-лактоназы в мутантных клетках был на 25% выше (на 1 г массы сухого вещества), чем в клетках дикого типа, так что суммарные различия достигают примерно двукратной величины.

Достичь вышеописанного результата можно гораздо проще и быстрее, если использовать методы геномной инженерии, а не мутагенез и отбор (один из подходов состоял во внесении в *E. coli*

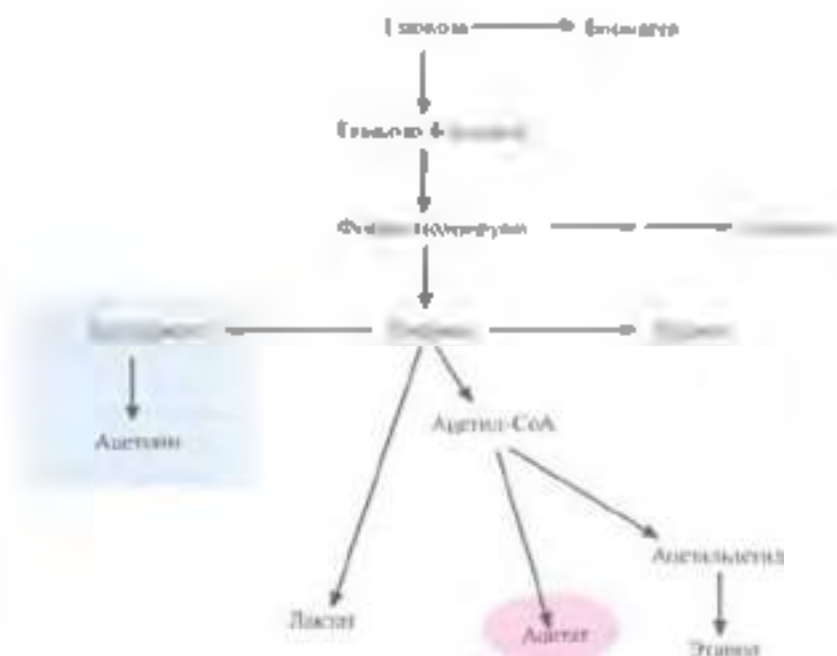


Рис. 6.17. Синтетические промоторы в метаболическом пути синтеза метаболитов на основе генов *E. coli* при ферментации на глюкозе, продуцирующей ацетат и этанол

тимо, кодирующей митохондриальной ДНК формирует эти мРНК образующиеся протеокиназы и полимераза, что приводит к уменьшению количества образующихся мРНК (рис. 6.17). Гены митохондриальной ДНК в клетках в составе одной популяции, в геме мицелии в составе другой, из другой группы несомненно эти Трансформированные клетки синтезируют гораздо меньше мРНК, чем нетрансформированные; вместо мРНК образуются шпатели, особенно примерно в 30 раз меньше полицикло, чем мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чтобы получить какой-то белковый продукт, необходимо обеспечить адекватную транскрипцию кодирующей ДНК гена и трансляцию кодирующей мРНК. Для инициации транскрипции в нужном месте необходим промотор, а для ее завершения — терминаторный элемент. Кодирующая ген часто бывает длиннее (как сигнальных последовательностей), и для его экспрессии в прокариотической клетке-хозяине нужно обеспечить и то, и другое. Кроме того, поскольку для решения биологической проблемы часто белок должен образовываться в больших количествах, необходимо использовать промотор, который позволял бы получить высокий уровень транскрипции (сильный промотор) и стабилизация мРНК-полимераза хозяинской клетки. Постоянная транскрипция кодирующего гена использует энергетические ресурсы хозяинской клетки, поэтому нужно использовать промоторы, работу которых можно регулировать либо с помощью специфических низкомолекулярных соединений, либо иными способами.

Эффективность синтеза белка зависит от многих и его мРНК специфических последовательностей. Чтобы предотвратить разрывание белкового продукта или обеспечить его секретацию, кодирующие гены, которые кодируют этот белок, подвержены кодированию и мутациям. Это может быть присоединение сайта связывания рибосомы перед сайтом инициации транскрипции (который в свою очередь, также бывает неким присоединением) или ло-

бавление к концу кодирующего гена терминирующего кодона, который обеспечивает быстрое транскрипции. Если нужно, чтобы белок секретировался, во перед кодирующим геном необходимо встроить сигнальную последовательность, рима считывания которой согласуется с таковой гена-хозяина.

Еще одна проблема заключается в стабильности белков, кодируемых кодирующими генами. Реконструированный белок может расщепляться протеиназами хозяинской клетки. Чтобы избежать этого, можно использовать кодирующий ген таковы образом, чтобы на N конце белковой молекулы оказались одна или несколько дополнительных аминокислот. В такой форме реконструированный белок уже не подвергается столь быстрой деградации. Кроме того, «ингибитор» аминокислоты иногда добавляют в последующей части аминокислотного белка, например с помощью полиинтерферона промотора хозяинской клетки. При этом место соединения компонента добавляется так, чтобы по нему можно было расщепить молекулу (лимит чекими или ферментативным путем) и выделить эти компоненты в чистом виде.

Благодаря тем микроорганизмам, с помощью которых получают белковые продукты, растут только в присутствии кислорода. Последствия этого видны в том, что при интенсионном росте его клетки быстро истощаются. Чтобы избежать этого, использовать для культивирования штаммы, неспособные синтезировать некоторые протеолитические ферменты (?) исключают в геном хозяинской клетки гены, кодирующие геномодии *Proteasome* sp., который связывает кислород окружающей среды и повышает его концентрацию в клетке.

С увеличением числа копий кодирующего гена увеличивается количество синтезируемого продукта. Однако при перекосе к крупномасштабному производству конструкция «плазмид/кодирующая ДНК» часто утрачивается. Чтобы избежать этого, разработаны способы интеграции кодирующего гена в хромосому хозяинской клетки. В этом случае ген остается в клетке как часть хозяинской ДНК.

Введение в геном хозяинской клетки и экспрессия чужеродной ДНК часто приводит к нарушению его метаболизма и нарушению функций — так называемой метаболической

перезагружке. Разработаны также ряд способов, позволяющих минимизировать этот эффект и одновременно оптимизировать выход белка-мишени и стабильность трансформированных клеток.

Система экспрессии весьма разнообразна, и исследователям приходится каждый раз подбирать условия, наиболее подходящие для получения того или иного белка в том или ином организме-хозяине. И все же, несмотря на различия в деталях, для создания самых разных систем экспрессии используются одни и те же основные приемы.

ЛИТЕРАТУРА

- Amann E., J. Brosius. 1985. "ATC vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40: 183-190.
- Arbuthnot A. A., K. Y. Sun, G. N. Bennett. 1995. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biochem. Prog.* 11: 475-478.
- Bachman A. D., F. Foley, A. Varskovsky. 1986. In vivo half-life of a protein in a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-186.
- Bugdasarian M. M., E. Amann, K. Lurz, B. Buckert, M. Bugdasarian. 1983. Activity of the hybrid *trp* *lac* (*trc*) promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of hybrid high-range, controlled-expression vectors. *Gene* 26: 273-282.
- Baker R. Y., A. Varskovsky. 1991. Inhibition of the N end rule pathway in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1090-1094.
- Chilton K., J. F. Curtis, J. De Modena, U. Rings, J. E. Bulles. 1990. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 8: 849-853.
- Chou C. H., G. N. Bennett, K. Y. Sun. 1994. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biochem. Biomag.* 44: 952-960.
- deBier H. A., I. J. Cumstock, M. Vasser. 1983. The *lac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25.
- Dowling R. S., C. W. Rabtown, R. R. Cline. 1994. Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol.* 16: 145-154.
- Ernst J. F. 1988. Codon usage and gene expression. *Trends Biotechnol.* 6: 196-199.
- Friesen J. D., G. An. 1983. Expression vehicles used in recombinant DNA technology. *Biochem. Adv.* 3: 205-227.
- Geison M. J. 1991. Both type and Messing inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 9: 368-369.
- Geitz H., A. Langner, A. C. Y. Chang, S. N. Cohen, H. Bujard. 1981. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4936-4940.
- Glick B. R. 1995. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biochem. Adv.* 13: 247-261.
- Glick B. R., G. K. Wiltney. 1987. Factors affecting the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 1: 277-282.
- Goldstein M. A., R. H. Dal. 1995. Prokaryotic promoters in biotechnology. In p. 105-128 M. R. E-Crewley (ed). *Biotechnology Annual Review*, vol. 1. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- Gwynne D. L., F. P. Buxton, S. A. Williams, S. Games, R. W. Davies. 1987. Genetically engineered secretion of active human Interferon and a bacterial endoglycanase from *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* 5: 713-719.
- Hajjarian G., H. Brilly, A. Remdes, F. A. Monters-Julia, C. Lazdinski, D. Raty. 1993. Targeting of Interferin-2 to the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2465-2473.
- Hartley J. L., Y. J. Gregor. 1981. Cloning multiple copies of λ DNA gene. *Gene* 13: 347-353.
- Hickney R. C. 1994. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 12: 456-463.
- Hogg T. P., K. S. Prickett, V. L. Price, R. T. Libby, C. J. March, D. P. Cerretti, D. L. Urdal, P. J. Cismik. 1988. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* 6: 1204-1210.
- Hsiung H. M., A. Cantrell, J. Eirink, B. Oudega, A. J. Veris, G. W. Becker. 1989. Use of bacteri-

- uman release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Bio/Technology* 7: 267-271.
- Jay G., G. Koury, A. K. Seib, F. Jay. 1981. Construction of a general vector for efficient expression of mammalian proteins to bacteria: use of a synthetic ribosome binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5543-5548.
- Jaspers L. S., J. H. Meesters, A. De Kester, H. Vackx, I. Van den Brande, Y. G. Ganssmans, M. J. Lauwereys, G. P. Vlasak, P. E. Staessens. 1995. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Bio/Technology* 13: 378-382.
- Kalle P., A. Palva, I. Palva. 1987. Enhancement of α -amylase production by integrating and amplifying the α -amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 27: 68-71.
- Kiel J. A. K. W., A. M. ten Berge, P. Burger, G. Venema. 1995. A general method for the consecutive integration of single copies of a heterologous gene at multiple loci in the *Bacillus subtilis* chromosome by replacement recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4244-4250.
- Kolata G. 1986. New rule proposed for protein degradation. *Science* 234: 151-151.
- Kukovsky K. S., J. G. K. Williams, A. A. Szalay. 1984. Length of foreign DNA in chimeric plasmids determines the efficiency of its integration into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene* 27: 289-290.
- Kuzlovskiy M., A. Vashchenko, G. Nash, R. W. Davis. 1993. A novel vector allowing the expression of genes in a wide range of gram-negative bacteria. *Gene* 70: 199-204.
- Labes M., A. Puhler, R. Simon. 1990. A new family of RSP1010-derived expression and lac-fusion broad-host-range vectors for gram-negative bacteria. *Gene* 89: 37-46.
- Lee N., J. Carlsburta, N. Walowright, D. Testa. 1984. Cloning with tandem gene system for high level gene expression. *Nucleic Acids Res* 12: 6797-6832.
- Leemans R., E. Hermant, W. Fiers. 1987. Broad host range expression vector based on the p^L promoter of coliphage λ regulated synthesis of human interleukin 2 in *Erwinia* and *Serratia* species. *J. Bacteriol* 169: 1899-1904.
- Little M., F. Breiding, B. Michael, S. Dabel. 1994. Surface display of antibodies. *Biotechnol Adv* 12: 539-555.
- Lu S. C., D. A. Webster, M. L. Wei, B. C. Stack. 1996. Genetic engineering to contain the *Kanazilla* hemoglobin gene enhances degradation of benzoic acid by *Xanthomonas malvifolia*. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 101-105.
- Louvan A. C., J. Bodlaender, M. de Groter, A. Vagehat, P. H. van Knippenberg. 1986. Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 14: 5481-5497.
- Magnoli S. K., H. I. Lennestrom, J. A. DeMudena, J. E. Curtis, J. E. Barley, J. L. Galvan, D. E. Hughes. 1991. Actinobolus production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* 9: 473-476.
- Meenan H. J., G. Georgiou. 1994. Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Bio/Technology* 12: 1107-1110.
- Mieschendahl M., B. Moller-Hill. 1985. F-coded, temperature sensitive λ cI₈₅₇ repressor gene for each construction and regulation of λ promoter dependent expression systems. *J. Bacteriol* 164: 1366-1369.
- Mieschendahl M., T. Peters, U. Huggli. 1986. A novel prophage independent λ regulated λ p^L expression system. *Bio/Technology* 4: 802-808.
- Mirby M., M. Ueno, S. Nishi. 1990. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif* 7: 129-136.
- Nagai K., H. C. Thompson. 1984. Construction of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309: 810-812.
- Nygren P. A., S. Stahl, M. Uden. 1994. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.* 12: 184-188.
- O'Neil K. T., R. H. Hoess. 1995. Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr. Opin Struct. Biol.* 5: 443-449.

- Perez-Perez J., G. Marquez, J. L. Barbero, J. Guikereez, 1994. Increasing the efficiency of plasmid export in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 12: 178-180.
- Krotzki E., H. Tsao, W. Flers, 1983. Improved plasmid vector with therminducible expression and temperature-regulated runaway regulation. *Gene* 27: 103-113.
- Rogers S., R. Wells, M. Rechsteiner, 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- Sander F. C., R. A. Luchini, D. E. Hughes, J. L. Galazzo, J. E. Bailey, 1994. Expression of *Vibrio cholerae* hemoglobin in *Corynebacterium glutamicum* increases final concentration and yield of L-histidine. p. 607-610. In I. Alberghina, L. Fiumali, P. Sansi (ed.) *Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Sassenfeld H. M., 1990. Engineering proteins for purification. *Trends Biotechnol* 8: 89-93.
- Sinnott J. C., D. G. Yarusso, 1996. Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 14: 629-634.
- Sung W. L., P. I. Yau, H. M. Zahak, S. A. Yezzer, 1996. Short synthetic oligodeoxynucleotide leader sequences enhance accumulation of human protein kinase synthesized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 93: 561-565.
- Talbot K., W. Gilbert, 1982. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79: 1830-1833.
- Taylor W. M., P. J. Hagerman, 1987. A general method for cloning DNA fragments in multiple copies. *Gene* 53: 139-144.
- Tobias J. W., T. F. Schrader, G. Rucap, A. Yanofsky, 1991. The N-end rule in bacteria. *Science* 254: 1374-1377.
- Tsukaya M., Y. Maehara, 1988. Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in eucaryotic bacteria. *Bio/Technology* 6: 428-430.
- Weinstock G. M., C. A. Hays, M. I. Bergman, R. Hainpar, D. Jackson, F. J. Silbany, J. Weisbaum, M. Zuehl, 1981. Open reading frame expression vectors: a general method for antigen production in *Escherichia coli* using protein fusion to β -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4432-4436.
- Wilson G., G. M. Studnicka, 1988. Expression of foreign proteins in microorganisms. *Biotecnol. Appl. Biochem* 10: 500-509.
- Williamson D. L., R. G. Harrison, 1994. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 9: 441-448.
- Williams J. G. K., A. A. Szalay, 1983. Stable integration of foreign DNA into the cytomembrane of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene* 24: 37-51.
- Yong R. S. Y., R. A. Wirtz, R. E. W. Hancock, 1995. *Parasitomonas auricularis* outer membrane protein OprM as an expression vector for foreign epitopes: the effects of positioning and length on the antigenicity of the epitope. *Gene* 158: 55-60.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Аллами способны можно найти на экспрессию генов, кодирующих и прокариотических организмах?
2. Что такое тем вектор и как его используют?
3. Почему плазмидный вектор с максимальной стабильностью не всегда является наилучшим экспрессирующим вектором?
4. Что такое лос промотор и как осуществляется его регуляция?
5. Промотор ρ факта λ , способный инфицировать только *E. coli*, тем не менее иногда используются как составную часть экспрессирующего векторы с тиреком кругом клетки. Как «приспособить» ρ -промотор для иного типа транскрипции и других организмов?
6. Почему структура сигнала белка иногда исключает получение чистых белков и системы измерения продукта. В чем преимущество таких сигналов? Как создают измерительные белки?
7. Что такое белки включения и как их делают на фабриках?
8. В чем преимущество локализации ядерных белков на поверхности клеток? Какие стратегии используются для того, чтобы сделать белки секреторными?
9. Как встроить в одну плазмиду несколько копий генов?

10. Как решить проблему обеспечения кислородом клетки *E. coli*, синтезирующей в большом количестве «удерживающий белок»?
11. Последовательность «миджет» может быть встроена в хромосому ДНК двумя способами: 1) сама по себе; 2) в составе плазмиды, которая несет эту последовательность. Как происходят каждое из этих событий? Какие преимущества или недостатки имеет каждая из плазмидных векторов в отношении ДНК?
12. Что такое метаболические перегрузки и их возможные причины?
13. Предложите несколько способов снижения метаболической перегрузки *E. coli*, синтезирующих в большом количестве рекомбинантный белок.

Получение рекомбинантных белков с помощью эукариотических систем

Для получения гетерологичных рекомбинантных белков с использованием эукариотической модельной ДНК (мДНК) обычно используются эукариотические системы экспрессии. Однако в некоторых случаях эукариотические белки, синтезируемые в бактериях, оказываются нестабильными или биологически неактивными. Кроме того, как бы тщательно ни проводилась очистка, конечным продуктом может быть загрязнен токсичными веществами или веществами, вызывающими повышение температуры у человека и животных (пироксимами). Чтобы решить эти проблемы, для получения рекомбинантных белков, предназначенных для использования в медицине, были разработаны эукариотические системы экспрессии. Такие белки должны быть идентичны природным по своим биохимическим, физическим и функциональным свойствам. Неспособность эукариот синтезировать эукариотические варианты белков обусловлена в основном отсутствием у них адекватных механизмов экспонирования специфических посттрансляционных модификаций.

Белки в клетках эукариот претерпевают следующие посттрансляционные изменения:

- Образование дисульфидных связей. Это решение катализирует фермент пирисульфидоксидоредуктаза. Неправильно уложенный белок оказывается нестабильным и неактивным.
- Протеолитическое расщепление предшественника, удаление определенной участка полипептидной цепи с образованием функционально активного белка.
- Гликозилирование: основная модификация, благодаря которой белки приобретают ста-

бильности, и в некоторых случаях особые свойства. Наиболее распространенная реакция гликозилирования это присоединение специфического сахарного остатка либо к серину или треонину (О-гликозилирование), либо к аспарагину (N-гликозилирование).

- Модификация аминокислот в составе белка: фосфорилирование, ацетилирование, гидрирование, гидроксилирование, сульфатирование, миристилирование и палмитоилирование.

Из всех этих модификаций эукариотические эукариотические клетки наименее всего способны осуществлять правильное гликозилирование и модификацию специфических аминокислот в гетерологичном белке. Однако ни одна эукариотическая система не может осуществить одновременно все посттрансляционные изменения в каждом потенциальном гетерологичном белке. Таким образом, для получения белка с полным набором специфических модификаций необходимо провести тестирование различных эукариотических систем экспрессии и выбрать такую, которая воспроизведет бы биологически значительный продукт.

Эукариотические экспрессирующие векторы имеют такую же структуру, что и их прокариотические аналоги (рис. 7.1), и должны содержать:

- эукариотический селективный маркер
- эукариотический промотор
- соответствующие эукариотические сайты терминации транскрипции и трансляции
- сайт полноразмерного иРНК.

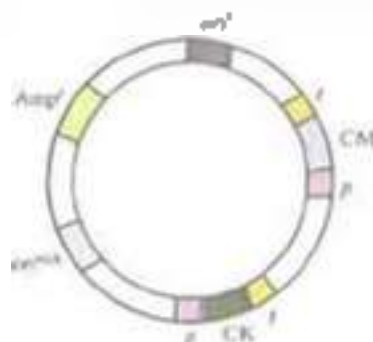


Рис. 7.1 Схематичная структура эукариотического экспрессирующего вектора. Генетические элементы эукариотического трансформации с (оригиналом) (ori), сайт для амплификации (СК) и сайт для терминации и полиаденилирования (P), эукариотический селективный маркер (CMV), сайт для инициации трансляции, флуориметрический сайт для эукариот (eGFP), сайт для инициации репликации, флуориметрический сайт (eGFP), селективный маркер *P^{neo}* (Amp^r).

Если вектор представляет собой плазмиду, реплицирующуюся независимо от хромосомы, то он должен содержать сайт инициации репликации, функционирования в конкретной клетке. Если же вектор предназначен для встраивания в хромосому эукариотической ДНК, то для обеспечения рекомбинации он должен нести последовательность, комплементарную определенному участку хромосомной ДНК хозяина (хромосомный сайт интеграции). Поскольку технически многие операции с рекомбинантными ДНК сложнее проводить в клетках эукариот, чем прокариот, большинство эукариотических векторов сконструированы как чужеродные. Другими словами, эти векторы несут для себя сайт для инициации трансляции и для себя селективный маркерный ген, один из которых функционирует в *Escherichia coli*, а другие — в эукариотических хозяевах клеток. Также векторные системы экспрессии разрабатывают для дрожжей, насекомых и клеток млекопитающих.

Введение ДНК в бактериальные и дрожжевые клетки называется трансформацией. В микробиологии этот термин используется для описания наследственных изменений в результате внедрения (проникновения) чужеродной (чужеродной) ДНК. А применительно к животным клеткам трансформация обозначает изменение

характера их роста в культуре, обусловленное прерыванием нормальных клеток в раковые. Чтобы избежать путаницы и терминологии, для обозначения наследственных изменений в животных клетках после введения в них чужеродной ДНК был введен термин *трансфекция*.

Для трансформации дрожжей обычно используют три способа. В первом случае линейную ДНК добавляют к клеткам дрожжей, клеточные стенки которых удалены химически или энзиматически (протопласты) (1). В других случаях клетки перед добавлением нуклеотидной ДНК обрабатывают ацетатом лития (2) или пов-вергают электропорации (3). Трансфекцию культур животных клеток осуществляют инкубацией клеток с ДНК, ослабленной фосфором кальция или DEAE-декстраном (1), либо электропорацией в присутствии очищенной трансформирующей ДНК (2). Как уже упоминалось в гл. 4, электропорация осуществляется и непосредственно на клетки кортикальных и плазматических мембран клеток млекопитающих воздействием тока, вследствие чего в наружной мембране или клеточной стенке образуются временные поры, через которые в клетку может проникнуть ДНК. В некоторых эукариотических системах для доставки ДНК в репродуцируемые клетки используют вирусы.

Системы экспрессии *Saccharomyces cerevisiae*

Для экспрессии клонированных эукариотических генов интенсивно используют обычные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Тому есть несколько причин. Во-первых, это одноклеточный организм, генетика и физиология которого достаточно изучены и который можно выращивать как в небольших лабораторных масштабах, так и в промышленных биореакторах. Во-вторых, выделение и выферментация нескольких сильных причудливых штаммов дрожжей, в этих системах эволюция дрожжевых экспрессирующих векторов могут использоваться природные, так называемые 2 мкДНК-плазмиды В-третьих, в клетках *S. cerevisiae* осуществляется большое число посттрансляционных модификаций. В-четвертых, лишь очень незначительное количество дрожжевых белков секретируются в среду; галлам образуются, если стероидный белок секретируется

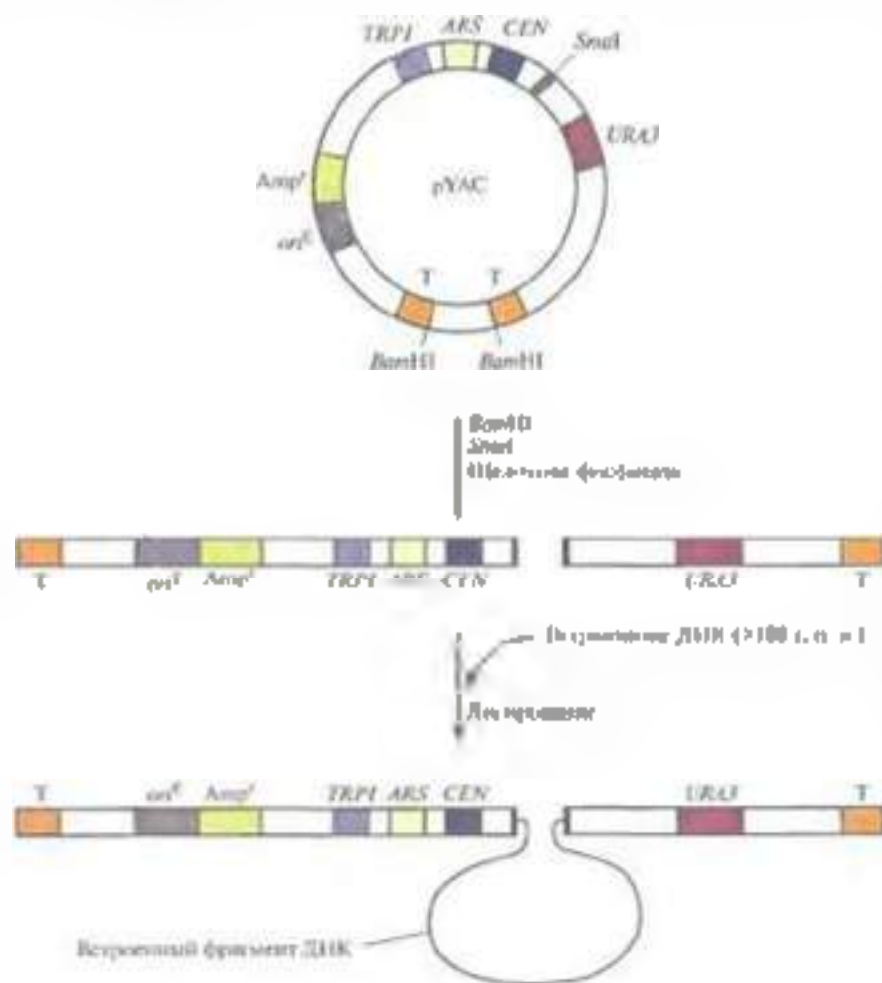


Рис. 7.3. YAC-система для клонирования. YAC-плазмиды (pYAC) содержат оригены (для маркерного гена *ori* (*Amp^r*); сайт интеграции репликации, функционирующий в *E. coli* (*ori^E*); сегменты дублированной ДНК, обеспечивающие участки *URA3*, *CEN*, *TRP1* и *ARS* (*CEN* – обеспечивает выделение (для центримерного функционирования), *ARS* обеспечивает автономную репликацию в клетках-хозяевах); сайт минимизации рекомбинации, *URA3* – один из сегментов биомаркера (триметилуридин) T – для селективной гибели дублированных хромосом. *Amp^r* – сайт селективной устойчивости к тетрациклину рYAC специфически обрабатывают *Smal*, *BamHI* и полученный фрагмент ДНК, а затем соединяют с фрагментом ДНК длиной 100 к.б.п. Конечная генетическая конструкция подвергают автономную ДНК и может стабильно поддерживать в дублированном состоянии *Leu⁺Trp⁺*

рутся в инфузильные эмбриональные клетки. Исследованиями группами исследователей были разработаны различные экспрессирующие дрожжевые векторы, но все они имеют сходные основные черты. Мы рассмотрим процесс экспрессии чужеродного гена в *S. cerevisiae* на примере синтеза фрагмента супероксида-дисмутазы человека.

Супероксид-анион – это побочный продукт утилизации кислорода аэробными организмами. У человека он участвует в стимуляции иммунного ответа фотоситов и привлечении лейкоцитов к месту инфекции. Ошибка при синтезе данного соединения и его проглатывание может вызывать повреждение клеток. У митохондриальной патологического патологического воздействия

техных веществ и принимает участие цитоплазматический фермент (Cu/Zn-супероксида-дисмутазы (Cu/Zn-SOD); он катализирует связывание супероксида-аниона с ионами водорода с образованием пероксида водорода, который в свою очередь служит субстратом для катализа или перекисью водорода. Супероксид-анион образуется также при повторной перфузии органа. кровообращения которого были прекращено перед хирургическим вмешательством. Чтобы избежать повреждения клеток супероксид-анионом, исследователи предложили перенос копировальной перфузии антител в орган. Cu/Zn-SOD может использоваться также для лечения пивной интоксикации жаболовской, как ацетальдегид, респираторный аритмический синдром и боли при Бехтерева. При этом в

обыч случаях лучше использовать белок, выделенный *Cu/Zn-SOD* человека, для того чтобы избежать любых нежелательных иммунных реакций, которые могут возникнуть при введении фермента от другого вида.

Первоначально кДНК *Cu/Zn-SOD* человека была клонирована в системе экспрессии *E. coli*. Но в этом случае от молекулы *Cu/Zn-SOD* только отщеплялся минимальный N-концевой пептид — так, как это происходит со всеми белками, синтезируемыми в *E. coli*. В следующие выходные (вплоть до ацилирования), как в клетках человека. Попробуем для получения функционального фермента кДНК *Cu/Zn-SOD* человека встроить в дрожжевой экспонированный вектор. Дрожжевые клетки не способны эффективно выжить в питрии, поэтому для контроля специфичных генов продуктов необходимо использовать соответствующие кДНК или эмбрионально синтезированные исследователями. Дрожжевой вектор с кДНК *Cu/Zn-SOD* человека (рис. 7.4) содержит: 1) дрожжевой ген биогенного азота (*LEU2*), 2) систему замыкания с сигналом инициации репликации ЭНК дрожжей, что обеспечивает репликацию плазмиды в дрожжевых клетках; 3) селективный маркер *E. coli*-ген устойчивости к ампициллину (*Amp^r*) и сайт инициации репликации, активный в *E. coli*, что позволяет осуществлять стандартные генетические манипуляции, необходимые для создания плазмиды, в клетках *E. coli*; 4) кДНК *Cu/Zn-SOD* человека, встроены между промотором дрожжевого гена (*GAPD*) и последовательностью сигнальной (*GAPD*) и последовательности транскрипции и полиадактирования мРНК (поли-А ген) (*GAPD*).

Этим вектором трансформировали штамм дрожжей, не способный к синтезу пептида (*LEU2*), и высевали их на среду без пептида. В этих условиях могут расти только клетки с функционированием *LEU2*-гена, находящегося в векторе. *GAPD* промотор не регулируется, транскрипция с него происходит непрерывно. Поэтому кДНК *Cu/Zn-SOD* человека транскрибируется в течение всего времени роста (кониституптивно). В этом эксперименте в дрожжевых клетках накапливается большое количество *Cu/Zn-SOD*, в частности, подобно активному

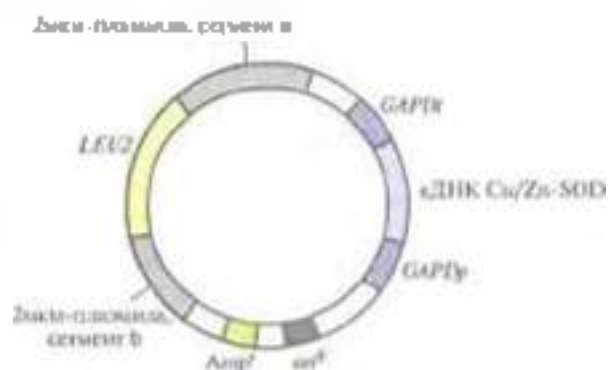


Рис. 7.4. Экспрессируемый вектор *S. cerevisiae* *Med* для человека (*GAPD*) и минимально терминирующей последовательности (*GAPD*) гена гликоцилтрансферазы *S. cerevisiae* встроены кДНК *Cu/Zn-SOD* человека. Ген *LEU2*, встроенный в определенную дрожжевую ДНК-плазмиду, кодирует генетический функционал азота. Ген устойчивости к ампициллину (*Amp^r*) и сайт инициации репликации *E. coli* (*ori*) переклонированы из плазмиды pBR322

белку из клеток человека, минимальный N-концевой пептид азота (был ацилирован).

4 структура эстрогеновых белков, синтезируемых *S. cerevisiae*

В дрожжевых клетках гликозилируются только секретруемые белки, поэтому для получения рекомбинантных белков, которые для пероральной активной формы должны подвергнуться N-гликозилированию, необходимо использовать системы секретины. Для того чтобы кДНК, которая кодирует интересующий исследователя белок, нужно разместить так называемый пре-про-α-фактор — ядерный (сигнальный) последовательность гена α-фактора дрожжевой плазмы. Синтезируемый рекомбинантный белок сможет в этом случае эффективно секретироваться дрожжами.

Во время транспорта белка в нем образуются дисульфидные связи, происходят протеолитические расщепления и другие посттрансляционные модификации, так что в конечном случае в среду попадает уже активный белок. Лизерный пептид обеспечивает правильное белка через липидную мембрану и секретину, при этом сам он отщепляется дрожжевой эндопептидазой, удалившей пептид *Lys-Arg*. По-

тому белки 1 и 2 и Ара даром не распадаются непосредственно перед ДНК, так чтобы после спlicingа сигнального пептида синтезировавшийся белок содержал на N-конце нужный аминокислотный остаток.

Именно для этого нужен экспрессируемый вектор с сигнальной последовательностью α -фактора, удалив которую можно получить модифицированный, биологически активный биоксидантин: он синтезируется и секретруется клеткой штаммом *S. cerevisiae*. Этот штамм был выделен из клеток бесспорночного штамма *Hansenula polymorpha*. Этот белок является важным питательным фактором и не вызывает нежелательных иммунологических реакций у человека. Его можно получать в жидкой форме в больших количествах, что упростило исследование его способности реагировать с узлами клеточной кришки и устранять другие проявления грибофагии. В соответствии с эмпирическими исследованиями [2-14] (см. также [4, 13]) из которых вытекало, что наиболее эффективные штаммы являются производными дрожжей перед испарением. Эти преимущества могут компенсировать высокую стоимость рекомбинантного грибулина, так что его применение в качестве средства защиты маловероятно.

Чтобы повысить эффективность секретной рекомбинантной белковой штаммом *S. cerevisiae*, были предприняты дальнейшие усовершенствования. Так, исключение выделений, специализирует на выделении только рекомбинантного белка суперэкспрессии такого природного фермента системы секреции, как дисульфидизомераза, которая обеспечивает правильную укладку белковой молекулы в процессе секреции. Для этого в штамме *S. cerevisiae* встроили ген дрожжевого дисульфидизомеразы, находящийся под контролем конститутивного промотора гинкратиле-индификалестирокенала и сигналы терминирующей транскрипции. Уровень синтеза дисульфидизомеразы модифицированным штаммом был в 10 раз выше по сравнению со штаммом дикого типа. Далее в штамме - суперпродукте дисульфидизомеразы ввели трансформированный экспрессирующий вектор, несущий ген фактора роста трансформации В человека. Количество секретированного этим штаммом трансформированного фактора

роста В человека превратилось в 10 раз количество фактора, секретировавшегося штаммом с нормальным уровнем синтеза дисульфидизомеразы. Суперпродукция дисульфидизомеразы повышает секретную белковую толщину с дисульфидными связями. Именно наличие других белков дрожжевой системы секреции может ограничить количество секретированного рекомбинантного белка с другими требованиями к укладке белковой молекулы.

Другие дрожжевые системы экспрессии

С помощью систем экспрессии *S. cerevisiae* удалось получить много разных рекомбинантных белков. К сожалению, в большинстве случаев уровень их экспрессии был довольно низким. Кроме того, обнаружилось и другие проблемы:

- При увеличении масштаба системы часто происходит интоксикация дрожжей, даже если не используются индуцируемые промитоты.
- Гетерогенный белок зачастую оказывается гетерогенным по структуре и содержит более 100 остатков аминокислот в каждой боковой цепи сахаридной цепи, в то время как в природе эти белки не содержатся только от 8 до 13 на остаток. Наличие лишней аминокислотной цепи может влиять биологически активностью продукта или его иммуногенностью.
- Во многих сверхэкспрессорах белки, которые должны были секретироваться, не только не концентрировались в периплазматическом пространстве, что еще более осложняло их очистку.

Все это является предметом научных исследований, которые направлены на получение гетерологичных белков с помощью других типов дрожжей и с помощью новых технологических систем. В частности, изучаются соответствующие векторы - системы экспрессии, стабилизирующие модифицированные регуляторные последовательности транскрипции и трансляции, возможность трансформации для клеток и получения высокопродуктивных белков и возможность культивирования трансформированных клеток. В качестве альтернативы *S. cerevisiae* можно использовать *Aspergillus nidulans*, дрожжи, которые применяются для промышленного производства лекарств

(β-галактозидазы); *Schizosaccharomyces pombe* дрожжи, размножающиеся делением, и не почкующиеся, *Yarrowia lipolytica*, которые используются как субстрат; *Rhizopus oryzae* и *Neurospora crassa*, которые могут использоваться метанол как единственный источник углерода и азота.

Схема построения плазмидно-вирусной системы в

Метанофильные дрожжи *P. roseolaris* можно использовать в качестве биореактора. Из небольшого количества культуры можно получить большое количество клеток, что позволяет использовать для увеличения выхода лизатами препараты гиперосмотических белков. Такой подход можно сделать, рассмотрев в качестве примера получение поверхностной пептиды вируса гепатита В (НВсАg) с помощью специально разработанных системы с использованием интегрирующей вектора. Сначала ген *HBsAg* встроили между промотором (гена аденовирусной I (*AOX1p*) и сигналы ускорения транскрипции (*AOX1p*) того же гена (рис. 7.5). Регуляция активности гена *AOX1* *P. roseolaris* осуществляется с помощью метанола. В

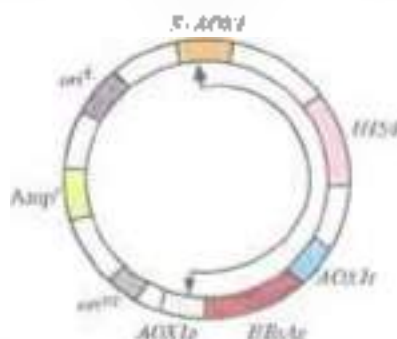


рис. 7.5. Интегрирующийся экспрессирующий вектор для *P. roseolaris*. Между промотором (*AOX1p*) и сигналом терминации транскрипции (*AOX1p*) гена аденовирусной I *P. roseolaris* встроили ген *HBsAg* гена, кодирующий один из фрагментов оболочки вирус гепатита В, генетически связанной с геном *AOX1*. Вектор содержит сайт ампициллиновой резистентности *P. roseolaris* (*Amp^R*), ген устойчивости к ампициллину (*Amp^R*) и сайт терминации репликации, включенный в *ori* (*ori⁺*). I-*AOX1* — это фрагмент 3' конца гена аденовирусной I *P. roseolaris* (предложен указанным сегмент, который интегрируется в геном *P.*

еги присутствует на дрожжевых клетках (таким образом прилагается до 30% всех белков клетки), и в отсутствие метанола в клетках аденовирус не синтезируется вообще.

Вектор (рис. 7.5), специально сконструированный для этих исследований, содержит следующие элементы: 1) сайт *AOX1p-HBsAg-AOX1p*; 2) сайт терминации репликации, функционирующий так же, как в *P. roseolaris*; 3) фрагмент ДНК, кодирующий сайт терминации репликации плазмиды pBK322 и селективный маркер *Leu⁺* гена; 4) фрагмент 3'-*AOX1*, соответствующий интерпронии кодирующей ДНК в определительном сайте транскрипции; 5) активный ген (аденовирусная I (*HIS4*), кодирующий фермент, который участвует в синтезе аминокислоты гистидина. Наличие в этой конструкции последовательностей pBK322 позволяет использовать для работы с геном *P. roseolaris*, что облегчает колонирование и при необходимости позволяет получать большие количества векторной ДНК.

Чтобы предотвратить утрату плазмиды, была предусмотрена интеграция участка *AOX1p-HBsAg-AOX1p* в геном *P. roseolaris*. Для этого в геном *P. roseolaris* *HIS4* с дефектным геном гистидина встроили трансформировали фрагмент вектора, кодирующим элементы *AOX1p-HBsAg-AOX1p*, *HIS4* и 3'-*AOX1* (рис. 7.5). В результате двойного кроссинговера между *AOX1p* и 3'-*AOX1* встроили ДНК, с одной стороны, и амплитетарными последовательностями хромосомной ДНК, с другой, кроссингом интеграции последовательностей *AOX1p-HBsAg-AOX1p* и *HIS4* в геном, стимулировался упрямый хромосомный ген *AOX1* (рис. 7.6). Клетки, в геном которых включился ген *HIS4*, растут на среде без гистидина; этот признак может использоваться для их отбора. Вторым критерием отбора служит замедление роста клеток в присутствии метанола, поскольку также потерян ген *AOX1* после двойного кроссинговера вставным остается только один, менее эффективный ген *AOX2*.

Клон с интегрированным фрагментом *AOX1p-HBsAg-AOX1p* при росте в присутствии метанола, который вытормозит *AOX1* промотор, синтезировать в больших количествах вирусный белок *HBsAg*, накапливающийся в цитоплазме. Белком протухи обрабатывал такой

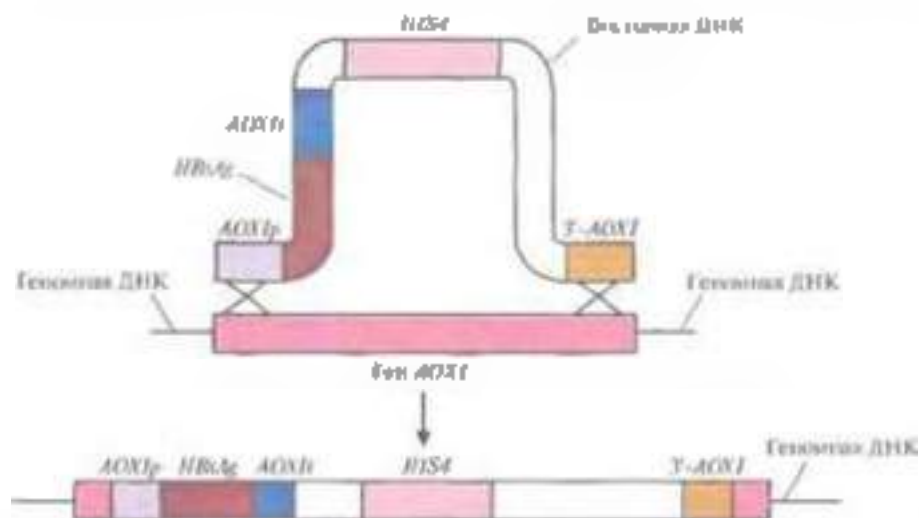


Рис. 7.6. Интеграция части экспрессирующего вектора в ген *альфа-амилазы* на 1 *P. dohrnii*. В результате двойной кросс-интеграции между геном *AOX1* и участками *AOX1r* и *3-AOX1* (серая часть рисунка) образовались две генерации вектора в геномную ДНК и участка *альфа-амилазы* гена *HIS4* (розовая часть рисунка) в геномной ДНК. Поскольку ген *HIS4* дает возможность клеткам расти на среде без аминокислот. В присутствии метанола *AOX1r* индуцирует транскрипцию гена *NBVAc*, а *AOX1* обеспечивает терминирование транскрипции и трансляцию фермента.

же мультидисциплинарным комплекс, как и соотвествующий белок в клетках человека, инфицированных вирусом гепатита В, и связывался с нуклеокапсином яичного вируса. При вирусной инфекции печени крысы в 240-литровой ферментере незначительного количества синтезируемого белка хватило бы примерно на 10¹⁰ животных. При этой генетической конструкции оставалась неизменной в течение 200 часов культивирования в присутствии метанола.

Синтез бычьего лактогена С2

Способность *P. dohrnii* секретировать гетерологичный белок исследовали в системе с использованием λ ДНК бычьего лактогена С2, кодирующей полипептидный белок и его собственный вирусный депозит. Бычий лактоген — это водорастворимый фермент, разрушающий клеточные стенки бактерий; он устойчив к протеазам и сохраняет активность в узком диапазоне рН, что позволяет использовать его в качестве добавки к кормам животных для улучшения пищеварения.

Вектор, созданный для этой исследования, был клонирован вектору *AOX1r-NBVAc-AOX1*,

описанному выше, за исключением того, что вместо мультиплицирующей способности *NBVAc* в него была встроена λ ДНК индуктора. Все как обычно было интегрировано в дефектную копию гена *HIS4* штамма *P. dohrnii*. Результате интеграции ген бычьего лактогена оказался фланкирован одним активным (*HIS4*) и одним дефектным (*HIS4'*) геном стрептомидазотетрациклиновой (рис. 7.7). Преимущественно бычий лактоген продуцировался в *P. dohrnii* и секретировался в среду; при этом увеличивалась активность секретированного белка была такой же, как у нативного фермента. При ферментации 10 л культуры в течение 200 ч в непрерывном режиме при высокой плотности клеток синтезировалось примерно 20 г лактогена.

Аутентичные гетерологичные белки были получены и с помощью других прожариваемых систем. Например, λ ДНК α - и β -цепей гемоглобина А человека были встроены между промотором (*AOX1r*) и сигналами терминирования транскрипции (*AOX1*) гена метаноловоситиля *Hansenula polymorpha* и помещены друг за другом в экспрессирующий вектор. Через 40 генераций был взят экстракт со случайно интегриро-

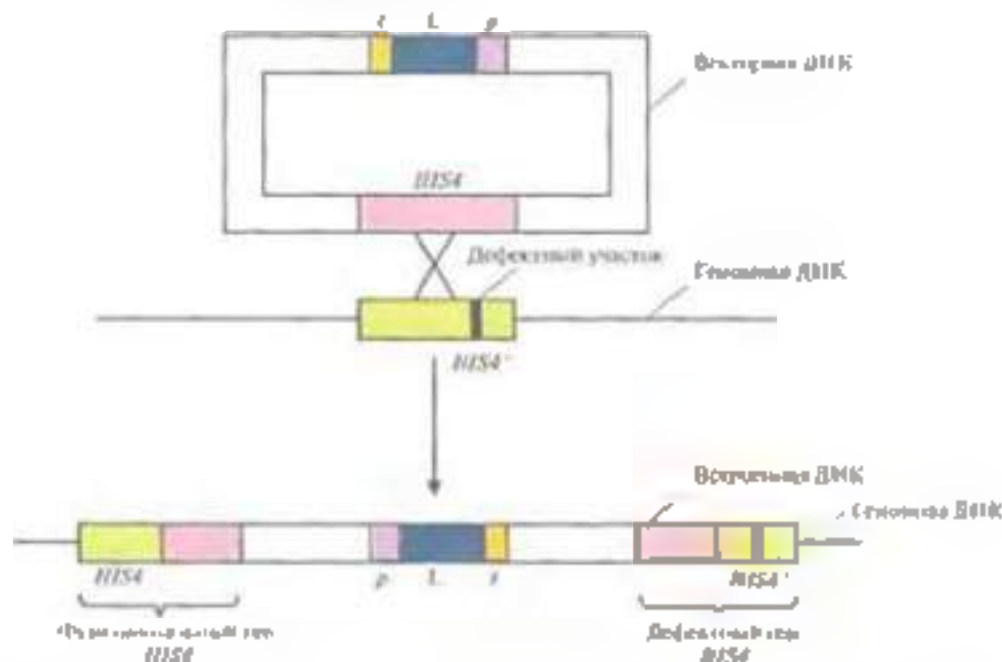


Рис. 3.7. Взаимная компрессированность (автоиммунно вектори и дефектный участок гена *HIS4*). Р играет в результате кроссинговера между плазмидными генами *HIS4* и геном *HIS4+* клетки-хозяина процесс инверсии в геномной цепи тРНК-гена, который кодируется функциональными функциональными и дефектным геном *HIS4*. ρ , L и S – промотор *AOX1*, кДНК белково-кодирующая С2 и сайты терминации транскрипции плазмиды марширования синтетически. Черная линия – дефектный участок в *HIS4* гене

мощным участком некодирующей вектори и показано, что в нем присутствует функциональный гемоглобин А с правильной тетрамерной структурой: две α - и две β -цепи ($\alpha_2\beta_2$). Кроме того, с использованием экспрессирующей вектори для *X. laevis*, существующий селективный маркерный ген и клонированный ген человека, оба под контролем индукторов млекопитающих, были получены большие количества рекомбинантных белков, кодируемых рибосомными генами человека.

Дальнейшие системы экспрессии стали играть важную роль в получении гетерологичных белков для клонирования, промышленного и медицинского целей. Однако, как показала инселективная, ни одна из них не может гарантировать получение репродуктивного белка любого гена. По этой и ряду других причин были разработаны системы экспрессии генов с использованием клеток насекомых и млекопитающих.

Системы экспрессии с использованием культур клеток насекомых

Вакцины инфицируют только беспозвоночных, в том числе насекомых. В ходе инфекционного процесса образуются две формы. Одна представляет отделимые вирионы, которые высвобождаются из инфицированной клетки хозяина, как правило эпител средней кишки, и способны инфицировать другие клетки этого органа. Вторая состоит из множества вирионов, заключенных в белковую матрицу. Белок этой матрицы называется полипротеин, а сама структура – интикарин. Этот полипротеин синтезируется через 36-48 ч после инфекции и продолжается 4-5 сут, пока живые клетки не инфицируют и колонизируют организм не погибнет. После этого количество таких частиц высвобождается и попадает в среду, где от инвазии их защищает белковый

матрицы. Если воспринятый матрицей сигнал приравнивает такую частоту, то полимеризация сополимера прерывается и высвобождаются ирионы, способные инфицировать новый инфекционный объект.

Промотор гена полимерина чрезвычайно силен, а лишь в равнинных вирусах не живит изнутри самого тела. Следовательно, вместе с последним (геном чужеродного) белка с последующей инкубацией полученным рекомбинантным бациловирусом культуры клеток насекомого может привести к синтезу большого количества гетероциклических белков, который благодаря системе выведения сверхтранскрипционных матриц (или у насекомых и млекопитающих будет близок (а возможно, и идентичен) к пятнистой форме того белка, который интересует исследователя. Неодна из этого на основе бациловируса белки из семейства нейтрина для млекопитающих генов, кодирующих белки млекопитающих и вирусов животного

Наиболее широко используется вирус млекопитающих ядерного полиомиелита *Autographa californica* (AcMNPV). Этот бациловирус инфицирует бабочку *B. mori* (или других насекомых), а также хорошо растет в культуре многих клеточных линий. Линии клеток, обычно используемые для работы с рекомбинантным AcMNPV, получают в процессе *Xenopus laevis* oocytes. Промотор полимерина в этих клетках чрезвычайно активен, и при их заражении бациловирусом легко типично вырабатывает большие количества белка.

Система экспрессии генов вектора на основе бациловируса

Первым шагом в конструировании рекомбинантного бациловируса AcMNPV состоит в создании трансгенного вектора. Трансгенный вектор — это прототипическая плазмида *E. coli*, содержащая фрагмент ДНК AcMNPV (рис. 7.8), который включает: 1) промотивную область и функциональную черту (или последовательность) ДНК AcMNPV, необходимую для компетентной рекомбинации с AcMNPV; 2) сайт для клонирования; 3) сайт терминирования полидезаминирования генов полимерина и присоединяющую к нему последовательность ДНК AcMNPV — антипромотивную область, обеспечивающую гомологичную рекомбинацию с AcMNPV (рис. 7.8). Клонированная наклонность гена полимерина

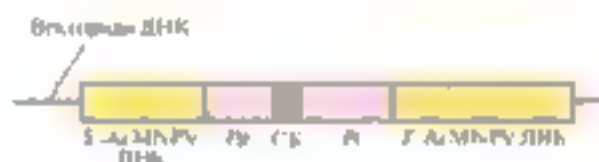


Рис. 7.8 4-компонентные предшественники генов на основе трансгенного вектора на основе бациловируса (AcMNPV). Ген белка-матрицы встраивается в сайт клонирования (СК) между промотивной областью (P) и сайтом терминирования (T) транскрипции (P). Пере- (примитивизм) и пост- (сайт терминирования) транскрипция направляет фрагменты ДНК AcMNPV (5' AcMNPV ДНК и 3' AcMNPV ДНК соответственно), обеспечивающие инициацию синтеза гетероциклического белка AcMNPV (ссылка) и последующую рекомбинацию с ДНК AcMNPV (ссылка) и последующую

значительного фрагмента удалена. Интересующий исследователя ген встраивается между промотивом и сайтом терминирования генов полимерина и может клонироваться в *E. coli*.

Культуры клеток насекомых, трансфицирующую ДНК AcMNPV, трансформируют тем трансгенным вектором, содержащим клонированный ген. В некоторых случаях трансфицированные клетки трансформируют двойной кристалл сахара, в результате которого клонированный ген вместе с промотивом и сайтом терминирования транскрипции генов полимерина встраивается в ДНК AcMNPV (рис. 7.9) образуя ген полиомиелита. Ирионы, не содержащие этого гена, образуют тем клеточного полиомиелита, из которых можно выделить рекомбинантный бациловирус.

Нагруженная и специфичная антигенная — утомительная и субъективная процедура. Вместо нее для упрощения рекомбинантного бациловируса можно использовать ДНК-матрицу (или матрицу) или матрицу (или матрицу) (МТР). Кроме того, если под контролем промотива бациловируса, в частности в равнинных и для получения стабильной антигенной формы, поместить ген *lacZ* / *l. coli*, кодирующий β-галактозидазу, и такую конструкцию встроить во фрагмент ДНК, встраивающийся в геном AcMNPV, то в присутствии соответствующего субстрата β-галактозидазы можно с рекомбинантным вирусом окрашивать в синий цвет.

Гетероциклический белок, синтезируемый в культуре клеток насекомых — хироин, ядовитый

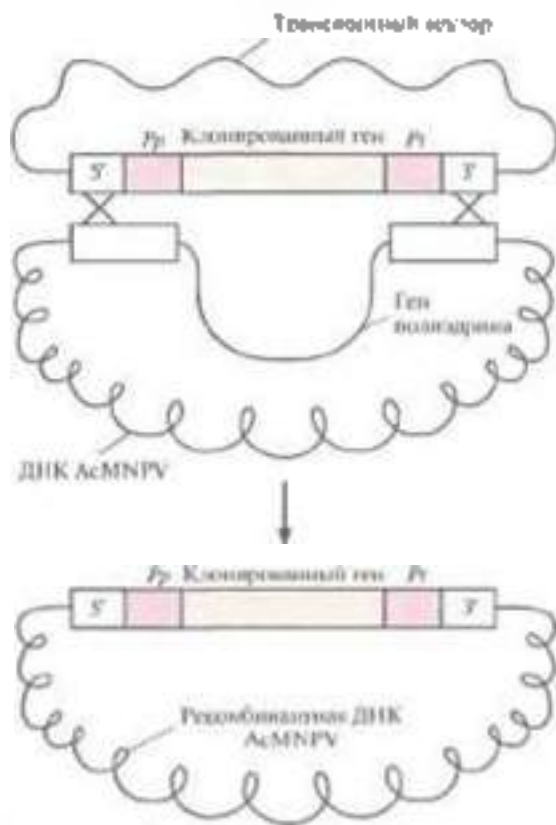


Рис. 1.9. Замена гена полимеразы AcMNPV единичной экспрессией транскрипционной единицы в результате не направленного кроссинг-овера в 5' и 3' участках

рекомбинантным бациловирусом, можно выделить, через 4–5 сут. С помощью системы экспрессии генов на основе бациловируса уже получено более 500 различных

гетерологичных белков, при этом более 95% из них имеют правильные пространственные конформации (рис. 7.10).

Получение рекомбинантных бациловирусов

Исходная методика получения рекомбинантных бациловирусов в дальнейшем была изменена по ряду причин. Во-первых, применение промотора гена полимеразы имеет ограничения: белки, синтезирующиеся на поздней стадии литического цикла, часто оказываются модифицированными не до конца. Для решения этой проблемы промотор гена полимеразы заменили одним из сильных промоторов AcMNPV, активно функционирующим с самого начала и до конца литического цикла. Во-вторых, дивергенция генов AcMNPV перед трансфекцией клеток инсектималя увеличивает долю живых личинок с рекомбинантными вирусами. Расщепление генов AcMNPV в одном сайте уменьшает число зон с нерекомбинантными вирусами, потому что дивергентные гены бациловирусов обладают ограниченной инфицирующей способностью. В результате двойного кроссинг-овера между дивергентной ДНК AcMNPV и кольцевым трансформантным вектором образуется замкнутая кольцевая молекула, которая обладает инфицирующей способностью. Чтобы обеспечить стабильную дивергенцию в каждом эксперименте, в геном AcMNPV ввели ряд векс полимеразы нестроити уникальных сайтов для рестриктазы *Bam*361. В результате доля зон личинок с рекомбинантными бациловирусами увеличилась с <1% (если использовались нерасщепленные кольцевые молекулы AcMNPV) до примерно 30%.

<p>α-Интерферон Антибиотикоподобные Антиген вируса сыпирной лихорадки Противостолбчатая антитоксин β-Интерферон Белый родопсин Антиген вируса свинной чумы Регулятор проницаемости мембраны млекопитающих в эпителии кишечника Антиген вируса бешеной лихорадки</p>	<p>Ферменты С-белок членистоногих респираторов Белок оболочки (НВ-1) Гемоглобин HSV Иммунные факторы человека ДНК-полимераза и митохондриальная ДНК-полимераза человека Гемоглобин человека Интерферон 2 Белок вируса Лейша</p>	<p>Белки вируса Множественные полипептиды оболочки белок – переносчик лекарственного вещества Белок оболочки вируса 1 конспиративный вирус герпеса человека 1 конспиративный вирус бешеной лихорадки Антиген герпеса человека человека Антиген оболочки респиратора человека Антиген оболочки человека</p>
---	---	--

Рис. 7.10. Исходные рекомбинантные белки, синтезируемые в системе экспрессии генов на основе бациловируса HSV-1 вируса иммунодефицита человека 1 типа, HSV – вирус простого герпеса

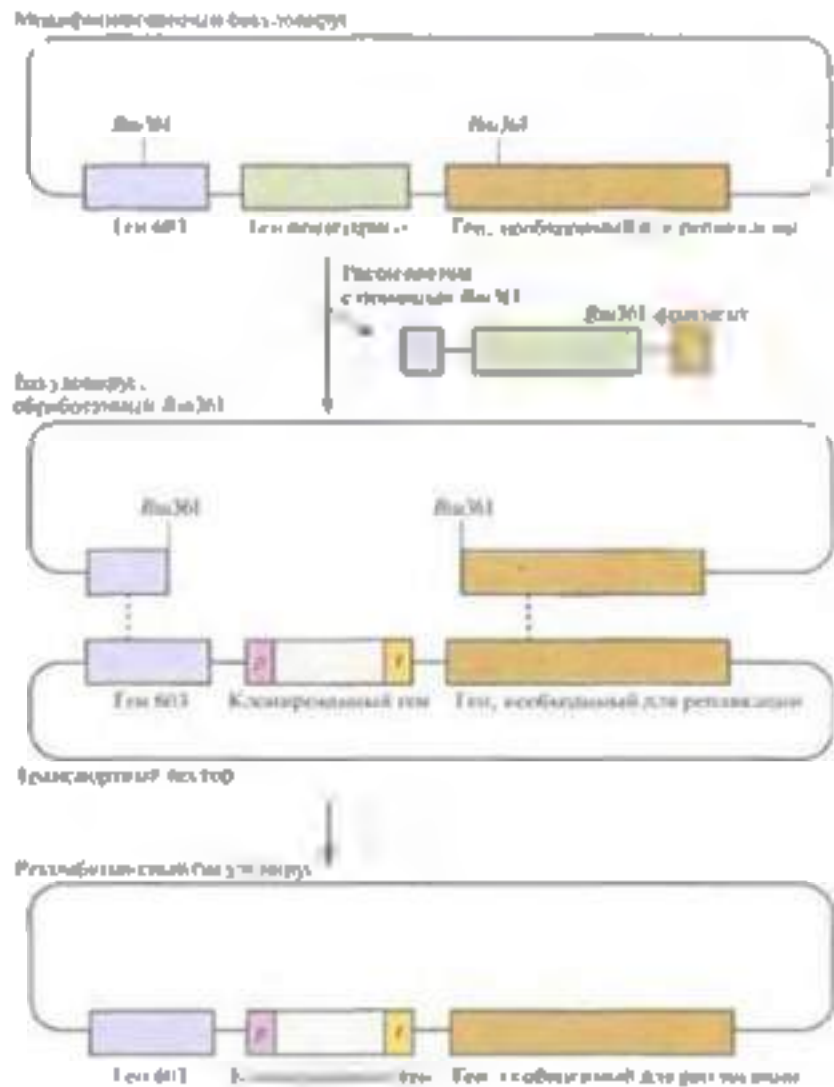


Рис. 7.11. Получение рекомбинантных бакуловирусов с геном *AcMNPV*, в котором в ген *f0* и ген *ORF162*, необходимый для репликации бакуловируса в клетках насекомых, встроены по одному *Bm161* сайт. Эти сайты кодируют ген полиедрина *AcMNPV*. Индуцируют рекомбинантный бакуловирус с *Bm161*, в результате чего выделяется фрагмент, необходимый между *Bm161*-сайтами. Трансформируют клетку насекомого, вирусом бакуловирус, который был обработан *Bm161*, трансформным вектором с клоноированным геном, фламинированным промотором (*p*) в другом терминирующем транскрипции (и ген полиедрина, а также с полноростерным геном *f0*) и геном, необходимым для репликации. В результате формируются вирусные частицы (структурные единицы) вируса рекомбинантного бакуловируса с функционирующей геном, необходимым для репликации. Выпуск рекомбинантных бакуловирусов в чужой организм (насекомое) *ФФ*.

клетки *E. coli* как плазмиды и ответственная за образование и трансформированный участок носителя бакуловирусов. Челюточные векторы (в основе бакуловирусов для *E. coli*) клеток насекомых являются базисными.

Система на основе базиса включает создание плазмиды *E. coli*, который между промотором и сайтом терминирующей ген-мишень (плазмид-донор). И донорный плазмид или устойчивость к тетрациклину и другой экспрессии ген-мишень функциональными нужными последовательностями, которые

совместимы с сайтом индукции и базисом, в ген устойчивости к тетрациклину (таблица 7.12, б). Реконструкция между соответствующими сайтами в донорной плазмиде и базисе может происходить только в присутствии модифицированных белков (белков трансформации), которые в другой клетке кодируются (вырабатываются) *E. coli* (плазмид-индукцией), несущей ген и ген устойчивости к тетрациклину (рис. 7.12, б).

Бактериальные клетки, несущие базис, трансформируют одновременно плазмид-до-

тепличной (X-Gal) Tc^r на пит. которые устойчивы к клиндамицину и чувствительны к клиндамицину и тетрациклину, несут только рекомбинантный бакциду, или донорную (сызидицу и плазмиду) ичоничициду. В наличии остатка клонированного гена после всех этих манипуляций можно убедиться при помощи ПЦР. Далее рекомбинантным бакцидом можно трансформировать клетку насекомого, в которой происходит транскрипция клонированного гена и синтез рекомбинантного белка.

Для создания экспрессирующей векторы на основе бакцилофруса используются и другие подходы. Один из них предполагает проведение жет «синтезгенерация» манипуляций с геном AcMNPV в дрожжевых клетках с целью введения в последующем в клетку насекомого. В другом «кодированная конструкция «клонированный ген-генот AcMNPV» включается систему рекомбинации in vitro, основанную на реверсии «встраивания ДНК бакцилофруса F1, включая такую конструкцию (напрямую) трансформации клетка насекомого».

Выделение рекомбинантного белка из клеток насекомых с помощью аффинного связывания

Для выделения специфически синтезированных белков из клеточных экстрактов и их смесей секретируемых белков можно использовать разные подходы. Один из них основывается на приращении к клонированному гену – без нарушения рамки считывания – сегмента ДНК, кодирующего короткую аминокислотную последовательность, которая специфически связывается с каким-либо химическим элементом, соединением или макромолекулой. Такую конструкцию «встраивают» в экспрессирующий вектор между промотором и сайтом терминирования транскрипции. Короткая аминокислотная последовательность в составе рекомбинантного белка, синтезируемого в хозяйской клетке, имеет роль аффинной метки. В одном случае перед клонированным геном был встроено – без нарушения рамки считывания – сегмент ДНК, кодирующий шесть остатков гистидина (His₆), специфичный участок кодирования семь аминокислот, и сайт

расщепления протеиназы из группы аминокислот; полученный рекомбинантный белок выделяли триацетатфенол на колонке с ионообменной смолой. Последующий этап – очистка остатков гистидина (гексаметилами) с помощью ионообменной смолы. Рекомбинантный белок выделяли в колонке His (ионитом) добавленным конкурентным соединением (например, имидолатом), который вытеснял гексаметилами рекомбинантного белка из комплекса с ионообменной смолой, ионитом. Буферы для аффинной очистки отщепляли с помощью протосапатического фермента (трипсины) и очищали рекомбинантный белок от нее и от протеиназы триацетатфенолом. Если рекомбинантный белок не предназначается для использования в мембранных целях, можно не отщеплять гексаметиламинную последовательность, поскольку обычно она не влияет на структуру и функцию белка.

Было разработано несколько вариантов метки. Среди них «глютаминилтрансфераза, белок, специфичный мальтозу, и короткая аминокислотная последовательность – аминокислоты аспарагин, которые связываются специфически с глютамоном, мальтозой и специфически взаимодействуют с рибозой. Используются и другие сайты расщепления, специфичные для трипсины, трипсинолиз и других протеиназ. Аффинная метка и сайт расщепления могут называться как на N- так и на C-конце рекомбинантного белка и использоваться в прокаротиотических системах экспрессии, а также в системах экспрессии на основе клеток насекомых, млекопитающих или грибов.

Экспрессирующие векторы для работы с клетками млекопитающих

Внехромосомные экспрессирующие векторы млекопитающим используются для изучения функций и регуляции генов млекопитающих. Кроме того, с их помощью могут быть получены аутогенные рекомбинантные белки, которые потенциально могут использоваться в терапевтических целях для лечения некоторых заболеваний человека. Уже сконструированные экспрессирующие векторы млекопитающим весьма многочисленны, но все они обладают следующими особенностями: (1) наличием эукариотических экспрессирующих векторов.

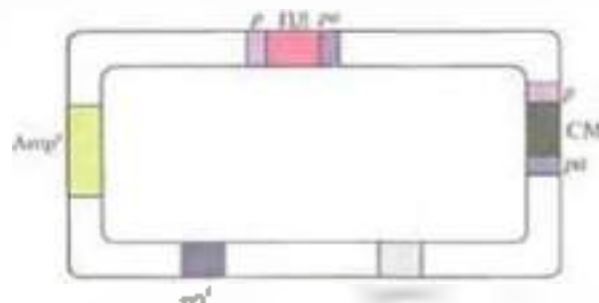


Рис. 7.13. Схематическая схема экспрессирующего вектора млекопитающих. Пул инкибер (ПН) и селективный маркер (СМ) кодируется под контролем эукариотического промотора (P) и сигнала полипептида инициации (сигн. P инициации вектора в $E. coli$) в клетках млекопитающих. Собирается с помощью инициации репликации ori^1 и ori^2 соответственно. Для отбора трансфицированных клеток $E. coli$ используется тем устойчивости к ампициллину (Amp^r)

Вектор, представленный на рис. 7.13, содержит эукариотический сайт инициации репликации вируса дикотилы (например, обертывающего вируса 40 [SV40]). Промоторы клонированного и селективного маркерного генов, а также ик-сигналы терминатора транскрипции (сигналы полиаденилирования) должны происходить из клеток эукариот; обычно используют регуляторные последовательности ДНК вирусов дикотилы (например, пикомоголовируса человека, SV40 или HSV) или генов млекопитающих (например, гены β гистона, металопротеиназа, тимицидиназы или бычьего тормоза роста). При этом более предпочтительны сильные промоторы и эффективные сигналы полиаденилирования. Последовательности, необходимые для отбора и амплификации экспрессирующего вектора млекопитающих в $E. coli$, приспосабливают стандартно клонирующего вектора $E. coli$ (на пример, плазмиды pUC3??)

Селективные маркерные гены

Для отбора трансфицированных клеток млекопитающих часто используют бычьего головного гена Neo^r , кодирующей неомycinфосфотрансферазу в neo^r системе применяется токсичное соединение генетинин (G 418), блокирующее транскрипцию в трансфицированных клетках млекопитающих. При этом в трансфицирован-

ных клетках G 418 фосфорилируется неомycinфосфотрансферазой и инактивируется. Следовательно, выживают и пролиферируют только клетки, синтезирующие продукт гена Neo^r .

Другая система отбора трансфицированных клеток млекопитающих основана на неомycinопорной гена, кодирующей фермент дигидрофолат релуктазу (DHFR). В этой системе используют клетки с дефектным геном DHFR, т.е. клетки, в которых функциональный DHFR не синтезируется. После трансфекции DHFR-клеток экспрессирующим вектором млекопитающих с функциональным DHFR-геном в среде дигидрофолат метотрексат. Не трансфицированные клетки не растут в его присутствии, а клетки, синтезирующие дигидрофолатредуктазу, выживают. После предварительного отбора клеток с DHFR-геном концентрацию метотрексата в среде увеличивают и отбирают клетки с большим числом копий вектора, синтезирующие в большом количестве рекомбинантный белок.

Разработаны и другие схемы отбора с дополнительными маркерами, например с использованием фермента глутаминсинтетазы (GS), обеспечивающей устойчивость к цитотоксическому действию метионинсульфоксида. В этой системе применяют вектор, несущий GS-ген. Его вводят в культуру клеток млекопитающих и для отбора клеток, несущих большое количество копий вектора, используют концентрацию метионинсульфоксида в среде. При этом в культурных клетках тоже должна присутствовать GS, поскольку только множественные копии GS-гена могут обеспечить устойчивость к метионинсульфоксида. Такая схема обладает определенными преимуществами перед описанной выше.

В экспрессирующие векторы млекопитающих уже встроены гены сильных рибозимов и осуществлена их экспрессия в эукариотических клетках. Иногда выход продукта увеличивается, если между промотором и клонированным геном встроить интрон. Механизм этого феномена неизвестен. Возможно, первичный транскрипт клонированного гена содержит скрытые сайты сплайсинга, по которым выделяется часть кодирующей области клонированного гена, а при наличии дополнительного интрона сплайсинг по ним происходит с меньшей вероятностью.

Высокий уровень экспрессии клонированного гена достигается при ее координации с экспрессией селективного маркерного гена. Для этого, например, ген *DHFR* встраивают поблизости от клонированного гена, так чтобы оба гена находились под контролем одного промотора и имели общий сигнал повыведения-инициации, а ген *DHFR* был фланкирован сайтами связывания интронов (*I*HFR) и рекомбинантный белок транслировался с первичного транскрипта и удалялся рибонуклеазой соответственно (рис. 7.14).

Экспрессия двух клонированных генов в одной клетке млекопитающих

Некоторые ценные в коммерческом отношении белки в активной форме состоят из разных полипептидных цепей. Например, тиреотропный гормон человека – это гетеродимер, а гемоглобин – тетрамер, состоящий из двух субъединиц, по две копии каждой ($\alpha_2\beta_2$). Получить активный мультисубъединичный белок, можно попытаться клонировать ген или хДНК как один из субъединиц, синтезировать и очистить

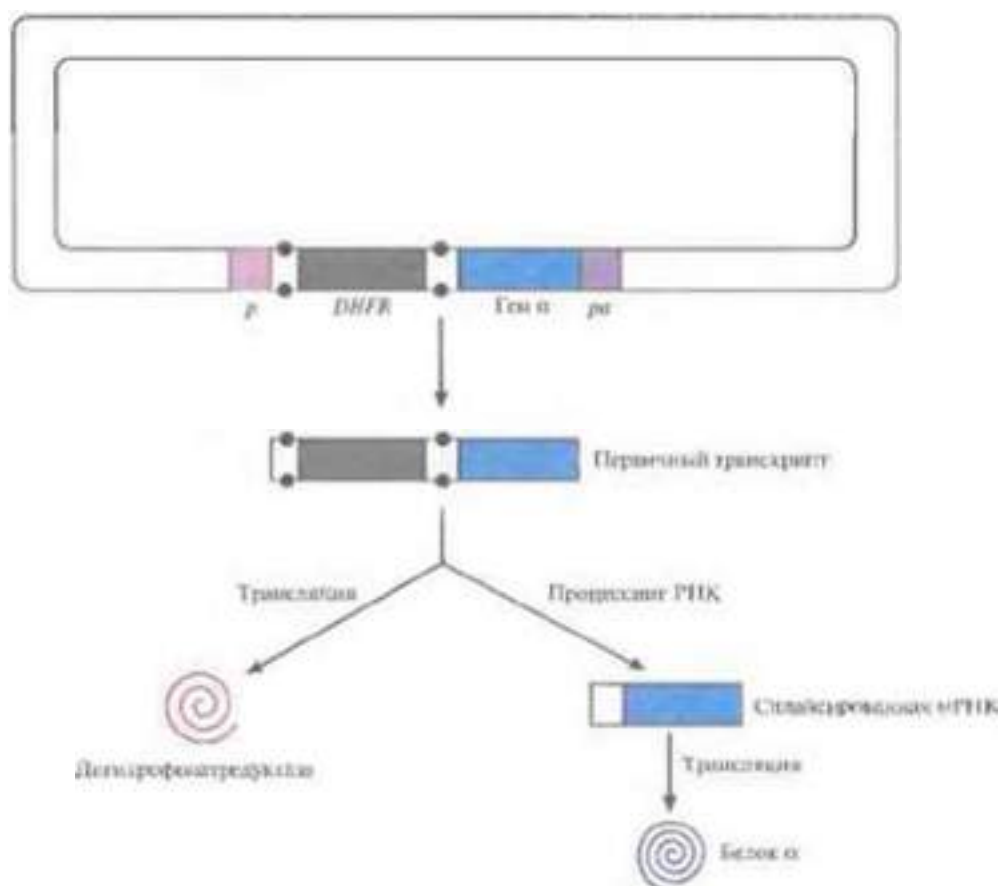


Рис. 7.14. Клонирование и экспрессия генов антидиуретического гормона (*DHFR*) и рекомбинантного белка. Ген *DHFR* встроили между ливерным и интронными сайтами селективного интрона (*I*HFR), через него же инципируют (*IC*) и ген *DHFR*, и клонированный ген находится под контролем одного эукариотического промотора (*P*) и имеет общий сигнал инициации-повыведения (*IC*). *DHFR* транслируется с несвязанного интрона (*I*HFR) транскрипта, а гетеродимерный белок (*белок α*) – с транскрипта, подвергнутого процессингу (*сплайсингу*)

субъединицы, а затем смешать их в пробирке. Однако таким образом удается получить лишь немногие тримерные белки, поскольку in vitro правильная укладка полипептидных цепей осуществляется редко. Сборка же димерных и тетрамерных белков in vitro протекает весьма эффективно. Поэтому были разработаны стратегии синтез двух разных рекомбинантных белков в одной клетке.

Для этого коляеские клетки одновременно трансфицируются двумя экспрессирующими векторами млекопитающих, каждый из кото-

рых несет ген для cДНК одной из субъединиц и разные типы селективных маркеров (рис. 7.15). Трансфицированные клетки подвергают двойному отбору, соответственно и выживают клетки несли оба вектора. Системы с двумя векторами успешно использовались для синтезов аутентичных димерных и тетрамерных рекомбинантных белков. К сожалению, дважды трансфицированные клетки часто утрачивают один из двух векторов. Кроме того, число копий каждого из векторов не всегда одинаково, так что одна субъединица может синтезиро-

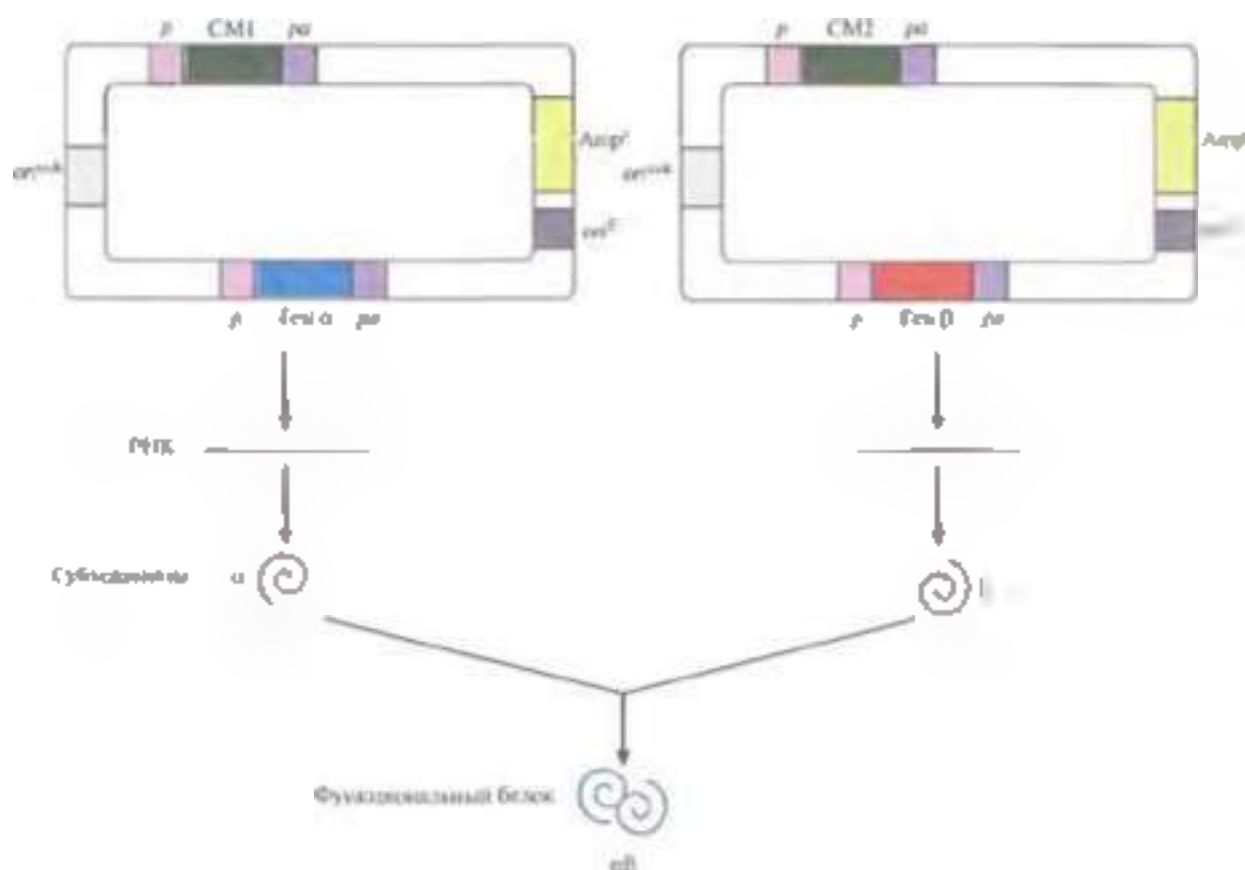


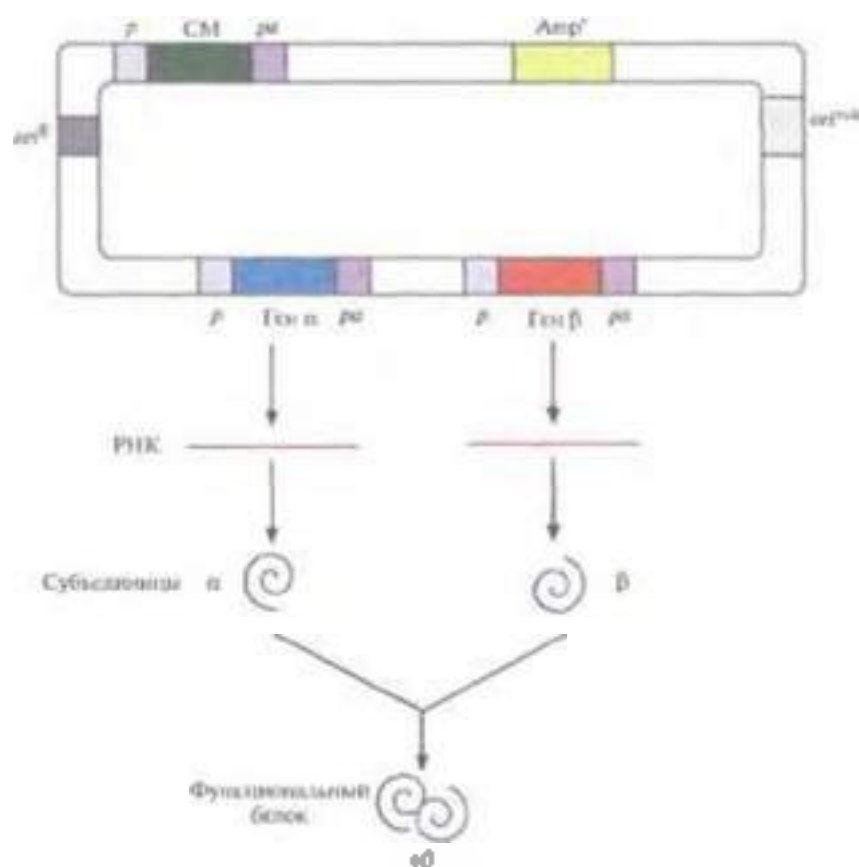
Рис. 7.15. Двухвекторная система экспрессии. Клонированные гены (α и β) кодируют субъединицы димерного белка ($\alpha\beta$). После олимеризации трансфекции клетки двумя плазмидами в *in vivo* синтезе образуются обе субъединицы (α и β) и собираются функциональный димерный белок. Оба вектора несут сайты минимального регулятора, функции которого в *E. coli* (ori^E) и в клетках млекопитающих (ori^M); маркерный ген (Amp^R) для отбора трансфицированных клеток; *E. coli* зюваротический трионитор (ori и cm) и полнактивированный CM , который регулирует экспрессию селективного маркерного гена (CM) в эукариотных клонированных генах.

каться в большем количестве, чем другая, и выход конечного продукта может снижаться. Чтобы решить эти проблемы, были сконструированы векторы, содержащие оба клонированные гены. В некоторых случаях они были помещены под контроль независимых промоторов и сигналов гликозилации (рис. 7.16). А для того чтобы гарантировать синтез рекомбинантных белков в одинаковом количестве, были созданы так называемые двунаправленные векторы, в которых клонированные гены разместились сегментами ДНК, содержащими внутреннюю сайт связывания рибосом. Такие сайты были обнаружены в геномах вирусов млекопитающих: они обеспечивают одновременную трансляцию различных белков с полицистронной мРНК. Транскрипция конструкции «ген-внутренний сайт связывания рибосом-ген» регулируется

одним промотором и одним сигналом полидегидрирования. Синтезируются один транскрипт с двумя генами, трансляция начинается с 5'-конца мРНК и с внутреннего сайта, в результате синтезируются субъединицы димерного белка α и β (рис. 7.17).

Суммируя, можно сказать, что экспрессируемые векторы млекопитающих столь же универсальны и эффективны как и векторы для других эукариотических систем экспрессии, если речь идет о получении аутентичных рекомбинантных белков для исследовательских и медицинских целей. Однако промышленный синтез рекомбинантных белков с использованием модифицированных клеток млекопитающих обходится слишком дорого. В этом случае предпочтительны менее дорогие системы экспрессии. За исключением тех ситуаций, когда

Рис. 7.16 Экспрессируемый вектор с двумя независимыми транскрибируемыми участками. Клонированные гены (α и β) кодируют субъединицы димерного белка ($\alpha\beta$). Каждый ген встроены в вектор как часть отдельной единицы транскрипции и контролируется под контролем эукариотического промотора (P) и сигнала полидегидрирования (μ). Каждая субъединица транскрипции со своим mRНК, объединяясь, субъединицы образуют функциональный димерный белок ($\alpha\beta$). Векторы содержат сайты или сигналы ретикуляции эндоцитоза в I сайтах (ori^I) и в частях млекопитающей (ori^M), маркерный ген (Amp^r) для отбора трансформированных клеток I сайта, селективный маркерный ген (CMV), называемый (cmv) транскрипции эукариотической промотора (P) и сигнала полидегидрирования (μ).



аутентичности рекомбинантного белка удается достичь только с помощью культуры клеток млекопитающих.

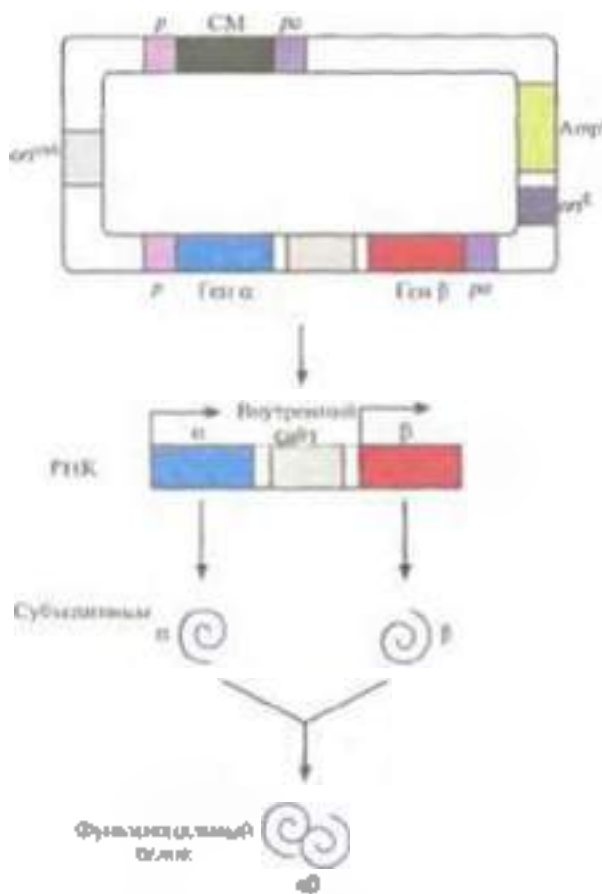


Рис. 7.17. Двухвекторный экспрессирующий вектор. Два кодирующих гена (α и β) кодируют субединицы димерной белка ($\alpha\beta$). Они размещены сегментами ДНК, который после транскрипции, на уровне мРНК, имеет лишь внутренний сайт связывания рибосом. Каждый ген находится под контролем индуцибельного промотора (ρ) и сайта полидендримизации (ρ II). Транскрипт мРНК начинается с 5' конца и с функционировать сайт (ρ II) (указан стрелкой). Синтезированные субъединицы объединяются с образующимся функциональным димером белка. Котор содержит сайт индукции димеризации (функциональный в ρ код ρ II) и в клетках млекопитающих (ρ II^{MD}); селективный маркерный ген (Amp^r) для выбора трансформированных клеток; ген селективный маркерный ген (CM), кодирующая под контролем индуцибельного промотора (ρ) и синтез индукцируемости (ρ II)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прокриотические системы экспрессии успешно используются для синтеза многих белков. Однако некоторые белки для превращения в активную форму должны претерпеть специфические посттрансляционные модификации – гликозилирование, фосфорилирование или шестипролинис, а бактерии в этом не способны. Поэтому были решены попытка экспрессировать кодирующие гены в эукариотических клетках с помощью специально созданных эукариотических экспрессируемых векторов.

Для синтеза разнообразных белков, кодируемых клонированными генами, использовались дрожжи *S. cerevisiae*. Их генетика хорошо изучена, а кроме того, их можно выращивать в больших ферментерах. Чтобы упростить очистку белков, были сконструированы векторы, обеспечивающие их секрецию. С помощью *S. cerevisiae* было получено множество самых разных аутентичных белков. Однако многие рекомбинантные белки в этой системе не подвергались посттрансляционной модификации, в том же их выходы зачастую были недостаточно высоки. Поэтому были предприняты попытки разработать другие дрожжевые системы синтеза рекомбинантных белков.

В качестве других эукариотических систем экспрессии, с помощью которых можно были бы получить биологически активные белки, исследователи сосредоточили усилия на создании экспрессируемых векторов на основе бакуловируса, в частности бакуловируса AcMNPV, инфицирующего клетки насекомых. Наиболее строгая предположить трансфекцию клеток насекомого, инфицированных AcMNPV, трансгенным вектором, который содержит клонированный ген, флуоресцентный AcMNPV-специфичный инклюзивный белок. В результате двойного скрещивания между вектором и геном AcMNPV клонированный ген встраивается в последний и попадает под контроль сильного промотора, функционирующего на последних стадиях личинического цикла. Клетки насекомого, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом, синтезируют гетеродимерный белок.

Частоту появления рекомбинантных бакулловирусов удалось повысить с менее чем 1% до 99%. Для этого ДНК АсМNPV обрабатывали энзимолучевой рестрикцией, которая расширяла ДНК в двух специфичных сайтах с выделением фрагмента, несущего часть генов, необходимого для осуществления янтрачешечного цикла. Клетки насекомого трансфицировали этим фрагментом, а затем трансформировали вектором. В результате довольно эффективно в некоторых клетках появлялись кольцевой геном АсМNPV, который содержал коцированный ген и функциональный ген, необходимый для осуществления янтрачешечного цикла. В результате почти все вирулентные бакулловирусы оказываются рекомбинантными.

Следующим шагом в усовершенствовании системы экспрессии на основе бакулловирусов состоял в создании вектора, чужеродного вектора *E. coli*/клетки насекомого, позволяющего проводить все генноинженерные манипуляции в *E. coli*. Клетки насекомого трансфицировали рекомбинантным бакулловирусом с целью получения гетерологичного белка. Примеры: 95% гетерологичных белков, синтезированных в системах экспрессии на основе бакулловирусов, имели соответствующие посттрансляционные модификации.

Внехромосомные экспрессирующие векторы млекопитающих обычно применяют для синтеза гетерологичных белков, используемых в научных или медицинских целях. Они представляют собой чужеродные векторы с сильными инициацией репликации вирусом дивальным в *E. coli* (капсиды). Результатом элементарной транскрипции обычно происходит из генома вируса дивальных или их геномов млекопитающих. Для отбора трансфицированных клеток используют ромбоидальные селективные маркерные гены. Некоторые системы отбора основаны на токсичности в среду выделяющегося количества интоксикационного соединения и позволяют получать клетки, содержащие большое число копий вектора, что увеличивает выход чужеродного белка.

Разработаны системы экспрессии млекопитающих, позволяющие получать белки, соответствующие двум разным субединицам. Для этого ко-

мбинные клетки трансфицированы сразу двумя векторами, каждый из которых несет единую из субединиц. Альтернативный подход состоял в использовании одного вектора, который несет эти два гена и в виде увеличенных единиц транскрипции или в виде единично транскрипционные, коллективно кодируют гены.

ЛИТЕРАТУРА

- Cockett M. L., C. R. Reddington, G. J. Yarranton. 1990 High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Bio/Technology* 8: 662-667.
- Cole E. S., W. Lee, K. Lauriere, C. Kelton, K. Chappel, B. Weinstein, H. Ferrer, P. Peterson, R. Hernandez, T. Edmunds, S. Richards, L. Decker, I. M. Kleeman, J. H. McPherson, H. M. Pratt. 1993 Recombinant human thyroid stimulating hormone: development of a biotechnology product for detection of metastatic lesions of thyroid carcinoma. *Bio/Technology* 11: 1014-1024.
- Cogg J. M., J. F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W. S. Craig, R. G. Buckholz, A. W. Madden, P. A. Kellarb, G. R. Davis, B. L. Smiley, J. Crue, H. Tomiyama, G. Velletchi, G. P. Thill. 1987 High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 479-485.
- Davies A. H. 1994 Current methods for manipulating baculovirus. *Bio/Technology* 12: 47-50.
- Digan M. E., S. V. Lal, R. A. Drierley, R. S. Siegel, M. E. Williams, S. B. Ellis, P. A. Kellarb, S. A. Proton, W. S. Craig, G. Velletchi, M. M. Harpold, G. P. Thill. 1989 Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 7: 160-164.
- Dirks W., M. Wirth, H. Huser. 1993. Dicotyloidic transfection units for gene expression in mammalian cells. *Gene* 128: 247-249.
- Gellissen G., Z. A. Jannietz, U. Weydemann, K. Melber, A. W. M. Strauss, C. P. Hollenberg. 1992. High-level expression of foreign genes in

- Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Adv.* 10: 179-189.
- Giza-Hama Y., H. Takada, H. Okada, M. K. Okada, H. Okayama, H. Kanagata. 1994. High-level expression of human lipocortin I in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* using a novel expression vector. *Bio/Technology* 12: 400-404.
- Gilbert S. C., H. van Uck, A. J. Greenfield, M. J. McAvoy, K. A. Deaton, D. Coghlan, G. D. Jones, D. J. Mead. 1994. Increase in copy number of an integrated vector during continuous culture of *Hansenula polymorpha* expressing functional human hemoglobin. *Yeast* 10: 1569-1580.
- The Global Use of Strategies to Open Occluded Arteries (GIUSTO) IIb Investigators. 1996. A comparison of recombinant hirudin with heparin for the treatment of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 335: 775-782.
- Hallenfeld R. A., R. Mills, P. Tekamp-Olsen, R. Blacher, S. Rosenbery, I. Oring, F. R. Masera, C. J. Scandella. 1987. Amino terminal acetylation of authentic human Cu, Zn superoxide dismutase produced in yeast. *Bio/Technology* 5: 363-366.
- Kidd I. M., V. C. Emery. 1993. The use of baculoviruses as expression vectors. *Appl Biochem. Biotechnol* 42: 157-159.
- Kitts P. A., R. D. Possee. 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Bio/Technology* 14: 810-817.
- Larache V., V. Strame, J. DeMutter, J. Messens, M. Lauwereys. 1994. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 12: 1119-1124.
- Loken G., A. Hindeil, S. Bernard, M. Nguyen-Juifferet, M. Hincquet, N. Riehl-Bellon, D. Carvallo, L. Yvonne Santos, S. W. Brown, M. Courtney, C. Roldan, Y. Lemaire. 1993. Expression and secretion in *S. cerevisiae* of biologically active leech hirudin. *Bio/Technology* 6: 71-77.
- Lutz B. K., L. M. Giere, R. A. DeMaico, A. Shio, A. Chakrabarti. 1994. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dictyonic DHFR origin expression vector. *Nucleic Acids Res.* 24: 1774-1779.
- Luckow V. A., S. C. Lee, G. F. Barry, P. O. Glaser. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Lacertella eoli*. *J. Virol* 67: 4566-4574.
- Peng S., M. Namburath, J. Logan, Z. Huang, T. Jillog, S. Kim, E. Hunter, E. Sanchez. 1993. One-step affinity isolation of recombinant protein using the baculovirus/insect expression system. *Protein Expr Purif* 4: 95-100.
- Robinson A. S., V. Hines, K. D. Wittup. 1994. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* 12: 381-384.
- Romano M. A., C. A. Scorer, J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423-448.
- Vazza L. A., L. Wittmer, D. R. Higgins, T. J. Purcell, M. Bergsted, L. A. Collins-Kacir, F. R. LaValle, J. P. Hoeller. 1996. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 14: 77-81.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Почему для получения белков, используемых в медицине, лучше применять эукариотические, а не прокариотические системы?
2. Какие достоинства и недостатки имеют различные типы дрожжевых векторов, предназначенных для получения данного рекомбинантного продукта?
3. Опишите основные свойства индукционной векторной системы *P. pastoris*, обладающей высоким уровнем экспрессии.
4. Что такое бакловирусы? Опишите исходную систему экспрессии на основе бакловирусов и ее последующие модификации.
5. Что такое бакцила? Для чего ее используют?

6. Что такое эффинные метки? Для чего ее не пользуют?
7. Опишите основные свойства микромоминно экспрессирующего вектора млекопитающих.
8. Опишите как минимум две селективные системы, используемые в случае экспрессирующих векторов млекопитающих.
9. Сравните разные λ -векторы в создании систем синтеза двух рекомбинантных белков в одной клетке млекопитающего.
10. Какими критериями руководствуются при выборе системы экспрессии генов неструктурных белков (дражжи, система экспрессии на основе факультативной клетки млекопитающих)?

Направленный мутагенез и геновая инженерия белков

Технология рекомбинантных ДНК позволяет выделить гены любых белков, существующих в природе, экспрессировать их в специфическом хозяинском организме и получить чистые белковые продукты. Однако физические и химические свойства таких «природных» белков часто не удовлетворяют условиям, обеспечивающим возможность их промышленного применения. Иногда для получения белков, обладающих нужными свойствами, в качестве источника соответствующих генов используют организмы, растущие в необычных, зачастую экстремальных условиях. Например, вля синтезе α -амилазы, не утрачивающей своей активности при высокой температуре, выделяют ее ген из *Bacillus stearothermophilus* — бактерии, естественной средой обитания которой является горячие источники с температурой воды 90 °С. Получением таким образом штамма, оставшаяся активной при температуре, при мытье осуществляют (производство при помощи этой штамма и крахмала). Для получения белков с другими свойствами можно использовать также мутантные формы генов. Однако число мутантных белков, образующихся в результате мутации отдельных нуклеотидов в структуре гена с помощью обычного мутагена, чрезвычайно велико. Мутагенез с последующим отбором редких генов дает в сравнительно лучшем случае несколько белков, поскольку большинство аминокислотных замещений сопровождается снижением активности фермента.

Для создания белков со специфическими свойствами можно использовать другой подход, основанный на введении и изменении в кодирующей их кодирующей гены. Это позволяет получать белки с другими, чем у их аналогов, свойствами

- Повысив константу Михаэлиса (K_m), можно увеличить термостабильность соединения субстрата с ферментом, а уменьшив константу (K_m) (уменьшив константу субстрата и продукт при определенных условиях, можно повысить обратную каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m) реакции. k_{cat} (число молекул продукта фермента (E_p), увеличивают на каталитическую константу (K_m)).
- Повысив стабильность белка в широком диапазоне температур или pH, можно использовать его в условиях, при которых исходный белок инактивируется.
- Создав белки, способные функционировать в бесводных растворителях, можно осуществлять каталитические реакции в неводных условиях.
- Изменить белок таким образом, чтобы он мог работать без кофактора, можно использовать его в некоторых экстремальных промышленных процессах.
- Изменив оптимальный pH фермента, можно повысить его специфичность и уменьшить число нежелательных побочных реакций.
- Повысив устойчивость белка в клеточном экстракте, можно упростить процедуру его очистки и повысить выход продукта.
- Изменив кинетику действия фермента, можно уменьшить степень его ингибирования ингибитором (по типу отрицательной обратной связи) и увеличить выход продукта.

Направленный мутагенез: методика

Получить новый белок с другими свойствами можно разными способами. Однако наиболее реально изменить свойства уже существующего белка. Изменить можно почти любой белок или его

ген (ближе к эмбриональной белковой резке) бывает строго специфичной и ее необходимо существовать только для каждого белкового продукта, поэтому лучше вносить мутации в его кодирующий ген. К сожалению, не всегда бывает известно, какую именно аминокислоту или последовательность аминокислот нужно изменить, чтобы получить белок с новыми физическими, химическими или биологическими свойствами. Может случиться, что изменения должны затрагивать два или три более аминокислотных остатка, расположенных далеко друг от друга в первичной цепи. Но специальному в результате удалось белковой молекулы. Есть надежда, что уже в недалеком будущем с помощью компьютерных расчетов удастся выявить участки первичной цепи белка, изменение которых с определенной последовательностью. Это значительно упрощает процедуру отыскания мутаций белков. Внесение новых генетических информации в кодирующий ген сейчас не составляет особого труда, однако чтобы определить, образуется ли желаемый белок нужными свойствами, необходимо предпринять целый ряд действий.

Несение специфических изменений в кодирующую последовательность ДНК, приводящих к определенным изменениям в аминокислотных последовательностях, называется (направленным) мутагенезом. Понятие функции аминокислот, замена которых дает желаемый результат, облегчается, если детально известны пространственная структура белка (ее устанавливают с помощью рентгеноструктурного анализа или других биологических методов). Однако для большинства белков такие данные отсутствуют, поэтому направленный мутагенез — это в значительной мере эмпирическая процедура, основанная на методе проб и ошибок. Каждый белок, кодируемый мутантным геном, нужно протестировать и убедиться в том, что мутация дала желаемый эффект.

Для идентификации мутантов в клонированных генах можно использовать следующие подходы. В одних случаях можно использовать специфические сайты клонирования генов, в других случайным образом вносимый короткий фрагмент в кодирующий ген и среди образующихся мутантных белков выбирать один, обладающий необходимой активностью.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК-фага M13

Олигонуклеотид-направленный (сайт-специфический) мутагенез — это способ наиболее простой метод внесения точечных мутаций в клонированный ген (рис. 3.1). Для его осуществления необходимо иметь: 1) точную нуклеотидную последовательность той области ДНК, которая соответствует мРНК-коду, подлежащему изменению; 2) характер аминокислотных замен. Обычно встроены в ген-мишень в определенную форму вектора на основе бактериофага M13. Сначала выделяют плазмидно-клеточную форму вектора (или цепь M13) и смешивают ее с синтетическим олигонуклеотидом, в частности комплементарным — и идентифицируют одного нуклеотида (нужному сегменту клонированного гена). Этот отщепившийся (с несвязывающейся) нуклеотида соответствует тому нуклеотиду колона мРНК, который необходимо изменить. В случае, представленном на рис. 3.1, трицепт АТТ, соответствующий кодон аминокислотному коду АУС, нужно изменить на трицепт СТУ, соответствующий лейциноному коду ССУ. Олигонуклеотид будет (гибридизация с комплементарным участком клонированного гена в том случае, если: 1) он выделен в количестве, во много раз превышающем количество ДНК M13; 2) нестарифицирован (нуклеотид находится примерно посередине олигонуклеотида); 3) оставит пробоват при высокой температуре и высокой ионной силе 3'-конца спаривается олигонуклеотидом (служит шпилькой для имплантации синтетической ДНК, а интактная цепь ДНК M13 — матрицей). Репликация осуществляется с помощью фиделити Кюмова ДНК-полимераза (*Karberichio coli*) при наличии в среде четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, а присоединение последнего нуклеотида к 3'-концу осуществляется с помощью олигонуклеотидной цепи к 3'-концу шпильки обеспечивает ДНК-лигаза фий Т4. Она катализирует синтез ДНК редко идет до конца, и поэтому двуцепочечные молекулы приходится отделить от нормальных центрифугированием в градиенте сахарозы.

Полностью двуцепочечными молекулами ДНК фага M13, содержащими, олиго-, некодирующие элементарные нуклеотиды, трансформируют клетки *E. coli*. В последних образуются фаговые

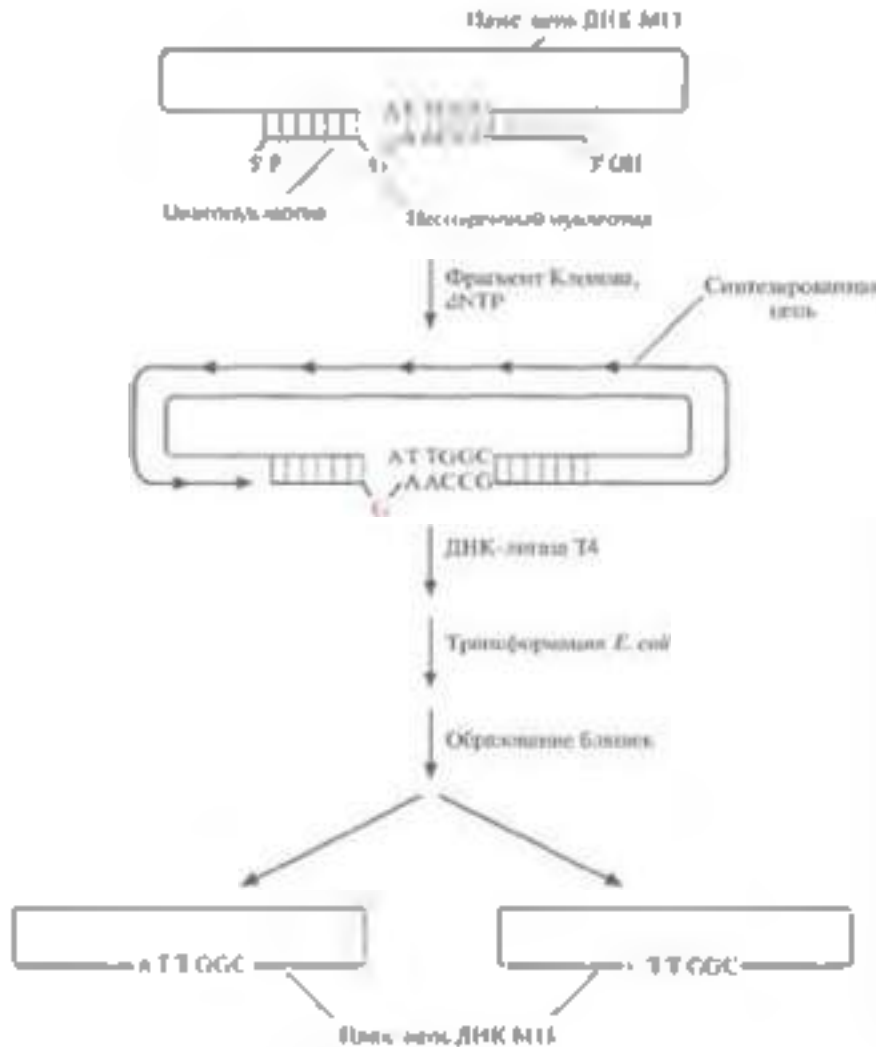
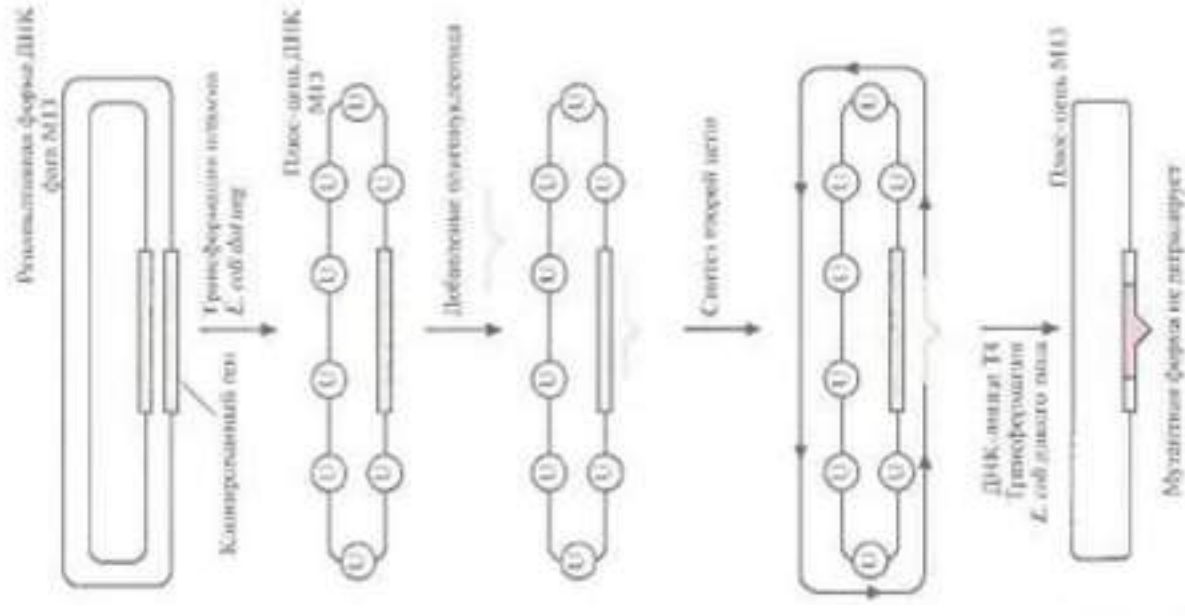


Рис. 9.1. Производство фаговых частиц при встраивании мутантного фанго-носителя ДНК фанга М13 (талис.-ген), несущего талис.-ген, синтезируемого с помощью фермента Клейна, в круговой векторный синтетический олигонуклеотид, содержащий фанго-основание, не имеет ленточные соответствия между основными последовательностями ДНК. Олигонуклеотид служит матрицей для синтеза ДНК, в М13-вектор с встроенным геном — матрицей. Реакция катализирует фрагмент Клейна и ДНК-полимеразы I и II. Синтезированную олигонуклеотидную цепь замыкают в кольцо ДНК-лиазой I. Образованные дуплексы циркулируют молекулами трансформируя *E. coli*. Часть фангоид частиц содержат ДНК дикого типа, часть — мутантный ДНК.

частицы, что в конечном счете приводит к явлению клеток и образованию бактерий. Поскольку различия между фаго-носителями и мутантными фагами являются мутациями, то для получения мутантных фагов можно использовать ДНК дикого типа, а именно — мутантную ДНК со специфической нуклеотидной заменой. Частицы, содержащие только мутантный ген, идентифицируют при помощи ДНК-гибридизации в жестких условиях, используя в качестве зонда исходный олигонуклеотид. Мутантный ген вырезают и встраивают в какой-либо экспрессирующий *col*-вектор. Мутантный белок синтезируют в *E. coli* и очищают.

На самом деле число фаговых частиц, несущих мутантную ДНК, оказывается гораздо меньше ожидаемых 50%: лишь 1/59 бактерий содержат фанго-носитель с мутантным геном. Чтобы повысить число мутантных фагов, метод олигонуклеотид-направленного мутагенеза модифицировали. Один из вариантов состоит во встраивании М13-вектора, несущего талис.-ген, в который необходимо ввести мутацию, в штамм *E. coli*, deficientный по двум ферментам метаболизма ДНК (рис. 9.2). Один фермент — это мутантный фангоид *dI* (рибонуклеотидил-трансфераза (*rib*)). Клетки с неактивной *dUTP*-рибонуклеотидил-трансферазой характеризуются повышенным содержанием *dUTP*, что приводит к

встраиванию в ДНК при репликации нескольких остатков dUTP вместо dTTP. Второй фермент — это дефектная урицил-N-гликозилаза (*ung*). В отсутствие функциональной урицил-N-гликозилазы остатки dUTP, случайно встроившиеся в ДНК, не могут быть удалены. В оплодотворенной ДНК M13, синтезированной в клетках клетки *E. coli*, прикреплено 15 тимидиновых остатков, оказывающих замедляющее действие на репликацию. Олигонуклеотиды с несколькими метками основательно отжигают с урицилсодержащей ДНК M13 и *in vitro* встраивают вторую



цепь. Двухцепочечной ДНК трансформируют штамм *E. coli*, содержащий функциональный ген *ung*. Активная урицил-N-гликозилаза высвобождает клетки, удаляет остаток урицила из ДНК M13 (рис. 8.2), исходная матричная цепь M13 деградировать и далее реплицируется только мутантная цепь, не содержащая dUTP. В результате выход фagosных частиц, несущих мутантный ген, значительно увеличивается.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием плазмидной ДНК

Основной недостаток олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием флага M13 — большое число пропусков. Чтобы выделить мутантную форму нужного гена, приходится затрачивать много времени. В качестве альтернативной системы с использованием флага M13 было разработано множество других подходов, основанных на применении плазмидной ДНК. Это позволяет обойтись без переноса интересующего исследователя гена из плазмиды в фagosую ДНК, а после завершения мутагенеза — обратно в плазмиду. Один из этих подходов включает встраивание ДНК в плазмидный вектор, который несет функциональный ген устойчивости к тетрациклину и неактивный ген устойчивости к ампициллину; в середине последнего вставлен ген тунисина (рис. 8.3). Клетки *E. coli* трансформируют вектором, несущим ДНК-мишень, и двухцепочечную плазмидную ДНК деацетируют щелочью с тем, чтобы получить одноцепочечные копии целевой молекулы. Денатурированную ДНК отжигают с тремя расплавленными олигонуклеоти-

Рис. 8.2. Повышение выхода мутантного флага M13 путем трансформации штамма *E. coli* *del ung*. Ген *ung* встраивают в двухцепочечную репликационную форму ДНК флага M13 и искусственно молекулярно трансформируют штамм *E. coli* *del ung*. Мутации *del ung* исключают возможность содержания dUTP в клетке, что приводит к включению в ДНК нескольких остатков dUTP (U), а мутация *del ung* блокирует их удаление. Двухцепочечной ДНК M13, содержащей ген *ung*, трансформируют клетки *E. coli* нового типа. Продукт гена *del ung* нового типа (урицил-N-гликозилаза) удаляет все остатки урицила из исходной цепи, и она деградирует. Мутантная цепь остается интактной, поскольку она не содержит остатков урицила. Эта цепь служит матрицей для репликации ДНК, и в результате доля фagosых частиц, несущих мутантный ген, увеличивается.

лами. Один из них предназначен для внесения изменений в клонированную ДНК-матрицу, второй – для устранения мутации в гене устойчивости к ампициллину, третий – для замены одного нуклеотида в гене устойчивости к тетрациклину с тем, чтобы инактивировать этот ген. В резуль-

тативную смесь добавляют четыре деионизированных нуклеотрифосфата и ДНК-полимеразу T4. Функционирование ампициллинофрагмента Клоновой ДНК-полимеразы (*E. coli*) Гибриониславинский олигонуклеотиды служат шаблоном для синтеза ДНК, а нуклеиновая кислота является

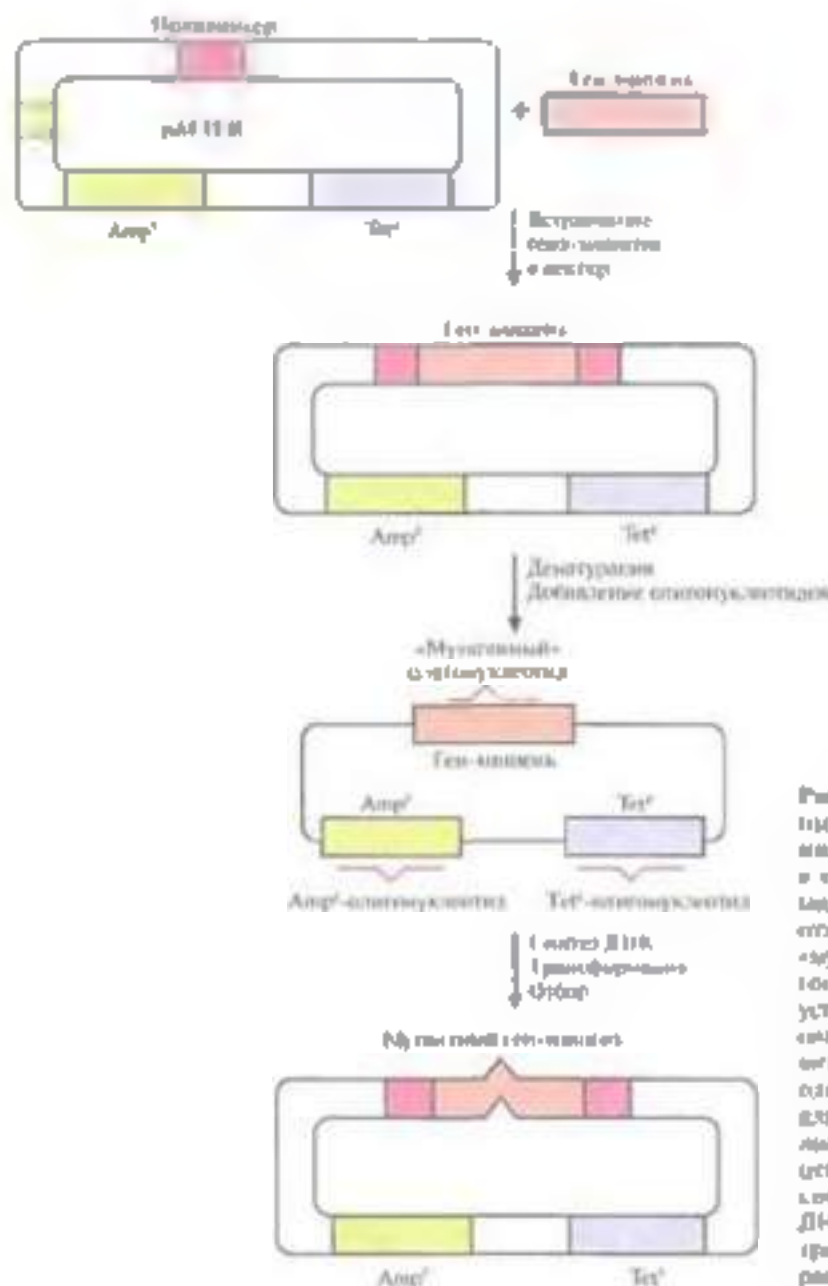


Рис. В.3. Олигонуклеотид (красный) мутации с использованием плазмидной ДНК *lacZ*-матрицы встроился в матрицу вставки *lacZ* ГИ. Плазмидная ДНК денатурирует и вступает в реакцию с тремя олигонуклеотидными «мутационными» олигонуклеотидами, один из которых, взаимодействующим с устойчивости в ампициллину (*Amp^r*), и олигонуклеотидом, взаимодействующим с устойчивости в тетрациклину (*Tet^r*). Эти олигонуклеотиды служат шаблоном для синтеза ДНК с помощью ДНК-полимеразы T4, в результате чего матрицей (двухцепочечные разрывы) и новой синтезированной цепи (красный) ДНК. Матрица T4 (продукты реакции трансформации клеток *E. coli*) и отбытие трансформанты *Amp^r* и *Tet^r*

ДНК — матрицей. Одноцепочечные гравиты в нуклеопротеиновой цепи замещаются с помощью ДНК-лигазы Та. По окончании синтеза и дигеронизации предуктами реакции трансформированной клетки *E. coli* Трансформантов отбирают по принципу устойчивости к ампициллину и чувствительности к тетрациклину. Примерно 90% из них содержат экспрессируемую мутированную клонированную ген. У остальных трансформантов клонированный ген не был изменен либо потому, что опсонизировали не трансформировались с ним, либо потому, что он вытеснился в ходе синтеза ДНК. Клетки, несущие мутированный клонированный ген, идентифицируют с помощью гибридомации. Все плазмиды, отмытые ферментами, опсонизированными (кроме того, который предшественник для изменения клонированного гена), а также буферы проходятся в наборе, что облегчает работу.

Одноклеточная-матричная мутирование с использованием ПЦР-амплификации

Более простой и быстрый метод получения больших количеств мутированных генов, димеризованный системе с использованием факта М13, — сайт-специфический мутирование в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Одним из вариантов этого подхода является использование Гет-иниции, встроенной в циркулярный вектор (рис. 8.4) и помещают препарат в две пробирки. В каждую из них добавляет по два специфических праймера для ПЦР 1 и 2 и одну пробирку, 3 и 4 — в другую. Праймеры 2 и 3 полностью комплементарны одному из участков клонированного гена или прилегающей к нему последовательности, а 1 и 3 комплементарны другому участку, но содержат один некодирующий нуклеотид мутирования и гибридируются с геномной цепью, так что в результате происходит замена одного нуклеотида данной пары. Поскольку сайт-специфический праймеров 1 и 2 в одной пробирке и 3 и 4 — в другой такой, что ПЦР-продукты в разных пробирках имеют разные концы. По окончании ПЦР содержимое пробирок объединяют и продолжают дегидратацию, а затем ренатурацию. Поскольку концы димеризированных молекул ДНК из двух пробирок некомплементарны, единичные ДНК из разных пробирок димеризуют с образованными комплементарными молекулами с образованными комплементарными молекулами с

двумя одноцепочечными гравитами. Эти гравиты ренатураются in situ после трансформации *E. coli*. При ренатурации одиночных цепей из одной пробирки образуются дивиденные молекулы. В клетках *E. coli* стабилизируются молекулы, а не плазмиды и наследуются только копией, а не дивиденные молекулы, при этом все они несут сайт-специфическую мутиацию. Таким образом, с помощью описанного метода можно повысить точность мутиации и клонированный ген, при этом отпадает необходимость во встраивании гена в ДНК факта М13, использование мутированных штаммов *E. coli* типа *lac neg* и в первом мутированного гена из М13-вектора в экспрессирующей вектор.

Случайный мутирование с использованием

высокочастотного аллелорезистентных праймеров

К сожалению, обычно бывает неизвестно, какую нуклеотидную замену в клонированном гене нужно произвести, чтобы получить белок с нужными свойствами. Поэтому часто предпочитают изменить один определенный нуклеотидный сайт всеми возможными способами. Например, можно синтетировать, опсонизированные праймеры, в опзон из сайтов которых найдутся различные нуклеотиды. Такие «высокочастотные» опсонизированные обычно получают, добавляя в амплификационный синтешор ДНК на опсонизированном этапе, когда в цепи должен происходить сайт специфический нуклеотид, небольшое количество (по несколько процентов) трех других нуклеотидов (рис. 8.5). В результате получается гетерогенный по одному сайту набор опсонизированных праймеров, с помощью которых можно получить соответствующий набор мутированных генов-мишеней с мутированными сайтами в специфическом сайте.

Этот подход имеет два преимущества: 1) не нужно в точности знать, какую роль играет тот или иной аминокислотный остаток в функционировании белка; 2) поскольку в данном сайте присутствуют разные аминокислотные замены, могут случайно синтезироваться белки с различными интересными и неожиданными свойствами. Конечно, если ни один из образующихся белков не обладает нужными свойствами, приходится все начинать сначала, синтезировать новый набор «высокочастотных» праймеров, комбинированных другой области гена.

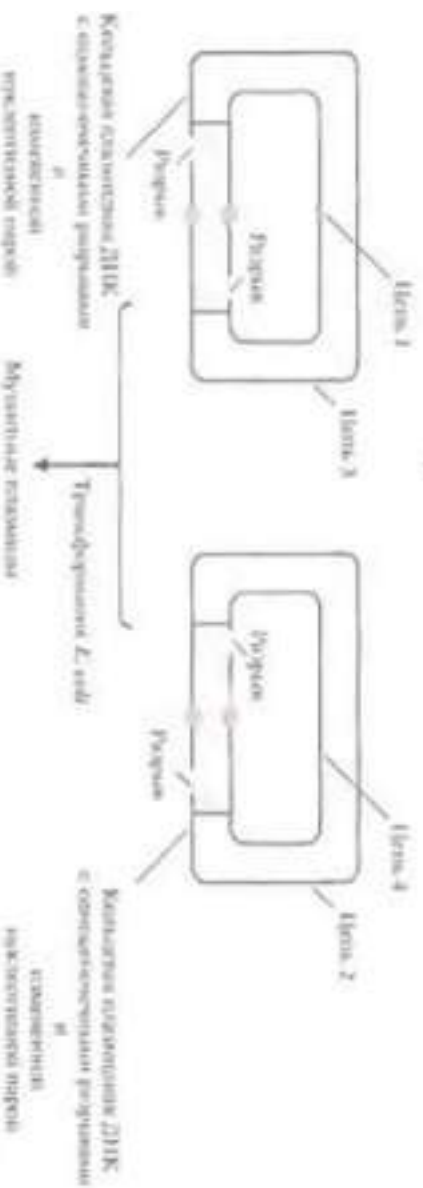
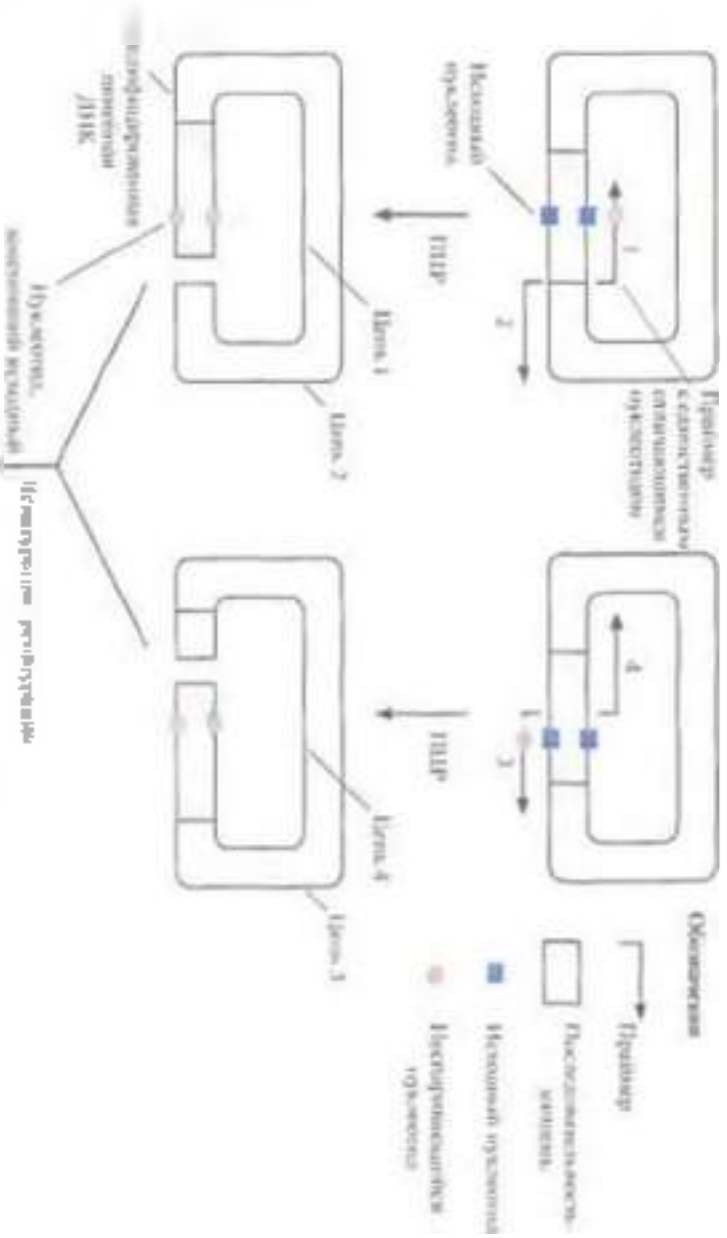


Рис. 8.4. Олигомеризованная олигомеризованная группа и мембранная ДHPK. Реагируя с рибосомами в двух клетках, в каждой из которых содержится олигомеризованная олигомеризованная группа ДHPK, но при этом только в одной из них. Клетки 1 и 2 содержат одну олигомеризованную группу ДHPK, но при этом только в одной из них. Клетки 3 и 4 содержат олигомеризованную группу ДHPK и при этом рибосомами с рибосомами. Процессные клетки рибосомами для рибосомной клетки. Но очевидно, что в этих клетках рибосома. В результате рибосома и мембрана олигомеризованной группы ДHPK, которая с другой олигомеризованной группой. После трансферента олигомеризованной группы ДHPK, которая с рибосомами мембранной клетки. Однако, и наоборот может рибосомами мембранной. Динамическая группа ДHPK и *L. reidi* are олигомеризованная.

Таблица 1



ВАЖНАЯ ВЕЩА

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием векторов на основе фазы M13: эффективный универсальный метод внесения точечных мутаций в любую фрагмент ДНК

M. J. Zakari, M. Zlotnik

Nucleic Acid Res. 10: 6407-6500 1982

Методы олигонуклеотид-направленного мутагенеза были специфически адаптированы для фазы M13. Этот вид мутагенеза можно считать «маленьким мутагеном» — «облегченным» мутагеном в фазе M13 и сравним с олигонуклеотид-направленным мутагеном в фазе M13 с флуоресцентным меткированием ДНК. Этот метод позволяет вносить точечные мутации в любую последовательность ДНК, включая участки, содержащие сайты рестрикции.

Важно в нем наличие в олигонуклеотиде, вносимом в фазу M13, специфического участка для олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Этот участок должен быть расположен в области, кодирующей сайт рестрикции. Метод позволяет вносить мутации в любую последовательность ДНК, включая участки, содержащие сайты рестрикции. Этот метод позволяет вносить точечные мутации в любую последовательность ДНК, включая участки, содержащие сайты рестрикции.

Этот метод может использоваться для фазы M13 с сайтами рестрикции ДНК, кодирующей и кодирующей фазой M13, и олигонуклеотидной ДНК, кодирующей олигонуклеотид-направленный мутагенез. Этот метод позволяет вносить точечные мутации в любую последовательность ДНК, включая участки, содержащие сайты рестрикции. Этот метод позволяет вносить точечные мутации в любую последовательность ДНК, включая участки, содержащие сайты рестрикции.

«Важно» мутагенезные олигонуклеотиды могут быть встроены в олигонуклеотидным способом. Один из вариантов описан в следующем. Это мутагенез и плазмиды между двумя уникальными сайтами рестрикции. Принцип действия заключается в

том, что в процессе рестрикции между сайтами рестрикции образуется олигонуклеотидный фрагмент (олигонуклеотидный фрагмент), который используется для олигонуклеотид-направленного мутагенеза. Этот метод позволяет вносить точечные мутации в любую последовательность ДНК, включая участки, содержащие сайты рестрикции. Этот метод позволяет вносить точечные мутации в любую последовательность ДНК, включая участки, содержащие сайты рестрикции.

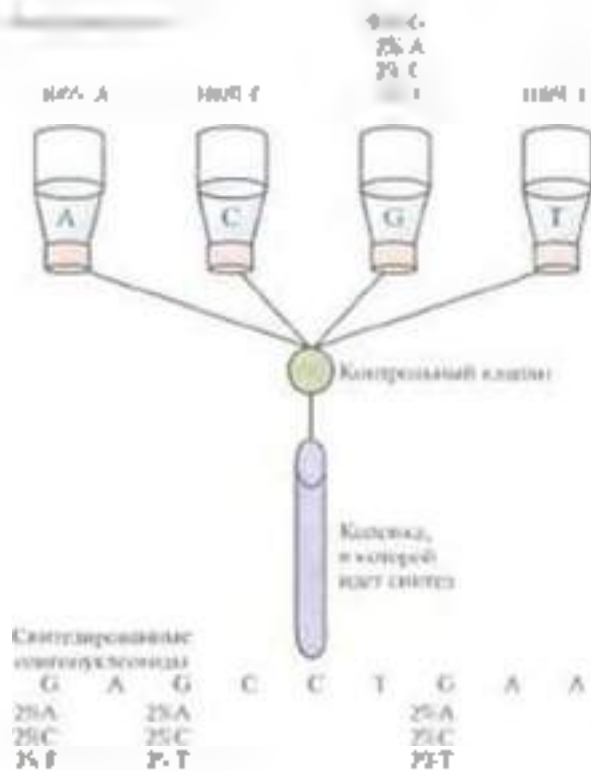


Рис. 1. Химический синтез олигонуклеотидных примеров, содержащих в определенных сайтах различные нуклеотиды. В данном случае в составе олигонуклеотидов (96%) содержится только фосфорамидиты A (25%), C (25%) и T (25%), так что в результате реакции образуется смесь олигонуклеотидов, в которых в определенных сайтах присутствуют A, C или T.

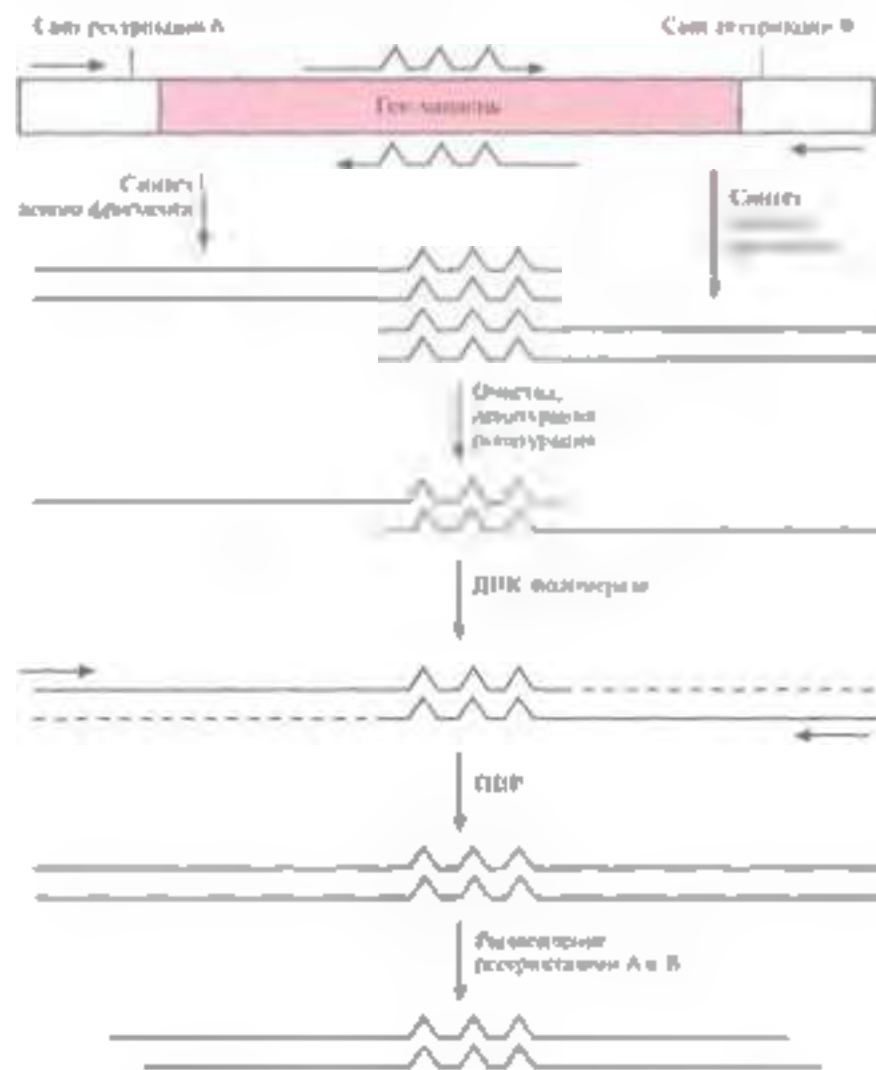


Рис. 10. Случайный мутагенез с использованием «ферментативной» олигонуклеотидной PCR. Слева и справа части гена-интереса трансформированы по отдельности с помощью PCR с использованием праймеров, показанных стрелками. «Вторичные» олигонуклеотиды набухают стрелками с краев набухания, каждая из которых является «клеточкой». Их последовательность кодирует единичный нуклеотид в гене-интересе. Ровные фрагменты олигонуклеотидов идентифицируют за исключением системы сайтов рестрикции. В результате образуются частицы олигонуклеотидов: «клеточки» ДНК, сгруппированные в области генов-интереса. На противоположных концах ДНК-клеточек и (продолжит. ДНК) «клеточки» ДНК PCR-продукты расщепляют с помощью рестрикции А и В и «клеточки» «клеточки», обработанные теми же ферментами.

находящим концом молекула. Амплифицированные молекулы обрабатывают двумя энзимными сайтами рестрикции уникальные сайты которых находятся на концах фрагмента, и встраивают в соответствующий плазмидный вектор. Этот метод позволяет получать измененные гены с помощью мутации.

Случайный мутагенез с использованием «клеточной» олигонуклеотидной PCR

Новыми методами мутации генов в амплифицируемый ген, основанными на использовании флага M13, были разработаны другие методы, в

которых использовались плазмидные ДНК. Одна из них схематично представлена на рис. 11. Ген-интерес встраивают в плазмиду поблизости от двух точек расположения сайтов рестрикции. Эти сайты набухают так, чтобы после расщепления двумя рестриктазами образовывались «клеточки» 3' и 5' концов, в частности, чтобы 3' конец сайта расщепления, расположенного рядом с клонированным геном, был «клеточкой», а 5' конец с другой стороны плазмиды «клеточкой».

Экзонуклеаза III (ExoIII) E, соев расщепляет молекулу ДНК только с «клеточкой» 3'-конца,

ни не с выступающим 3'- или любым 5'- концом. Ее добавляют в реакцию смесь после инкубирования ДНК с двумя рестриктазами, и она защищает от усорченного 3'-конца цепи по одному нуклеотид. Через определенное время реакции останавливают и используют пробел с помощью фермента Клякса ДНК-полимераза I, используя смесь обычных четырех дезоксирибонуклеотидов с добавлением азидата одного из них. В результате получают плазмиды, содержащие ген-мишень, в одном или нескольких сайтах которого находится одно соответствующее нуклеотид. Они трансформируют клетки *E. coli*. Плазмиды реплицируются, а в клонированный ген включают нуклеотид, отличный от такового в исходном гене.

Кроме описанного выше, для случайного мутагенеза используют и другие методы. Например один из вариантов сайт-специфично-направленного мутагенеза с применением ДНК-фига M13. В этом случае опранкой для синтеза ДНК служит смесь олигонуклеотидов, содержащих случайные аманы. В результате получают библиотеку клонов, несущих множество мутаций в различных сайтах. Недостаток подхода, при котором в клонированном гене образуется большее число случайных мутаций, состоит в необходимости тестирования большого числа клонов для идентификации того, который детерминировал бы синтез нужного белка. Это весьма неприятно

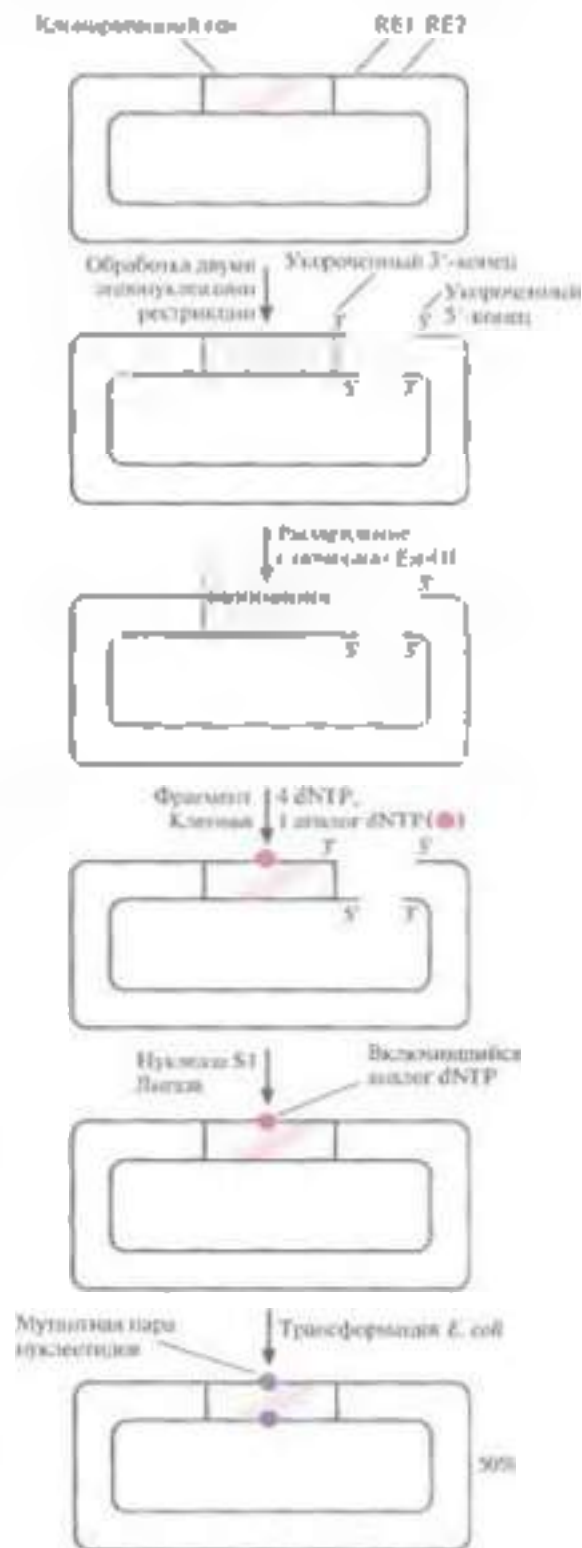


Рис. 8.7. Внесение случайных мутаций в клонированный ген Клякса, несущий клонированный ген, расщепленный рестриктазами RE1 и RE2, в результате чего образуются сайты 3' и сайты 5'-укороченные концы (по соответствию один 3' и один 5' выступающие концы). Затем его обрабатывают ферментом Клякса и смесь обычных рестриктаз ДНК только с усорченного 3'-конца, удалив по одному нуклеотиду. Через определенное время реакцию останавливают и используют пр обрабатывающийся пробел с помощью фермента Клякса ДНК-полимераза I *E. coli*. При этом в реакцию добавляют азидат одного из четырех дезоксирибонуклеотидов (dNTP) N₃ и в необходимом количестве смеси обычных четырех дезоксирибонуклеотидов (dNTP) для образования гетеродуплекса с помощью ДНК-полимераза I и трансформируют клетки *E. coli*. При последующей репликацией векторной ДНК в клонированную цепь включается нуклеотид, отличный от исходного, в том сайте, где находится одно нуклеотид. В результате и клонированный ген несет мутацию.

здоров, но зачастую только так можно выявить белки, обладающие новыми свойствами. Как только эта задача решена, определяются нужную нуклеотидную последовательность соответствующего клонированного гена и идентифицируют соответствующий сайт(сайты).

Углубление белково-

На долю 20 из многих тысяч изученных и охарактеризованных ферментов приходится более 90% всех ферментов, используемых в настоящее время в промышленности. В табл. 8.1 перечислены некоторые наиболее важные из них и указана область их применения. Остальные ферменты не используются потому, что приносящая им актуальность не удовлетворяет требованиям, предъявляемым высокоспециализированными процессами, протекающими *in vitro*. Большинство ферментов быстро денатурируют при высокой температуре и в присутствии органических растворителей, а именно в этих условиях протекают многие промышленные процессы. Конечно,

те же стабильные ферменты можно использовать и в биотехнологии микроорганизмов, однако это направление не всегда выгодно по сравнению с применением таких ферментов, которые можно приобрести в готовом виде. Поэтому эти ферменты можно использовать при проведении анализа смеси мутантов и селекционировать соответствующие.

Образование допептидных дисульфидных связей

Термостабильность белковых молекул можно повысить, внеся в них изменения, благодаря которым они дольше не разворачиваются при повышенной температуре. Кроме того, такие термостабильные белки часто не разрушаются в органических растворителях и при нефитологических условиях (например, при экстремальных pH). К значительному повышению стабильности белковой молекулы может привести образование в ней дополнительных дисульфидных связей. Основная проблема здесь заключается в том, чтобы эти связи не мешали нормальному функционированию белка. В одном из экспериментов при помощи онтогенеза направленного мутагенеза были созданы шесть вариантов лизоцима фазы T4 с новыми внутримолекулярными дисульфидными связями. Для этого два, четыре или шесть специфических аминокислотных остатков в полипептидной цепи были заменены на остатки цистеина, в результате чего образовалась одна, две и три дисульфидных связи соответственно (табл. 8.2).

Аминокислотные остатки, замененные на остатки цистеина, располагались в активном ферменте близко друг к другу, так что при образовании новых дисульфидных связей общая конформация молекулы существенно не изменялась. Кроме того, они находились вне активного центра фермента — области, наиболее чувствительной к малейшим изменениям конформации. Связи образовывались между остатками 3 и 97, 9 и 164, 21 и 142 (начало нумерации с N-конца).

После мутагенеза мутантные формы идентифицировали и экспрессировали в *E. coli*, реконбирантные белки очищали и определяли их ферментативную активность и термостабильность (табл. 8.2). Последняя обычно маркируется температурой, при которой молекула денатурирует на 50%; степень денатурации определяется

Таблица 8.1. Некоторые ферменты и области их применения

Фермент	Применение
α-Амиллаза	Пивоварение, производство спирта
Аминоксилаза	Получение L-аминокислот
Бромелайн	Размягчение мяса, осветление соков
Каталаза	Антиоксидант в соевых и других употребительно пищевых продуктах
Целлюлоза	Получение спирта и глюкозы
Фитин	Размягчение мяса, осветление соков
Глюкоксилаза	Пивоварение, производство спирта
Глюкозооксидаза	Производство сыров с высоким содержанием фруктозы
Глюкозооксидаза	Антиоксидант в соевых и других употребительно пищевых продуктах
Инувертин	Извлечение сахарозы
Лактаза	Угущивание сливок, сыров, глазирование
Липаза	Сыростроение, пастилизация, производство сыра
Папаин	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производство спирта
Протеаза	Денатурация, производство спирта
Ренин	Сыростроение

Таблица 2. 4 варианта аминокислоты I в окислительных парах, полученных с помощью метода окисления¹

Фермент	142-валентные аминокислоты муцигена						Термостабильность		t, °C	
	3	4	73	54	91	142	5	5		
Дрожжи (10%)	W	W	Tr	Cys	C	Tr	Leu	0	140	43,9
Пивные дрожжи (10%)	W	Tr	Tr	Tr	Ala	Tr	Leu	0	140	—
A	Tr	Tr	Tr	Tr	Cys	Tr	Leu	1	95	46,7
B	Tr	Cys	Tr	Tr	Ala	Tr	—	1	110	48,1
C	Tr	Tr	Cys	Tr	Ala	Cys	Leu	1	0	42,8
D	Cys	Cys	Tr	Tr	Cys	Tr	Cys	2	95	57,6
E	Tr	Cys	Cys	Tr	Ala	Cys	Cys	2	0	38,9
F	Cys	Cys	Cys	Tr	Cys	Cys	Cys	3	0	45,4

* По данным работы Malmqvist et al. *Appl. Biochem.* 3:62-70, 1981.

но и окислительной разности раствора белка. Исходя из (таблицы) формы пептида 142-валентные или свободные остатки цистеина, не участвующие в образовании дисульфидных связей. У фермента так называемого «осциллирующего типа» они связаны на остатках Tr и Ala, при этом активность и термостабильность фермента остаются прежними. Исследования «осциллирующего типа» служила стандартом при сравнении карбоната с неопределенными термостабильными дисульфидными связями в также исследуемых образцах (случайные дисульфидные связи между свободными остатками цистеина и остатками, присутствующими в пептидном белке).

Результаты этого эксперимента показали, что термостабильность фермента повышается при образовании связей дисульфидных связей, при этом наиболее термостабильным является белок с максимальным числом этих связей. Однако наиболее активными (С, Е и F), будут более термостабильными, чем другими ферментами или фермент «осциллирующего типа», не обладающий ферментативной активностью. Возможно, это обуславливается незначительным конформационным изменением при образовании дисульфидных связей между остатками 21 и 142 Хотя свободные остатки белков с помощью метода окисления являются частью простого собой эти процессы (т. е. даются не всегда бывает ясно, является ли именно аминокислота поименована «идеальными» формами), эти данные эксперимент показывают, что получение термостабильных белков с дополнительными дисульфидными связями является реальным.

Была предпринята также попытка исследовать термостабильность муцигена аминокислоты *Aspartic acid* ферменты, который можно использовать при производстве бургера. Одним из этапов этого процесса является удаление гемоглобина из пурпуры с целью ее стабилизации, при этом образуются большие количества токсичных отходов. Обработка зрелой мясной клетчаткой повышает кислотность мясного стабилизатора. К сожалению, перед добавлением ферментов пурпуру обрабатывают горячей водой, и поэтому снижается эффективность мясного стабилизатора к уменьшению количества пурпуры, распадающей на окисление пурпуры клетчаткой мясной «остатки» животного при относительно низких температурах.

Чтобы определить, какие участки пептида пурпуры могут быть введены или для или для дисульфидных связей для стабилизации фермента без нарушения его каталитической активности, использовались компьютерные моделирование пространственной структуры белков. Были получены модели прототипных стабилизаторов в *Aspartic acid*. Все они обладали более высокой термостабильностью, чем муцигенный фермент, и при этом при более высокой активности (при 60 °C, как и муцигенный белок, в этом, содержащий дисульфидную связь между N- и C-концами, был даже в два раза более активным и оставался стабильным 85% своей активности после 2-часовой обработки при 60 °C, в то время как муцигенный фермент полностью утрачивал активность в этих условиях уже через 30 мин). Успех этих экспериментов показывает, что муцигенный стабилизатор можно использовать для повышения термостабильности

ности различных ферментов, если только для них имеются достаточно хорошие репутационно-структурные данные (И тем не менее нецелесообразно утверждать, что термостабильные белки будут широко использоваться при производстве бумаги).

Зависимость активности от pH и температуры

При высокой температуре остатки аспарагина и глутамина могут расщепляться с образованием аммиака. Термостабильные ферменты не разрушаются и испаряются, и глутаминобутироил-амино-аспарагиназа, что приводит к локальным изменениям конфигурации полипептидной цепи и аль-соединение — к утрате активности белком, в котором они находятся.

Чтобы установить, какое влияние оказывает наличие некоторых остатков аспарагина в молекуле трифосфат-киназы *Saccharomyces cerevisiae* на свойства фермента, были выполнены следующие эксперименты. Трифосфат-киназа состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из них содержит два остатка аспарагина, один из которых может превратиться в глутамин (термостабильность белка, по сравнению с тем, как расположена в месте сопряжения субъединиц). При помощи аминокислотной-анализатора были проведены следующие эксперименты в лабораториях JФ и JН (табл. 8.3). Зависит ли от pH и от температуры термостабильности фермента, от аспарагинобути-

кислоту — аспарагина. Фермент, полученный при замене остатков аспарагина на остаток глутаминовой кислоты, оказался не-стабильным даже при повышенной температуре и обладал низкой ферментативной активностью (в табл. 8.3 не представлен).

Следует отметить, что раскомбинированный белок в присутствии кинематического показателя, что существует взаимосвязь корреляции между термостабильностью белка и его устойчивостью к протеолитическому расщеплению. Полученные данные говорят о взаимосвязи со свойствами термостабильных форм других ферментов путем замены местонахождения остатков аспарагина.

Зависимость чисел стабильных сульфидных мостиков

Пожеревый белок, синтезируемый в дрожжевых клетках, иногда складывается менее активно, чем ожидается, и чтобы повысить его активность, можно использовать метку аминокислотами. Например, при экспрессии в *E. coli* кодирующей кодирующей ДНК (кДНК) β-интерферона человека (β-ИФН) белковый продукт обладал в 10 раз меньшей активностью, чем нативный галактилозоновый фермент. При этом β-ИФН синтезировался в довольно большом количестве, однако почти все его молекулы образовывали полимер и более высокомолекулярные неактивные комплексы.

Как показал анализ аминокислотной последовательности гена β-ИФН, в нем присутствуют три остатка цистеина. В отличие от них или исключительно, исключены, участвуют в образовании дисульфидных связей, присущих к образованию димеров и олигомеров в клетках *E. coli*. Но не в клетках человека. Было высказано предположение, что замена одного или нескольких неактивных колоний на сериновые приводит к снижению активности, не обратившего внимания. Серины был выбран потому, что его структура сильно со структурой цистеина и исключением того, что вместо серина содержится кислород (поэтому не может образовываться дисульфидная связь).

Присутствие этих экспериментальных исследований (используя данные инфракрасной спектроскопии молекулярной структуры β-интерферона и были вынуждены справиться со стабильностью

Таблица 8.3 Термостабильность при pH 4 трифосфат-киназы трифосфат-киназы (термостабильности ферментов)¹

Фермент	Получены заменой остатков		Время инкубации, мин
	84	78	
Нативный фермент	Asp	Asp	11
A	Asp	His	31
B	Asp	His	14
C	His	His	21
D	Asp	His	11

¹ По данным по данным Albert et al. Proc. Acad. Sci. USA 73: 673 (1976).

Термостабильность ферментов определяется как время инкубации при 60°C, в течение которого фермент теряет 50% своей активности.

выше для растворимых белков. Иными словами, они не были, какой из трех остатков цистеина был ответствен за формирование межмолекулярных дисульфидных связей. Как следует из приведенной таблицы цистеина, участвующим в образовании дисульфидных связей между молекулами НФФ с аналогичной структурой, было известно, что делало возможным сравнение аминокислотных последовательностей этих двух молекул (рис. 2.2). Как показали результаты анализа, остатки Cys-31 и Cys-141 в НФФ находятся в тех же позициях, что и остатки Cys-29 и Cys-138 в НФФ. Поскольку последние участвуют в образовании дисульфидных связей, было разумно предположить, что Cys-17 в НФФ не включен в формирование таких связей и его можно заменить.

Это предположение оказалось правильным: при синтезе в клетках *E. coli* Sec 17-НФФ мультимерные комплексы не образовывались. Кроме того, этот интерферон обладал такой же увеличенной активностью, как и аутогенный естественный НФФ, и был более стабилен при дансальном хранении, чем нативная форма.

Повышение ферментативной активности

С помощью направленного мутгенеза можно не только повысить стабильность ферментов, но и изменить их каталитическую активность. В настоящее время для существенного и быстрого ферментативной активности является достаточно хорошо охарактеризованного фермента необходимо располагать атомной информацией о геометрии его активного центра. В этом случае можно предсказать, какие замены необходимо произвести для изменения специфичности фермента к данному субстрату.

Возможности данного подхода иллюстрируют результаты эксперимента по изменению специфичности связывания субстрата прироста рНК синтетической *B. subtilis* стрептоиды. Этот фермент катализирует амплитудирование рНК, который специфически связывает иризон ($r\text{PHK}^{12}$), в ходе двухступенчатой реакции

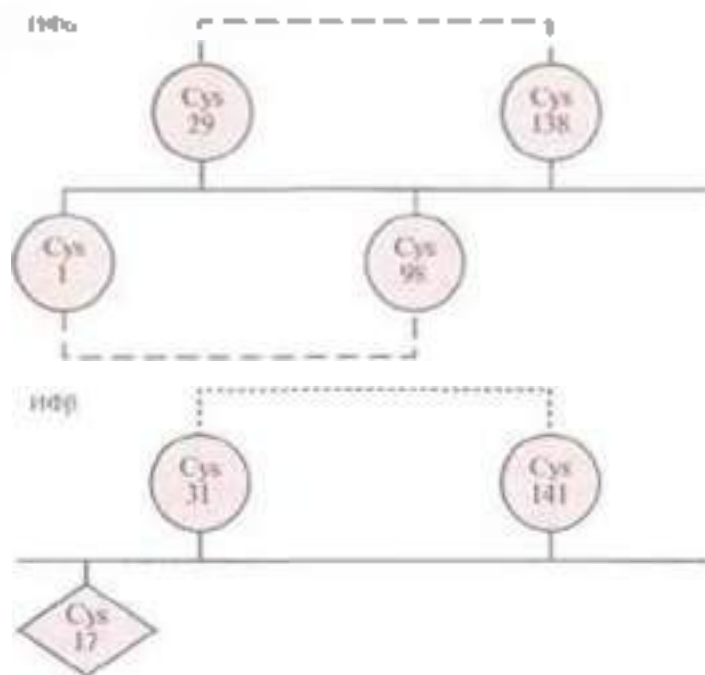


Рис. 2.2 Показание остатков цистеина в аминокислотах НФФ и НФФ, между которыми образуются дисульфидные связи. Выделенные дисульфидные связи (дисульфидные связи) в НФФ образуются (нативными аминокислотами, а предположенными связями в НФФ — замененными

На стадии 1 АТФ активирует тирозин (Tyr), в результате чего образуется комплекс с ферментом тирозинаминазой (Tyr-A) и пирифосфат (PP_i). На стадии 2 тирозинаминаза гидролизует при участии свободной 3' гидроксильной группы молекулы tРНК, тем-по тирозин присоединяется к tРНК с выделением AMP. В ходе обеих реакций субстраты остаются связанными с тирозином tРНК-синтетазой.

Во времени постановки кинетических данных определена пространственная структура тирозин tРНК-синтетазы *R. ruber* [10] и до недавнего времени считалось, что при помощи компьютерного моделирования можно было предсказать кинетические данные и тем самым исследовать активационные участки на активационных ферментах с субстратами. Чтобы проверить правильность предположения, с помощью компьютерного моделирования изучены в том числе tРНК-синтетазы были внесены специфические мутации. Остаток тирозина в положении 51 (Tyr-51) был заменен на остаток аланина или пролина. В мутации фермент гидролизует группу Tyr-51 образуя индифферентную связь с остатком ксантина рибозимом, который ингибирует активность, и предполагалось, что такой же слабый связыватель увеличит скорость фермента к АТФ.

Чтобы определить влияние (или отсутствие) ферменты, определить на кинетические константы. В некоторых случаях изменение связывалось более существенными, чем ожидалось (табл. 8.4). Так, если для Ala-51 фермента константа связывания (K_{d1}) с АТФ увеличилась примерно в два раза без значительного изменения каталитической константы (k_{cat}), то для Phe-51 фермента – более чем в 100 раз. При этом каталити-

ческая эффективность (k_{cat}/K_{d1}) реакции активационного увеличения увеличилась в одиннадцать раз. Результат, полученный для Phe-51 фермента, был неожиданным, поскольку замена тирозина на пролин должна была привести к нарушению (по крайней мере локальному) структуры в сайтах и/или области, что предположительно должно было отрицательно сказаться на связывании субстрата.

Эти данные показывают, что тирозин не только слабый, но и отрицательный результат специфических активационных данных, с которыми специфично связывание не же можно идентифицировать биохимические группы, вместо которых приводит к увеличению кинетических свойств фермента. Кроме того, стало очевидно, что структура связывания фермента к субстрату, в таком виде, тирозин к субстрату, эффективнее (реакции можно считать по-прежнему) и соответствующим образом в активационный этап.

Измененные потребности ферментов в металлических кофакторах

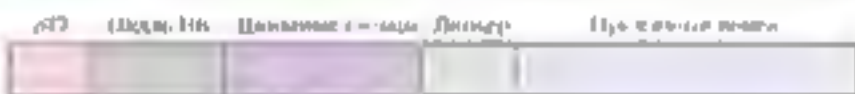
Субтилыны – строгие протеиназы, секретируемые в культурах дрожжей трийносомителлием дрожжами, широко используются в качестве биокатализаторов в промышленности. Все они (почти) сильно зависят от ионов кальция в качестве кофакторов для стабильности. В соответствии, субтилыны основываются в таких промышленных процессах, где участвуют в больших количествах соединения, действующие металлы, в том числе кальций, и в таких условиях субтилыны быстро теряют свою активность. Чтобы решить эту проблему, попытались сначала изменить субтилыны способности связывать кальций, в итоге увеличить стабильность молекул промышленного фермента.

Исследование молекулярного субтилына было начато с идентификации гена КРД *Rorillus orbiculus* [11]. Прежде всего, по большому количеству структурных данных, было решено было определить структуру белка, в этом с использованием аминокислотид-интерактивного мутационного скрининга с использованием пуклестивных, кодирующими участком белковой молекулы от 75

Таблица 8.4. Эффективность активационных, осуществляемых тирозин (Tyr-51) и индифферентных (Ala-51 и Phe-51) тирозин tРНК-синтетазы^a

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	K_{d1} , мМ	k_{cat}/K_{d1}
Tyr-51	4,7	2,5	1,90
Ala-51	4,4	1,2	3,70
Phe-51	1,8	0,019	95,26

^a [10] *Journal of Molecular Biology*, 1997, 277, 110-120



Фиг. 8.9. Геномная структура рестриктазы, кодирующей рестриктазу EcoRI. Белки, кодируемые геном рестриктазы EcoRI

ментом, узнающим сайты длиной 2 и 3 н.п. и больше, так что для получения ломих рестриктаз не обязательно использовать альтернативные генетические инженерные подходы.

Существует весьма интересный класс белков, в молекуле которых присутствуют уникальные структурные домены, содержащие глутамин, Zn^{2+} – так называемые цинковые пальцы. Эти белки связываются со специфической нуклеотидной последовательностью, взаимодействуя своим ц-спиральным участком и близкую бороздку двойной спирали. Так, белок ZNF68 из клеток мышей содержит три цинковых пальца, каждый из которых взаимодействует с определенным кодом ДНК. Поскольку эти пальцы связываются с ДНК независимо друг от друга, их можно объединить в составе сайта и получить таким образом, чтобы связывание происходило с определенным сайтом. Это позволяет создавать нуклеотидные рестриктазы ДНК в уникальных сайтах, объединив нуклеотидные последовательности, кодирующие цинковые пальцы, с частью гена рестриктазы (белка EcoI) бактерии *Flavobacterium obovatum*. Чтобы проверить реальность этого предположения, был создан гибридный ген, кодирующий участок из шести остатков пептида на N-конце белковой молекулы для упрощения синтеза рекомбинантного белка, три цинковых пальца, анкер (SH₂Site), для придания гибкости рекомбинантной молекуле, а также сплитинг часть гена нуклеаза EcoI (рис. 8.9). После очистки рекомбинантного белка N-концевые остатки пептида на были удалены обработкой трипсином.

Бактерии, синтезирующие живущие клетки рестриктазы, взаимодействуют с ДНК на расстоянии с помощью ферментов, метилирующих те участки молекулы, с которыми связывается соответствующий эндонуклеаз рестриктазы. Однако в своем клеточном состоянии не защищен от рекомбинантной рестриктазы EcoI и чтобы предотвратить гибель растущих клеток, синтез гибридного фермента подавляют, помещая ее ген под контроль системы экспрессии бактериофага [7].

В результате этих экспериментов были получены две рекомбинантные эндонуклеазы рестриктазы EcoI. Одна из них расщепляла ДНК Фиг. 8.9 в том сайте, который и ожидается, а вторая – в соседнем сайте и – в меньшей степени – в двух других сайтах. Это не удивительно, поскольку эти цинковые пальцы расположены в основном до и в трех основных триплексах. Хотя эти рекомбинантные ферменты пока нельзя использовать в лаборатории, они являются хорошим примером уникальных нуклеотидных рестриктазы представляется весьма перспективным.

Иммунные специфичности и специфичности ферменты

Фибринолиз является активатором тканевого плазминогена (tPA) – это сериновая протеиназа, состоящая из нескольких доменов, ее нуклеотиды и каталитическая доменная структура. К образованию tPA быстро приводят из системы кринообразования, поэтому его приводит к образованию путем диффузии. Чтобы добиться желаемого терапевтического эффекта, необходимо использовать высокие концентрации фермента, а это может приводить к неспецифическому внутреннему кровоизлиянию. Таким образом, было бы весьма желательно получить плазминулизу фермент tPA, обладающий высокой специфичностью к фибрину и триплексах и не вызывающий кровоизлияния. Белок с такими свойствами можно получить, внося специфические мутации в ген нативного tPA. Заметив Thr-100 на Asp, получили фермент, сохраняющийся в 10 раз дольше, чем нативный вариант. Заметно уменьшилось 296–299 с 1ys-His-Arg-Arg in Ala-Ala-Ala-Ala влияясь существенного повышения скорости фермента к фибрину. Заметно Asp-117 на Glu, получили фермент с такой же фибринолитической активностью, как у нативного фермента. Внося эти три мутации в один белок, получили фермент, обладающий всеми тремя свойствами (табл. 8.6). Чтобы повысить, можно использовать его вместо нативного tPA, нужно провести дополнительные исследования.

Таблица 2.6. Стабильность и активность различных мутантов фермента ФР¹ в

Вариант	Мутация(ы)	Стабильность в часах	Средняя активность	Активность в часах	Стабильность относительно дикого типа
4	His(83) →Asp	10	0,34	0,68	0,56
1	(Val(64)Arg(296-299)→Ala(64)Ala(296-299))	0,25	0,03	0,11	1,11
1	His(83) →Asp, (Val(64)Arg(296-299)→Ala(64)Ala(296-299))	1,3	0,33	0,13	0,65
4	His(83) →Asp, Asp(117) →Ile	1,4	1,0	1,1	1,17
1	(Val(64)Arg(296-299) →Ala(64)Ala(296-299) Asp(117) →Ile)	1,2	1,33	0,16	1,48
6	His(83) →Asp, (Val(64)Arg(296-299) →Ala(64)Ala(296-299) Asp(117) →Ile)	8,1	0,87	0,18	0,93

¹His(83) →Asp, (Val(64)Arg(296-299) →Ala(64)Ala(296-299) Asp(117) →Ile)

Важнейшим свойством фермента ФР является его стабильность. Стабильность фермента ФР в отношении температуры и pH является одним из его важнейших свойств. В настоящее время известно, что фермент ФР обладает высокой стабильностью в отношении температуры и pH. Это свойство фермента ФР является одним из его важнейших свойств. В настоящее время известно, что фермент ФР обладает высокой стабильностью в отношении температуры и pH. Это свойство фермента ФР является одним из его важнейших свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свойства стабильности белка зависят от его аминокислотной цепи, которая в свою очередь определяется аминокислотной последовательностью. Неактивные аминокислоты в определенных местах играют ключевую роль в определении специфичности, термостабильности и других свойств белка, так что замена единственного нуклеотида в гене, кодирующем белок, может привести к исключению в него аминокислоты, приводящему к изменению его активности, либо, наоборот, к улучшению какой-либо специфической свойства. С помощью технологии рекомбинантных ДНК появилась возможность производить специфические замены в кодирующих генах и (или) белках, содержащих важные аминокислоты и заданных сайтов. Такой подход получил название направленной мутации. Как правило, интересующий исследователя ген клонируют в ДНК фага М13 (двухцепочечную форму ДНК этого фага копируют с помощью вирусами-хозяева, ежедневно приращивая систему роста фазы обратного, чтобы в ген-мишень был встроена определенная нуклеотидная последовательность. Затем трансформировав двучепочечными ДНК М13 клетки *E. coli*. Часть образующихся в клетках фаговых частиц несет ген, содержащий фрагмент мутации. Такие частицы идентифицируют, встраивают мутантный ген в экспрессирующий вектор, синтезируют белок и определяют его активность. Вносить изменения в кодирующие гены можно также с помощью плазмидных ВЦР (обычно известно, какую

аминокислоту (аминокислоты) необходимо заменить для того, чтобы улучшить то или иное свойство белка-мишени. При этом (предельно тщательно) необходимо учитывать, а не наоборот, а именно - характерный мутации.

Выбор аминокислоты, подлежащей замене, для того, чтобы привести к изменению роли в функционировании белка. Данные об этом получают в виде генетической информации при помощи рентгеновской кристаллографии трехмерной структуры белка. Изменив специфические сайты или целые участки белковой молекулы, можно повысить термостабильность белка, и изменить его чувствительность к pH, специфичность, аллостерическую регуляцию, подверженность к фактору и другим свойствам. Так, термостабильности триофидогенномеры не удалось повысить, изменив аминокислоты в двух позициях. Этот подход можно использовать как для придания новым свойствам уже существующим белкам, так и для создания уникальных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

- Abern T. J., J. I. Casal, G. A. Petosa, A. M. Kibbey, 1987. Control of oligomeric enzymethroughout by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 675-679.
- Kraige J., U. Kibel, J. F. Hansen, G. Dodson, M. T. Hansen, S. Hayward, S. G. Melberg, F. Norris, K. Norris, L. Seal, A. B. Sorenson, H. O. Volgi. 1988. Monomeric mutants obtained

- by protein engineering and their medical implications. *Nature* 333: 679-682.
- Chen K., F. H. Arnold. 1991. Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *Bio/Technology* 9: 1073-1077.
- Dong W. P., J. A. Nickbarg. 1992. Site directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200: 81-88.
- Gebshichter J., F. Witney, P. Yockenbery. 1987. Efficient site-directed in vitro mutagenesis. *Gen Techniques* 5: 786-791.
- Herlihy S., M. Kacera. 1990. A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. *Gene* 94: 143-147.
- Hermes J. B., S. M. Parikh, S. C. Blacklow, H. Kogler, J. R. Knowles. 1989. A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxynucleotide primers. *Gene* 84: 143-151.
- Key B. A., N. F. Pank, C. J. Reffan, J. Berleau, H. Njuyen, A. Chow, J. Lal, L. Peris, C. Pater, J. Ogas, T. Echeserry, U. Hussain, W. F. Bennett. 1994. A faster acting and more potent form of tissue plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3670-3674.
- Kim Y.-G., J. Choi, S. Chandrasegaran. 1990. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusion to FokI cleavage domain. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 87: 1156-1160.
- Kirchhoff F., H. C. Desmolders. 1995. Random mutagenesis of short target DNA sequences via PCR with degenerate oligonucleotides. *Methods Mol. Biol.* 57: 323-333.
- Landt O., H.-P. Gromm, J. Haber. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 94: 125-128.
- Mark D. E., S. D. Lee, A. A. Creasey, R. Yamamoto, L. S. Liu. 1984. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc Natl Acad. Sci USA* 81: 5662-5666.
- Matsuzawa M., G. Nisner, B. W. Mathews. 1989. Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds. *Nature* 342: 291-293.
- Nomob Y., T. Schiguchi. 1990. Protein engineering for thermostability. *Trends Biotechnol* 8: 16-20.
- Pfechock M. P., R. N. Hars. 1994. Oligonucleotide design and optimized protocol for site-directed mutagenesis. *Bio Techniques* 16: 702-707.
- Shimizu H., Y. Shimura. 1988. A rapid and efficient method for targeted random mutagenesis. *Gene* 64: 313-319.
- Soult M. 1985. In vitro mutagenesis. *Annu Rev Genet.* 19: 423-462.
- Strasberg S. L., P. A. Alexander, D. T. Gallagher, G. L. Gilland, H. L. Barnett, P. N. Bryan. 1995. Directed evolution of a subtilisin with substrate-independent stability. *Bio/Technology* 13: 669-673.
- Wakarchuk W. W., W. L. Soag, H. L. Campbell, A. Cunningham, D. C. Watson, M. Yaguchi. 1994. Thermostabilization of the *Bacillus cereus* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Eng* 7: 1379-1386.
- Wetzel R., L. J. Perry, C. Yelless. 1991. Mutations in human interferon gamma affecting infection body formation identified by a general immune chemical screen. *Bio/Technology* 9: 731-737.
- Williamson A. J., A. R. Fersht, D. M. Blow, P. Carter, G. Winter. 1984. A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering. *Nature* 307: 187-188.
- Zoller M. J., M. Smith. 1982. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 10: 6467-6500.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие физические и химические свойства ферментов можно изменить с помощью направленного мутагенеза?
2. Предположим, что вы клонируете и культивируете ген, экспрессирующийся в *E. coli*, и хотите изменить его активность. Опишите в результате применения стандартного метода мутагенеза с использованием ДНК M13 по ряду температурных режимов лишь увеличивая часть клонов приобрести мутантный ген-инженер, а эффективность из них содержит интактный ген. Как увеличить долю клонов, содержащих ДНК с нужной мутацией?
3. Предположим, что вы выбрали ген фермента, синтезирующегося в *E. coli*. Опишите стратегию изменения каталитической активности этого фермента, применяя во

внимание тот факт, что вы знаете нуклеотидную последовательность кодирующего его гена, но не знаете, какой из участвующих молекул ферментов ответствен за каталитическую активность.

4. Каковы преимущества и недостатки олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием бактериофага M13 и PCR?
5. Опишите стратегию олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием плазмидной ДНК.
6. Как, используя «вырожденные» примеры, можно вносить случайные мутации в ДНК?
7. Опишите стратегию повышения стабильности белка, в котором а) отсутствуют остатки цистеина; б) присутствует нечетное число остатков цистеина.
8. Как влияет замена аспарагина на другой аминокислотный остаток на стабильность белка?
9. Каким образом можно изменить потребность фермента в кофакторах?
10. Как вы будете изменить каталитическую активность или субстратную специфичность фермента, ген которого вы выделили? В чем смысл этой процедуры?

Молекулярная биотехнология микробиологических систем

С развитием технологии рекомбинантных ДНК появилась возможность более эффективно использовать многие полезные свойства микроорганизмов. В ч. II мы рассмотрим некоторые примеры практического применения микробиологических систем, модифицированных методами генной инженерии.

С помощью современных генетических методов биологи научились превращать бактерии в своеобразные «биологические фабрики» по производству белковых препаратов (например, рестризирующих эндонуклеаз), различных химических соединений, аминокислот, антибиотиков и т. д. Клонировав в бактериальных клетках специфические гены, они создают новые пути биосинтеза для получения уникальных метаболитов, применяют клонированные гены болезнетворных микроорганизмов в качестве зондов для диагностики заболеваний человека и домашних животных, используют инактивированные гены для получения безопасных и эффективных вакцин.

Методами генной инженерии можно усиливать природную способность определенных видов бактерий к осуществлению специфических биохимических процессов. Например, уже получены штаммы бактерий, которые более эффективно разрушают токсичные отходы, загрязняющие окружающую среду, способствуют ускорению роста сельскохозяйственных культур, «фиксируют» азот, расширяют целлюлозу до низкомолекулярных углеводных соединений, уничтожают вредных насекомых.

Часто думают, что выращивание больших количеств микрорганализмов представляет собой рутинную процедуру. Однако для успешного получения рекомбинантных белков в промышленных масштабах необходимо контролировать множество параметров, от которых зависит рост синтезирующих их микроорганизмов и чистота получаемых продуктов.

Молекулярная диагностика

Успехи современной медицины и сельского хозяйства часто зависят от того, удастся ли обнаружить специфические вирусы, бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы, белки и низкомолекулярные соединения в организме человека или животного, в растениях, воде или почве. Например, профилактику и лечение любого инфекционного заболевания значительно облегчает ранняя и точная идентификация возбудителя его патогенного микроорганизма. Для проведения многих диагностических процедур

необходимо сначала вырастить культуру патогенным патогенного микроорганизма и лишь затем проанализировать спектр его физиологических свойств. Хотя подобные тесты весьма эффективны и обладают достаточно высокой специфичностью, они часто занимают много времени и являются дорогостоящими. Это относится к идентификации бактерий, и паразитических микроорганизмов (табл. 9.1). Кроме того, весьма ограниченна возможность выявления тех патогенных микроорганизмов, которые пло-

мо растут в культуре либо вообще не видны в культуре. В качестве примера можно привести облигатных внутриклеточных паразитов *Mycobacteria tuberculosis*, которые вызывают туберкулез, передающуюся воздушно-пылевым путем и распространяющуюся в Северном Америке и Европе. Хотя давно трудно диагностировать инфекцию для этого необходимая переносимая культура клеток. При этом часто получают ложноположительные результаты (т.е. ложно диагностируют отсутствие микроорганизма), в результате чего не проводится адекватное лечение. Безусловно, если для выявления микроорганизма необходимо выращивать его в культуре, то рутинной может стать активациями лишь несколько из всех известных патогенных микроорганизмов. Чтобы устранить это приращиваемое ограничение, были разработаны методы молекулярной диагностики, в основе которых лежит иммунологические анализы или методы обнаружения специфической ДНК.

Любой метод выявления патогенных микроорганизмов должен быть достаточно простым и обладать высокой специфичностью и чувствительностью. Специфичный биохимический тест должен давать положительный ответ только на микроорганизм (или молекулу-мишень, чувствительный обнаруживать очень малые количества такой мишени даже на фоне других микроорганизмов или молекул, выражающих образцы. Простота метода подразумевает, что он является достаточно продуктивным, эффективным и недорогим для рутинного применения.

По оценкам специалистов, объем мирового рынка иммунологических тестов в 1993 г. составил 3,4 млрд. долл. США и в ближайшие 10-15 лет будет подниматься на 5-10% ежегодно. В 1994 г. объем мирового рынка ДНК-диагностических тестов был равен примерно 30 млрд. долл., а в 2000 г. он, по-видимому, составит 600 млрд. долл., а к 2004 г. - 2 млрд. долл. В этом смысле мы обеспечим притягательность методов молекулярной диагностики и сферу их применения.

Методы иммунодиагностики

Многие иммунологические системы детекции обладают высокой чувствительностью и специфичностью, являясь в то же время достаточно

простыми. Они широко используются для тестирования лекарственных препаратов, инфекций и мониторинга различных экологических проблем, определены специфические метаболитов, идентификации и контроля патогенных микроорганизмов, но имеют в свои ограничения. Если целевой-мишенью является белок, то необходимо обеспечить высвобождение антигена с его генов и создать условия, в которых не происходит маскирование или блокирование сайта связывания с антигеном.

Традиционные процедуры диагностики возбудителей инфекции опираются либо на набор характеристика патогенного микроорганизма, либо, что предпочтительнее, на одну уникальную, легко выявляемую особенность. Классические микробиологические анализы (т.е. специфичный набор биохимических характеристик, при помощи которых можно будет типифицировать обнаруживаемый патогенный микроорганизм). Например, некоторые штаммы диплококков вырабатывают специфические ферментативные соединения, которые и используются для выявления в биохимическом образце. Часто подобную маркерную молекулу можно выявить непосредственно, введя соответствующий биохимический анализ. Но такой подход неизбежно приведет к увеличению числа необходимых лабораторных систем детекции патогенных микроорганизмов. Более предпочтительным был бы универсальный метод, позволяющий выявлять любую маркерную молекулу независимо от ее химической природы. Именно таков является метод, основанный на идентификации каталитической активности.

Ферментативный иммуносорбентный анализ

Существует целый ряд вариантов, позволяющих определить, применимо ли соотношение антигена с соответствующим антителом (или наоборот) ферментативный иммуносорбентный анализ (ELISA), который часто используется для диагностики. Процедура включает следующие этапы (рис. 9.1):

1. Образец, в котором могут обнаруживаться специфическую молекулу или микроорганизм, фиксируют на твердой подложке, например на пластинчатой микролитровой чашке планшета, обычно имеющей 96 лунок (рис. 9.1, А)

2. К фиксированному образцу прибавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело), затем промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы первого антитела (рис. 9.1, Б)
3. Добавляют второе антитело, которое специфически связывается с первым антителом и не взаимодействует с маркерной молекулой (рис. 9.1, В). К этому антителу присоединен фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза или уреаза), катализирующий превращение неокрашенного субстрата в ок-

рашенный продукт. Промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы второго антитела-фермента.

4. Добавляют неокрашенный субстрат (рис. 9.1, Г)
5. Присутствие качественного или количественно определенного окрашенного продукта.

Если первое антитело не связывается с маркерной молекулой, то оно удалится при первом промывании. Поскольку при этом конъюгату второе антитело-фермент не с чем связываться, он удалится при втором промывании, и образ

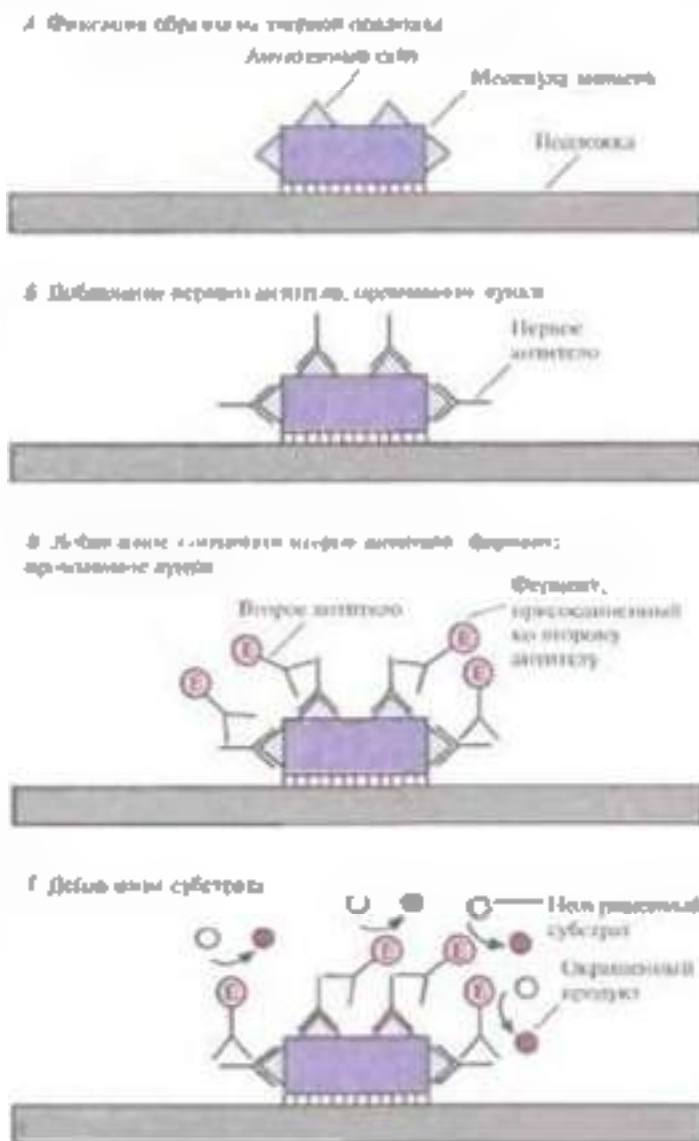


Рис. 9.1. Обнаружение антигена-маркера в принципе ELISA. E фермент присоединенный ко второму антителу.

остается неограниченным. Если связывание с мишенью происходит, то второе анти тело при соединении в термому, и компьютеризированный фермент катализирует образование легко регистрируемого окрашенного продукта.

Основной принцип ELISA – специфическое связывание первого антитела с мишенью. Если молекула мишень представляет собой белок, то его очищенный препарат обычно используют для получения антител, при помощи колумбной ионо и выщелочивания мишень. Антитела, которые образуются в сыворотке (антисыворотке) крови иммунизированного животного (обычно крыска), связываются с разными антигенами детерминантами (эпитопами) молекулы мишени. Какую смесь антител называют полноклеточным препаратом. Используются полноклеточных антител имеет два недостатка, существенных для некоторых методов диагностики: 1) содержание отдельных антител в полноклеточном препарате может варьировать от одной партии к другой, 2) полноклеточных антител нельзя применять, если необходимо различить две сходные мишени, т.е. когда требуется (мишень) и негенотипизированной (не мишень) формы различия единственной детерминантой. Однако эти проблемы сейчас разрешены, поскольку сейчас научились получать препараты антител, выработанных к одной антигенной детерминанте, т.е. препараты моноклональных антител.

Мишень и мишень антитела

У млекопитающих в теле непрерывно вырабатываются сложный набор клеточных систем, защищающих организм от токсичных веществ и инфекционных агентов. К числу их число защитной реакции является индуцированной выработкой клеток антигенными системами специфиче ских белков (антител), которые взаимодействуют с чужеродными микроорганизмами (антигенами) и при помощи других белков иммунной системы, включая клетки дендритов, нейтрофилов и макрофагов. В ответ на иммунологический стимул каждая антигенпрезентирующая клетка синтезирует и выделяет специфиче ский белок, который с помощью средств распознавания взаимодействует с мишенью, антигенным детерминантом молекулы антигена. Поскольку в мо-

лекуле антигена обычно присутствует несколько разных эпитопов, антитела против каждого из них вырабатываются отдельными клетками иммунной системы. Таким образом, каждое из которых взаимодействует с разными антигенами, называют поликлональным.

Уже в начале нынешнего века, когда о роли специфичности антител ничего не было известно, что их специфичность можно использовать для выявления инфекции. Позже антитела стали применять в качестве диагностического инструмента для выявления токсичных соединений в клинических образцах. К сожалению, эффективность первичных поликлональных антител варьирует от одной партии к другой, поскольку в сыворотках при проведении иммунизации антителопроизводящие клетки сильнее стимулируются одними детерминантами данной антигена, а в других иммунная система активнее отвечает на другие эпитопы того же антигена. Это имеет влияние на способность разных препаратов нейтрализовать антителы посылать отдельные эпитопы обладают разной эффективностью (стимулирующей способностью). Следовательно, в данной партии поликлональных антител может содержаться мало молекул, направленных против основного эпитопа, а в результате она будет менее эффективной, чем предыдущая.

Следовательно, для практического применения антител в качестве диагностического инструмента или компонента терапевтических средств необходимо было создать такую линию клеток, которая росла бы в культуре и производила антитела одного типа, обладающие высоким уровнем специфичности к антигену-мишеню, – моноклональные антитела. Подобная клеточная линия могла бы быть получена из гибридом неспецифиче ской молекулы антител. К сожалению, В-лимфоциты (В-клетки), синтезирующие антитела, не могут воспроизводиться в культуре. Решение данной проблемы выдвинулось в создании гибридной клетки. Получив генетическую составляющую от В-клетки, она могла бы выработать антитела, а приобрести способность к делению от клеток совместного типа – раба в культуре. Было известно, что В-лимфоциты иногда перерождаются и становятся раковыми (миеломными) клетками, приобретающими

способны к росту в культуре и способны в то же время синтезировать В-клетки. Так клетками миелоиды, в первую очередь те, которые не им ребитываются антител, стали кандидатками на сравнение с антигенопродуцирующими В-клетками В-серии 20 к 1. Они и в итоге стали реальными.

Обработка и отбор гибридных клеток

Первый шаг в процессе получения гибридной клеточной линии, продуцирующей антитела определенного состава во выбраной мышиной клетке. После ряда манипуляций, проведенных в темноте петкошкой пелелы, промывкой, помещают на различные жидкостные мышиные стволы. Если ствол развится, то животные умерщвляют, и из мышечной селезенки, промывают ее, и смешивают и немедленно приступают к высвобождению единичных клеток, среди которых находится и антигенопродуцирующая В-клетка. Вспесь клеток смешивают сывороткой со плоскими человеческими клетками, дефектными по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (HGPRT). Комбинированную взвесь в течение нескольких минут инкубируют в 35% -ном поливинилпирролидоне, а затем оседают в среду, содержащую гипоксантин, тимидин и тимидин (среда ГАТ).

Обработка поливинилпирролидонем обеспечивает выживание клеток, так же менее чувствительных к радиации в клеточной культуре. Важным событием в смеси присутствия клеток миелоиды, селезенки, а также смешивания клеток миелоиды-селезенки, миелоиды миелоиды, селезенки-селезенки. Только в среде ГАТ растут только гибридные клетки миелоиды-селезенки, все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать. Клетки селезенки и смешивания клеток селезенки-селезенки вообще не растут в культуре, а миелоидные клетки HGPRT и смешивания клеток миелоиды-миелоиды не могут использовать гипоксантин в качестве предшественника в процессе синтеза пуриновых оснований (гуанин и аденин, без которых невозможно синтез нуклеиновых кислот). Но у нас есть другой естественный путь синтеза пуринов — при участии дигидрофолатредуктазы, поэтому в составе среды и наличие антибиотиков, ингибирующих активность этого фермента. Таким образом, миелоидные клетки

HGPRT и смешивания клеток миелоиды-миелоиды не могут синтезировать пурины в среде ГАТ и погибают.

Смешивание клеток селезенки-миелоиды растет в среде ГАТ (посильно: 1) клетки селезенки производят функциональную HGPRT, которая может утилизировать в синтез пуринов в среде несмотря на блокирование синтеза пуринов с участием дигидрофолатредуктазы антибиотиком, 2) клетки миелоиды способны активно делиться. Таким образом, необходимым для устранения блокирования в синтезе пуринов, обусловленного ингибированием дигидрофолатредуктазы. На 10-14 сутки после сливания клеток в среде ГАТ остаются и растут только смешивания клеток селезенки-миелоиды. Их в том числе в лунке пластинок микролитровальным фликсом и высеивают на полую культуральную среду без ГАТ.

Идентификация гибридных клеточных линий, секретирующая специфические антитела

Теперь необходимо идентифицировать гибридные клетки, вырабатывающие антитела в значительном количестве. Для этого обычно проводят скрининг культуральной среды собранной секреторными антителами. Среду из лунки, в которой есть растущие клетки, сифонит и переносит в лунку другой микролитровой лунки, предварительно очищенные сывороткой антитела миелоиды. Если в культуральной среде выявляют антитела (первое антитело), то оно смешивают с другим и остаются в лунке после из промывания. Затем в лунке добавляет второе антитело, специфичное к мышиным антителам. Оно будет присоединяться к любому первому антителу, связанному с антителом.

А используемый иммуноглобулин второго антитела предварительно присоединяют фермент, который превращает неокрашенный субстрат в окрашенное соединение. Изменение цвета раствора ионизирующим излучением говорит о том, что в исходной культуральной среде собрано антитело, специфичное к данному антителу (рис. 9.7). Если же такое антитело в среде отсутствовало, то второму антителу не с чем будет

сливаются и они сливаются при первом прикосновении. Субстрат в таких лунках остается неокрашенным.

Лунки пестрой микроплазмовидной окраски, среда (с микробом) дает положительный им-

мунный ответ (иммунореактив), могут содержать смесь слившихся клеток. Чтобы исключить ложные, представляющие собой одну клетку (клетки), клеточную суспензию из таких лунок помещают в культуральную среду и высеивают в другие лун-

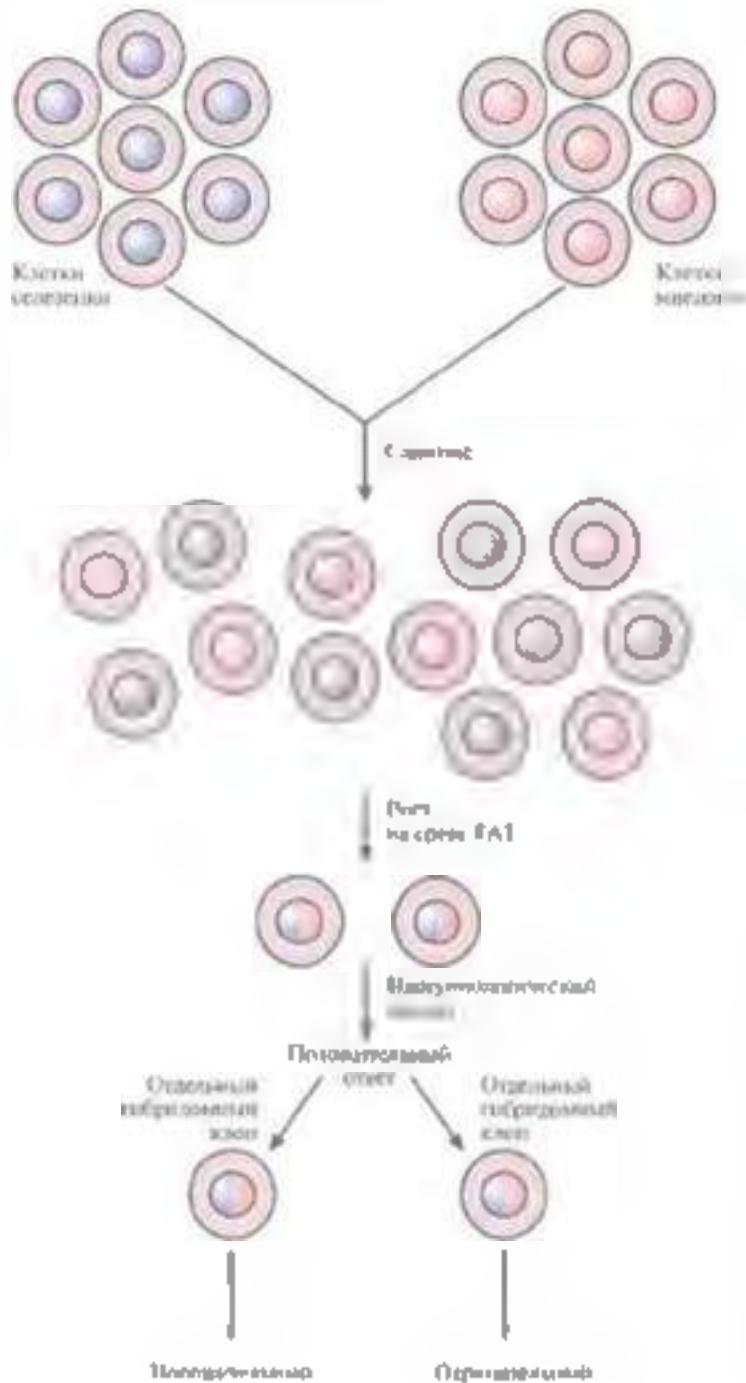


Рис. 9.2. Слияние клеток, вырабатывающих моноклональные антитела. Выходит клетка репродукции мышья, микроплазмовидной окраски, не способная к делению, и кровяная не сливается с клетками мышья. Не вырабатывают антитела. Слиявшиеся клетки отбирают по способности к росту на среде F1 (гипонатриевый, микробный, трипановый). Клетки, вырабатывающие специфические антитела в микроплазмовидной окраске (клетки гибридомы), идентифицируют на микробиологическом ответе и субкультивируют, чтобы получить отдельные клоны. Из гибридомы, растущей в культуре и секретирующей специфические ТИД, получают моноклональные антитела.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Уровень специфических иммуноглобулинов
 Гормональный фон
 Липидный состав и жирность
 Ферментативная активность
 Тиреоидный статус
 Протеинемия

МАРКЕРЫ ОПУХОДЕЙ

Канцеро-эмбриональный антиген
 (цифровой вариант традиционных методов
 иммунохимии)

Родовые факторы риска метастазов

ИНТОКСИКИ

Интерлейкины I-II
 Колонистимулирующий фактор

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТОВ

Теофиллин
 Гепталин
 Циметидин

РАЗЛИЧНЫЕ СЕРИИ ИЛИ

Тиреостатики
 Ингибиторы 5 α
 Ферменты
 Препараты против опухоли
 Гормоны

ИДИОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Хлороформ
 Гидроксид
 Кристаллы
 Гематин
 Лецитин
 Сидерин

Рис. 9.3. Перспективные моноклональные антитела для маркировки различных соединений в диагностике и физиологии человека.

ки. После культивирования полученных клонов среды вновь тестируют, определяя, какой из клеточных линий (гибридом) продуцирует моноклональные антитела, распознающие антиген-мишень. В том случае, когда получают более одного специфичный гибридомы, проводят дальнейшие исследования, позволяющие определить, направлены ли антитела, вырабатываемые разными клонами, против одной и той же антигенной детерминанты. Каждый клон, продуцирующий моноклональное антитело, можно поддерживать в культуре практически бесконечно. Кроме того, образцы можно заморозить в жидком азоте и использовать их в дальнейшем как источник клеток.

Применение моноклональных антител позволяет существенно повысить специфичность метода ELISA, поскольку они связываются с по-

ним, строго определенным эпитопным сайтом. К настоящему времени получены целой ряд моноклональных антител, которые можно использовать для обнаружения различных соединений в иммунологических микроанализах (рис. 9.3). Альтернативой получению моноклональных антител из культуры гибридомных клеток может быть отбор и размножение моноклональных антител в их чистоте (Fv-фрагменты), например против антигена-мишени, с помощью *E. coli* (см. гл. 10).

Системы ДНК-диагностики

Информация о всем многообразии свойств организмов заключена в его генетическом материале. Так, патогенность бактерий определяется наличием у них специфического гена или набора генов, в результате которого либо человек заболевает в результате заражения определенным геном. Сегмент ДНК детерминирует движимый биологический процесс, имеет строго определенную нуклеотидную последовательность и может служить двойственным маркером.

В отличие многих биотриков и патогенов для молекулярных методов лент гибридомных нуклеиновых кислот - сравнение двух или более ментарных сегментов разных молекул ДНК. Процедуры в общем чертах состоят в следующем.

1. Фиксация одноцепочечной ДНК-мишени на мембранном фильтре
2. Нанесение меченой одноцепочечной ДНК-зонда, которая при определенных условиях (температуре и ионной силе) спаривается с ДНК-мишенью.
3. Промывание фильтра для удаления избытка несвязавшейся меченой ДНК-зонды
4. Детекция гибридных молекул зонд/мишень.

В диагностических тестах, основанных на гибридном нуклеиновых кислот. Ключевыми являются три компонента: ДНК-зонд, ДНК-мишень и метод детекции гибридного сигнала. Система детекции должна быть в высшей степени специфичной и высокочувствительной.

Гибридизационные зонды

Чтобы обеспечить эффективность диагностического теста, гибридирующие ДНК и РНК зонды должны быть высокоспецифичными. Другими словами, необходимо, чтобы зонд гибридизовался только с исходной нуклеотидной последовательностью. Если есть вероятность появления ложноположительных (включая гибридные зонды) или ложноположительных (отсутствие сигнала при наличии нуклеотидной цепи-мишени) или ложноположительных (отсутствие сигнала при наличии нуклеотидной цепи-мишени) результатов, то целесообразность применения теста заметно снижается. Специфичность зонда может проявиться на разных уровнях: они могут «растворять» два и более нуклеотидов, посланных вперёд одной нити или разных зонды. И возможности от ситуации к ситуации могут быть представлены молекулами ДНК или РНК, они могут быть длинными (более 100 нуклеотидов) или короткими (менее 50 нуклеотидов), представлять собой продукт копирования генов, или конкретные ответные гены или их фрагменты.

Зонды получают разными способами. Одним из них состоит в следующем: ДНК патогенного микроорганизма расщепляют с помощью рестриктазы эндонуклеазы и амплируют в полимеразном усилителе. Затем проводят скрининг рекомбинантных плазмид с использованием генной ДНК как патогенной, так и генной геномной нити. Те плазмиды, которые сохранили последовательности, гибридирующиеся только с ДНК патогенного штамма, составляют основу высокоэффективных зондов. После этого проводят ряд дополнительных гибридных с ДНК, выделенными из различных организмов, чтобы удостовериться, что потенциальные зонды не реагируют с ними перекрестной гибридизации. Для определения чувствительности метода как минимум необходимо проверить также на выделенных образцах, в том числе и на синтетических культурах.

Несомненно важно, чтобы ДНК зонды можно было проводить на полимерном материале, без дополнительного его культивирования или выжигания нуклеиновой кислоты, особенно в тех случаях, когда тестируются клинические образцы. Исследованиями с успехом проводят гибриди-

зацию с ДНК мишенями, присутствующими в образцах мочи, мочи, крови, слюны из зева и в тканях без предварительной их очистки. Если специфичность последовательности мишени не исследуемым образом связана с мочью, ее можно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Лабелировка зондов

В качестве примера использования ДНК зондов в диагностике заболеваний можно привести процедуру обнаружения *Mycobacterium tuberculosis*. Этот паразит вызывает туберкулез, наиболее распространенное заболевание среди всего населения Земли. Он инфицирует тригггеры и разрушает их, что приводит к развитию туберкулеза, а в тяжелых случаях и к инвалидности, смерти и другим осложнениям. Чтобы выявить источник инфекции, оценить эффективность лечения, необходимо достаточно чувствительные, простые и недорогие методы. В настоящее время зонды диагностируют с помощью метода радиоизотопной последовательности на уровне нуклеотидов, но трудоемкого и значительного много времени процесса. Иммунологические методы обнаружения *Mycobacterium tuberculosis*, такие как ПЦР, достаточно быстрые и не могут быть использованы, но с их помощью нельзя отличить текущую инфекцию от давней, особенно при этом определяется только наличие антигена и *Mycobacterium tuberculosis* в крови больных.

Для излучающей ДНК зонды (текущей инфекции), т. е. для выявления ДНК в образцах, в качестве основы используется метод зондов (практически последовательности ДНК *P. tuberculosis* Стюарта с помощью ДНК зонда (проводится скрининг библиотек геномной ДНК паразита). Затем отбираются клоны, дающие наиболее интенсивный гибридный сигнал, поскольку именно они предполагают, что содержат высокоэффективные последовательности ДНК, способные к гибридным с ДНК зонда *Mycobacterium tuberculosis*. В качестве специфического зонда мы берем последовательность, гибридирующуюся с ДНК *P. tuberculosis*, но не с ДНК *P. carinii*, *P. carinii* для ДНК человека. С его помощью

иные методы ПЦР-диагностики болезни Чагаса служит дополнением к традиционным, широко используемым методам.

Среди из ПЦР-тестов способом выявления фрагмента ДНК длиной 188 п. н., который присутствует во множестве копий в геноме *T. cruzi*, ни отсутствует в геномной ДНК несвязанной родственной паразитов. После амплификации этот фрагмент без труда обнаруживается с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Незначительно варьируя методику проведения ПЦР (например, изменяя концентрацию ингибиторной активности препаратов), как желают можно использовать для обнаружения ширинки спектра бактерий, вирусов и паразитов.

Нерадиоактивные методы детекции

В биохимическом лаборатории для гибридизации используют меченые меченные коарми либо радиоактивным изотопом, чаще всего ^{32}P . Такие коарми обладают высокой удельной радиоактивностью и обеспечивают хорошие характеристики сигнала. Радиоактивно меченный коарми соединяется с фиксированной на нем ДНК-матрицей, ирригуют гибридами, отмывая несвязанную ДНК-коарми и детектируют метку с помощью радиоавтографии.

Сильно ^{32}P является короткоживущим изотопом, испускающим высокоэнергетическое излучение. при работе с ним необходимо использовать специальные оборудование и обеспечивать безопасную утилизацию отходов. Чтобы обойти эти трудности, были созданы нерадиоактивные системы детекции. Для усиления гибридационного сигнала в этом случае используется ферментативное преобразование хромогенного или флуоресцентного субстрата: первый из них под действием фермента изменяет окраску, а второй испускает свет. В большинстве подобных систем применяются ДНК-зонды, содержащие фиксированные нуклеотиды. Гибридизация и детекция сигнала проводится более или менее стандартным образом.

1. Зонды, меченные биотином, гибридизуют с ДНК-матрицей (рис. 9.4. А)
2. Промывают фиксатор для удаления избытка несвязанного биотина

3. Добавляют авидин (белок куриного яйца) или стрептавидин (бактериальный выдел авидина) (рис. 9.4. Б).
4. Добавляют биотинилированный фермент (целочную фосфатазу или пероксидазу хрена) (рис. 9.4. В).
5. В зависимости от используемого фермента добавляют хромогенный или флуоресцентный субстрат и регистрируют изменение окраски либо флуоресценции, сопровождающую преобразование субстрата в продукт (рис. 9.4. Г).

В качестве альтернативы после гибридизации ДНК с биотинилированным коарми можно добавить уже готовый комплекс стрептавидин-фермент, имеющий сайт связывания с биотином.

Как авидин, так и стрептавидин связываются с биотином очень прочно (константа диссоциации $(K_d = 10^{-15})$); кроме того, каждый из белков имеет четыре независимых биобиндующих сайта, благодаря чему одна молекула авидина или стрептавидина может одновременно присоединять фермент и коарми, меченные биотином. Биотинилирование и связывание со стрептавидином не приводят к снижению ферментативной активности. В хромогенных системах детекции в том месте, где находится гибридная ДНК, под действием фермента образуется непрозрачный краситель, а в флуоресцентных системах — продукт, который испускает свет.

Нерадиоактивные системы детекции обладают и другими преимуществами: биотинилирующая ДНК остается стабильной при комнатной температуре как минимум год; методы регистрации флуоресценции обладают такой же чувствительностью, как и методы регистрации радиоактивного сигнала; детекция испускаемого света при помощи рентгеновской пленки или фотодиода, как и регистрация изменения цвета, занимают несколько часов. По-прежнему, флуоресцентные системы регистрации сигнала, все же более чувствительные, чем хромогенные, и менее инертны все остальные, используемые при ДНК-диагностике. Если при этом применяется ПЦР, то амплифицируемый продукт можно пометить флуоресцентным красителем, присоединив его

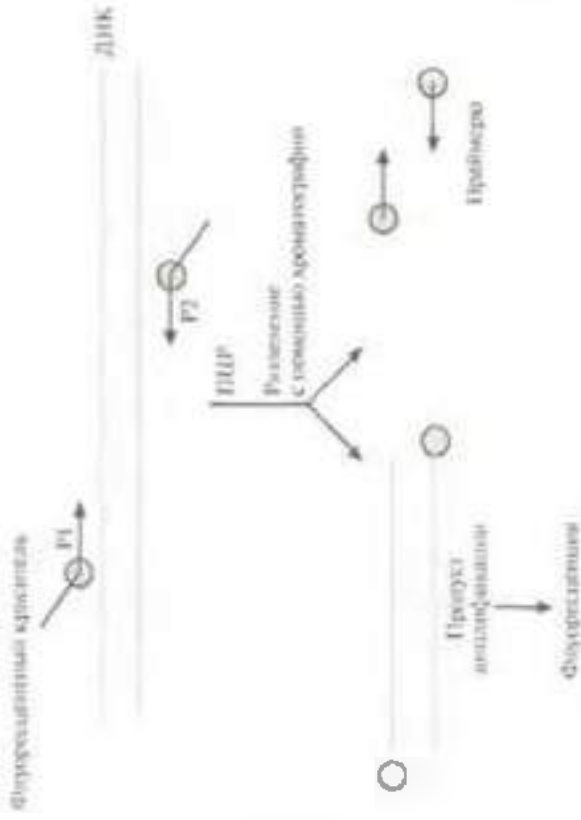


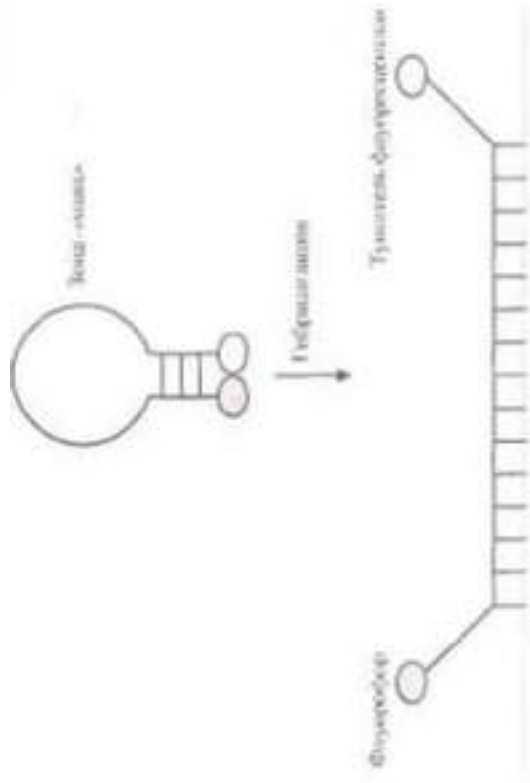
Рис. 9.5. Детекция ПИР-продуктов с помощью флуоресцентного красителя, присоединенного к приборам (F1 и F2).

флуорофора и тушителя, и жид испускает свет. Температура реакционной смеси должна быть близка к комнатной, поэтому при ее нагревании индикатор денатурирует, флуорофор и тушитель расходятся и происходит флуоресценция. Необходимо также, чтобы все 15 нуклеотидов жиды были комплементарны соответствующей последовательности ДНК- или РНК-матрицы.

Геномная дактилоскопия

Метод геномной дактилоскопии (ДНК-пипривание) часто используется в судебной медицине для идентификации биологических образцов. С его помощью можно доказать, что подозреваемый действительно совершил преступление, или, наоборот, что он невиновен. Для проведе-

ДНК-матрица



Флуорофор и тушитель флуоресценции

Рис. 9.6. Гибридизация жиды - «молекулярного зонда» с ДНК-матрицей. Обозначенная область жиды гибридируется с комплементарной последовательностью ДНК-матрицы, это «индикатор» разрабатывается, флуорофор и тушитель флуоресценции прикрепляются к жиде. При этом происходит флуоресценция. Это указывает на то, что между жидой и последовательностью матрицы произошло приращивание гибрида. Из работы Турр, Коппет, Лар, *Biotechnology*, 14: 303-308, 1996, с разрешения

ния ДНК: трипировидини синцити берут часть биоматериала (соскоб с кожи, слюну, кровь), культивируют клетки (например, из эпителия кожи, волос) и определяют, достаточно ли в нем активных ДНК для последующей диагностики. Затем ДНК подвергают эндонуклеазному расщеплению, получившие фрагменты разделяют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозный фильтр. Проводят исследовательскую гибридизацию с четырьмя или пятью разными мечеными зондами, каждый из которых распознает определенную последовательность ДНК (при этом перед гибридизацией со следующим зондом предыдущий полностью удаляют с мембраны). После каждой гибридизации с помощью радиоактивных зондов выявляют появившиеся продукты гибридизации зондов с рестрицированной ДНК, и строят «картинку фрагментов» для всех зондов (рис. 9.7). Каждый этап (гибридизация и радиоавтография) длится от 10 до 14 сут., так что вся процедура может занять много недель и даже несколько месяцев. В качестве зондов обычно используют минисателлитные ДНК: многократно встречающиеся в геноме человека и состоящие из tandemно повторяющихся участков. Длина минитрпа варьирует от 9 до 40 п. н., а их число — от 10 до 30; при этом один и те же минисателлитные последовательности у разных индивидов имеют почти равную длину. Эти различия возникают в результате увеличения или уменьшения числа повторяющихся повторов, но, в отличие, в ряде реплайшинг ДНК. Никаких биологических последствий такие вариации не имеют. Несколько минисателлитных ДНК идентифицируют белых. Ребенок наследует одну минисателлитную последовательность от одного родителя, а другую — от другого.

«ДНК-отпечатки» данного человека представляет собой набор различающихся по длине фрагментов, количество которых минисателлитным последовательностям его генома. Понять большинство различий при этом повторная вероятность того, что в популяции найдется два человека с идентичными «ДНК-отпечатками», равно 10^{-12} – 10^{-16} . Другими словами, характер расположения число минисателлитных ДНК почти столь же индивидуален, как и отпечатки пальцев. Генетическую родственность определяют также при установлении отцовства. Часть полос

«ДНК-отпечатки» ребенка должны соответствовать поясам минисателлитных «отпечатков», а часть отцовского.

Если ДНК в исследуемом образце недостаточно, то она не очень сильно загрязнена, можно амплифицировать небольшие участки минисателлитной ДНК с помощью ПЦР, а затем провести их идентификацию; этот метод более



Рис. 9.7. Использование Southern-гибридизации для судебной идентификации ДНК, модифицированной в крови исследуемого, из крови крови из слюны и из крови ребенка. На рисунке видно, что у ребенка была обнаружена одна и та же рестрицированная эндонуклеазой «лестничная» фрагментов для ДНК, также присутствующая в крови из слюны исследуемого. Наличие ДНК (идентичности и отличия) в «лестничном фрагменте» для ДНК подтверждено.

частытелей, чем определение полиморфизма длины tandemных повторов.

Использование полиморфных ДНК-маркеров

Метод «ДНК-отпечаток» может оказаться удобным и при установлении родства между различными культурами. Одним из вариантов этого метода является использование полиморфных ДНК-маркеров для амплификации случайных фрагментов (random amplified polymorphic DNA, RAPD). Для этого берут произвольные праймеры длиной 9–10 нуклеотидов, не содержащие палиндромных нуклеотидных элементов GC-соотнесение 50–60%, и добавляют их на этапе денатурации к превариатам хромосомной ДНК растений. Каждая ПЦР инициируется одним праймером, который должен быть способен связываться с обеими цепями ДНК-матрицы. Нуклеотидная последовательность всех олигонуклеотидов известна, но каждой из них окажется эффективным только один ПЦР, если праймер гибридизуется с обеими цепями ДНК-матрицы в присутствии окислителя и смеси расплавителя на расстоянии от 100 до 300 п. н. друг от друга, то флуоресцирующий или окрашенный ДНК будет амплифицирован, а

полученный фрагмент можно выделить с помощью геля-электрофореза и визуализировать окислением. Число разных фрагментов ДНК, образующихся при амплификации, зависит от праймера и исходной ДНК. Для одного и того же праймера и ДНК-матрицы продукты амплификации будут каждый раз одинаковыми, а изменятся только набор полученных фрагментов. Таким образом, используя один и тот же набор окислителя и окислительных праймеров, можно сравнивать RAPD-«ДНК-отпечатки» разных растений культур и следовательно, и сами культуры. Для определения родства между двумя очень близкими сортами или культурами растений часто приходится использовать несколько произвольных праймеров с известной нуклеотидной последовательностью (рис. 9.8). Как и все другие молекулярные маркеры, RAPD можно применять для характеристики отдельных растений, отдельных хромосом или генов.

По сравнению с другими методами идентификации сложных ДНК метод RAPD обладает следующими преимуществами: 1) для всех видов растений можно использовать один и тот же (универсальный) набор олигонуклеотидных праймеров; 2) не нужно создавать гетерозисные би-

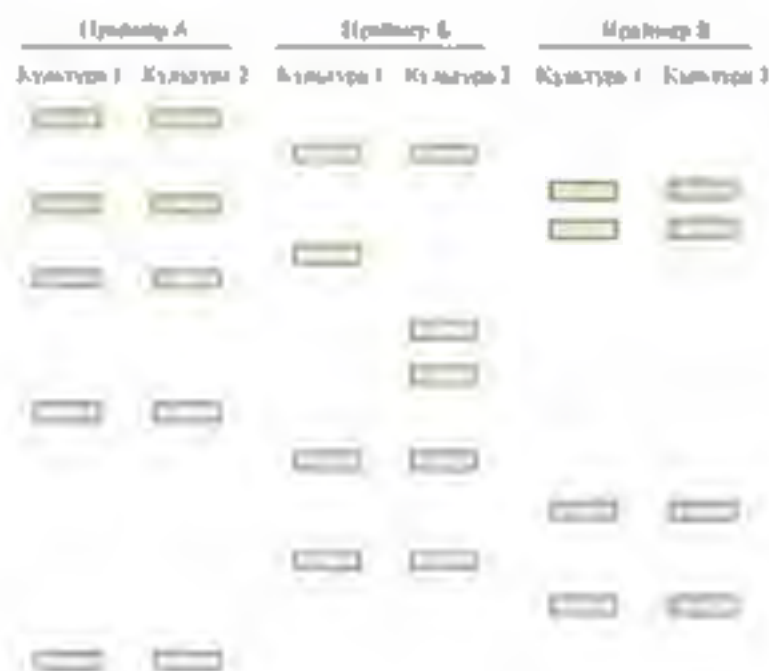


Рис. 9.8. Электрофорез ПЦР-амплифицированных фрагментов растительной ДНК в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидилом. Для амплификации фрагментов ДНК из двух культур использованы три разных произвольных праймера. В случае праймера А и В характер гетерозисного полса в полиакриламидном геле для культур 1 и 2 совпадает, если не использовать праймер Б. В противном случае различается. Таким образом, с помощью праймера Б можно выявить различия между культурами 1 и 2.

нотенды, использовать радиоактивные нуклеотиды (сферидианжик), т. е. можно легко и быстро характеризовать быстрое количество сферидианж; 3) процесс можно автоматизировать. Кроме того, для проведения обычной ПЦР не обязательно иметь присутствие последовательности, исключено использование фрагмента интрона для амплификации. В случае же RFLP амплифицируется только участок генома, содержащий две комплементарные примычки последовательности, которые фланкируют сегмент ДНК длиной от 100 до 3000 н. п.

С помощью метода RFLP удалось отличить друг от друга шесть субпопуляций куркумы и показать, что ПЦР-продукты сферидианж куркумы представляют собой сочетание ПЦР-продуктов родственных интродуцированных RFLP-маркеры используются также для скрининга ринка штаммов *Trichoderma reesei* штаммы, они различаются по количеству «серповидных» у взрослых штаммов. Было установлено различие между интродуцированными (не привнесенными к рынку) штаммами и штаммами (не интродуцированными) штаммами.

Молекулярная диагностика генетических заболеваний

Диагностика наследственных заболеваний человека на генетическом уровне дает ответ на вопрос, наследовали ли обследуемые индивидуумы или их потомки в группу повышенного генетического риска. ДНК-анализ можно использовать для выявления носителей генетически наследственных заболеваний, а также для пренатальной и пресимптоматической диагностики наследственных генетических нарушений.

Тесты на уровне ДНК позволяют безболезненно выявлять специфические мутации. Раньше для этого применялись биохимические методы, основанные на выявлении продукта амплифицированного гена. ДНК-тесты не требуют экспрессии мутантного гена для его выявления, что позволяет разработать системы скрининга для всех моногенных заболеваний.

Серповидноклеточная анемия

Серповидноклеточная анемия – генетическое заболевание, обусловленное заменой одного нуклеотида в кодоне, который соответствует шест-

ой аминокислоте в β -цепи гемоглобина. У индивидов, гомозиготных по мутантному гену (A/S), эритроциты имеют необычную серповидную форму; по сравнению с нормальной конформацией молекулы гемоглобина вследствие замены в кодоне на глубинном уровне нуклеотид мутантного гемоглобина не может с достаточной эффективностью агрегировать в склероз, и эритроциты в капиллярах становятся тяжелыми и прогрессирующим повреждением склероз, мочка, суспензия и другие органы. У гетерозиготных по данному гену (A/S) (носителей генетического заболевания), эритроциты имеют нормальную форму, в некоторых случаях они проявляются лишь в определенных условиях (на большой высоте над уровнем моря либо при сильном напряжении или низких температурах, когда снижается содержание кислорода). Если оба родителя гетерозиготны (имеют генотип A/S), то вероятность того, что их ребенок будет гомозиготным по мутантному гену (S/S) (т. е. будет болен серповидной клеточной анемией), составляет 25%. Ген серповидноклеточной анемии с высокой частотой встречается среди афроамериканцев и индейцев, в то же время встречается редко в Европе. В США проводят скрининг для выявления носителей гена серповидной клеточной анемии, которые могут передать этот ген своим потомкам. Рисками для их потомков являются следующие тесты:

1) наличие одного нуклеотида в β -глобинном гене, приводящего к серповидноклеточной анемии, сопровождается амплификацией сайта для рестрикции (сайта) эндонуклеазы SmaI. Этот фермент узнает последовательность CCGAGG и рестрицирует молекулу ДНК между основаниями C и G (N – любой нуклеотид, кроме G). В нормальном гене эта последовательность имеет вид CCTGAGG, а в гене серповидноклеточной анемии – CCTCTG. На этом участке обозначается ДНК-диагностика данного заболевания (рис. 99).

Используя примеры, фланкирующие сайт SmaI, амплифицируют с помощью ПЦР небольшое количество тестируемой ДНК (рис. 99, А). Амплифицированный фрагмент обрабатывают SmaI, продукты рестрикции разделяют с помощью гель-электрофореза и окрашивают на бромистом литмем. При наличии SmaI-сайта на электрофорезном геле виден специфический набор полос (рис. 99, Б), отличный от такового

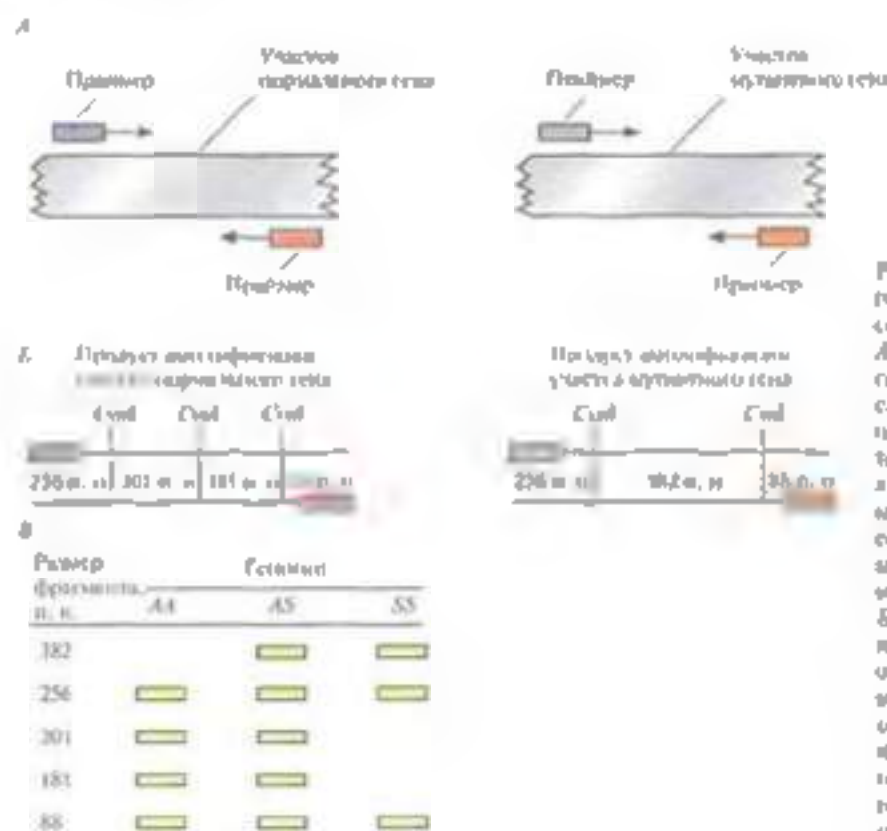


Рис. 9.4. Выделение муляжного тела, использованного для реализации стратегии альтернативной сплайсинга. А. ПЦР-амплификация участка β-глобулиновой цепи, содержащего сайты для рестриктазы CspI, один из которых отсутствует в муляжном теле. Б. Рестрикция полученных ПЦР-продуктов с помощью CspI. Муляжное тело содержит три CspI-сайта в сегменте ДНК, флажок в первом фрагменте, а муляжный — два. В. Электрофоретические разделение фрагментов, полученных при обработке ПЦР-амплифицированного β-глобулинового ДНК с помощью CspI. AA — гомодипольность по муляжному β-глобулиновому телу, AS — гетеродипольность, SS — гомодипольность только сегмента муляжного индекса.

и отсутствие CspI-сайта. Описанным способом можно без труда и достаточно быстро установить генетический статус исследуемого, не проводя при этом процедуру гибридизации.

Метод ПЦР/ЛОЗ

Не все генетические нарушения, приводящие к появлению дефектных копий, сопровождаются отсутствием или наличием сайтов рестрикции, пригодных для обнаружения специфическими зондами в различных методах. В одном из таких методов — ПЦР и метод, основанный на лигировании олигонуклеотидных зондов (ЛОЗ), ПЦР/ЛОЗ.

Предположим, что в определенном сайте нормального гена (скажем, в 106-м положении) находится пара А-Т, и в том же сайте муляжного гена — G-C. Если нуклеотидные последовательности, flankирующие 106-й нуклеотид, можно синтезировать два коротких (70 нуклеотидных) фрагмента, прилегающих к данному сайту и

комплементарных противоположным цепям (рис. 9.10). Основная особенность этой пары олигонуклеотидов состоит в том, что 3'-концевой нуклеотид одного из них (конц X) имеет незащищенную основанную, находящуюся в 106-м положении нормальной последовательности, в 5'-концевой нуклеотид второй (конц Y) комплементарен нуклеотиду, примыкающему к 106-му нуклеотиду. При отжиге этих зондов с содержащей нормальной последовательности ДНК муляжное (амплифицированное методом ПЦР) происходит их полная гибридизация, и при добавлении в реакцию смеси ДНК-лигазы концы X и Y ковалентно спаиваются. Если же эти концы отжигаются с муляжной ДНК, в которой произошла замена 106-го нуклеотида, то нуклеотиды муляжного сайта 3'-концевой нуклеотид конца X не может образовывать пары с концами Y муляжного гена, гибридизуется полностью, ДНК-лигаза не может спаять концы X и Y.

А С өлшеулері деңгейлендірілген ақпарат



Б Төбеліктерде ақпарат ДНҚ-ының өзгеруіне әкелетін ДНҚ

Негізгі ақпараттың өзгеруіне әкелетін



В Бір ақпараттың ағылы

Ағырықтар

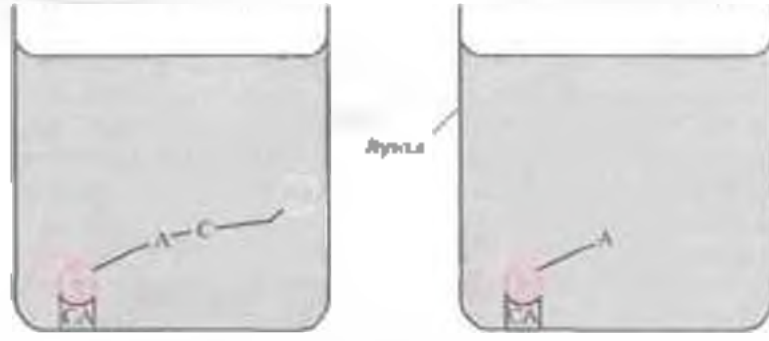
Өзгеруіне әкелетін



Г Сөз ағылы: ақпараттың ағырықтары; ағырықтар

Ақпараттың ағырықтары ДНҚ

ағырықтар мен ағырықтар ДНҚ



Д Диффузиялық механизмдер - ағырықтар мен ағырықтар - ақпараттың ағырықтары

Ақпараттың ағырықтары ДНҚ

Ағырықтар мен ағырықтар ДНҚ

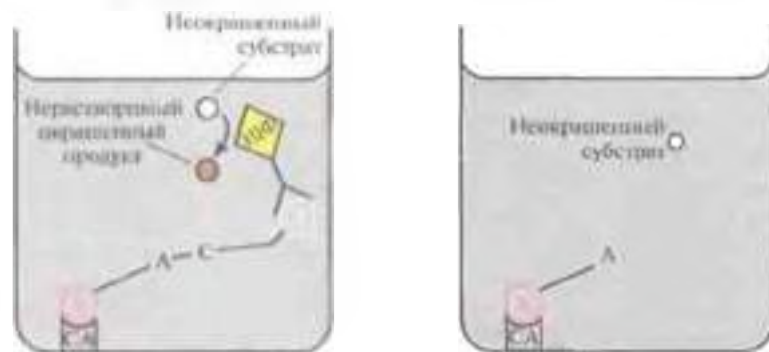


Рис. 9.10 Мотив ДНҚ/ЛОЗ
Б бөлігі; Д ағырықтар.
ЩФ - өлшеуіші фосфор
рль. СА - стрептомицин

Можно считать нормальными и другие аллельные варианты гена. Полностью соответствующим последовательности с мутацией ЮФ и мутацией ЮФ. При таком выборе зонда конкурентное будет происходить в случае их отжига с мутантной ДНК-мишенью и не будет в случае отжига с нормальной мишенью. Таким образом, метод ПЦР/ДЮГ различает две ситуации: наличие зонда в отсутствие димеризации.

Чтобы определить, произошло ли тегирование 5' конца зонда X меткой биотина, в 3' конце конца Y детектирующим, ингибирующим взаимодействием, сывалкиваемым с конкурентивной мишенью. После гибридизации и димеризации проводят денатурацию ДНК для удобства дальнейшего тегирования зонда и перекрест смеси в используемую вставку, покрытую стрептавидином. Вставку промывают, чтобы удалить весь материал, кроме связанного со стрептавидином биотинилированного зонда. Затем добавляют в вставку метки к детекции смеси, представляющей соединения со свободной фосфатами. После промывания, в месте которой произошло увеличение неспецифичной конкуренции, добавляем бесцветный красящий субстрат. Образующиеся растворы в лунках лунки и вступает в специфичную реакцию с детекцией смеси с ядом, меченым детекцией смеси, с ядом, что позволяет быть лунками с зондом, меченым биотином. Если же метки не связаны, лунки не окрашены не будут.

Различия между двумя лунками, можно установить количественно статус любого человека. Например, ДНК гетерозиготных носителей дает положительный ответ с обеими парами зондов, ДНК энд, обладающих двумя копиями нормального гена, — только с тем набором зондов, который содержит мутацию. Комплементарная нормальная сайт, и, наоборот, ДНК носителей с двумя (мечеными) копиями гена только с набором зондов, детектирующих мутантный сайт. Чтобы минимизировать необходимость для анализа количество исходной ДНК, перед гибридизацией участок ДНК-мишени, содержащий тестируемый сайт, амплифицируют с помощью ПЦР.

ПЦР/ДЮГ является быстрым, чувствительным и высокоспецифичным методом. Все его стадии работы автоматизированы, что позволяет проводить до 1200 тестов в день.

Более простым, хотя и менее чувствительным вариантом ПЦР/ДЮГ является метод зондовой зондовой реакции. Тестируемую ДНК смешивают с избытком двух индикаторных зондов, отмеченных флуоресценцией, в присутствии термостабильной ДНК-лигазы. Проводят димеризацию при 65 °С, затем повышают температуру до 94 °С, чтобы произошло денатурация образующихся зонды до зонд-ДНК-мишени, и вновь поднимают температуру до 65 °С для гибридизации зондов с денатурированной индикаторной ДНК-мишенью с ДНК-мишенью. Этот шаг повторяют 20 раз. Если индикаторные ДНК-зонды полностью комплементарны ДНК-мишени, то димеризация будет происходить в каждом цикле, и после 20 циклов выключится достаточно количество индикаторных (меченных) зондов X и Y для того, чтобы их можно было обнаружить с помощью флуоресценции или ELISA. Если зонды не комплементарны, то димеризация не произойдет и индикаторный продукт не будет.

Тегирование с использованием физически меченых ПЦР-примеров

Классическим методом тегирования основано на применении ПЦР-примеров, меченных различными флуоресцентными красителями. Чтобы различить мутантную ДНК и ДНК дикого типа, проводят ПЦР двумя разными примерами. Один из них (Р1) комплементарен ДНК-мишени типа W на 5'-конце помечен красным цветом, другой (Р2) комплементарен мутантной ДНК и на 5'-конце помечен флуоресцентным (зеленый цвет) (рис. 9.11). В обоих случаях амплификация проводится в присутствии третьего, немеченого примера (Р3), комплементарного противоположной цепи. Поскольку ПЦР может идти только в том случае, когда пример полностью комплементарен ДНК-мишени, в присутствии в реакционной смеси всех трех примеров будет амплифицироваться либо ДНК дикого типа, либо мутантная ДНК, либо обе они, в зависимости от ДНК-мишени, играющей роль матрицы. Если матрица гомозиготна по ДНК дикого типа, то также проведенная ПЦР и удалении лишнего примера будет излучаться флуоресцентная красная свет. Если матрица гомозиготна по мутантной ДНК — зеленого, в если присутствует и мутантная ДНК, и ДНК дикого

гена (т. е. мизанга тетрануклеотид) – желтого. Этот метод можно автоматизировать и адаптировать для любого однонуклеотидного сайта-мишени в любом гене с известными нуклеотидной последовательностью.

Мутации в разных сайтах одного гена

Целью не всегенетического обследования обуславливается наличие специфическим к тапсисомем в гене. В большинстве случаев мутации происходят

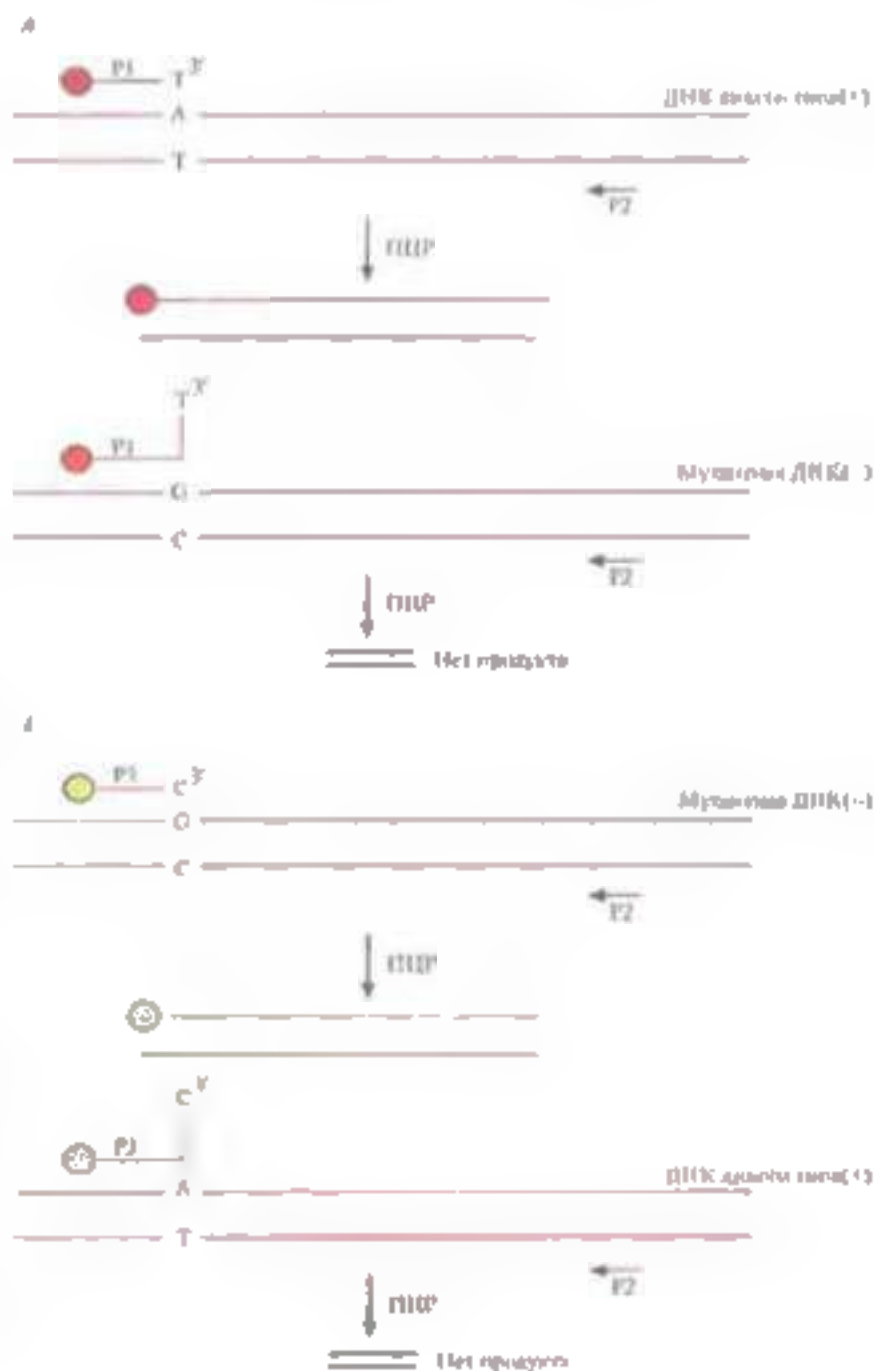


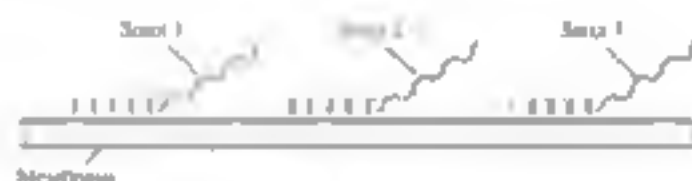
Рис. 9.10. Обнаружение точечных мутаций с помощью флуоресцентно меченных ПЦР-продуктов. А. Исходный вариант праймеры P1 и P2, амплифицируют ДНК дикого типа. Мутация ДНК при наличии данного праймера не амплифицируется и в результате с праймера P1 5'-конца праймера P1 не образуется продукт, праймер P2 меченый B. Исходный вариант праймеры P1 и P2, амплифицируют мутацию ДНК. ПНК дикого типа и в этом случае не амплифицируется 5'-конца праймера P1 помечен флуоресценцией, праймер P2 меченый C. Если оба праймера амплифицируют сайт дикого типа и мутантному сайт. В случае наличия «+/-» «+/-» «+/-» образуются ПЦР-продукты, меченные как в диком, так и в мутантном сайте флуоресценцией, и светит светом, определяются цветом и цветом флуоресценции.

дти в разных сайтах и прелесть одного гена, но приводит в одному генетическому дублированию). В качестве примера можно привести β та-гемоглобин-последовательные дублирование, связанное с утратой активности β -глобина У-астрономических носителей при этом обычно наблюдается увеличение объема. Индивиды же, гомозиготные по одному или нескольким носителям во многих мутантных сайтах, для поддержания жизни нуждаются в регулярном переливании крови и другим исечением. Поскольку мутации в живом геноме весьма специфичны сайтам β -глобинового гена имеет трино-

дти в β -глобине, необходимо провести по крайней мере восемь разных тестов. Такая диагностика возможна, хотя и весьма дорогостоящая.

Поэтому для скрининга мутации, возникающей в разных сайтах одного гена, была разработана стратегия ПЦР/дифференциальной протекции одной плазмиды. Для этого синтезируют набор специфических 20-нуклеотидных зондов, каждый из которых полностью комплементарен фрагменту гена-мишени, используемую мутацию К 3'-концу каждого зонда присоединен флуорофор (FUT) для ин-

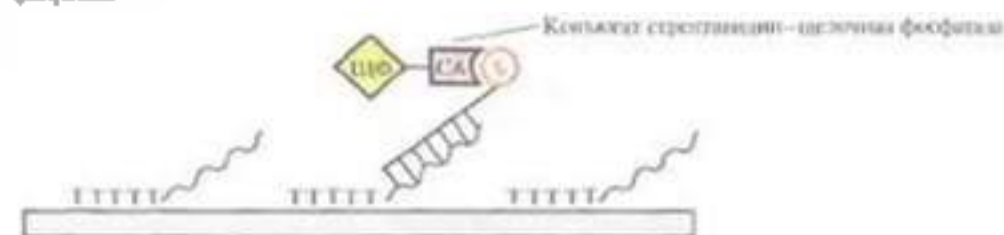
А. Связывание специфических зондов с мутацией



Б. Связывание зонда с ПЦР-амплификацией и последующим флуоресцентным считыванием



В. Дифференциальная протекция-цементная фосфатаза



Г. Дифференцирование субстрата

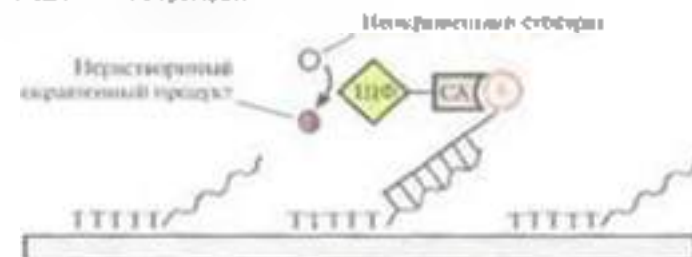


Рис. 9.12. Выявление мутаций в разных сайтах одного гена в биотин-СА-стрептавидин-ЦФ-щелочной фосфатазе.

примерно 441 нуклеотидов, с помощью которого ДНК-зонд связывается с зарисованной точкой на нитчатом фильтре, а остальная его часть остается свободной и может гибридизоваться (рис. 9 [2]). Сегменты тестируемой ДНК, каждый из которых включает по одному из возможных мутационных сайтов, одновременно амплифицируют с помощью ПЦР, причем один праймер из каждой пары из 5' конца помещен боитином. Амплифицированные фрагменты ДНК мишеней гибридизуют с зондами, пришитыми к фильтру, в условиях, обеспечивающих гибридизацию только полностью комплементарными последовательностями. В гибридаризованную смесь добавляют стрептавидин, связанный с пероксидазой хрена или уреазой. После гибридизации промывают фильтр и добавляют неокисляющий субстрат. Если имеет место полное соответствие между амплифицированным сегментом ДНК-мишени и специфическим олигонуклеотидным зондом, то на фильтре появится меткая точка. На один и тот же фильтр можно нанести несколько точек, соответствующих разным рядам различных специфических олигонуклеотидных зондов. Проанализировав эту меткую молекулу, можно идентифицировать один из многих возможных сайтов мутации.

Перспективы

Молекулярная диагностика – это быстро развивающееся направление. Хотя его основные принципы уже сформировались, технические детали отдельных тестов могут различаться. Для получения в достаточном количестве ДНК мишеней сейчас успешно применяют ПЦР. Использование ПЦР и специфические зонды существенно повышает чувствительность тестов и позволяет применять неравносбалансированные смеси, а также автоматизировать и флуоресцентные системы регистрации. В многих случаях для выявления мутации или экспонирования ДНК инфекционных агентов в исследуемом образце достаточно провести ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов. Не вызывает сомнения, что с помощью ДНК-зонда можно будет выявлять белки (антитела), а возможно и vice versa наиболее перспективным ис-

тически и инфекционно-эпидемиологическим, а также молекулярным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Любой эффективный диагностический тест должен быть: 1) высокоспецифичным в отношении молекулы-мишени; 2) достаточно чувствительным для выявления небольших количеств мишени; 3) достаточно простым, позволяющим без труда получать единичные результаты. Существуют два типа методов молекулярной диагностики: один основан на соединении зонда к конкретному антигену, другим на идентификации специфических последовательностей с помощью гибридизации или ПЦР.

Наиболее распространенным молекулярным методом является EISA. Вкратце он состоит из следующего: 1) фиксация образца на твердой подложке; 2) амплификация первого антигена, специфичного к антигену-мишени, и его связывание с антиген-мишенем; 3) добавление комплекта вторых антиген-ферментов, который присоединяется к первому антигену; 4) добавление невариабельного субстрата, который под действием фермента, входящего в состав комплекса, превращается в окрашенное соединение. Изменение цвета реакционной смеси свидетельствует о присутствии в образце молекулы-мишени.

EISA применяется для обнаружения различных белков, идентификации вирусов и бактерий, а также определения низкомолекулярных соединений в широком спектре биологических образцов. Чтобы повысить специфичность пары зондов, для диагностики часто используют многокомпонентные комплексы. При этом для уменьшения стоимости прибегают к технике клонирования их фрагментов в E coli и получения помбинтерьерно гибридов, а их се клоном – клонировать вектор комбинации E-фрагментов.

Высокочувствительным и специфичным методом обнаружения пуликопидных последовательностей в биологических образцах является гибридная методика. Это используют при обнаружении способной идентификации патогенных микроорганизмов в клинических образцах и различных микроорганизмах в окружающей среде.

ДНК дивергенция основывается на обнаружении известных цуклеотидных последовательностей, для этого синтезируют специфические праймеры и амплифицируют последовательность-мишень. Это позволяет использовать неравноактивные системы детекции (например, химилюминесцентный метод) или регистрировать ПЦР-продукты методом геля-электрофореза. Кроме того, ПЦР-продукты можно поместить в флуоресцентный краситель, присоединив его к 5'-концу праймера.

В судебной медицине все более широкое применение находит метод генотипа для токсикологии, основанный на том, что ДНК каждого человека образует уникальный набор гибридных зондов. При этом в качестве зондов обычно используют минисателлитные ДНК человека, которые не кодируют никакие белки и определяются маркерами наследственности.

Для характеристики ДНК растений используют набор прозонных олигонуклеотидных праймеров, проводят ПЦР-амплификацию случайных фрагментов ДНК, осуществляют электрофорез и получают специфичный для каждого растения набор полос ДНК, данные по которым кодируются RAPD.

Методы ДНК дивергенции применяют также для обнаружения точечных мутаций в данном гене. Одним из подходов является литиринг-ингибитор олигонуклеотидных праймеров. При исследовании всего одного нуклеотида в месте стыковки гибридирующихся олигонуклеотидов, дисперсионная протеклодетекция

ЛИТЕРАТУРА

- Barany E. 1991. Single nucleotide genetic disease detection using cloned thermostable ligase. *Proc 1991 Miami Biotechol Winter Symp.* 1: 85.
- Barke R. H., L. Nambaeang, W. Koober, G. C. Alestra, H. V. Pinnadu, D. F. Wirth. 1986. Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 231: 1434-1436.
- Bogdanov T. L., R. A. Sakki, C. H. Letchum, R. M. Watson, H. A. Erlich. 1988. The use of non-radioactive oligonucleotide probes to analyze enzymatically amplified DNA for prenatal diagnosis and forensic DNA typing. *BioTechnology* 6: 941-947.
- Chen H. P., C. Suprenko, J. Mackay, M. E. Gaskill, P. Hansen. 1990. Chemiluminescent detection of nucleic acid hybridization. *Focus* 12: 9-12.
- Cardoz C. T. 1987. Disease diagnosis by recombinant DNA methods. *Science* 236: 1223-1229.
- Chen H. P., Y. W. Kan. 1989. Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: a color complementation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9178-9182.
- Debratun P. G. 1992. Profiling identity the changing face of DNA fingerprinting. *Trends Biotechnol.* 10: 96-102.
- Erlich H. A., D. Gelfand, J. J. Somlyo. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651.
- Gilman J. C. 1987. Non-radioactive probes for specific DNA sequences. *Trends Biotechnol.* 5: 332-334.
- Hartskerk R. A., M. J. L. De Wit, P. R. Kistner. 1989. Polymerase chain reaction for the detection of *Alicycobacterium legum*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2357-2364.
- Jeffreys J. A., A. MacLeod, K. Tanabe, D. L. Bell, D. G. Monkton. 1991. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354: 204-209.
- Kingsbury D. T. 1982. DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. *Trends Biotechnol.* 5: 107-111.
- Kleser L., G. Gebreyes. 1990. Dinitroethyl nucleotides for labeling and detecting DNA. *Methods Enzymol.* 184: 561-577.
- Kobayashi, C. Miyake. 1973. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Koppavannu M. S., J. W. Hoffmann, C. E. Casper, S. G. Spitzer, S. L. Grace, S. P. Bajaj. 1991. Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1143-1147.
- Matthews J. A., L. J. Kricka. 1988. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Anal. Biochem.* 169: 1-25.
- Nickerson D. A., R. Kaiser, S. Lippin, J. Struett, L. Hood, U. Landegren. 1990. Automated DNA diagnostic using an ELISA based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8923-8927.

- Persing D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover, T. J. White (ed.). 1993. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Pilkayts B. B., R. H. Gelber, T. M. Shinnick. 1990. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested primer-pair amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1913-1917.
- Pollard-Kulsh D., A. C. Simmonds, A. P. Selman, H. Alkharaz, M. A. W. Brady. 1990. Nonradioactive DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 185: 353-358.
- Rafiqul J. A., S. V. Tingey. 1991. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Genet. Genes* 9: 275-279.
- Sadi R. K., P. S. Walsh, C. H. Levenson, H. A. Erlich. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230-6234.
- Sapler G. S., A. C. Levine. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 625-649.
- Tjard S., F. H. Kramer. 1990. Nucleic acid probes that fluoresce upon hybridization. *Acc. Biochem.* 14: 303-308.
- Waldman T. A. 1991. Molecular methods in diagnosis and therapy. *Science* 252: 1657-1662.
- Weiss J. B. 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 111-130.
- White T. J., N. Arachala, H. A. Erlich. 1989. The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 5: 183-188.
- White T. J., H. Nadej, P. H. Persing. 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.* 29: 161-196.
- Wolter G., C. Mikolaj. 1991. Monoclonal antibodies. *Nature* 349: 293-299.
- Yu K. F., A. Van Deynze, K. P. Ravel. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, p. 287-301. In B.R. Clark and J.E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Кратко опишите, как с помощью ПЦР можно выявить изменение в гене β -глобулина человека, приносящее к серповидноклеточной анемии.
2. Найдите принцип метода ПЦР/ЛОД.
3. Что такое метод ELISA?
4. Опишите три способа нерадикального метода чешуи ДНК. Каковы преимущества нерадикальных методов детекции?
5. Перед тем как стать врачом разработать простейший тест на наличие и количество вируса, который вызывает заболевание, необходимо использовать методы, позволяющие выявить вирус при его минимальном содержании в организме инфицированного животного, еще до появления каких-либо симптомов заболевания. Кратко опишите и объясните последовательность ваших действий.
6. Что означает чувствительность, специфичность и простота применительно к диагностическим тестам?
7. Как в настоящее время диагностируют болезнь Чагаса? Каким образом можно усовершенствовать существующую процедуру?
8. Почему используют флуоресцентные единичные олигонуклеотиды для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей?
9. Что такое зонд «молекулярный маяк» и как он действует?
10. Где чаще всего используют мультизонды и как их используют для характеристики следовых количеств ДНК в судебной медицине?
11. Что представляет собой метод RAPD и как его используют для выявления генетических вариантов растительных культур?

Микробиологическое производство лекарственных средств

До появления технологии рекомбинантных ДНК многие лекарственные препараты на основе белков человека удавалось получать только в небольших количествах, их производство обходилось очень дорого, а механизм биологического действия иногда был недостаточен изучен. Предполагалось, что с помощью новой технологии можно будет получить весь спектр таких препаратов в количествах, достаточных как для их эффективного тестирования, так и для применения в клинике. И эти ожидания оправдались. На сегодняшний день клонировано более 400 генов (в основном в виде кДНК) различных белков человека, которые в принципе могут стать лекарственными препаратами. Большинство этих генов уже экспрессированы в клетках-хозяевах, и сейчас их продукты подлежат проверке на возможность применения для лечения различных заболеваний человека (табл. 10.1). Впрочем, млн более 30 таких биотехнологических препаратов и популяционно одобренных в США (табл. 10.2), пройдет еще несколько лет, прежде чем они будут рекомендованы для широкого использования и поступят в продажу; вначале их подвергнут проверке на животных и проведут тщательные клинические испытания. Однако фармацевтические фирмы уже сейчас проявляют к ним интерес. Но подсчетам специалистов, ежегодный объем мирового рынка лекарственных препаратов на основе белков человека составляет около 150 млрд долларов и постоянно растет. Объем мирового рынка лекарственных средств на основе рекомбинантных белков увеличится на 12–14% в год и к 2000 г. составит примерно 20 млрд долларов.

Разработка новых методов профилактики и лечения многих заболеваний человека после огромных влив в рост благосостояния людей в XX в. Однако этот процесс никогда нельзя считать законченным. Так называемые «старые» заболевания (например, туберкулез) могут дать о себе знать вновь, как только будут ослаблены профилактические меры или появятся резистентные штаммы. Всякая прикладной видовой перспектива применения в качестве терапевтических средств специфических агентов, их можно будет использовать для нейтрализации токсинов, борьбы с бактериями, вирусами, для лечения различных заболеваний. Агентами можно उपодобить самоизготавливаемому растению, которая либо неустойчива к «нарушителям» – жукам-вредителям, либо она оснащена «босталовой», разрушает специфическую клетку-мишень. К сожалению, несмотря на многообещающие возможности, агенты довольно редко применяются для профилактики и лечения болезней и других заболеваний. И лишь в последние время, с развитием технологий рекомбинантных ДНК и разработкой методов получения моноклональных агентов и с расшифровкой молекулярной структуры и функции иммуноглобулинов, интерес к применению специфических агентов для лечения различных заболеваний вновь пробуждается.

Лекарственные препараты

Выделение кДНК интерферона

Для выделения генов или кДНК белков человека используют разные подходы. В ряде случаев выделяют нужный белок и определяют аминокислотную последовательность соответствующей

Интерфероны человека, полученные методом генной инженерии

Первый ген интерферона был выделен в начале 80-х гг. С тех пор было обнаружено несколько различных интерферонов. Как мы уже говорили, исходя из химических и биологических свойств, их можно подразделить на три группы: ИФ α , ИФ β и ИФ γ . ИФ α и ИФ β синтезируются клетками, образующими преградную вирусную или вирусную ИНК, а ИФ γ вырабатывается в ответ на действие веществ, стимулирующих рост клеток. ИФ α кодируется семейством генов, включающих как минимум 15 независимых копий, в то время как ИФ β и ИФ γ кодируются одним геном каждый. Подтип ИФ α различают по уровню специфичности. Например, при проверке эффективности ИФ α_1 и ИФ α_2 на обезьянах (вирусом лямпы клеток (или эти микроорганизмы проявляют сходную патогенную активность, в случае же обезьяны вирусом клеток человека ИФ α_2 оказалась в 10 раз эффективнее, чем ИФ α_1 . Если рекомбинантная вакцинация производится на клетках эмбриона, то ИФ α_2 оказывается в 30 раз менее эффективным, чем ИФ α_1 .

Было предпринято несколько попыток сопоставить ИФ с комбинационными соединениями, используя тот факт, что члены семейства ИФ α

различаются по степени и специфичности своей противовирусной активности. Теоретически этого можно достичь, соединив части последовательностей генов разных ИФ α . Это привело к образованию гибридного белка с другими свойствами, чем у каждого из исходных белков. Сравнение последовательностей «ДНК ИФ α_1 и ИФ α_2 » показало, что они содержат одинаковые сайты рестрикции в позициях 61, 92 и 191. После расщепления объекта «ДНК» этих сайтов и последующего лигирования фрагментов было получено несколько гибридных генов (рис. 10.1). Эти гены экспонировали в *E. coli*, синтезирующие белки отсчитывали их активность на биологических функциях. Примеры чуждых свойств гибридных ИФ на культуре клеток млекопитающих показали, что экспрессия из них (применяя большую активность, чем родительские молекулы). Кроме того, многие гибридные ИФ индуцировали образование 2'-5'-олигонуклеотидов синтетическими контрольными клетками. Этот фермент участвует в синтезе 2-5 связываемых олигонуклеотидов, которые в свою очередь активируют лизинную кисточную элаборирующую, расщепляющую вирусную мРНК. Другие гибридные ИФ проявляли большую, чем родительские молекулы, ингибирующую активность в культурах различных типов клеток человека.

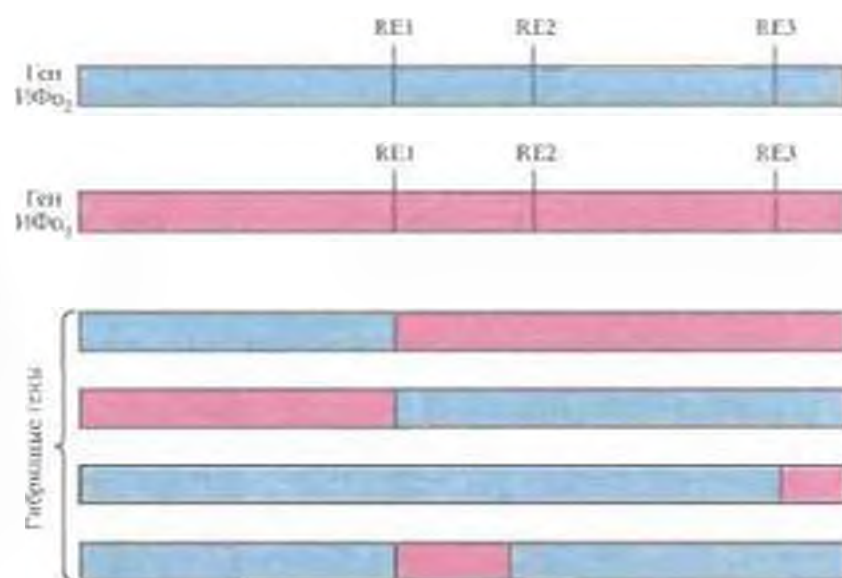


Рис. 10.1 Структура генов ИФ α_1 , ИФ α_2 , и четырех гибридных генов (combinationally constructed recombinant genes) генов ИФ α_1 и ИФ α_2 образуются идентично у них одинаковые сайты для рестрикции (сайты рестрикции обозначены RE1, RE2, RE3). Рестрикция на этих сайтах и гибридизация полученных фрагментов привели к образованию гибридных генов в нижней части рисунка (рестрикции четыре копии)

Гормон роста человека, полученный встадом генов мышей

Создание конструированных новых белков путем замены функциональных доменов или с помощью направленного мутагенеза можно использовать для усиления или ослабления биологической деятельности белка. Например, марновый гормон роста человека (ГРЧ) связывается в разных типах клеток как с рецепторами гормона роста, так и с пролиферативным рецептором.

Чтобы избежать нежелательных побочных эффектов в процессе лечения, нужно исключить присоединение ГРЧ к пролиферативному рецептору. Поскольку устьев молекулы гормона роста, связывающийся с этим рецептором, по своей аминокислотной последовательности лишь частично совпадает с участком молекулы, который взаимодействует с пролиферативным рецептором, удалось избирательно снизить совпадение гормона с имплантом. Для этого использовали сайт-специфический мутагенез, в результате которого произошли определенные изменения в основном гетероцепе некоторых аминокислот (His-18, His-21 и Gly-174) – лигандов для сайта Zn^{2+} , необходимых для высокоэффективного связывания ГРЧ с пролиферативным рецептором (рис. 10.2). Модифицированный гормон роста связывается только со «своим» рецептором. Полученные результаты представляли несомненный интерес, но смогут ли модифицированные ГРЧ найти применение в клинике, пока неизвестно.

Оптимизация генов экспрессии

Недостаточно создать новый белок, важно оптимизировать экспрессию его гена. Для начала исследователям определяют возможность синтеза достаточных количеств аутогенного белка в прокардиотической или эукардиотической системе экспрессии. Прокариотическими системами обладают преимущественно, поскольку работа с ними обходится дешевле, а прокардиотическая выше. К сожалению, не все эукардиотические синтетические фундаментальные формы эстероидных белков с одинаковой эффективностью, поэтому необходимо проводить сравнительные эмпирические оценки.

При изучении экспрессии гена интерлейкина-3 человека в различных клетках-хозяевах «вылучили» минималную область *5' flanking region* (табл. 10.4). Хотя в одной из систем *E. coli* была достигнута несколько более высокая урожайность экспрессии, полученный белок массой 20 кДа представлял собой продукт спlicing интерлейкина-3 с участием β -галактозидазы *E. coli*, а не желаемый аутогенный белок массой 35 кДа. Как правило, подобный альтернативный белок нельзя использовать в качестве лекарственного средства. Клетки дрожжей *Kluyveromyces fragilis* и *Saccharomyces cerevisiae*, а также клетки человека были способны эффективно производить интерлейкин-3, однако уровень экспрессии в них был относительно низок. Гликозилтрансферазы оказывают значительное влияние на активность интерлейкина-3, но несут в откуп никакой разницы в размере молекулы.

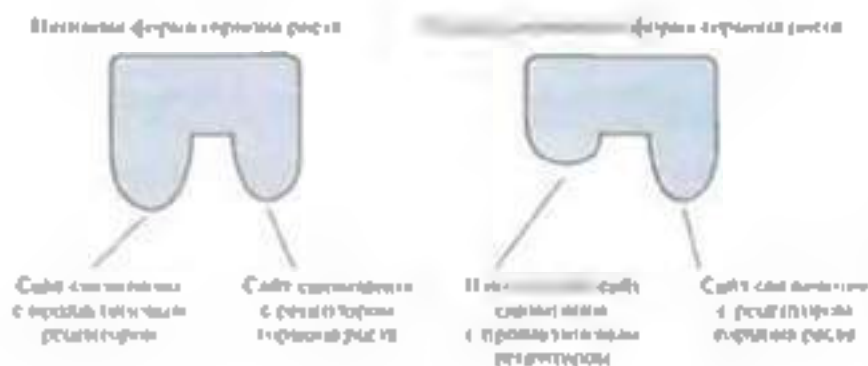


Рис. 10.2. Селективное избирательное связывание модифицированной формы гормона роста человека (ГРЧ). С помощью сайт-специфического направленного мутагенеза изменили форму ГРЧ, чтобы новая специфичность связывалась с пролиферативным рецептором, но сохраняли специфичность к рецептору гормона роста.

Таблица 10.6. Уровень экспрессии гена интерлейкина-3 в разных системах клеток зародка¹

Вектор системы	Промотор ²	Уровень экспрессии, I.U.	Анализ белков, кДа
Клетки зародка	Min (интерлейкин-3)	1	30-40
<i>E. coli</i> (трансформант)	Амплион	300	15 (зрелый)
<i>E. coli</i>	lacZ	30	15 (зрелый)
<i>E. coli</i>	lacZ	900	20 (интерлейкин)
<i>A. baumannii</i>	Лактаза	20	30-100
<i>S. pneumoniae</i>	Фактор неспецифичности	20	20-100

¹ Из работы van Leeuwen et al., *Dev. Growth Differ.* 9: 47-52, 1991, с разрешения

² В таблице — Min и Амплион — это названия систем, а lacZ и Фактор неспецифичности — названия генов в данной системе

Ферменты

Интена-1

Наиболее частым летальным заболеванием в большинстве стран Европы является муковцидоз. В США ежегодно 30 000 случаев этого заболевания, в Канаде и странах Европы — 23 000. Пациенты с муковцидозом часто страдают инфекционными заболеваниями, поражающими легкие. Летальные респираторные инфекции интеназином в конце концов приводит к появлению респираторных заболеваний (таких как бронхит, бактериит и пр.) и в итоге интеназином накапливается в легких может стать, вызывая в итоге летальность. Одним из вариантов слезы является высокомолекулярный ДНК, который интеназином является ферментом, который расщепляет высокомолекулярную ДНК на более короткие фрагменты. Фермент интеназин имеет в составе карбоксил и карбоксильных муковцидозом, он расщепляет ДНК, активность слезы интеназином, что обеспечивает дыхание. Интеназин и не интеназином муковцидозом, они обеспечивают состояние больного. Препараты интеназина были недавно одобрены Департаментом контроля и качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США), и сейчас его продажа началась в США с примерно 100 млн долларов.

Альгинат-лигаза

Альгинат — это полисахарид, синтезируемый рядом видов морских водорослей, — также производится морскими бактериями. Это многомерный полимер является для сахара —

β -D-маннуронит и α -L-гулуронит), относительное содержание и распределение которых и определяют свойства конкретного альгината. Так, остатки α -L-гулуронита образуют межцепочечные и внутримолекулярные связи (путем связывания ионов кальция; остатки β -D-маннуронита связывают ионы других металлов. Альгинат, содержащий только связи, образует пластичный гель, вязкость которого прямо пропорциональна размеру молекулярных молекул.

Выделение альгината сложными методами гидролиза альгината существование полисахарида вязкость слезы у больных муковцидозом. Чтобы улучшить вызываемые пути и обеспечить состояние больного, в дополнение к обработке ДНК интеназином следует провести действия интеназином с помощью альгинат-лигазы.

Ген альгинат-лигазы был выделен из *Pseudomonas* sp., граматрицидной почвенной бактерией, активно вырабатывающей этот фермент. На основе *E. coli* был создан банк клеток *Escherichia coli* и проведен скрининг тех из них, которые синтезируют альгинат-лигазу, путем высевания всех клонов на твердую среду, содержащую альгинат, с добавлением ионов кальция. В таких условиях весь альгинат, находящийся в среде, в виде почвенной, который образует гелевую структуру альгинат-лигазу колонии, образует синтетический и становится мутным. Гидролизом альгината теряет способность в формировании связей, поэтому среда вокруг синтезирующей альгинат-лигазу колоний остается прозрачной. Анализ клонированного фрагмента ДНК, присутствующего в одной из положительных колоний, показал наличие открытой рамки считывания, кодирующей полипептид мол. массой около 69 000. Более детальные биохимические и

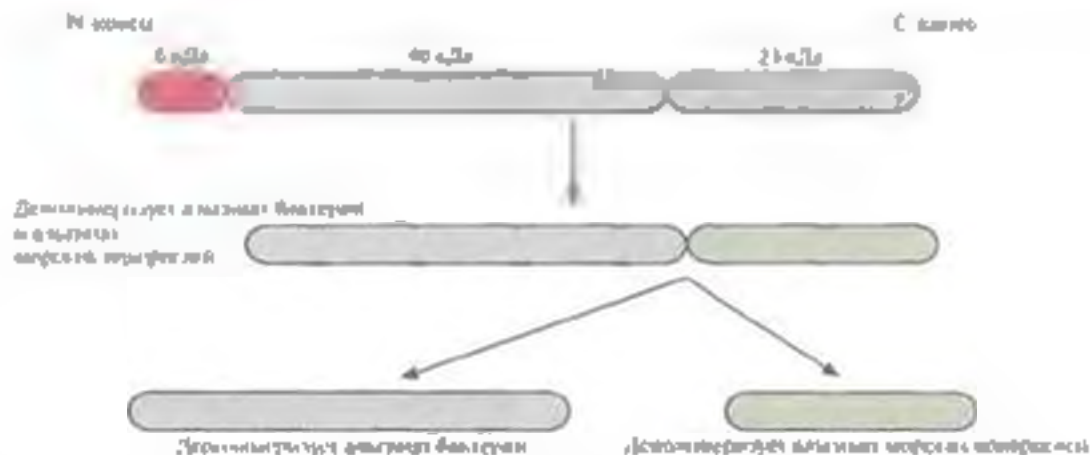


Рис. 10.3. Процесс протеолиза при участии фермента (рекомбинантного аллели гена *B. subtilis*), при котором фермент *B. subtilis* в результате гидролиза белков массой 64 кДа (катионный белок) образуется фермент массой 63 кДа, стабильный к гидролизу, а также ферменты массой 33 кДа, активно способствующие гидролизу пептидов. В результате гидролиза 64 кДа, гидролизующий бистраничный белок

генетические исследования показали, что этот полипептид, из эпитопов, является предвестником туберкулеза, и является основным компонентом *Mycobacterium* sp. (рис. 10.3). Сначала какой-то препарат ипотетический фермент образуется от всего N-концевого пептида массой около 60 кДа. Остающийся белок массой 63 000 способен детоксицировать альбумин, гидролизующий как бактерицидную и эффективную антибактериальную. При его последующем гидролизе образуется продукт массой 33 000, действующий на эпитопы туберкулеза, и фермент массой 40 000, гидролизующий эпитопы бактерий. Для получения большого количества фермента массой 40 000 использовалась ДНК эпитопов гидролизатора полимеризации (PCR), в этом направлении в настоящее время *B. subtilis* является основным вектором, несущим ген, кодирующий сигнальный пептид α -амилазы *B. subtilis*. Транскрипция миноризируется при помощи системы желейности гена эпитопов туберкулеза (рис. 10.4). При

трансформации клеток *B. subtilis* полученной штаммом и высеивании их на селективную среду (первую среду) с добавлением (или без) антибиотиков образуются колонии с большим эффектом. Когда такие колонии выращивали в другой среде, рекомбинантные штаммы не выделялись в культуральную среду. Последующие тесты показали, что этот фермент способен эффективно гидролизировать эпитопы, синтезируемые штаммом *P. aeruginosa*, которые были выделены из легких больных муковисцидозом. Для того чтобы определить, насколько эффективно гидролизуются эпитопы, (уже) эпитопы туберкулеза (исследования)

Моноклональные антитела как лекарственные средства

Примерно 100 лет назад была предложена попытка лечения детей, больных дифтерией, с помощью поликлональной антисыворотки, получен-

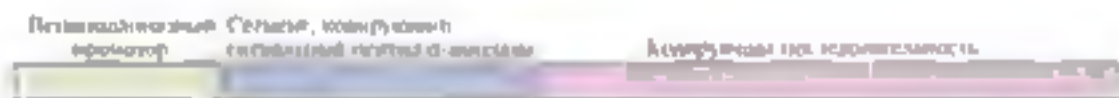


Рис. 10.4. ДНК, кодирующая эпитоп-ген массой 40 кДа. К последовательности, кодирующей N-концевого эпитопов туберкулеза, присоединены сетью ген, кодирующий α -амилазу *B. subtilis*, кодирующий ее сигнальный пептид. Транскрипция контролируется при помощи системы желейности гена эпитопов туберкулеза *B. subtilis*.

ной от лоявшей, которую инфицировали *Sarbecovirus arbidensis*, вызывающей лифтерию у человека. *S. arbidensis* инфицирует горло и миндалины, вызывает эозинофилию, тремор и ивни к гибели клеток человека. Проникая в кровоток, этот вирус поражает органы, удаленные от места первичной инфекции, и в отсутствие лечения болезнь может иметь летальный исход. (В те времена, о которых идет речь, смертность достигала 45%.) Однако, если больному в течение нескольких дней после начала инфекции ввести рекомбинант антител мыши, содержащую антитела к этому коронавирусу, то у него развивается пассивный иммунитет, который позволяет избежать летального исхода.

К сожалению, речь, связанный с использованием антител, не позволяет широко применять этот метод терапии. Дело в том, что в организме человека часто вырабатываются собственные антитела по чужеродным белкам, присутствующим в щелочной или частично окисленной мышьякпротек, и се повторно выселяет в случае сенситивизации организма может привести к реакции иммуноаллергического шока и гибели пациента.

С развитием гибридных технологий значительно улучшилось то, что антитела можно будет использовать в качестве терапевтических средств для поддержания постоянного уровня чистых моноклональных антител в организме. Однако остаются проблемы, связанные с риском развития нежелательных реакций, связанных с развитием иммунного ответа и дисфункцией гели в организме больного могут вырабатываться собственные антитела на детерминанты моноклональных антител мыши. Поэтому основной задачей в настоящее время состоит в том, чтобы разработать методы получения моноклональных антител человека, обладающих как специфическими иммуногенетическими свойствами, так в индивидуальной иммуногенетической

Структура и функции антител

Молекула антитела (иммуноглобулин) состоит из двух «легких» (L) и двух «тяжелых» (H) белковых цепей, которые соединены водородными связями и расположены в строго определенных местах дисульфидными мостиками. N-концевые участки C- и H-цепей образуют антигенсвязывающий сайт. Отдельные домены

(области) молекулы антитела выполняют разные функции, что объясняет взаимодействие с разными антигенами (рис. 10.5). Антигенсвязывающие сайты состоят из трех участков, определяющих комплементарность антигена к антигену (С1)R, от анти-суперэкспонен-детерминанг геронд), и образуются сверхбелками (V_H и V_L) области на N-концах H- и L-цепей. Для CDR характерны очень высокая изменчивость последовательности аминокислот, поэтому их еще называют гиперперебелковыми. Помимо гипербелковых (V_H и V_L), область L-цепей содержит одну константную область, или анти-С₂, и четыре H-цепей: три константных области, или домена (C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). При обработке антитела протеолитическими ферментами щелочным образуется три фрагмента: два тяжелых (F₂)H, каждый из которых содержит участок F₁ цепи, специфичную дисульфидными мостиками с V_H и C_{H1}-доменами H-цепей, и один Fc, состоящий из двух соединенных дисульфидными мостиками доменов C_{H2} и C_{H3}-доменов H-цепей Fab-фрагмент, точнее его N-концевая часть, называемая F₁-фрагментом, обладает антигенсвязывающей способностью, присутствуя в антигенной молекуле антитела (рис. 10.5) При этом его аминокислотная последовательность у разных молекул существенно различается.

После связывания антитела с антигеном антителами выпускаются следующие реакции иммунного ответа.

- Активируется система комплемента. Компоненты этой системы разрушают клеточные мембраны, активируют фагоциты и генерируют сигналы, мобилизуя другие иммунные системы иммунного ответа.
- В результате связывания Fc-участка антитела с Fc-рецептором эффекторной клетки запускается реакция окислительной дегрануляции эозинофилов. Активированная эффекторная клетка высвобождает вещества, разрушающие тучную клетку, с которой связан Fab-участок молекулы антитела.
- После связывания Fab-участка с растворимым антигеном Fc-участок антитела может присоединиться к Fc-рецепторам фагоцитов, которые захватывают и разрушают комплекс антител-антиген.

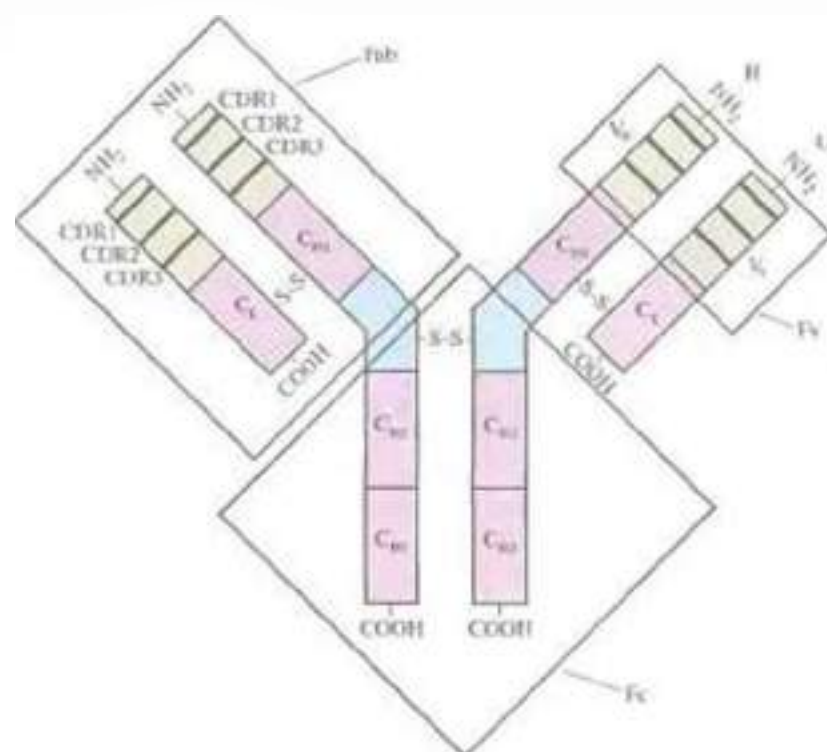


Рис. 10.5. Структура молекулы иммуноглобулина II. H-цепи (верхние) и L-цепи (нижние) и гипервариабельных (V_H и V_L) и консервативных (C_H, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}) доменов Вартебургских доменов содержат CDR-участки (CDR1, CDR2 и CDR3)

Профилактика отторжения трансплантированных органов

В 1970-х гг. были пересмотрены взгляды на пассивную иммунизацию: ее стали считать профилактическим средством борьбы с отторжением трансплантированных органов. Предлагалось вводить пациентам специфические антигены, которые будут связываться с лимфоцитами определенного типа, уменьшая иммунный ответ, направленный против пересаженного органа.

Первыми веществами, рекомендованными Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США) для использования в качестве иммуносупрессоров при пересадке органов у человека, были моноклональные антитела мыши ОКТ3. За отторжение органов отвечают так называемые Т-клетки – лимфоциты, дифференцирующиеся в тимусе. ОКТ3 связывается с рецептором, находящимся на поверхности любой Т-клетки, который называется CD3. Это предупреждает развитие полного иммунного ответа и отторжение трансплантированного органа. По-

добная иммуносупрессия весьма эффективна, хотя и вызывает некоторые побочные действия, например вызывает диарею и артериальную гипотензию сердца.

Лекарственные вещества, связанные с лимфоцитами и тимическими клетками

Лекарственные вещества, препятствующие высоко активности при тестировании *in vitro* (обычно в культуре клеток), зачастую оказываются значительно менее эффективными *in vivo*. Кажущееся снижение их эффективности объясняется тем, что они не достигают органа или клетки-мишени в нужной концентрации. Усиление дозы принимаемого препарата не решает проблему, поскольку при этом часто возникают побочные эффекты. Более того, чтобы избежать таких эффектов, многие терапевтические средства введено в дозах, не достигавших оптимальных, что значительно снижает их эффективность. Для обеспечения доставки лекарственных веществ к месту их действия используют несколько приемов. Включают это в особые препараты липосомы, эмульсии, обо-

лочки, которые имеют высочайшее сродство к нужным рецепторам. Встраиваются вены специфических рецепторов и инфузируются в зону пораженных лимфоцитов, которые высвобождают эти рецепторы и не передаются в опухоль. 3) Присоединяет молекулы лекарственных веществ к моноклональным антителам, специфичным (то есть связанным с белками, функционирующими на поверхности строго определенных клеток, например опухолевых (рис. 10.6). 4) Используют лекарственные вещества в ионизирующей форме, переводя их в активное состояние при помощи ферментов. Чтобы такое превращение происходило только вблизи клеток-мишеней, фермент присоединяют к моноклональному антителу, специфичному к гиперэкспрессивному антигену той же цели (рис. 10.6).

Для эффективной работы последней из описанных систем необходимо, чтобы а) моноклональное антитело, связанное с ферментом, персонифицированное лекарственное вещество в ионизирующую форму, было в достаточной степени очищено и имелось в нужном количестве; б) связывалось с высокоэкспрессивным для клеток-мишеней белком; в) было стабильным в физиологических условиях, но в то же время быстро высвобождалось из кровотока; г) при необходимости могло проникать в опухольную ткань, обеспечивая доступ препарата ко всем ее клеткам. В этом случае мишенями оказываются строго определенные клетки, что позволяет использовать лекарственное вещество в гораздо меньших дозах, чем при прямом введении. Применение в такой системе моноклонального антитела мыши может приводить к развитию иммунного ответа, поэтому очень важно использовать фрагменты антител человека или опител, максимально схожих с мыши по структуре.

Наиболее частой причиной смерти в странах Северной Америки и Европы является тромбоэмболия мозговых или сердечных артерий. Тромб состоит из молекул фибрина, фактора свертывающей системы крови, образующегося в ответ на повреждение сосудистой стенки. В норме молекулы фибрина и образующиеся тромбы расщепляются с помощью пламина сериновой протеиназы, который образуется из плазминогена под действием активатора (рис. 10.7). Однако нередко из биологическая



система работает недостаточно эффективно, что приводит к закупорке артерий. В таких ситуациях для повышения уровня пламина в крови было предложено использовать активатор пламина в качестве терапевтического средства.

Однако пламин способен разрушать и прерывать молекулы фибрина фибринолизом (рис. 10.7), и если уровень пламина в результате терапии с несколькими единицами активатора увеличивается слишком сильно, могут возникнуть обширные внутренние кровотечения. Это привело к необходимости создания трифосфатических препаратов, разрушающих только фибрин в

системе работы недостаточной эффективной, что приводит к закупорке артерий. В таких ситуациях для повышения уровня пламина в крови было предложено использовать активатор пламина в качестве терапевтического средства.

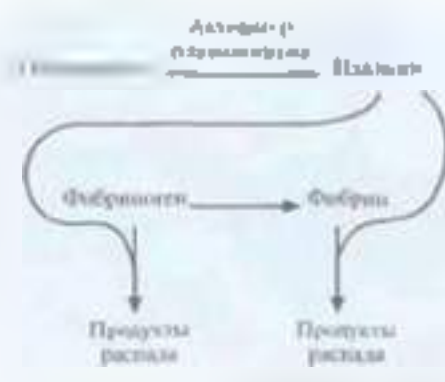


Рис. 10.7. Активация плазминогена с превращением его в плазмин и разрушение плазминогеном субстратов (фибриногена и фибрина) в крови

тромбе. Ученые искали из того, что если в эритроциты плазмикогена «привнести» антиген, специфичное к фибрину, то будет увеличиваться только локальное повышение концентрации плазмина вблизи тромба (рис. 10.8). Для проверки этой гипотезы в качестве специфичный активатор плазминогена был присоединен к моноклональному антителу, специфичному в отношении фибрина. Исследования на мышиных системах показали, что комплекс присоединялся к сгустку крови и лизировал их, не вызывая значительного разрушения фибриногена. Были созданы и другие типы антителом антителом активатор плазминогена, тоже присоединяющиеся к локальному

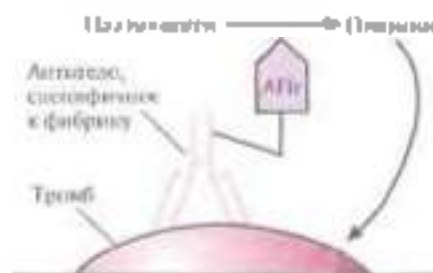


Рис. 10.8. Структура моноклонального антитела комплексного агента. К моноклональному антителу, специфичному к фибрину, присоединен активатор плазминогена (АПГ). Этот комплекс специфично связывается с фибрином, накопившимся в тромбе, активатор плазминогена разрушает накопившиеся плазминогеном тромбы, и локально активирует тромб

обращению плазмикога, разрушающего артериальные сгустки

Мини-индустрия антител из человека

Несмотря на кажущуюся универсальность иммуносервации, этот метод имеет и ряд ограничений, связанных с применением моноклональных антител животных и (прежде всего) присоединением к ним нужных молекул. Сам процесс иммунологического приобщения весьма неэффективен, присоединение происходит случайным образом, в крайнем случае, при этом может снижаться ферментативная активность антитела (для ингибитора или других веществ, используемых в терапии). Кроме того, если предлагается многократное введение препарата, необходимо не только пытаться антитела человека, а не животных, чтобы предотвратить возникновение перекрестных иммунных реакций и сенсибилизацию пациента

Создание специфических антител, не вызывающих перекрестных реакций представляет собой довольно трудную задачу, поскольку получение антител человека путем транзитивной гибридизации (описанной выше) сталкивается с рядом проблем.

- Хромосомы человека в клетках, полученных спlicing антропоидов человека с клетками мышей, нестабильны, поэтому трудно получить клетки, способные вырабатывать моноклональные антитела человека.
- Пока не удалось получить эффективные клеточные линии мыши человека, которые могли бы синтезировать антитела.
- Иммунный ответ человека различным антигенами не проводится по стандартным эталонным критериям.

Таким образом, для получения антител человека необходимо разрабатывать другие подходы. В связи с тем, что В-лимфоциты человека, активно продуцирующие специфические антитела, обрабатывают флуоресцентно меченным антителом, затем с помощью клеточного сортера получают численно обогатившие В-лимфоциты, вырабатывающие эти антитела. Поскольку В-клетки этого типа присутствуют в культуре, для улучшения роста их трансформировали вирусом Эпштейна-Барр. Некоторые клетки трансформированных В-клет-

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Полипептид, обладающий действием лейкоцитарного интерферона человека, синтезируется в *E. coli*.S. Narita, H. Tani, A. Hall, L. Johnson, M. Strick, J. Szabo, W. Bol, K. Cantell, C. Weissmann
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1980

В конце 70-х — начале 80-х гг. широкое внимание биологическим наукам привлекла в себе внимание общественности и научным сообществом. Одним из биотехнологических продуктов был интерферон. Его выработку в больших количествах удалось осуществить против человека вирусом инфлюэнцы в ядре. О выделении cДНК интерферона человека и его последующей экспрессии в *Escherichia coli* сообщали газеты и журналы всего мира.

Некоторые особенности интерферона связаны с наличием в cДНК особенно сложным во-

первых, поскольку то, что интерферон был выделен более чем в 10 000 раз, это означало почти лишь в очень небольшом количестве, поэтому в то время не была известна его точная молекулярная структура, в отличие от чужеродного интерферона, обладающего всеми признаками вирусной природы или биологическим происхождением. Однако только по значению биологического действия в ядре животного на культуру клеток, а это сложный и длительный процесс. Впервые в чужеродной микробной клетке

удалось создать в ядре человека, способные производить интерферон и достаточно высокие количества. В. е. существует ли в геноме мРНК интерферона? Несмотря на все эти трудности, в конце концов была выделена и охарактеризована cДНК, кодирующая интерферон. С тех пор были обнаружены локально различные типы интерферонов. Были выделены гены человеческих интерферонов и показано их наличие при лечении различными вирусными заболеваниями, но, в целом, интерферон не стал панацеей.

ток (вырабатывал) моноклональные антитела человека, взаимодействующие с селектирующим антигеном. К сожалению, мышь моноклональных клеток был очень небольшим и они обладали низкой антигенспецифичной активностью. К тому же вероятность того, что в иммунизированной организме найдутся секретирующие антитела клетки, которые будут распознавать опсказирующий антиген, очень мала.

Для этого родной материал из млекопитающих клеток человека мутативным мышам, которые практически лишены собственной иммунной системы. После трансформации иммунных стволовых клеток человека с помощью стробирующего тяжелым сочетанием иммунодепрессанта (*anti* мышам), они приобретают клетки иммунной системы человека и в ответ на введение антигена могут вырабатывать антитела человека.

Предпринимаются попытки ввести в родимый мышам гены иммуноглобулинов человека с целью создания трансгенных мышам, которые в ответ на введение антигена выработают антитела человека. Чтобы получить от трансгенных животных клетки, секретирующие специфические моно-

клональные антитела, можно использовать стандартную гибридную технологию. Это просто сделать в таких лабораторных условиях линии и определить, какие из них вырабатывают антитела, кошернее всего иммуноглобулинов человека. Недавно появились сообщения о том, что уже получены трансгенные мышь, экспрессирующие различные формы H- и L-цепей иммуноглобулинов человека.

Гриппозитации стволовых клеток иммунной системы человека с помощью и получение линий трансгенных мышам — весьма трудные способы применения моноклональных антител человека. Поэтому ученые пытаются создать генетически модифицированные млекопитающие организмы человека, которые можно использовать в качестве терапевтических средств, и избежать типичных биологических проблем, связанных с мышью и разрушить ее.

Гибридные моноклональные антитела человека и мыши

Тот факт, что разные участки молекулы иммуноглобулина взаимодействуют с разными антигенами, позволяет модифицировать моноклональные антитела

мым таким образом, что оно приобретает некоторые особенности антитела человека, сохранив в то же время свою исходную антигенспецифичность. Такое гибридное антитело получали химическим. Первым участком моноклонального антитела мыши, который был идентичен соответствующему участку антитела человека, был Fc-фрагмент. Выбор объясняется тем, что Fc-фрагмент антитела мыши выполняет роль эффектора иммунного ответа у человека недостаточно хорошо; кроме того, он с большой вероятностью индуцирует образование антител к антигену человека. Чтобы изменить иммуногенность и усилить эффекторные функции, пришлось изменить последовательности ДНК, кодирующие C_H-области 1- и H-цепей мышиной добуитнойoglobина, наиболее важные для функции специфического моноклонального антитела мыши (рис. 10.9). Таким образом можно осуществлять ретровирусный реинтерпретировать ДНК in vitro с применением олигонуклеотидов в качестве матрицы либо экспонировать субклеточные фракции ДНК. Сегменты ДНК, кодирующие химерные цепи, встраивают в экспрессирующую вектор и вводят в культуру В-яйцеклетки, из которой выделяют гибридомы антител и

Химерные антитела. Несмотря на то что выявлен небольшой участок моноклонального антитела мыши к поверхностному антигену клеток рака толстой кишки человека, тестировали на больных с раком толстой и прямой кишки. Антитела оста- вались в кровотоке примерно в шесть раз дольше обычных антител мыши, тем самым оказывали свое действие в течение большего времени. При этом лишь у одного пациента из 10 наблюдался слабо выраженный иммунный ответ к соединению. В этих испытаниях не удалось получить противоракового эффекта антител; возможно, это было связано с введением их в слишком малых дозах или с тем, что раковый процесс шел уже на поздней стадии. В опытах in vivo химерные антитела проявляли высокую эффекторную активность, что позволяет надеяться на успешное их применение в других случаях.

Характеристики химерных антител, в том числе их специфичность, — это первый шаг в создании моноклональных антител мышей и крыс, обладающих скоростью с антителами человека. Другой стадией состоит в получении только СDR участков человеческих антител фрагменты-

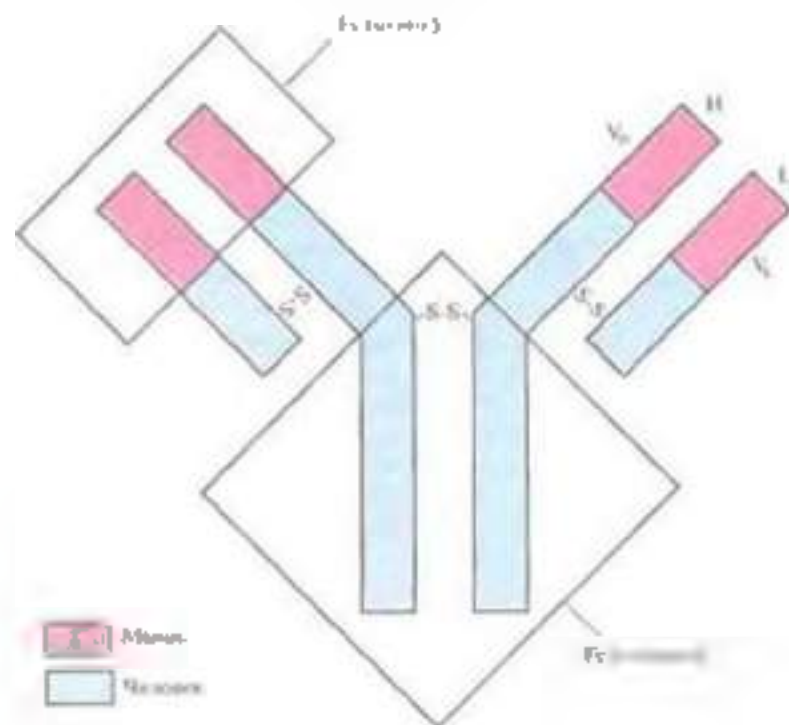
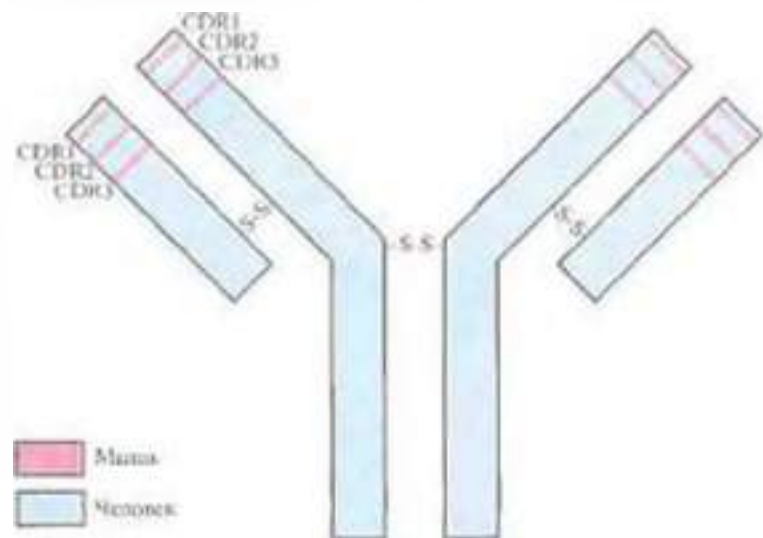


Рис. 10.9. Получение методом генной инженерии антитела, сходное по своей структуре с антителом человека. Участки генов L- и H-цепей гаммаглобулина человека, кодирующие V_L и V_H домены, заменены на соответствующие ДНК, кодирующие V_L и V_H домены мышиной добуитнойoglobина (образуются рекомбинантные цепи, кодирующие химерный иммуноглобулин). Если мышью антителоспецифичность специфичность мочить, то антитело антитела мыши эффекторными свойствами Fc-фрагмента иммуноглобулина человека и повышенной иммуногенностью для человека.

Рис. 10.10. Полученное методом темной печати антигенное антитело, сходное по своей структуре с антигеном человека. Сегменты ДНК, кодирующие СDR-участки (CDR1 и CDR2) мыши человека, заменены на соответствующие сегменты ДНК, кодирующие СDR-участки H- и L-цепей мышиного глобулина мыши. Продуктом этого рекомбинантного гена является мышино-человеческое антитело, состоящее из двух цепей с антиген-связывающей специфичностью моноспецифичного антитела мыши (участки, выделенные розовым цветом) и цепи (или цепи) специфичного антитела человека (участки, выделенные голубым цветом).



ми моноклональным антителом гризунов (рис. 10.10). Также «аксимицидные» формы антител человека могут стать эффективным терапевтическим средством, поскольку они по своей антигенспецифичности приближены к исходным моноклональным антителам гризунов.

Моноклональные антитела гризунов, сходные с антителами человека, можно получить, введя в гДНК L- и H-цепей из источника антиген гибридомы гризунов и выгипнфицировав их в переменные области с помощью ПИР. В качестве примеров для амплификации можно использовать олигонуклеотиды, комплементарные высококонсервативным сегментам ДНК, фиксирующим с 5' и 3' концов последовательность, кодирующую переменную область. Эти нуклеотидные последовательности гДНК переменных областей легкой и тяжелой цепей (V_L и V_H), легко определить группам СDR, основываясь на том, что соответствующие им последовательности гипервариабельны, и то время как вариабельные области относительно консервативны. Исходя из данных о нуклеотидных последовательностях ДНК, кодирующих СDR гризунов, сплелировать шесть пар олигонуклеотидных примеров. Каждая пара инициирует синтез ДНК, кодирующей одну из цепей СDR гризунов: три, локализованных на H-цепи, и три — на L-цепи. Кроме того, на 5'-конце каждого примера находилось 17 динуклеотидных нуклеоти-

дов, комплементарных фиксирующим гипервариабельным кармашкам участков ДНК человека, по которым присоединено ограничение СDR-ДНК гризунов (рис. 10.11). Далее с помощью олигонуклеотид-инфракрасного мутагена можно осуществить последовательную замену СDR-ДНК человека амплифицированной СDR-ДНК гризунов — фактически «пересадку» СDR от гризунов в вариабельные участки молекулы антитела человека. Модифицированную таким образом гДНК антител встроили в векторы экспрессии и трансформировали ими подходящие клетки хозяина, обычно E. coli или клетки млекопитающих, в которых и выращивались антитела.

Данный метод предполагает, что за антител связывающую способность антитела отвечают только СDR участки, а не вариабельные области. Однако, если связанные «гибридные» антитела с антителом проявляют практически эффективно, может возникнуть необходимость в том, что не некоторых аминокислотах в вариабельных областях с помощью аминокислот-нативного мутагена.

К настоящему времени этим методом получено более 30 различных моноклональных антител, обладающих сходством с антителами человека. Данное тело-оптима, являясь весьма эффективным и универсальным, довольно дорогостоящим и требует больших затрат вре-

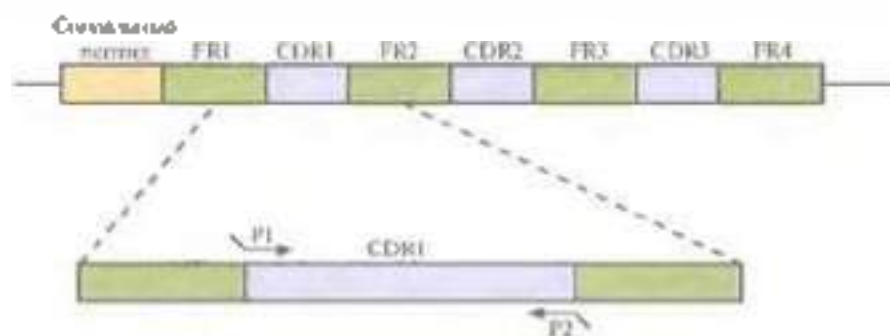


Рис. 10.11 ПЦР-амплификация CDR1-участка кодирующего и несущего κ -ДНК L-цепи человека в линии и животного (рыбу). Схематически показаны праймеры P1 и P2 кодирующей цепи (слева) и несущей ДНК CDR1-участка (справа) и продукта. Кроме того, каждый праймер спаривает со 5'-конца 32 нуклеотидов, кодирующих участок вариабельного участка (фрагмент переноса, FR) κ -ДНК L-цепи антитела человека. Используют также пар олигонуклеотидных праймеров три для V_L - и три для V_H -областей, с помощью ПЦР амплифицировали открытые или закрытые ДНК-сегменты, кодирующие CDR-участки антитела рыбы. Затем, используя олигонуклеотид-направленный мутаген, выявили тип соответствующего сегмента генов животного человека. Таким образом, оказалось, что амплифицированные фрагменты кодирующей цепи и несущей κ -ДНК имеют одинаковую структуру.

мени. Возможно, более перспективным способом получения антител человека и их фрагментов окажется метод, основанный на использовании фиговых «хембиотерных» библиотек, созданных на основе cDNA, полученной из В-клеток путем мутирования *in vitro*.

Производство антител с помощью *E. coli*

Гибридомы, подобно большинству других клеточных культур животных, растут относительно медленно, не достигают высокой плотности и требуют сложных и дорогих сред. Получаемые таким образом monoclonal antibodies очень дороги, что не позволяет широко использовать их в клинике. Чтобы решить эту проблему, были предприняты попытки создания своего рода «биофабриков» на основе генетически модифицированных бактерий, растений и животных. Для эффективной доставки и функционирования некоторых иммунотерапевтических средств достаточно одной антигенсвязывающей области антитела (Fab- или Fc-фрагмент), т. е. присутствие Fc-фрагмента антитела необходимо.

На рис. 10.12 представлен метод получения функциональных антител с помощью *E. coli* (рис. 10.12)

1. Используют мРНК, выделенную из вырабатывающих антитела клеток (В-лимфоцитов) мыши или человека, синтезируют κ -ДНК.
2. Проводят рандомную ПЦР-амплификацию κ -ДНК, кодирующую H- и L-цепи.
3. Амплифицированные κ -ДНК обрабатывают специфическими рестрицирующими энзим-нуклеазами, в этом направлении в вектор (на основе бактериофага λ - κ ДНК H- и L-цепей) содержат разные, характерные для каждой из них сайты-нуклеазные сайты, что облегчает специфическое встраивание каждой нуклеотидной последовательности в свой вектор. На этом этапе происходит клонирование множества разных сегментов H- и L-цепей (рис. 10.13, А и Б).
4. κ -ДНК одной H- и одной L-цепи встраивают в общий «комбинаторный» вектор, так что в бактериофаге синтезируются обе цепи и образуется «полноценный» Fc-фрагмент (рис. 10.13, В).

Синтез H- и L-цепей происходит во время антигенсвязывания бактериофага λ , поэтому можно провести скрининг библиотек клонов комбинаторных бактериофагов с целью определения их антигенсвязывающей активности.

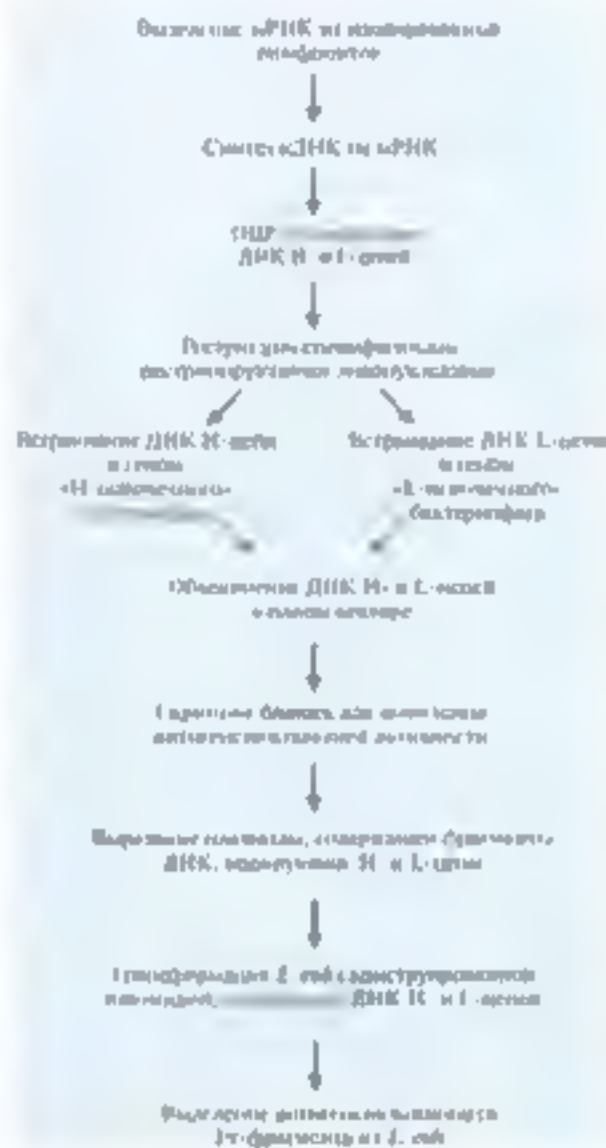


Рис. 10.12. Создание с помощью *E. coli* комбинаторной библиотеки cДНК V_H- и V_L-областей антитела

На этапе соединения cДНК II и I цепей в едином векторе образуется вирсуальный спектр генов различных антител. Некоторые из них кодируют уникальные сайты связывания, получить которые с помощью обычной гибридной технологии ни бы, но невозможно. Пул антител млекопитающих включает 10^8 – 10^9 разных агентов. Фантомная библиотека содержит примерно столько

же все клонов, поэтому можно сказать, что такая комбинаторная библиотека будет вырабатывать такое же количество различных антител (F₂-молекул), как любое млекопитающее. Кроме того, описав состав исходную комбинаторную библиотеку, можно комбинировать I и II-цепи и получать F₂-фрагменты, распознающие необычные эпитопы. Еще большего разнообразия можно достичь, используя неспецифический мутагенез. Поскольку за относительно короткое время можно провести скрининг миллионов фантомных библиотек, идентификация F₂-фрагментов с нужной специфичностью занимает от 7 до 14 дней. Для сравнения, скрининг нескольких сотен гибридных клеточных линий обычно занимает месяцы.

Векторы на основе бактериофага λ не очень пригодны для получения больших количеств белковых молекул. Чтобы решить эту проблему, сконструировали такой вектор, в котором ДНК II и I-цепей встраиваются в сайт фантомной плазмиды ДНК. Такую плазмиду, содержащую ДНК II- и I-цепей, можно вырезать из вектора и трансформировать ею *E. coli* (рис. 10.12). В качестве источника вектора, ДНК F₂-фрагмента будет многократно реплицироваться в клетках *E. coli* с образованием большого количества продукта, который можно использовать как в диагностических, так и в терапевтических целях.

При создании комбинаторных библиотек вместо фага λ можно использовать интегральные бактериофаги M13 (рис. 10.14). В этом случае соответствующий фрагмент нуклеотида синтезируется как часть интегрального белка, или лигандного по полярности фантомной частицы. Скрининг комбинаторной библиотеки фрагментов антител можно провести при помощи ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA). Суть метода состоит в следующем: образцы (плазмиды) из библиотеки помещают в ячейки планшетов, содержащие антител-антитела. Ячейки промывают, чтобы удалить несвязанные фантомные частицы. В каждую ячейку вносят компоненты, состоящий из антитела, специфически связывающегося с белком фантомной оболочки, и фермента. Ячейки промывают для удаления неспецифического компонента и добавляют в каждую из них хромогенный субстрат, который расщепляется ферментом, специфичным с фантомой, и окрашива-

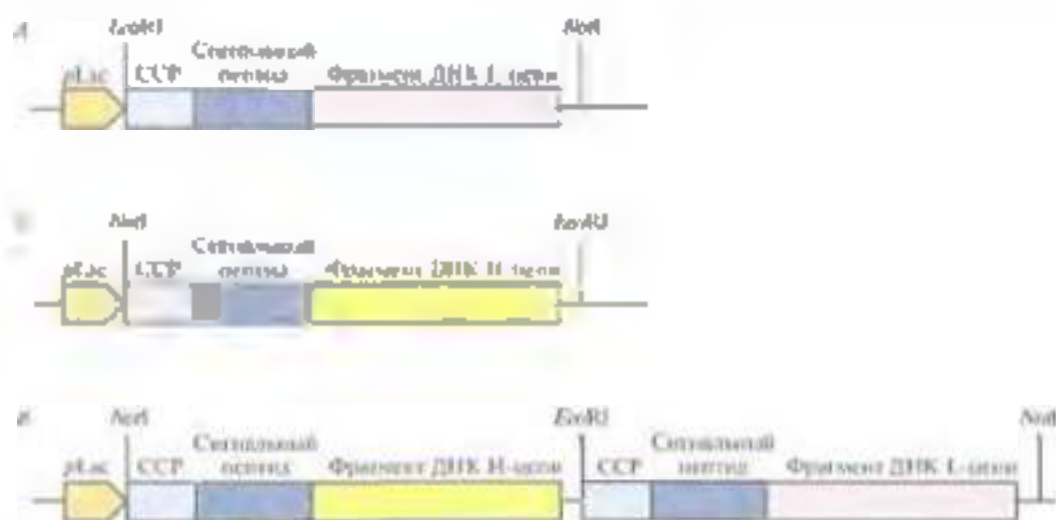


Рис. 10.13. Синтезированные участки ДНК из комбинаторной библиотеки «ДНК I»-фрагмента, клонированные в бактериофаг λ . А и Б. Фрагменты ДНК I (А) и II (Б) цветом разделяют векторы и векторы (на основе бактериофага λ). Проводя рестриктизой с помощью *EcoRI*-связанности и интродуцируя фрагменты ДНК из библиотеки II-фрагмента в фрагменты ДНК из библиотеки I-фрагмента, в результате чего получим комбинаторную библиотеку, состоящую из множества симметричных фрагментов I и II-фрагментов с экспрессией сигнального фрагмента в одном векторе. pLac – lac-промотор *E. coli*, ССР – сайт связывания с рибосомой.

вместе ячеек), в которых находятся фagosые частицы, несущие антитела к антигену-мишеню. Процесс отбора и последующая очистка бактериофагов, синтезирующих фрагмент антитела, специфичный к нужному антигену, в этом случае гораздо проще, чем тогда, когда проводится отбор в бактериях λ . Выделенный фаг, синтезирующий желаемый фрагмент антитела, можно экстрагировать конструируя этот фрагмент ДНК и субклонировать ее в экспрессирующем векторе. Разные варианты антител с повышенной способностью к антигену-мишеню можно получать изменением фрагментов ДНК V_L и V_H -областей или с помощью неспецифического мутагенеза.

Работая методом получения Fc-фрагментов, исследователи попытались определить, способны ли тяжелые без ковариантного участка (т.е. V_L и V_H -домены) образовать функциональную молекулу, способную связывать антиген. Комбинаторные эксперименты трехмерной структуры предполагаемого одноцепочечного антитела показали, что для образования димера, необходимой для связывания антигена, V_L и V_H -домены должны быть разделены лицевым пептидом. Именно это в

виду, V_L и V_H -ДНК, синтезированные на ДНК-матрице клонированного моноклонального антитела, присоединили к химически синтезированной ДНК-линкеру, создав конструируемо V_L -ДНК-якорь- V_H -ДНК. Соответствующий одноцепочечный белок синтезировали в *E. coli*, очистили и обнаружили, что его способность и специфичность к антигену сходны с таковыми нативной моноклонального антитела. Таким образом, с помощью *E. coli* можно без труда получать функциональные одноцепочечные антитела.

Одноцепочечные антитела могут найти широкое применение в клинике и тех случаях, когда проведение Fc-эффекторных функций не является необходимым, а малый размер молекулы (что важно для одноцепочечного антитела составляет примерно 27 кДа, а иммуноглобулина G – 150 кДа) дает определенные преимущества. Кроме того, к одноцепочечному антителу можно присоединить последовательность, кодирующую или эту белок, позволяющая функционировать молекулу, которая способна связываться с определенной мишенью, проявляя при этом специфическую активность.

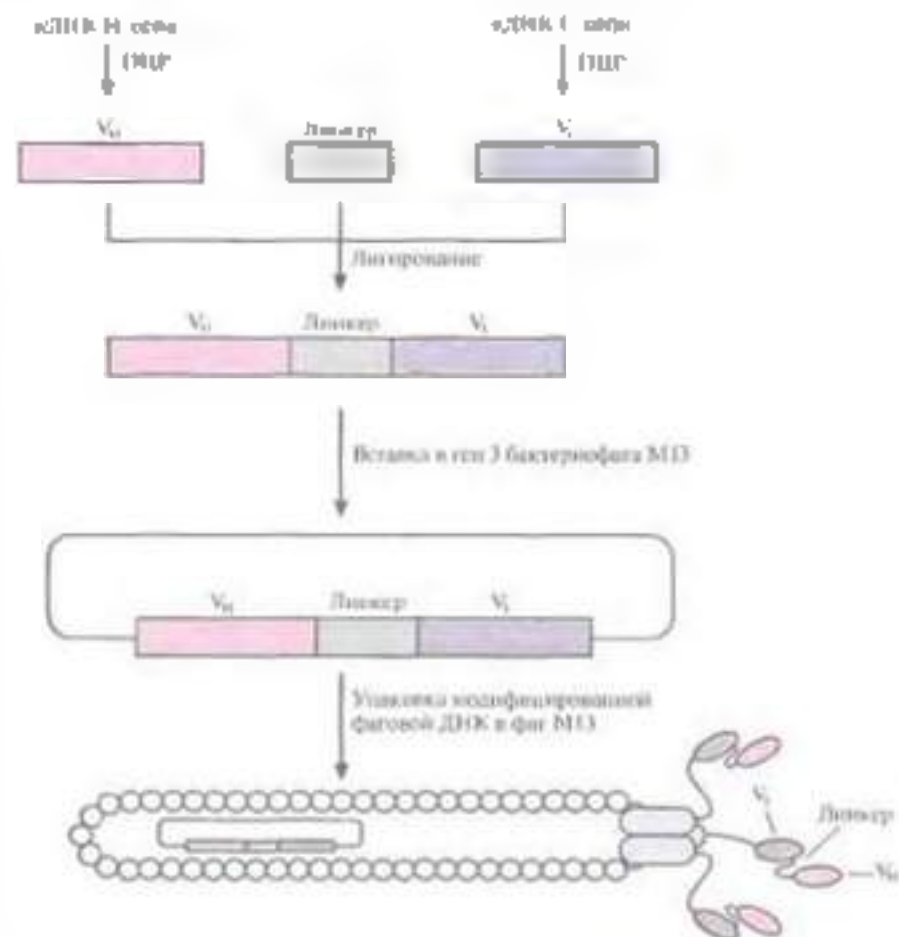


Рис. 10.14. Создание комбинаторной библиотеки cДНК. Р-фрагменты линируются по границе инсерционного сайта рекомбинации M13. cДНК V_H и V_L областей гипериммунизации методом ПЦР, а затем лигируются, используя ДНК короткого инсерционного сайта. Полученные фрагменты ДНК встраиваются в библиотеку cДНК с помощью метода вставки в сайт 3 бактериофага M13. Фрагменты в составе сайта M13 с присоединяются к вилковому белку, который кодирует инверсионный фибриллярный белок. В M13 с сайт 1 синтезируется при белковой оболочке, поэтому каждая рекомбинантная ффа M13, содержащая гибридную cДНК, кодирует библиотеку cДНК антигенных сайтов. Брест места при молекулы инверсионного белка, состоящего из продоля в сайте 1 и одноцепочечного участка

Было проведено также еще один эксперимент; вместо того чтобы соединить V_H и V_L сайт коротким пептидом, выносившим карбоксильную область, модифицированную таким образом, чтобы между ними образовывался дисульфидный мостик. Эффективность такой стабилизации вродимой дисульфидной связью Fc-молекулы, связанной с токсином, разрушающим раковые клетки, сравнили с эффективностью одноцепочечной Fc-молекулы, связанной с тем же токсином (рис. 10.15). Обнаружилось, что стабилизированный дисульфидной связью и одноцепочечный Fc иммулотоксина обладают одинаковой активностью и специфичностью, но первый в несколько раз стабильнее. Можно предположить, что в таких ситуациях стабилизированные Fc молекулы могут оказаться предпочтительнее одноцепочечных Fc молекул.

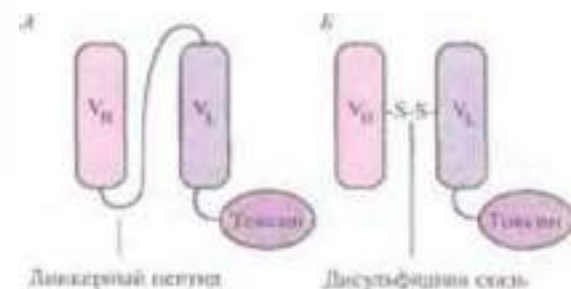


Рис. 10.15. Сравнительное изображение одноцепочечного Fc-иммулотоксина (а) и Fc-иммулотоксина, стабилизированного дисульфидной связью (б)

Лекарственные средства против ВИЧ

Ученые пока не удалось излечить пациента, достоверно инфицированную припад вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который вызывает развитие синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Паря целью с содержанием галкоб вакцинны идет поиск других средств, позволяющих замедлить патологический процесс.

ВИЧ поражает один из видов лимфоцитов, а именно Т-хелперы (Т_H-клетки). В норме в процессе развития иммунного ответа Т_H-клетки синтезируют продукты лимфоцитарных специфических антигенов и высвобождают факторы, стимулирующие другие клетки иммунной системы к участию в иммунном ответе. Т_H-клетки играют в этом процессе ключевую роль, и при ВИЧ-инфекции они перестают функционировать. Как только вирус внедряется в Т_H-клетку, он становится защищенным от иммунной системы организма и начинает оказывать свое разрушительное действие на Т_H-клетки.

- В результате размножения вируса в инфицированной клетке происходит ее лизис.
- Пораженная клетка действует как фабрика по производству ВИЧ-гликопротеина (gp120), который вызывает разрушение Т_H-клеток и других Т-лимфоцитов.
- Пораженная клетка связывается с другими Т_H-клетками, формируя синцитий, который не способен выполнять функции, свойственные незараженным Т_H-клеткам.

Клиническим следствием ВИЧ-инфекции является неспособность иммунной системы организма обеспечивать его защиту от обычных бактериальных и вирусных инфекций, которые в конце концов приводят к гибели больного, несмотря на лечение антибиотиками и другими средствами.

На первом этапе ВИЧ-инфекции происходит взаимодействие между гликопротеином оболочечной вируса молекулы 120 кДа (gp120) и рецептором на поверхности Т_H-клеток CD4 (рис. 14.16, А). В этом поражении Т_H-клеток блокируется действие CD4. Процесс замедляется также при связывании белка CD4. Однако ни один из этих способов не приводит к

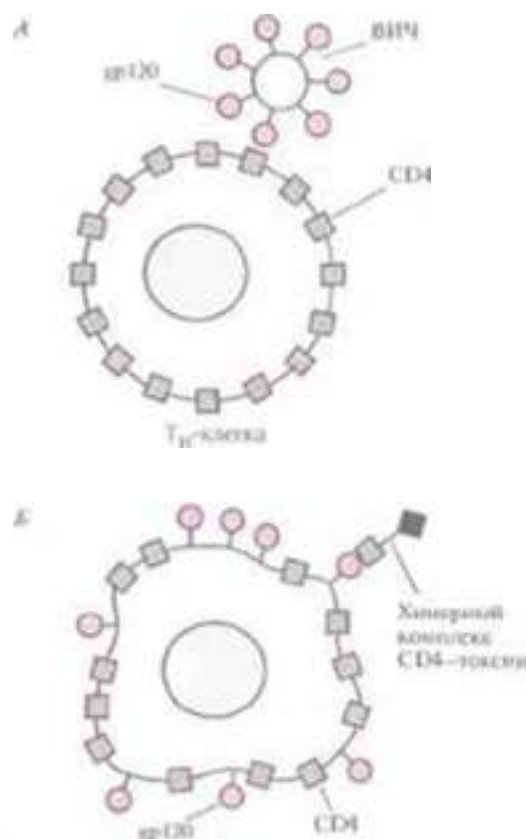


Рис. 14.16. ВИЧ-инфекция и ее терапия. А. С помощью ВИЧ в Т_H-клетки осуществляется контирование вирусного белка gp120 с Т_H-клеточным рецептором белком CD4. В. На поверхности ВИЧ-инфицированной клетки находится белок gp120, с которым может связываться свободный симметричный комплекс CD4 токсина. После внутриинтерклеточной связи, токсинная часть симметричного комплекса убивает ее.

умножению вируса. Один из подходов, обеспечивающих защиту Т_H-клеток, так и ингибирование вируса, заключается в создании химерного белка, состоящего из фрагмента молекулы CD4 и Fc-фрагмента иммуноглобулина. Свойства этого белка, называемого CD4-иммуноглобулином, определяются составными частями его молекулы: CD4-компонент связывает gp120 и блокирует ВИЧ, а иммуноглобулиновый спос способен замедлить разрушение молекулы и также и ее взаимодействие с клетками, иммунными

рецептор к антителу. После присоединения СМ-вируса к свободной вирусной частице или в инфицированной клетке вирус вызывает реакцию опосредованную антителами клеточной дифференцировки, которая обеспечивает уничтожение вируса или пораженной им клетки.

Другой важной патологической характеристикой различных ВИЧ-инфекции, заключается в нарушении системы метки ВИЧ-пораженных клеток для их специфического уничтожения. Например, если считать два фрагмента ДНК, один из которых кодирует рецептор СМ, а другой - интратоксичный токсин *Резидовина* (экзотоксин А), то мы увидим тем, кодирующим чimerный белок с мифическими свойствами (рис. 10.17) Экзотоксин А *Резидовина* это белок с мол. массой 66 кДа, состоящий из трех доменов: домен I отвечает за связывание с клеткой, II - за транзитивные белки в клетку, III - за прикрепление ВИЧ-рибы к извращенческому фактору элонгации (EF-2), что приводит к его инактивации. Chimerный белок СМ-экзотоксин А *Резидовина* вместо домена I содержит большую часть последовательности СМ (рис. 10.17), и следовательно что обладает и цитотоксической активностью экзотоксина *Резидовина*, и др120-связывающей активностью СМ. На поверхности всех ВИЧ пораженных клеток находится гликопротеин gp120, поэтому СМ-домен чimerного белка соединяется жакантически с липид клетками. При присоединении к инфицированной клетке, чimerный белок проникает внутрь нее при участии янсения

II экзотоксина А *Резидовина*. Затем чimerный белок часть чimerного белка инактивирует фактор элонгации EF-2, участвующий в синтезе белка. Это препятствует дальнейшему синтезу белка, что в конце концов приводит к гибели клетки. Таким образом, СМ-домен «помечает» ВИЧ-пораженные клетки, а экзотоксин выступает в роли «наибольшего убийцы».

Синтезируется в *E. coli*, чimerный белок образует экстракционные биологически активные включения. Их растворяют в гуанидинхлориде и выделяют с помощью быстрого разведения в ионно-обменной хроматографии. Полученный таким образом белок с успехом выдержал проверку в контрольной культуре клеток. Ошибка в ориентации чimerы на *Резидовина*-компонент чimerного белка может возникнуть при неправильной реакции, и не исключено, что это придется вырывать вместе с какими-либо мутационными, например шкотовыми. Нужно иметь в виду, что описанный выше способ борьбы с ВИЧ-инфекцией выводится из начальной стадии развития, а это в будущем не может оказаться весьма эффективным.

Готовые иммунпрепараты обладают достаточно высокой эффективностью, что позволяет применять их в начале роста и вместе с химиотерапией. Кроме того, они могут оказаться полезными для лечения различных иммунообразований, а иногда и применять химиотерапию. На пораженные клетки можно «нацелить» и другие цитотоксические белки, например дифтерийный токсин или растительный токсин ринцин. Впрочем, даже при

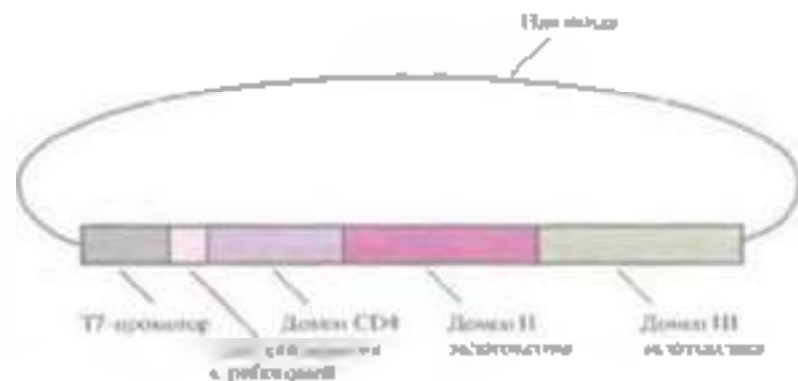


Рис. 10.17. Генетически сконструированный чimerный комплекс СМ-экзотоксин А *Резидовина* (клеточный рецептор gp120) и ринцин Т7 *E. coli*

- Hurtos D. K. 1991. Human and mouse monoclonal antibodies by repetitive cloning. *Trends Biotechnol.* 9: 169-175.
- Caplan D. J., S. M. Chamon, J. Marteau, S. A. Marsters, T. Gregory, H. Mitsuya, R. A. Byrn, C. Lazar, F. M. Warr, J. E. Croppman, S. Broder, D. H. Sallib. 1989. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 337: 525-530.
- Chamon S. M., A. Ashkanazi. 1996. Immunoadhesins: principles and applications. *Trends Biotechnol.* 14: 52-60.
- Chaudhary V. K., T. Mizukami, T. R. Fuerst, D. J. FitzGerald, B. Moss, I. Pastan, E. A. Berger. 1988. Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human CD4-Pseudomonas cytotoxin hybrid protein. *Nature* 335: 369-372.
- Chester G. A., R. E. Hankins. 1995. Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol.* 13: 294-300.
- Chiswell D. J., J. McCafferty. 1992. Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.* 10: 30-34.
- Collet T. A., P. Hoban, H. O'Kennedy, C. F. Barbas III, D. R. Burton, R. A. Lerner. 1992. A binary plasmid system for shuffling combinatorial antibody libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10026-10030.
- Cunningham B. C., J. A. Wells. 1991. Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3407-3411.
- Davis G. T., W. D. Brdick, F. W. Voss, I. W. Jacobs. 1991. Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells. *Bio/Technology* 9: 165-169.
- Dewarsho M., D. Collier. 1991. Enhancement of the thrombolytic potency of plasminogen activators by conjugation with class-specific monoclonal antibodies. *Bioconjugate Chem.* 2: 291-300.
- Gran H., L. A. Maremi, C. F. Barbas III, T. A. Collet, R. A. Lerner, A. S. Kang. 1992. *In vitro* selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3576-3580.
- Harris W. J. 1994. Humanizing monoclonal antibodies for *in vivo* use. *Animal Cell Biotechnol.* 6: 259-279.
- Hodgson J. 1991. Making monoclonals in microbes. *Bio/Technology* 9: 421-425.
- Husebeckers F. M. 1994. Tumor targeting: activation of prodrug by enzyme-monoclonal antibody conjugates. *Trends Biotechnol.* 12: 234-239.
- Hoie W. D., L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Altling-Mees, D. R. Burton, S. J. Benharik, R. A. Lerner. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 246: 1275-1281.
- Johanson V. S. 1983. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* 219: 632-637.
- Little M., F. Breiling, S. Dohet, P. Fuchs, M. Braunger. 1995. Human antibody libraries in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 41: 187-195.
- Lofoglio A. G., R. H. Wheeler, J. Traug, A. Haines, K. Rogers, E. R. Harvey, J. Sun, J. Grayson, M. B. Khayati. 1989. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4220-4224.
- Marto J. D., A. D. Griffiths, M. Mahapatra, T. P. Chelvan, J. M. Rye, G. Winter. 1992. By-passing immunization: building high affinity antibodies by chain shuffling. *Bio/Technology* 10: 779-783.
- Meyer F., A. Hinnen, A. Meider, M. G. Grotter, S. Alkro. December 1989. Hybrid antibodies. U.S. patent 4,885,168.
- Muller R. J., E. A. Grzesk, J. R. Ambreg, B. S. Hay, H. H. Hogrefe, M. M. Kubitz, A. Greener, M. Altling-Mees, H. Anlaufel, J. M. Sharr, J. A. Senger, B. Shapiro. 1990. Identification of human antibody fragment clones specific for tetanus toxin in a bacteriophage lambda immunoprecipitation library. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8095-8099.
- Murata K., I. Inoue, T. Hasegawa, S. Abe, Y. Yasamoto, T. Yasashita, M. Takagi, K. Sakaguchi, A. Kimura, T. Imataka. 1993. Bacterial alginate lyase: enzymology, genetics and application. *J. Ferment Bioproc.* 76: 427-437.
- Nagata S., H. Taira, A. Hall, L. Johnson, M. Stredell, J. Escoff, W. Ball, K. Castell, C. Weismann. 1980. Synthesis *in vivo* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 284: 316-320.
- Pastan I., D. FitzGerald. 1991. Recombinant scFvs for cancer treatment. *Science* 254: 1173-1177.
- Puckham A. 1991. Antibody engineering: advances from the use of *E. coli* expression systems. *Bio/Technology* 9: 545-551.

- Primm S. B. 1986. The application of genetically engineered microorganisms in the production of drugs. *J. Appl. Biotechnol.* 41: 99-116.
- Queen C., W. P. Schindler, H. E. Sefick, P. W. Payne, N. F. Landolf, J. E. Dunno, N. M. Avdalovic, M. Levitt, M. P. Jungles, T. A. Waldmann. 1989. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 10029-10033.
- Reker Y., U. Dreikmann, K. O. Webber, S.-H. Jung, I. Pastan. 1991. Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fc fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunoglobulin containing disulfide-stabilized Fc. *Protein Eng.* 7: 697-704.
- Rickmann L., M. Clark, H. Waldmann, and G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323-327.
- Taniguchi M. T., Y. Fujii-Karubaya, M. Nomura. 1990. Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4013-4016.
- van Leeuwen R. W., J. G. Halbach, R. F. W. C. van Beckhoven, H. Burger, L. C. J. Dorsselt, R. W. J. Hoogstraal, P. J. Leysen, D. Noorden, N. L. M. Peysen, G. Wagenvoort. 1991. Production of human interleukin-1 using industrial microorganisms. *Bio/Technology* 9: 47-52.
- Yanagisawa T., J. A. J. Williams, K. Pritchard, J. K. Gribouris, A. R. Pope, J. C. Farrington, J. McCafferty, R. A. Hodby, J. Wilson, K. S. Johnson. 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Art. Molotechnol.* 14: 309-314.
- Waldmann T. A. 1991. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* 252: 1657-1662.
- Winter G., C. Milstein. 1991. Man-made antibodies. *Nature* 349: 293-299.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Вам нужно клонировать и экспрессировать фрагмент ДНК, кодирующий интерферон человека. У вас нет пушинок ДНК-жила для гибридизации, но вам удалось выделить инициаторы человека, в которых можно индуцировать синтез интерферона с интенсивностью, превышающей фоновую примерно в 100 раз. Какую стратегию клонирования и экспрессии этой ДНК вы выберете?
2. Что такое Fc-фрагмент молекулы антитела? Fab-фрагмент? Fc-фрагмент? C1q-участок?
3. Как осуществляется координированный синтез легкой и тяжелой цепей антитела в *E. coli*?
4. Какова роль ДНК ш 3 в выживании при лечении муковисцидоза?
5. Как можно стабилизировать синтез антителами, кодируемой клонированным геном, в трансформированных клетках *E. coli*?
6. Что такое комбинаторная библиотечка cДНК?
7. Как с помощью бактериофага λ113 можно избирать Fc-фрагменты, связывающиеся со специфическими антигенами-мишенями?
8. Что такое стабилизированная дисульфидными связями и олигосахаридной Fc-молекулы?
9. Как, присоединяя ферменты к моноклональным антителам или их Fc-фрагментам, можно получать лекарственные средства?
10. Как получить моноклональные антитела опигело, максимально близкие по структуре к антителам человека? Почему, они необходимы?
11. Опишите способ получения рекомбинантных средств, которые «помечены» и уничтожают специфические клетки.

Вакцины

Вакцины способны формировать у реципиента иммунитет к патогенным микроорганизмам и тем самым защищают его от инфекции. Идея из пероральной или переносимой вакцины пастера и протинтае адриана выработана вписе адриана к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к его инактивации (нейтрализации или гибели), блокируя его репликацию и не позволяют размножиться (убивают).

Эффект выдвинули открыл более 200 лет назад — в 1796 г. — врач Эдвард Дженнер (он пытался экспериментально, что человек, переболевший коревой оспой, не очень восприимчив к другим видам оспы, становится невосприимчивым к оспе (вазальной) натуральной оспе выскол континентале заболелом с высокой смертностью. Дале если былой не помидает, у него не редко возникают различные уродегия, пилищеские расстройство и септиция Дженнер публично принял прививку коровой оспы 8-летнему мальчику Джеймсу Филпсу, используя для него материал из пустулы больной коровой оспы, а затем через определенное время доказали инфицировал ребенка таким же пустулы больноту натуральной оспой. Все проявление заболевания ограничилось покраснением в месте прививки, после нуудим через несколько дней.

Ранее также инфекционные болезни, как туберкулез, оспа, холера, брюшного тиф, бубонная чума и тифоидный, были настоящим бичом для человечества. С появлением вакцин, антибиотиков и современных мер профилактики эти эпидемические болезни удалось взять под контроль. Однако критичные меры со временем становились не эффективными, а появились новые

выполки (эболовирия). В 1991 г. эпидемия холеры произошла Перу; в течение трех следующих лет было выявлено примерно 1 млн заболевших, около 100 тысяч из них умерли. К сожалению, против многих болезней человека и животных вакцин не существует. Сегодня во всем мире более 2 млрд людей страдают заболеваниями, которые можно было бы предотвратить с помощью вакцинации. Вакцины могут оказывать полезным и для профилактики последствий экологических — повышение безопасности (например, США).

Как правило, современные вакцины создаются на основе убитых (инактивированных) патогенных микроорганизмов либо живых, но не репродуцируемых (аттенуированных) штаммов. Для этого штамм сначала либо выращивают в культуре, очищают, а затем инактивируют или модифицируют таким образом, чтобы он стал невосприимчивым к репродукции и основными вирусными частицами. Несмотря на многочисленные успехи в создании вакцин против таких заболеваний, как туберкулез, дифтерия, коклюш, столбняк, оспа и бешенство, необходимость своевременных вакцин сталкивается с проблемами окружающей.

- Не все патогенные микроорганизмы удается культивировать, поэтому для многих заболеваний вакцин не созданы.
- Для получения вирусных вакцин и человека необходима длительноживущая культура животных клеток.
- Титр вирусных вакцин и человека в культуру и скорость их размножения часто бывают очень низкими, что удорожает производство вакцин.

- Многие страны соблюдают меры предосторожности, чтобы не допустить инфицирования персонала.
- При нарушении правил асептики процесс в лаборатории широким образом распространяется или распространяется ослабленные вирусы и другие микроорганизмы, что может привести к неумеренному росту микроорганизмов и фауны.
- Асептические планы могут расширяться в исключительных случаях, потому что необходимо исключительно минимизировать вирулентность.
- Некоторые штаммы (например, СНИД) можно предупреждать с помощью противоядия вакцин.
- Большинство современных вакцин имеют ограниченный срок годности и сохраняют активность только при пониженной температуре, что затрудняет их использование в развивающихся странах.

В последние десятилетия, с развитием технологий рекомбинантных ДНК, появилась возможность создать более совершенные вакцины, не обладающие недостатками традиционных вакцин. Для их разработки применяются методы генной инженерии.

- Лициеинный микроорганотом дифференцирует деградацию генов, ответственные за вирулентность. Способность выжить в культуре клеток при этих условиях. Такой микроорганизм можно безболезненно использовать в качестве живой вакцины, поскольку инфицирование клеток культуры исключает возможность возникновения нежелательных эффектов.
- Создают живые непатогенные системы переноса отдельных генетических детерминант патогенности патогенного организма. Такая система переноса способствует развитию выработки иммунного ответа на патогенный микроорганизм.
- Если патогенные микроорганизмы не растут в культуре, можно использовать плазмиды и экспрессировать в альтернативном хозяине (например, в *E. coli* или другой клетке-хозяине патогенных генов или белков, которые содержат основные антигенные детерминанты, и

использовать эти белки для «субъединичных» вакцин (см. следующую главу).

- Некоторые патогенные микроорганизмы действуют исключительно, патогенные организмы действуют только в определенных условиях. Для таких организмов можно создать специальную вакцину, увеличивая уровень инфицирования, сконструировать ген, кодирующий компонент белка, одна часть которого будет взаимодействовать с инфицированным клеткой, а другая - уничтожать ее. Эта вакцина не является активной вакциной, хотя она и действует только на инфицированные клетки, устраняя самую патогенную функцию патогенных организмов.

В вакцинах для животных представляется более достижимым увеличение патогенности, полученными с помощью технологий рекомбинантных ДНК, были вакцины против лицевой болезни, дижтерии и диареи поросят. Созданы и другие вакцины для животных, а в скором времени появятся и рекомбинантные вакцины, представляющие для человека (табл. 11.1).

Субъединичные вакцины

Как правило, вакцины содержат экспрессированные патогенные микроорганизмы (или их патогенные или антигенные детерминанты), вырабатываемые в ответ на их введение, они взаимодействуют с поверхностными белками патогенного организма и вызывают иммунный ответ. В связи с этим возникает вопрос: всегда ли вакцины содержат целые клетки или лишь часть-то специфические антигенные компоненты? Что касается вирусов, то, как было показано, для выработки в организме хозяина ответа на вирусную инфекцию достаточно очищенных поверхностных белков вируса (белков капсидов или инкапсулированных) (рис. 11.1). Вакцины, содержащие лишь отдельные компоненты (патогенного микроорганизма), называют «субъединичными»: для их разработки с успехом используются технологии рекомбинантных ДНК.

Субъединичные вакцины имеют свои достоинства и недостатки. Достоинства состоят в том, что препараты, содержащие очищенный иммуно-

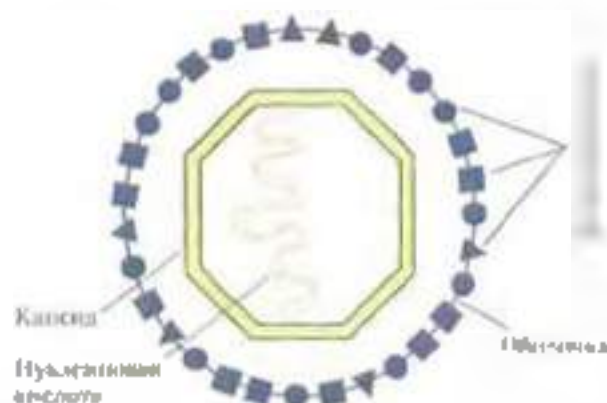


Рис. 11.1. Структура вируса герпеса. Белком вокруг обычно представляют спиксиделам) оболочкой нуклеотидной кислоты (одно- или двуцепочечный ДНК или РНК длиной от 2 до 200 т. н. п.), заключенной в белковый капсид. У некоторых вирусов капсид окружен еще в внешней оболочкой.

Противогерпетические вакцины

Вirus герпеса (герпеса) (HSV, herpes simplex virus) вызывает инфекционные заболевания человека эпидемного или местного характера (такие как инфекция глаз, менингит, уретрит и другие инфекции и т. д.) Кроме того, он является возбудителем, поэтому вызывающим убитым или аттенуированным вирусом стимулируется с определенными рисками развития рака. Для защиты от HSV-инфекции можно использовать вакцину субъединичную вакцину.

Для создания любой субъединичной вакцины прежде всего нужно идентифицировать все компоненты патогенного микроорганизма, которые индуцируют выработку антител. В случае HSV типа 1 (HSV 1) таким компонентом является гликопротеин D оболочки (gD). В ответ на введение этого гликопротеина мышам у них вырабатываются антитела, нейтрализующие интактный HSV. Ген gD HSV-1 был идентифицирован, клонирован и введен в экспрессирующую вектор в клетках млекопитающих и раседе) в яд-клетки китайского хомячка (СНВ), в которых в ответ на gD происходит гликозилирование углеводов белков. Полностью синтез гена gD кодирует белок, а вирус связывается с мембраной клетки млекопитающей (рис. 11.2, А). Гликозильный белок труднее синтезировать, чем растворимый.

мно. поэтому ген gD модифицировали, удалив ту его часть, которая кодирует С-концевой трансмембранный домен (рис. 11.2, Б). Затем модифицированным геном трансформировали СНВ-клетки, которые гликозилировали белковый продукт и секретировали его во внеклеточную среду, поскольку он не мог прикрепиться к клеточную мембрану. Лабораторные опыты показали, что антигены, вырабатываемые в ответ на введение модифицированного бел- gD, эффективны в отношении как HSV-1, так и HSV-2.

Противогерпетические вакцины

Вirus папулы (I MIV, foot-and-mouth disease virus) и вирус стенокардии (herpesvirus) являются возбудителями тяжелых заболеваний человека и животных. Для защиты от I MIV-инфекции используют вакцину, содержащую вирус, инкапсулированный фос-

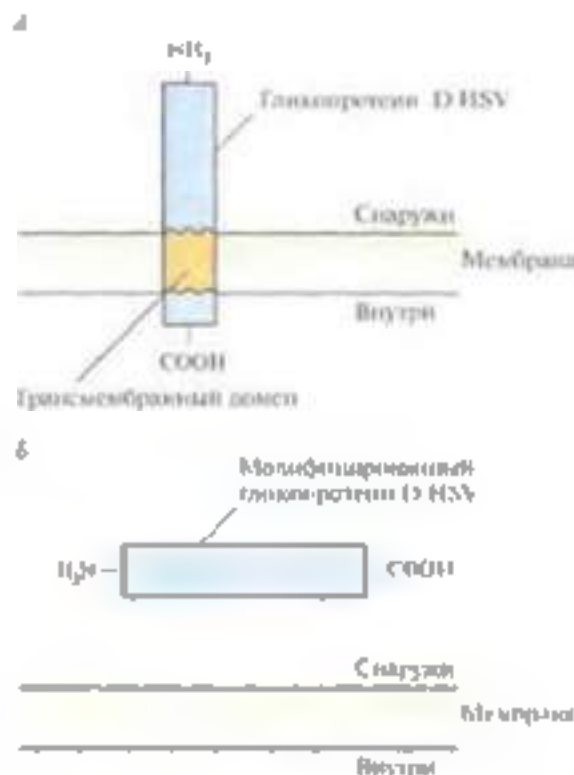


Рис. 11.2 А Молекула gD HSV-1 с трансмембранным доменом, погруженным в липидную среду мембраны. Б Растворимый белок gD, не содержащий трансмембранного домена

миллион. В мире ежегодно производится примерно 3 млрд. доз этой вакцины.

Секретин является мощной детерминантой индуцирующей образование антител. Является вирусной консервацией белок 1 (VP1, viral protein 1). Это более слабый антиген, чем поверхностные вирусные частицы, но все же он индуцирует образование антител и обеспечивает защиту животных от инфекции. Поэтому были предприняты попытки клонировать VP1-ген.

Геном FMDV представляет собой циркуляционную РНК. Поэтому сначала синтезировали полирибонуклеопротеиновый комплекс в виде примерного ИИИ и т. Затем ее реплицировали с помощью рестриктазы *NotI* и клонировали получившие фрагменты в экспрессирующий *E. coli*-векторе. Продукт кодирующей последовательности VP1 гена идентифицировали иммунологическими методами как часть этого (примерно) белка, синтез которого контролирует системный β -интерферон- β репрессор. Белок состоит из 396 аминокислотных остатков, состоит из части молекулы репликасы бактериофага MS2 и консервативной VP1-белок FMDV. Он кодирует чуждую и индуцирует выработку интерферона β MDV животного.

Получить разрешение на применение вакцины, содержащей лигандный белок, очень трудно, поэтому, вероятно, придется субклинировать VP1-последовательность в другом экспрессирующем векторе. Тем или иным, субклиническая вакцина против ящура скоро будет готова для проведения клинических испытаний.

Противотуберкулезные вакцины

Туберкулез - системное инфекционное заболевание, широко распространяемое во всем мире. Его возбудителем является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*. Она инфицирует разные ткани и органы (чаще всего легкие) и приводит к гибели клеток. В наибольшей наблюдаются поражения легких, в их отсутствие лечение заболевания заканчивается смертью. Но сейчас, при патогенном микроорганизмом инфицированном около 2 млрд. людей, в туберкулез ежегодно умирает примерно 3 млн. человек. Последние 30 лет для лечения туберкулеза использовались антибиотики, но уже выработалось устойчивых к этим препаратам *M. tuberculosis*, так что

заболевание, казавшееся побежденным, вновь стало серьезной проблемой.

В настоящее время в ряде стран в качестве противотуберкулезной вакцины используется одна из штаммов *Mycobacterium bovis*, бактерия Кальметта-Герена (BCG, bacillus Calmette Guerin). Однако эффективность такого подхода вызывает сомнения по двум причинам: 1) живые BCG-клетки могут вызвать серьезное заболевание у лиц со сниженным иммунным статусом (например, у больных СПИДом); 2) лица, которые имеют BCG-вакцину, дают положительный ответ на обычную процедуру выявления инфицированных туберкулезом бактерий, что не позволяет отличить их от больных туберкулезом. В связи с этим в некоторых странах, в том числе и в США, BCG-вакцина в настоящее время не разрешена. В качестве замены более безопасной и эффективной субклинической противотуберкулезной вакцины были изучены иммуноиндукционные свойства очищенных мембранных белков *M. tuberculosis*. Из живых бактериальной культуры выделили и очистили шесть основных из 100 секреторных белков, и каждый из них по отдельности, а затем различные их комбинации использовали для иммунизации морских свинок. Животным вводили в виде взвеси примерно 200 живых клеток *M. tuberculosis*, что является для них весьма высокой дозой. Через 9-10 недель животных умерщвляли и исследовали их легкие и селезенку на предмет присутствия этой патогенной бактерии. При введении некоторых комбинаций очищенных белков патоген неся, поражение легких и селезенки и уровень смертности были таковы же, как и при введении чуждого живых BCG-вакциной. Теперь нужно провести сравнение эффективности белков *M. tuberculosis*, полученных с помощью техник или рекомбинантных ДНК, с эффективностью секреторных белков и разработать безопасную и эффективную вакцину для профилактики туберкулеза у человека.

Пептидные вакцины

Далее возникает следующий вопрос: может ли небольшим участком белковой молекулы (эпитоп) служить эффективной субклинической вакциной и индуцировать выработку антител? Интуитивно кажется, что те эпитопы, которые доступны

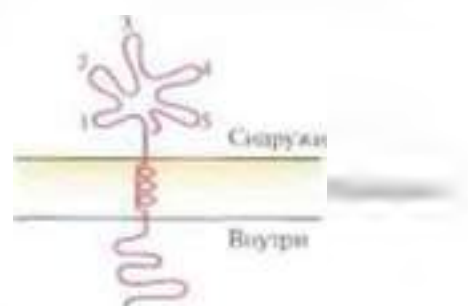


Рис. 11.3. Сферический мембранный белок, внешние концы (1–5) которого могут индуцировать иммунный ответ

Для эпитопов (т. е. те, которые находятся на поверхности вируса), обладают иммуногенными свойствами, а внутренние домены неэпитопны, если только они не влияют на конфигурацию гликозилевого домена (рис. 11.3). Если по предположительным меркам, то кортикаре белки, индуцирующие эпитопы (антигенные детерминанты), можно использовать для создания вакцин.

Несколько лет в анаэробных условиях химическими методами домены VP1 FMDV и протемнили возможность создания на их основе рекомбинантных вакцин. Каждый из эпитопов, соответствующих аминокислотным остаткам 141–160, 151–160 и 200–213 С-концевому участку VP1 и аминокислотным остаткам 9–24, 17–32 и 25–41 N-концевого участка, сходны по структуре с инертным

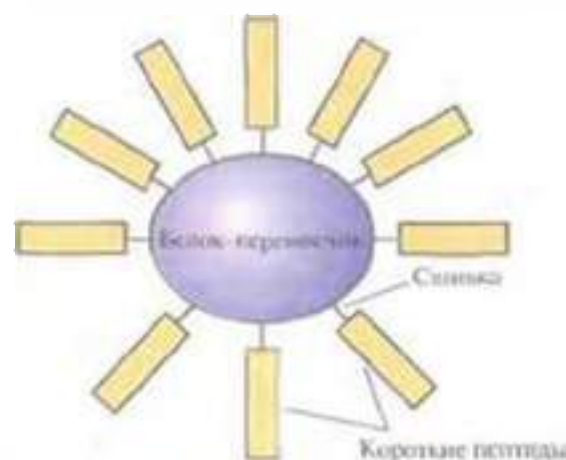


Рис. 11.4. Короткие пептиды, соединяемые с белком-переносчиком и служащие основой эпитопной вакцины.

белком-переносчиком (неиммуногенной молекулой фиксурелина), чтобы преаптировать их разрыве. И ввели эффект синхронизации (рис. 11.4). Синтез эпитопов в количестве, достаточном для защиты животного от последующей FMDV-инфекции, выполняется только при введении пептидов 141–160. Введение же участка VP1 или пептидов 9–24, 17–32 и 25–41 индуцирует синтез эпитопов в незначительных количествах.

Более длинный пептид, состоящий из аминокислотных остатков 141–158 и 200–213, который был соединен другой примитивной остатками, индуцировал инфекционный синтез эпитопов у морских свинок даже в том случае, когда они не были соприкасались с белком-переносчиком. Это «двухэпитопная» молекула оказалась эффективнее любого изолированного пептида в отношении пролиферации FMDV у крупного рогатого скота и морских свинок.

Эти результаты являются весьма многообещающими, однако количество (доза) пептидов по материалу, необходимому для получения иммунного ответа, примерно в 1000 раз выше, чем в случае защиты FMDV-вакциной. Чтобы решить эту проблему, фрагмент ДНК, кодирующий пептиды из аминокислотных остатков 142–160 VP1 FMDV, соединил с геном, кодирующим вирусный белок гепатита В (HBsAg). При экспрессии этого синтетического гена в *E. coli* или культуре животных клеток его продуктом — белковые молекулы — в процессе сборки образовывались стабильные «27nm-частицы», на поверхности которых находились пептиды из VP1 FMDV. Эти частицы обладали высокой иммуногенностью. Таким образом, HBsAg можно использовать в качестве «инфекционной молекулы-носителя синтетических пептидов». Сравнительная иммуногенность рекомбинантных пептидов FMDV вакцин, содержащих домен 142–160 VP1-белка, продемонстрировала, что иммуногенность синтетического белка, состоящего из HBsAg и указанного домена, в 10 раз выше, чем у соответствующей FMDV-частицы, в 35 раз выше, чем у синтетического белка, состоящего из β -галактозилосиды *E. coli* и домен 137–162 из VP1 FMDV, и в 500 раз выше, чем у соответствующей синтетической пептиды, состоящего из аминокислотных остатков 142–160. Поскольку синтетический пептид, соединенный с HBsAg, образует 27nm-частицы, сход-

ные с вирусом гепатита В, и они обладают почти такой же иммуногенностью, как и интактный вирус, на основе которого получен синтетический пептид. Этот подход может стать основным способом доставки вакцин в места их действия.

Их же существует несомненно стремление использовать в качестве вакцин и короткие пептиды в качестве вакцин.

- Эпитоп, используемый для создания эффективной вакцины. Должен представлять собой короткий, но непрерывный участок белковой молекулы, а это бывает не всегда.
- Классификация пептида должна быть такой же, как у эпитопа в интактной вирусной частице.
- Иммуногенный эпитоп может не обладать естественной иммуногенностью. В будущем синтетические пептидные вакцины могут стать высокоспецифичной, относительно недорогой, безопасной и эффективной альтернативой традиционным вакцинам, хотя для этого необходимо провести еще немало исследований.

Генная иммунизация

Новый подход, позволяющий индуцировать у организма иммунный ответ без введения антигена, основан на введении в клетки животного животного гена, кодирующего белок-антиген. В первом эксперименте такого рода F. Collier и др. содержали в клеточном геноме гены белок-антигена, транскрипцию которого вызывали под контролем промотора вируса аденовы, клетки вводили в млекопитающих мышь и бомбардировали эти клетки ультрафиолетом. Впоследствии выяснилось, что экспримируемую КДНК можно вводить в клетки и с помощью перетрививической культуры расторгая с большим количеством плазмиды, несущей соответствующую ДНК. Для этого необходимо $10^7 - 10^8$ раз больше ДНК, чем при бомбардировке млекопитающими. В одном из экспериментов более чем в 75% случаев ген включился в клетки мыши, и синтез ирритантный белок-антиген индуцировал синтез антител. Этот подход открывает и обладает значительными, что требует много времени и средств, для исследования для соз-

дания вакцинной генноинженерной рекомбинантной ДНК. Кроме того, получаемые с его помощью белки с большей вероятностью подвергнутся правильной посттрансляционной модификации, чем белки, синтезируемые организмом-хозяином. Этот метод, выходящий за рамки генной иммунизации, можно использовать для вакцинации домашних животных.

Перспективы генной иммунизации были тщательно изучены. В одном из серий экспериментов чинам в культурах клеток и эритроцитах мыши рода *C. albipolymorphus*, несущей КДНК (рекомбинантная вирусная группа А, транскрипцию которой контролирует под контролем промотора вируса саркомы Рауса или млекопитающего). Хотя уровень экспрессии гена рекомбинантного был относительно низким, что не позволяло регистрировать через 2 нед после иммунизации в крови мышей обнаружился антитела к нему. Важным фактом иммунологических мышей оказалась значительно выше, чем мышам из контрольной группы (рис. 11.5). Более того, они были иммунологически и в другом смысле вирусной группы. Такая перекрестная защита не обнаруживается при введении традиционных вакцин против гриппа (в том числе из курицы против гриппа), полученных из клеток курицы вакцины специфичны лишь в отношении штамму вируса. Более того, традиционные вакцины сохраняют свою эффективность только до тех пор, пока остаются не изменеными-иммуногенными антигенами к возбудителю, для генно-инженерных вакцин характерно высокое качество мутиаций, что приводит к появлению существующих различий между штаммами вируса. Начиная же белки, такие как нуклеокапсид, относительно стабильны и индуцируют иммунную систему по другому механизму, чем обычные чужеродные антигены.

ДНК-иммунизация позволяет не только индуцировать синтез белковых антигенов, но и индуцировать иммунный ответ, направленный именно на кодируемый полипептидный белок, а не на саму ДНК. Поэтому один и тот же белок можно использовать для доставки разных белков или для индивидуальной введения эпитопов и даже генов.

Судя по введенной в клетку ДНК (сложности возможности. В принципе это может индуцировать и

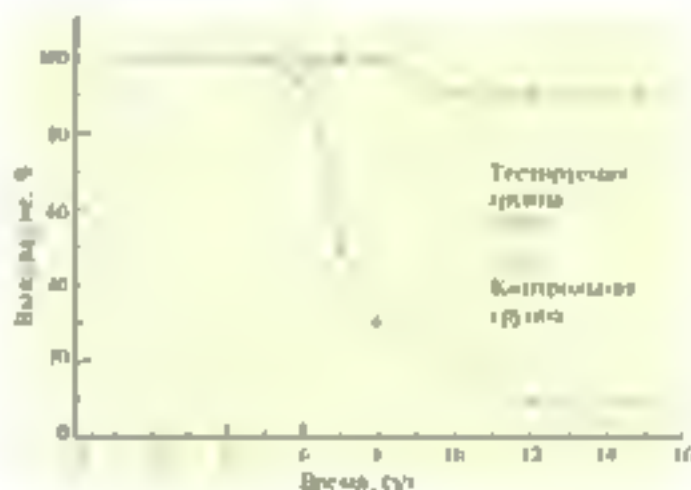


Рис. 11-5. Выделение мышечных культур вирусного ДНК. Тестовая мышечная культура инфицирована *E. coli* пилоситой, несущей ДНК рекомбинантного вируса (группа А) или контролем (группа В) вируса саранчи. Различия в контрольной мышечной культуре (заключены в ДНК) до сих отсутствуют (напротив, время, прошедшее после контакта мышечной с вирусом группы В).

геном животного с весьма серьезными последствиями, если при этом возникает какой-то новый ген или происходит злокачественная трансформация клетки. Однако такое развитие событий считается крайне маловероятным. Скорее всего такая ДНК какое-то время просуществоует в клетке в виде перелачиваемого автономного элемента, а затем разрушится. Известно иммунизацию пока не используют для выработки иммунитета в отношении патогенных микроорганизмов (вирусу гриппа А, вирусу иммунодефицита человека типа I, вирусу бычьего герпеса, вирусу бешенства, *Mycobacterium* sp., вызывающему туберкулез, вирусу гепатита В) у животных, но не у человека.

Для обеспечения доставки ДНК в клетки животных при проведении генной иммунизации была открыта мутифицированная штамм *Shigella flexneri*. Эта бактерия проникает в эпителиальные клетки животных путем фагоцитоза, и при существовании в ней плазмиды ДНК попадает в цитоплазму клетки-хозяина, где и происходит трансформация и репликация переносимого элемента, происходящая под контролем регуляторного промотора. *Shigella* — патогенный микроорганизм, и как таковой он не может использоваться для доставки ДНК. Его заменитель можно получить, если удалить в ген код кодирующий фермент аспарат-β-галулактосил-ацетиламинотрансферазу, который участвует в синтезе компонента клеточной стенки диваниномисляющей кислоты. Штаммы с мутацией в

этом гене растут только в присутствии диваниномисляющей кислоты и их можно использовать для доставки плазмидной ДНК в эпителиальные клетки животных, поскольку они в них не пролиферируют.

Эксперименты, в которых в качестве вектора для доставки ДНК в клетки животных использовалась *Shigella*, были проведены на морской свинке, и хотя они пока имеют ограниченную ценность, судить об безопасности данной системы можно будет лишь после проведения клинических испытаний. Основным преимуществом этого подхода является возможность перорального введения вакцины.

Аттенуированные вакцины

В некоторых случаях в качестве живых вакцин можно использовать генетически модифицированные (рекомбинантные) микроорганизмы (бактерии или вирусы). Такие вакцины могут быть либо ослабленными микроорганизмами, либо лишенными определенных антигенных детерминант ослабленного патогенного агента, либо отными выделенных микроорганизмов, у которых модифицированы или деактивированы гены вирулентности. В этих случаях основные антигенные детерминанты являются структурными компонентами (белковыми или вирусными частями) и имеют такую же конформацию, какую они принимают в нативном микроорганизме. Немодифицированный же типично часто утрачивает исходную конформацию и становится лишь слабым иммунный ответ.

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Иммунизация с помощью белков, синтезированных *in vitro* из данных о нуклеотидной последовательности РНК вируса ящура

J. I. Dulle, R. A. Hogg, H. Alexander, T. M. Simons, J. G. Smith, R. A. Lerner, D. J. Rowland, I. Hopp
Science 200 20-23, 1979

Начиная с первой половины столетия двадцатого более 200 лет назад безуспешно осуществлялись попытки искусственным путем синтезировать различные вирусные или вирусные белки. Этот процесс достаточно эффективен при синтезе и распространении ряда вирусных белков, однако его эффективность ограничена из-за трудности все вирусы мигрировать в культуру, что не позволяет создавать вакцины против них, поскольку их традиционная репликация происходит в клеточных системах, являющихся или все вирусные белки (или их фрагменты) предварительно вactivated. С развитием молекулярной биологии и биохимии вакцинация была осуществлена впервые с помощью фрагментов белка С (антигена нуклеокапсида) вируса ящура.

Исследования в области вирусологии и иммунологии, начавшиеся с открытием вирусных вакцин, стимулирует разработку вакцин с использованием четвертичных, и терции присутствующих на поверхности вирусной частицы, при этом разумно было предположить, что оптимальной иммуногенной будет белок, синтезируемый с такой же антигенностью, как у вирусной антигенной детерминанты. Выяснилось, что белки, синтезируемые *in vitro* в этом случае, могут антигенно отвечать представителю субот-клеточной детерминанты.

Белки С, выделенные с помощью транскрипции РНК вируса ящура и определенной антигенной последовательности, являются вирусным белком - VP1. Этот белок

соответствующим экспериментальным путем (в том числе, что его антигенная детерминанта находится на N- и C-концах белковой молекулы. Различные методы исследования, такие как синтез полипептидов, которые синтезируются белками переносчиками и белками ящура. В ответ на введение вакцины С-концы были синтезированы VP1 и критично важна для синтеза вирусной белковой молекулы. Это работа была опубликована в журнале *Science* 200 20-23, 1979. Это дает возможность синтезировать белки, которые являются активными компонентами (или субъединицами) доминирующей антигенности вирусного белка, и, следовательно, можно создавать вакцины против вируса ящура.

Противохолерные вакцины

Живые вакцины, как правило, гораздо более эффективны, чем неживые (или субъединичные). Основное требование, предъявляемое к ним, отсутствие в инокулируемом материале вирусных или риккетсиальных агентов. Это требование удовлетворяется при создании живой противохолерной вакцины. Холе́ра - быстро развивающаяся кишечная инфекция, характеризуется диареей, анурией, падением кровяного давления, обезвоживанием, судорогами, смертью. Передается через фекально-оральную передачу. В жарких странах, где системы очистки воды и удаления сточных вод полностью развиты, угроза холеры вполне реальна.

Возбудителем холеры является *Vibrio cholerae*. Бактерия размножается в тонком кишечнике и выделяет в большом количестве экзотоксин, который и ответствен за патогенный эффект. Это

термолабильный белок; он состоит из субъединицы А, которая обладает АТФ-рибозилтрансферазной активностью и стимулирует аденилатциклазу, и пяти субъединицами В, которые специфически связываются с клеточным рецептором слизистой кишечника. Субъединица А имеет две функциональные группы, обладающие токсической активностью, и А₁, отвечающая за ее связывание с субъединицей В. В настоящее время используется противохолерная вакцина, содержащая убитые фенолом холерные палочки; она обеспечивает только частичную защиту от инфекции и лишь в течение 3-6 мес. Поэтому были предприняты попытки создать другие типы противохолерной вакцины.

Как показали проведенные ранее исследования, субъединичная вакцина, содержащая инактивированный холерный экзотоксин, не приводит к выработке полноценного иммунитета

Поскольку *V. cholerae* колонизирует слизистую кишечника, разумно было предположить, что наиболее эффективной будет пероральная протипокарицидная вакцина. Имея это в виду, создан штамм *V. cholerae*, из генов которого была deletedирована часть кодирующей A_1 -петли нуклеотидной последовательности. Этот штамм не синтезирует энтеротоксин, а потому не является патогенным и подходит для создания живой вакцины.

Эксперимент состоялся в следующем. В ген A_1 -петли *V. cholerae* был встроены ген устойчивости к тетрациклину. При этом прерывались, разорваны участки для A_1 -петли, но штамм стабильно устойчивым к тетрациклину. Его нельзя было использовать в качестве вакцины и потому, что со временем происходила спонтанная утрата тетрациклинового гена, и синтез энтеротоксина восстанавливался. Чтобы обойти эту проблему, создали штамм с дефисной нуклеотидной последовательностью, кодирующей A_1 -петлю, которая не могла восстановиться (рис. 11.6). Для этого использовали следующий подход.

6. Внехромосомная плазмиды не могла долго существовать в холерном вибрионе и через несколько поколений была утрачена.

7. Обработке клеток с интегрированной дефисной A_1 -кодирующей последовательностью, не позволяя их чувствительность к тетрациклину.

Полученный таким способом стабильный штамм с deletedированной кодирующей A_1 -петли последовательностью не синтезировал вакцины энтеротоксин и при этом сохранил все остальные биохимические свойства патогенной формы *V. cholerae*. Проклатные в шестомаше время капитальные испытания эффективности этой формы как протипокарицидной вакцины пока не дали однозначного результата. Вакцина обеспечивает почти 90%-ую защиту от холеры, но у некоторых нездоровых наблюдаются побочные эффекты. Возможно, понадобится изменить другой хромосомный locus этого штамма, чтобы можно было использовать его как вакцину.

Применение современных вакцин

Другой способ получения непатогенных штаммов, пригодных для создания на их основе живых вакцин, состоит в удалении из генома патогенных бактерий хромосомных областей, отвечающих за незаменимые жизнеобеспечивающие функции. При этом лучше деактивировать по крайней мере две такие области, поскольку вероятность их одновременного восстановления очень мала. Предполагается, что штамм с двойной децелиацией будет обладать оптимальной протидефективной способностью и сниженной патогенностью, но отвечает наработку комбинированного ответа.

Рядные штаммы *Salmonella* вызывают острые кишечные инфекции, постпатогенную инфекцию, брюшного тифа, пищевую токсикоинфекцию. Для профилактики всех этих заболеваний совершенно необходимо иметь эффективную вакцину. Чтобы получить аттенуированные штаммы *Salmonella*, носили децелиацию в гены *arv*, кодирующие ферменты биосинтеза ароматических соединений, и в гены *dar*, кодирующие ферменты метаболизма пуринов. Такие штаммы с двойной децелиацией вызывают легкую форму инфекции и обладают в 10^6 раз меньшей вирулентностью. На их основе уже создана эффективная

1. Плазмиду, которая содержит сегмент ДНК, кодирующий A_1 -петлю, обработали рестрицирующими энзимостеплазином *SalI* и *XbaI*, каздала из которых расщепилась только кодирующая A_1 -петля последовательности вставки.

2. Чтобы замкнуть плазмиду в кольцо, к *SalI*-сайту привнесли *XbaI*-лиinker и обработали плазмиду рестриктазой *XbaI*.

3. С помощью ДНК-аппарата фага T4 соединили *XbaI*-сайты вставки. В результате на поверхности кодирующей A_1 -петли последовательности оказалась удаленная сегмент длиной 550 п. н., соответствующий аминокислотным остаткам 183-194.

4. С помощью колонизации перенести эту плазмиду в штамм *V. cholerae*, несущий ген устойчивости к тетрациклину в locus, кодирующий A_1 -петлю.

5. При обработке галактозидазы оставшиеся в клетке плазмиды чистые последовательности *arv*, *dar*, *arv* и A_1 -петли, и геном A_1 -петли *Salmonella* Tc^r-геном, кодирующая A_1 -петля метаболизма пуринов. Такие штаммы с двойной децелиацией вызывают легкую форму инфекции и обладают в 10^6 раз меньшей вирулентностью.

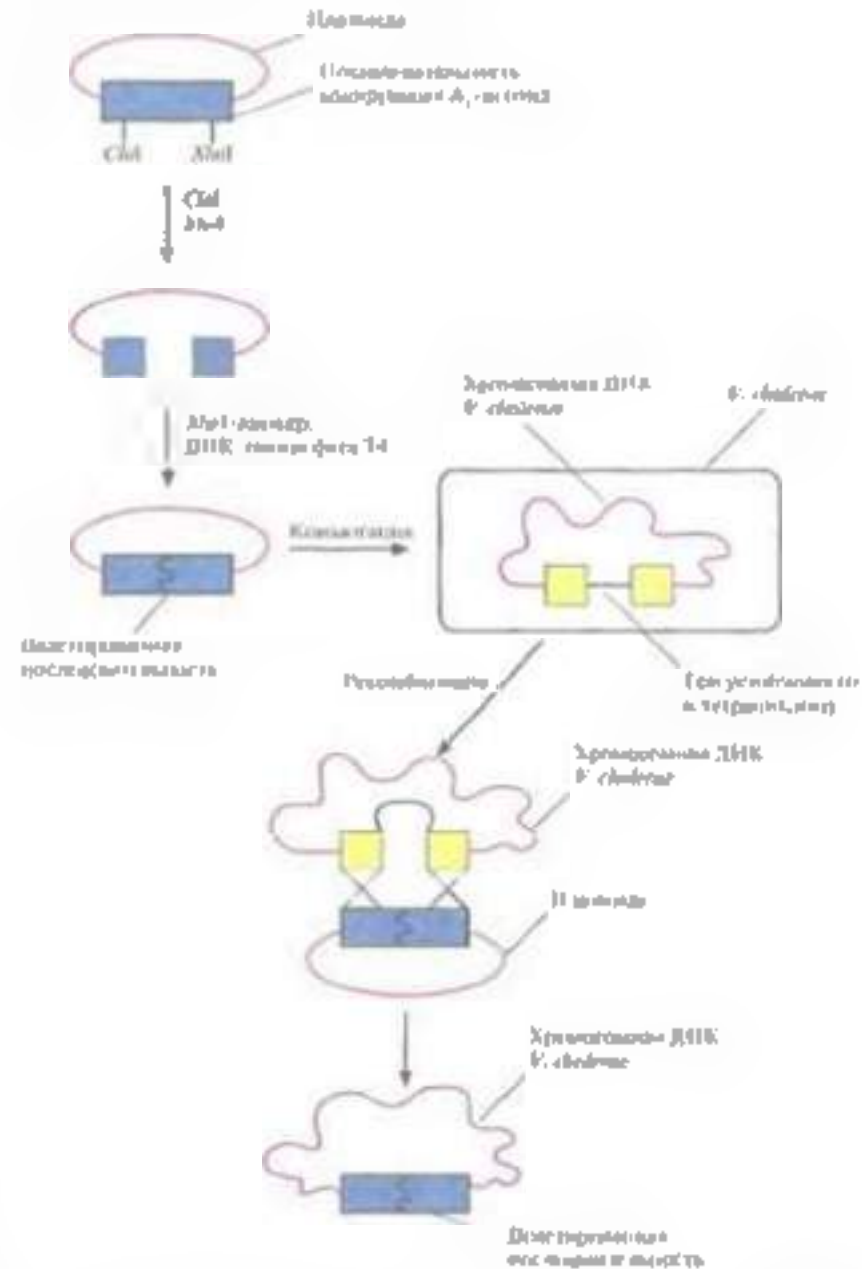


Рис. 11.6. Создание плазмиды *V. chlamydiae* с конечной частью нуклеотидной последовательности, кодирующей А-гемолитическую токсину

периферичне і звичайні для мишкив, овеи, крупного рогатого скоту, пинцини, а совсем недавно – и для человека.

Противокарициноматозные вакцины

Простейшие паразиты *Leishmania* также могут вызывать у человека различные иммунные ответы, однако создание эффективных вакцин при-

тих них представляется собой интеллектуальную задачу. С этой целью можно использовать attenuированные линии *Leishmania*, но они часто ревертируются и становятся вирулентными, а кроме того, могут длительное время бессимптомно персистировать в организме человека – рецидивировать инфекции – и передаваться другим людям. Чтобы решить эти проблемы, пытаются создать атте-

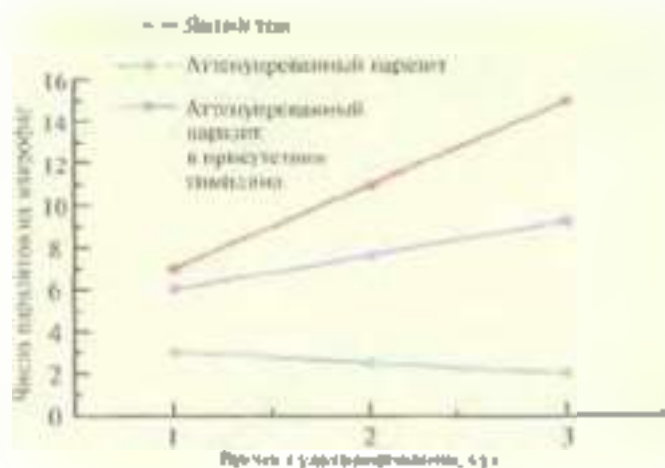


Рис. 11.7. Промофертилизация паразита *L. major* в присутствии вируса в присутствии тимолина. Для каждого в трех случаях (отсутствия паразита, отсутствия тимолина и паразита, присутствия паразита в присутствии тимолина) (Из работы Tilly et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10267–10269, 1995, с изменениями.)

нуронную персонифицированную днк *Leishmania* с помощью введения одного из важных для метаболизма генов (например, гена дигидрофолатредуктазы тимидилатсинтазы). У паразита от этого паразита, *Leishmania major* E10-5A3, паразит дигидрофолатредуктазы тимидилатсинтазы были внесены геном устойчивости к тетрациклину G-418 и проинфицированы. В отличие от паразита дикого типа, при выращивании *L. major* E10-5A3 в обычной культуре или в культуре макрофагов и среде необходимо добавлять тимидин (рис. 11.7). Промофертилизация ВАЛВ/с паразита оставалась жизнеспособной в течение нескольких дней, что достаточно для создания стабильного штамма у животных (рис. 11.8), но недостаточна для развития заболевания. Ни персонифицированная днк

ни, ни заболевание не возникли ни у одного из животных. Чувствительность паразита к тетрациклину была доказана введением паразита в культуру макрофагов. Проведены дополнительные эксперименты по жизнеспособности, можно быть уверенной, ее инфекционность при выведении из человека.

«Векторные» вакцины

Противотуберкулезные вакцины

В качестве эффективной живой прививочной вакцины широко использовался возбудитель туберкулеза (БКК), относящийся к роду микобактерий. Геном этого возбудителя состоит из 187 генов, кодирующих примерно 200 различных белков, ДНК БКК ретрансри-

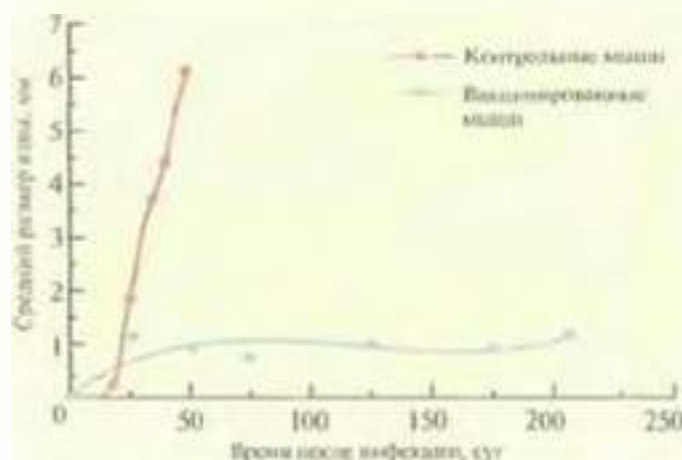


Рис. 11.8. Изменения в вирулентности паразита *L. major* вакцинированных мышей у мышей ВАЛВ/с после введения персонифицированной паразита *L. major*. В момент времени 0 мышей, представленные вакцинированными персонифицированным паразитом, зараженными паразитом, в среднем определяли средним размером колонии (мм) или. Контрольные мыши не вакцинированы. (Из работы Tilly et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10267–10269, 1995, с изменениями.)

ется в цитоплазме инфицированных клеток, а не в ядре, филаггера (цилички) у вируса герпеса ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и ферментов, осуществляющих репликацию, метилирование и полиаденилирование мРНК. Поэтому, если в геном ВКО встроить чужеродный ген, так чтобы он находился под контролем ВКО-промотора, то он будет экспрессироваться независимо от регуляторных и ферментных систем хозяина.

ВКО имеет широкий спектр хозяев (полющичья и бесполоночная), остается жизнеспособным в течение многих лет после лиофилизации (испарении воды с помощью замораживания) и не обладает антигенными свойствами, а потому может использоваться для создания так называемых векторных вакцин. С их помощью осуществляется доставка и экспрессия в организм-хозяина чужеродных генов, кодирующих антигенные белки, белки индуцирующей выработку протективных антител. Геном ВКО имеет большие размеры и не содержит уникальных сайтов рестрикции, что не позволяет встраивать в него дополнительные нуклеотидные последовательности. Однако нужные гены можно встроить в геном ВКО с помощью соматической рекомбинации in vivo следующим образом:

1. Сегмент ДНК, кодирующий специфичный антиген (например, HBsAg), встраивают в плазмидный вектор (например, вектор системы ВКО) промотора, включенного в каждую либо искусственный ген ВКО, например ген тимидинкиназы (рис. 11.9, А).
2. Этим плазмидой трансформируют культуру дефектных по тимидинкиназе животных клеток, обычно фибробластов куриного эмбриона, предшественников инфицирования ВКО дикого типа, который синтезирует функциональную тимидинкиназу.
3. В результате рекомбинации между нуклеотидными последовательностями, фиксирующими промотор и ген протективного антигена, и соответствующими последовательностями вирусного генома происходит встраивание чужеродного гена в вирусную ДНК (рис. 11.9, Б). Частота такой рекомбинации невысока, однако понижаями клеток, содержащих реком-

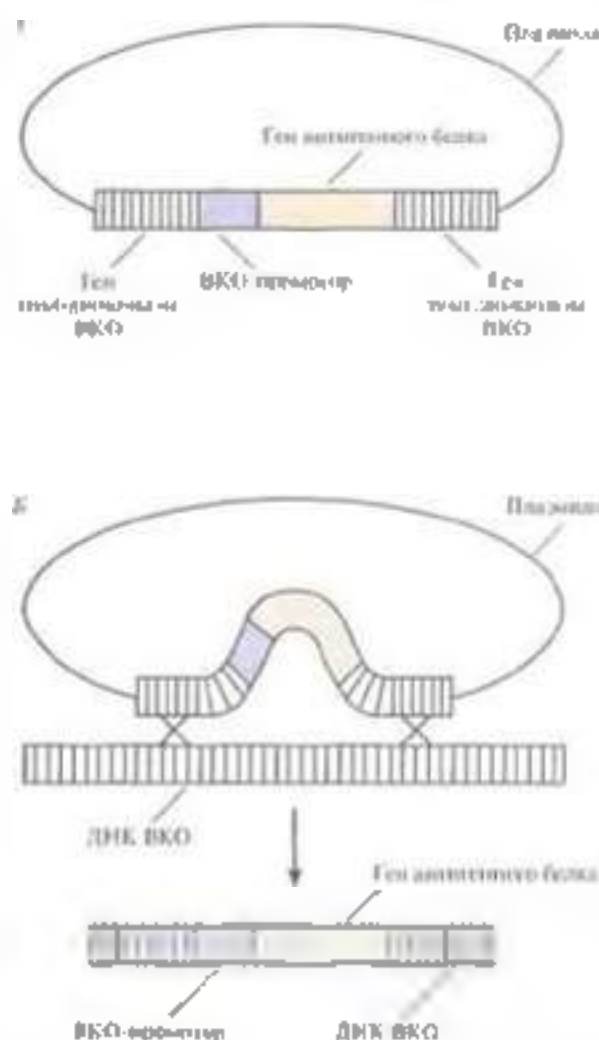


Рис. 11.9. Встраивание в ДНК ВКО гена, белковый продукт которого (обычно вирусный антиген) индуцирует иммунный ответ. А Плазмиды, несущий ген интересного белка, способный экспрессироваться. Б ДНК-фрагмент (красный цвет), помещенный в встраиваемый сайт гена в ДНК ВКО.

бинантных ВКО, можно обогатить, используя селективную среду с бромдезаминурацином. Этот токсичный аналог тимидина в его отсутствие тимидинкиназой не фиксируется и синтезируемая ДНК не оказывает токсического действия. Дефектные по тимидинкиназе клетки хомяка, которые содержат обычный ВКО, в присутствии бромдезаминурацина погибнут, в клетках, несущих рекомбинантный ВКО с реплем в гене им-

мыслили, что становится устойчивым в его экспрессионной деятельности.

4. Проводят окончательный отбор с помощью ДНК-зонда, гибриды удаляются с геном антигенного белка.

Поскольку дефектные по стабильности ВКО спонтанно возникают с относительно высокой частотой (примерно 1 на 10^3 – 10^4 вирусных частиц), нередко проводят коинфекцию клеток как минимум селективными маркером и нужным геном. Это объясняет разнообразие спонтанных мутаций и мутантов, полученных с помощью гомологичной рекомбинации. В качестве селективного маркера обычно применяют ген *neo*, кодирующий фермент неоминцил-фосфотрансферазу II и обеспечивающий устойчивость к воздействию миноминина G-412. Этот ген, в отличие от других селективных маркеров, остается стабильным при встраивании в геном ВКО.

Разработанная специальная система, позволившая избежать прерывания рамки считывания генов ВКО при встраивании чужеродного гена. При этом опадает необходимость в использовании селективного маркера, поскольку каждая образующаяся в культуре рекомбинантный вирус бу-

дет содержать и экспрессировать ген-мишень. ДНК ВКО широко применяется ген *pr27*, отмеченный за образование бляшек при росте вируса в монокультурной культуре живых клеток (рис. 11.10, А). Если заменить этот ген маркерным геном *E. coli*, то образуется мутантный ВКО, который не формирует бляшек при выращивании его в течение 2–3 сут в культуре живых клеток (рис. 11.10, Б). Ген-мишень встраивается в этот мутантный вирус с помощью гомологичной рекомбинации его ДНК с вектором, несущим ген *pr27* и ген-мишень (рис. 11.10, В). Мутантный ВКО, получивший ген *pr27*, приобретает способность к образованию бляшек, при этом в его геноме встраивается ген-мишень, а маркерный ген утрачивается. Мутантный вирус с селективным геном *pr27* не может ревертировать к дикому типу, поэтому каждая вирусная частица, образующая бляшку, содержит желаемую конструкцию. Этот метод прост, применим для переноса и экспрессии любого гена-мишени, не требует наличия дополнительных маркерных генов и не прерывает рамки считывания генов ВКО.

В геноме ВКО уже удалось встроить и экспрессировать в культуре живых клеток несколько генов антигенных белков: G-белка ви-

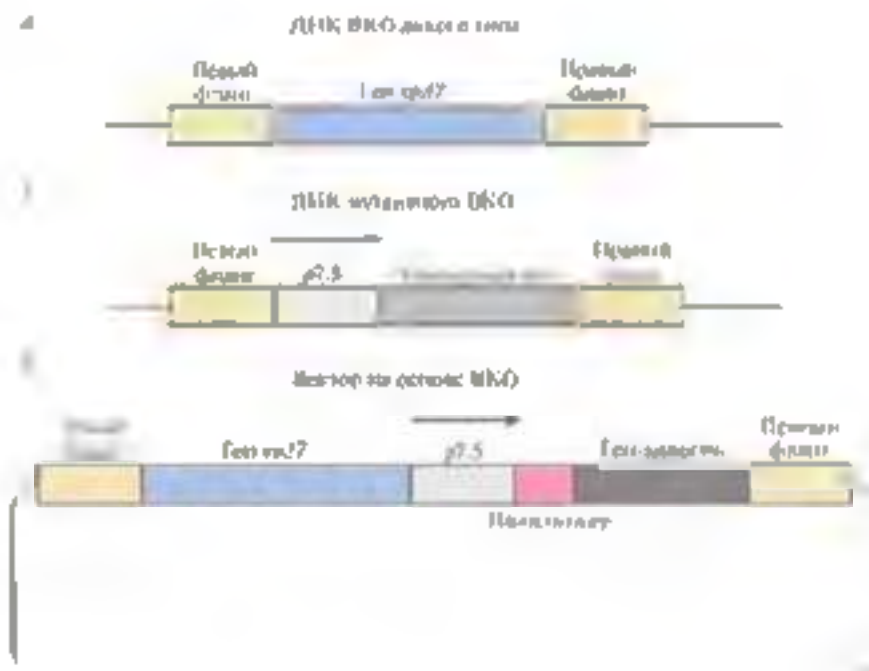


Рис. 11.10. А ДНК ВКО дикого типа. Б ДНК мутантного ВКО. В вектор на основе ВКО. Левый фланк и правый фланк — последовательности, прилегающие к гену и справа соответственно к гену *pr27* в геноме ВКО дикого типа. Промотор гена *pr27* (к ним относится *pr27.5* — сильный «триггер» или «спонсор») ВКО-промотор. Все мутации встроены и встраиваются (геном) в геном рекомбинантного вируса между рекомбинантными участками ДНК мутантного вируса (триггер) и маркерным геном *E. coli* на ген *pr27* и ген-мишень.

рда белешества, иммерсионного антигена ислэнэна Н, ковалентных белков вируса Свинбас, NP- и HA-белков вируса гриппа, N- и G-белков вируса геморрагического сыпчатого, гликопротеинного вируса простого герпеса. Некоторые из полученных на основе ВКО рекомбинантных вакцин можно использовать для создания эффективных вакцин. Так, рекомбинантный ВКО, экспрессирующий ген сцепленного O-вируса простого герпеса типа 1, предотвращает герпетические инфекции у мышей, а рекомбинантный ВКО, экспрессирующий ген поверхностного антигена вируса бешенства, индуцирует выработку протективных антител у птиц. Основными переносчиками вируса бешенства в Европе

всё горные ВКО-вакцины но должны предотвратить иммунный сразу от нескольких инфекций. Для этого можно использовать рекомбинантные ВКО, которые несут несколько генов, кодирующих различные антигены.

Известно, что от определённого ВКО-промотора чужеродный белок может синтезироваться в рибосоме или по крайней мере на поверхности мембраны, при этом его количество определяется силой промотора. Обычно для экспрессии большого уровня экспрессии используются «подрывные» ВКО-промоторы: р11 (промотор гена, отвечающего за синтез белка митochondрия) и пррСАФ (промотор гена интегрального белка вируса коровьей оспы типа А). При встраивании в сайт ДНК ВКО нескольких чужеродных генов каждая из них помещается под контроль отдельного ВКО-промотора, чтобы предотвратить генотоксичные рекомбинации между различными участками вирусной ДНК, которая может привести к утрате важных генов.

Живым рекомбинантным вирусным вакцинам свойственны преимущества перед неживыми вирусными и субвиральными вакцинами: 1) они являются аутогенными антигенами практически не отличаются от газетной цели обычной инфекции; 2) вирус может реплицироваться в клетке-хозяине и увеличивать количество антигена, который индуцирует продукцию антител В-клетками (гуморальный иммунитет) и стимулирует выработку Т-клеток (клеточный иммунитет); 3) остринантные гены ингибируют белков в адне и быстрее число сайтов действия ВКО ещё больше увеличивает его вирулентность.

Недостаток живой рекомбинантной вирусной вакцины состоит в том, что при вакцинации лиц со сниженным иммунным статусом (например, больных СПИДом) у них может развиться тяжёлая вирусная инфекция. Чтобы решить эту проблему, можно встроить в вирусный вектор ген, кодирующий человеческий интерферон-2, который стимулирует Т-клеточный ответ и ограничивает пролиферацию вируса.

Нежелательные побочные эффекты пролиферации ВКО можно предупредить индукцией цели вируса после вакцинации. Для этого были созданы чувствительные к интерферону вирус (ВКО данного типа относительно устойчив к его действию), экспрессируя который можно регулировать в случае возникновения при вакцинации осложнений.

Механизм устойчивости ВКО к интерферону остаётся неустановленным, пока не были обнаружены открытые рамки считывания КЗЛ, кодирующая белок массой 10,4 кДа. Этот белок содержит аминокислотную последовательность, гомологичную N-акциевич части эукариотического фактора инициации eIF-2α мол. массой 16,1 кДа. N-концевые области обоих белков содержат 17 практически идентичных аминокислотных остатков, причём в положении 51 в обоих случаях находится серин, который в eIF-2α фосфорилируется активированным интерфероном Р1-киназой, что приводит к ингибированию синтеза белка и обрабатываемых интерфероном клетках. КЗЛ-белок действует как конкурентный ингибитор фосфорилирования eIF-2α, обеспечивая устойчивость ВКО к интерферону, и если эти гены ВКО удалять ген КЗЛ или его часть, то вирус станет чувствительным к интерферону С помощью ПЦР-мутации гена КЗЛ, находящегося в составе плазмиды, и последующей гомологичной рекомбинации между ДНК ВКО и плазмидой, нельзя иметь КЗЛ-последовательности разных типов модифицированным вариантом была сконструирован мутантный ВКО КЗЛ. Этот штамм оказался в 10–15 раз более чувствительным к интерферону, чем штамм дикого типа (рис. 11–11). Эта работа является важным шагом на пути создания более безопасных ВКО-векторов. Последовательности, сходные с КЗЛ, могут сохраняться и другие устойчивые к интерферону вирусы, что по мнению с помощью де-

земля при соприкосновении, состоит в ретровирусной проекции того агента патогенной бактерии на поверхность другой непатогенной бактерии. Многие бактерии имеют жгутики, состоящие из белка филаментин; под микроскопом они выглядят как нити, отходящие от бактериальной клетки. Если сделать так, что жгутики непатогенного микроорганизма будут несанкционированно прикреплены к поверхности патогенного микроорганизма, то можно будет индуцировать выработку протективных антител.

Нашим такой подход использовали при создании противохолерной вакцины. Синтетический аденонуклеотид, кодирующий эпитоп субъединицы В холерного токсина, встроили в гипервариабельный участок гена филаментин *Salmonella* и полуконечно сконструировали в референции по филаментин путем *Salmonella*. При этом было известно, что эпитоп, кодируемый 50–64 аминокислотные остатки субъединицы В холерного токсина, индуцирует выработку антител в низкотоксигенном холерном токсигене. Химерный филаментин нормально функционирует в эпитоп холерного токсина, реагируя с на поверхности жгутиком. Иммунизируя мышей с помощью гипертермолабильной нителлины примерно $5 \cdot 10^8$ эпитоп или убитых формальдином бактерий с модифицированным филаментином индуцировали выработку большого количества антител как в петлю (50–64 аминокислотных остатков), так и в эпитопе нителлинового холерного токсина. Антиточными образцы были экстрагированы и далее три раза через нителлин в один филаментин один ген *Salmonella* и создать полноразмерную протипов герма культуру вакцины.

С помощью переработки введенных интензивных эпизодов *Salmonella* можно осуществлять доставку в эпитопы холерного токсина бактерии, живущие в широком спектре животных, включая рыбу. Если имеет выбор промотора, контролирующего транскрипцию чужеродного гена. Если используется сильный промотор, может возникнуть метаболическая перегрузка, характеризующаяся трансферрином бактерий. В отличие от ферментов, эпитопы животного-хозяина не являются выделенной системой, и экспрессия чужеродного гена нельзя регулировать изменением температуры или добавлением специфических индукторов. Регули-

ровать роль может играть только промотор, регулирующий на те или иные стимулы. Например, работу индуктора *nitB* *Sal* можно регулировать, изменяя содержание нитритов и нитратов в среде. В наиболее активном или в ингибиторном условиях. В одном из экспериментов промотор *nitB* использовали для контроля экспрессии гена неспецифического иммуногенного С-фрагмента столбчатого токсина в аттенуированном штамме *Salmonella*. В развивающейся стадии инфекции *Salmonella typhi* у крысы более 1 млн. клеток в мл. Если генетически модифицированный штамм *Salmonella* выживет в организме животного, то С-фрагмент столбчатого токсина синтезируется и будет при пероральном введении той бактерии встраиваемым мышам С-фрагмент синтезируется, и у животных вырабатываются антитела к нему. Таким образом, штамм *Salmonella*, в котором встроены С-фрагмент столбчатого токсина, кодирующийся под контролем промотора *nitB*, можно использовать как живую пероральную противостолбчатую вакцину. Чтобы выяснить, насколько эффективен этот подход (то бактерии человека, необходимо провести дополнительные исследования).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционные вакцины содержат инвазивные или аттенуированные патогены: микробными (бактериями или вирусами). Эти вакцины имеют ряд недостатков: не все патогенные микроорганизмы можно выращивать в лабораторных условиях для получения больших количеств; работа с бактериями в больших количествах требует соблюдения строгих мер предосторожности, аттенуированные штаммы нередко ревертируют и становятся вирулентными; инвазивная часто бывает неполной, срок годности вакцин зависит от условий хранения.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет создавать искусственные вакцины, используя при этом различные плазмиды. Деактивированные или инактивированные, генетически модифицированные, содержащие неинфекционные, иммунологически активные штаммы, которые не могут

репертирывать и становиться патогенными. Клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного организма, встраивают в генно-инженерного носителя (обычно вирус) и получают безопасную, не содержащую болезнетворных микроорганизмов вакцину. Наконец, гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенных микроорганизмов, встраивают в экспрессирующие векторы, получают нужный продукт в большом количестве и используют его как вакцину. Последняя подход позволяет производить субединичные и пептидные вакцины (если используются только сегменты гена в первом случае и фрагменты гена или кодирующие domains основных антигенных детерминант — во втором). Пептидные вакцины получают и с помощью химического синтеза пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Andis R., D. Silvers, S. D. Suggs, P. L. Achacoso, C. J. Miller, B. Baltimore, M. B. Felberg. 1994 Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* 265: 1448-1451.
- Bittle J. L., R. A. Haughton, H. Alexander, T. M. Shmielek, J. G. Sutcliffe, R. A. Lerner, D. J. Rowlands, F. Brown. 1982. Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298: 30-33.
- Blasco J., M. P. Klein, R. Lathé, J. P. Leong, P. P. Pastoret, J. P. Soulebot, P. Desmettre. 1986. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia vaccine. *Nature* 321: 373-375.
- Blasco R., B. Moss. 1995. Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* 149: 157-162.
- Doolittle J. L., P. E. Highfield, G. A. M. Cross, D. J. Rowlands, P. A. Lowe, F. Brown, T. J. R. Hark. 1981. Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes. *Nature* 290: 300-302.
- Brown F. 1984. Synthetic viral vaccines. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 221-235.
- Brown F. 1985. Peptides as the next generation of foot and mouth disease vaccines. *Bio/Technology* 3: 445-448.
- Burnette W. N. 1990. The advent of recombinant pertussis vaccines. *Bio/Technology* 8: 1003-1005.
- Charles L., G. Dougan. 1990. Gene expression and the development of live enteric vaccines. *Trends Biotechnol.* 8: 117-121.
- Charfield S. N., I. G. Charles, A. J. Mullooly, M. D. Over, G. Dougan, D. Pickard, D. Slater, N. F. Fairweather. 1992. Use of the *lacZ* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technology* 10: 388-392.
- Chou M., R. Yakhrov, J. Bittle, J. Hogle, D. Baltimore. 1985. Synthetic peptides from four separate regions of the poliovirus type 1 capsid protein VP1 induce neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 910-914.
- Clarke R. E., S. E. Newton, A. R. Carroll, M. J. Francis, G. Appleyard, A. D. Syeed, P. E. Highfield, D. J. Rowlands, F. Brown. 1987. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature* 330: 381-384.
- Cohen J. 1993. Naked DNA points way to vaccines. *Science* 259: 1691-1692.
- Cremer K. J., M. Maclellan, C. Wahlenberg, A. I. Nuthins, B. Moss. 1985. Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 228: 737-740.
- DiMarchi R., G. Brooke, C. Gale, V. Crickoeth, T. Ducl, N. Mowat. 1986. Protection of cattle against foot and mouth disease by a synthetic peptide. *Science* 232: 639-641.
- Ferguson M. 1991. Progress towards rabies control. *Trends Biotechnol.* 9: 7-11.
- Finkelstein A., R. F. Silva. 1989. Live recombinant vaccines for poultry. *Trends Biotechnol.* 7: 271-277.
- Fletcher C., A. Hogg, B. Moss. 1987. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression. *Nature* 330: 254-262.

- Grakau F. I. 1990 Adenoviruses as expression vector and recombinant vaccines. *Trends Biotechnol* 8: 15-27
- Horvath M. A., R. W. E. Lee, B. J. Millan, G. Harth. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1530-1534.
- Jones T. R., S. L. Hoffman. 1994. Malaria vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 303-311.
- Kaper J. B., H. Lockman, M. M. Riddin, M. M. Levine. 1984. A recombinant live oral cholera vaccine. *Biotechnology* 2: 345-349.
- Kaper J. B., H. Lockman, M. M. Riddin, M. M. Levine. 1984. Recombinant nontoxicogenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccine candidates. *Nature* 308: 655-658.
- Kaper J. B., J. G. Morris, Jr., M. M. Levine. 1995. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 48-86.
- Kisim D. C., S. N. Isaacs, I. A. Quakyi, R. W. Gwate, R. Moss, D. B. Keister. 1991. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Science* 252: 1310-1313.
- Kupper H., W. Keller, C. Kurz, S. Fossa, H. Schaller, R. Franze, K. Strohmater, O. Marquardt, V. G. Zaslavsky, P. H. Hofschneider. 1981. Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *E. coli*. *Nature* 289: 555-559.
- Lasky L. A., D. Douberko, C. C. Simonsen, P. W. Berman. 1994. Protection of mice from lethal herpes simplex virus infection by vaccination with a secreted form of cloned glycoprotein D. *Biotechnology* 2: 577-578.
- Low R. S., P. M. Keller, R. J. Keech, A. J. Durbin, Y. Whang, A. J. Morgan, E. Neff, R. W. Ehn. 1987. Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3896-3900.
- Mekalanos J. J., J. C. Sudoff. 1988. Cholera vaccines fighting an ancient scourge. *Science* 245: 1387-1389.
- Nebel M.-L., H. L. Davis, M. Schlegel, M. Mancini, P. Toffin, R. G. Whaley. 1993. DNA mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5307-5311.
- Older J. N., O. E. Herbs. 1990. Vaccinia virus: a versatile tool for molecular biologists. *Trends Biotechnol* 8: 20-25.
- Moss B. 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 252: 1662-1667.
- Nebel G. J., P. I. Felgner. 1993. Direct gene transfer (or immunotherapy and immunization). *Trends Biotechnol* 11: 211-215.
- Oeston S. M. C., C. O. Incak, H. A. D. Stoeber. 1989. Immunoreponse to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella typhimurium*. *Science* 244: 70-72.
- Nussenzweig H. S., C. A. Long. 1994. Malaria vaccines: multiple targets. *Science* 265: 1381-1383.
- Obeid S., H. Hengartner, H. M. Zinkovangel. 1991. Vaccination for disease. *Science* 251: 195-197.
- Paoletti E., J. Tartaglia. January 1995. Interferon sensitive recombinant poxvirus vaccine. *US patent* 5, 378, 457.
- Ratafia M. 1987. Worldwide opportunities to genetically engineered vaccines. *Biotechnology* 5: 1154-1158.
- Sizemore D. R., A. A. Branstrom, J. C. Sudoff. 1995. Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270: 299-302.
- Slaver C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. J. Durbin, I. A. Hanson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. E. Hatfull, S. H. Snapper, R. G. Barletta, W. H. Jueths, Jr., H. K. Blum. 1991. New use of Bx1₁ for recombinant vaccines. *Nature* 351: 456-460.
- Tang H.-C., M. DeVit, S. A. Johnston. 1991. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.
- Tartaglia J., E. Paoletti. 1988. Recombinant vaccinia virus vaccines. *Trends Biotechnol* 6: 41-46.
- Thrus R. G., J. G. Gielens-Faba, I. A. R. De Freitas, S. M. Beverly. 1995. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10267-10271.
- Vimer J. B., J. J. Donnelly, S. Parker, G. H. Rhodes, P. I. Felgner, V. J. Dwarti, S. H. Grumbine-01, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, I. A. Han, K. R. Gaudet, D. Martinez, H. C. Peary, J. W. Silver, D. L. Montgomery, M. A. Liu. 1993.

Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите кратко способ создания вакцин из кролика бактерия, продуцирующая токсины
2. Что ограничивает применение традиционных вакцин?
3. Предположим, что вы принимаете участие в работе международной организации по охране здоровья животных и вам нужно создать вакцину против крайне вирулентного вируса крупного рогатого скота. Известно, что геном представляет собой полидециллирированную линейную двоякоцепочечную РНК длиной 10 1 0 0 н и содержит восемь разных генов. Вирус не имеет оболочки, его основной поверхностной детерминантой является белок капсиды (VP 2). Какую стратегию вы используете?
4. Какие подходы применялись при создании пептидных противовирусных вакцин?
5. Что представляет собой вирус коровьей оспы и как с его помощью можно получать уникальные живые рекомбинантные вакцины?
6. Предположим, что вы вывелили РНК-содержащий вирус, вы — бешенство у собак и свиней. Как на основе этого очищенного вируса создать рекомбинантную вакцину, защищающую животных от бешенства?
7. Как работники Всемирной организации здравоохранения вы сделали новую оптимальный способ искоренения бешенства в инфицированных линиях животных. Предположим, что у вас есть пептиды вакцины и вакцина на основе вируса коровьей оспы; выберите одну из них и обоснуйте ваше решение.
8. Как можно использовать в качестве вакцины бактерии со спорами?
9. Перечислите преимущества живой рекомбинантной вирусной вакцины перед неживой и сублетальной вакцинами.
10. Опишите несколько подходов, использованных при создании холерной вакцины

Использование рекомбинантных микроорганизмов для получения коммерческих продуктов

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

При наличии эффективной системы экспрессии получение белков продуктом специфического гена не составляет особого труда. Белок может представлять собой либо тот или иной продукт, который хотят получить (например, рестрицирующую эндонуклеазу), либо фермент, катализирующий определенную химическую реакцию (например, одну из реакций фиксации азота антибиотиков). Иногда в результате генетических манипуляций микроорганизм приобретает способность к синтезу нового фермента и может использоваться для получения или иного низкомолекулярного соединения — витаминов, аминокислот, красителей, антибиотиков, предшественников различных биохимических и т. д. Такой микроорганизм становится «фабрикой» по производству указанного метаболита.

Эндонуклеазы рестрикции

Развитие технологии рекомбинантных ДНК было бы невозможным, если бы в распоряжении исследователей не было бы таких эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз). В настоящее время в продаже имеется более 300 различных рестриктаз. Эти ферменты отличаются самым разным происхождением: эубактериальным, археобактериальным, фотосинтезирующими, диатрифовыми,

микотрифовыми, термофильными, психрофильными, медленно- и быстрорастущими. Для культивирования каждого из них необходимо подобрать оптимальные условия ферментации — температуру, pH, состав среды, концентрацию кислорода — с тем чтобы максимизировать выход желаемого фермента. Чтобы не пришлось выращивать большое число разных микроорганизмов, готовить многокомпонентные среды, разрабатывать разные ферментеры и тратить время на подбор оптимальных условий роста для многочисленных штаммов, часто координируют гены эндонуклеаз рестрикции в *Escherichia coli*. Это позволяет стандартизовать условия получения необходимых продуктов. Кроме того, культура клеток *E. coli* быстро достигает высокой плотности и может быть приспособлена для споропродукции необходимого фермента.

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

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

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

На рис. 12.1 представлена стратегия выделения и клонирования в *E. coli* гена рестриктаза *RsaI* грибострацеллярной бактерии *Arizidocera zizymy*.

- 1 ДНК *R. zizymy* расщепляют с помощью *HindIII* и вырезают фрагмент с *HindIII* сайт плазмиды pRR322.
- 2 Рекомбинантными плазмидами трансформируют клетки *E. coli* HB101 и выращивают их в жидкой среде, а затем инфицируют бактериофагом λ . Если в какой-либо клетке экспрессируется ген фермента рестрикции, то она оказывается устойчивой к лизису фаговым типом λ . ДНК которой активно расщепляется синтезируемой рестриктазой.
- 3 Трансформированные клетки, устойчивые к фагу λ , подвергают осмотическому шоку, чтобы высвободить периплазматические бел-

ки. Определяют активность рестриктаза *RsaI* в белковом экстракте.

- 4 Положительные клоны тестируют на наличие *RsaI*-метилирующей активности.

Один положительный клон, выделенный в этом эксперименте, содержит встроенный фрагмент ДНК длиной 4 в. н. н. с инсерцией оперонной рестриктазы и метилазы *RsaI* в промоторном *P. lacZ* сайт. В клоне, несущем эту генетическую конструкцию, соблюдая естественный порядок порядка синтеза, сначала синтезируется метилирующий фермент, затем эндонуклеазы рестрикции. Уровень экспрессии гена рестриктаза *RsaI* в *E. coli* был примерно в 10 раз выше, чем в *R. zizymy*. Как и предполагалось, рестриктаза не кодировалась в периплазматическом пространстве, а метилаза в цитоплазме. Метод получения *RsaI* клонированием соответствующего гена в *E. coli* оказался более эффективным, чем выделение этого фермента из *R. zizymy*.

Для выделения генов, кодирующих ферменты рестрикции и модификации (метилирования), можно использовать также другие методы, которые состоят в следующем:

- 1 Создают банк клонов ДНК организма донора, продуцирующего известную эндонуклеазу рестрикции. Используют при этом плазмидный вектор, который должен содержать по крайней мере один сайт узнавания для этой рестриктазы.
- 2 Трансформируют *E. coli* гибридными плазмидами.
- 3 Из трансформированных клеток, выращенных в жидкой селективной среде (т. е. из клеток, содержащих плазмиду), выделяют плазмидную ДНК.
- 4 Обробачивают ее интересующей исследователя эндонуклеазой рестрикции.
- 5 Трансформируют *E. coli* плазмидными ДНК, обработанными эндонуклеазой рестрикции.

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

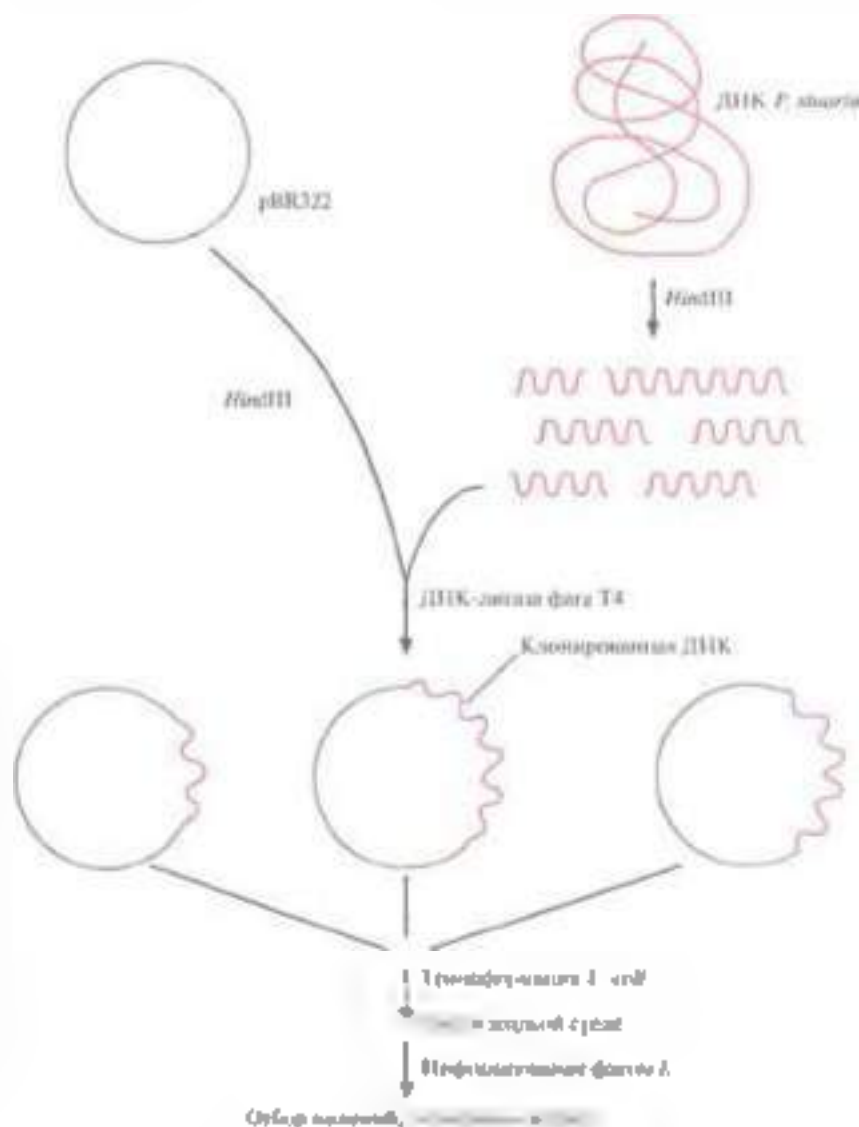


Рис. 12.1. Клонирование с использованием рестриктаз *Hind* III и субстрата его трансформации бактериями *E. coli*. Хромосому ДНК *P. stuartii* расщепляют *Hind* III и встраивают фрагменты в плазмиду pBR322. Трансформируют recombinантный плазмидой *E. coli*, выращивают клетки в агаровой среде и инфильтруют фазой I. Отбирают трансформанты, устойчивые к флу; именно они могут экспрессировать клонированный ген *Gal*.

Рассмотрим следующий пример. В плазмиду pBR322 встраивали *Hind* III-фрагменты ДНК *Neurospora crassa* и трансформировали ею клетки *E. coli* выделенную из трансформированных клеток плазмиду ДНК обрабатывали рестриктазой *Dde* I. Плазмиды, несущие и экспрессирующие ген кодирующего фермента, не расщеплялись, поскольку все восемь сайтов узнавания *Dde* I в pBR322 были метилированы. Смесь плазмид, обработанных *Dde* I, использовали для трансформации *E. coli*. Образование трансформантов, несущих ген функци-

онального модифицирующего фермента *Dde* I, обеспечивали только целые кольцевые молекулы плазмидных ДНК. Остальные плазмиды были расщеплены жидкофазной рестриктазой. Для того чтобы определить, какие клоны содержат ген фермента модификации, и ген жидкофазной рестриктазы, трансформанты тестируют на наличие в них активной рестриктазы *Dde* I. Отрицательный контроль можно с успехом использовать для выделенной гены любой рестриктазы, лишь бы он находился достаточно близко к гену соответствующего модифицирующего фермента и

был вставлен в плазмидный вектор, и введенный по меньшей мере один сайт узнавания для димера фермента.

Малые биологические молекулы

Использовать технологию рекомбинантных ДНК, чтобы эффективно улучшить стабильность микроорганизмов, иногда в них новые гены или модифицируя уже существующие. Основной целью таких изменений является создание рекомбинантного микроорганизма с новой ферментативной активностью, способного превращать существующий субстрат в ценный продукт, который обычно получают только с помощью химических и микробиологических методов.

Синтез L-аскорбинной кислоты

В настоящее время для крупномасштабного производства L-аскорбиновой кислоты (включая ее) используют весьма трудоемкий процесс, включающий одну микробиологическую стадию и несколько химических; основным субстратом для него является D-глюкоза (рис. 12.3). На последнем этапе этого процесса 2-кетол-L-гуляровая кислота (2-KLG) превращается в аскорбиновую и L-аскорбиновую кислоты. Значительные экспериментальные показали, что 2-KLG можно получить другим путем. Так, одни бактерии (*Asciobacter*, *Glycolobacter* и *Erwinia*) могут превращать глюкозу в 2,5-дикетил-D-глюконную кислоту (2,5-DKG), а другие (*Sorbitobaccillus*, *Vibrio* и *Actinobacter*, синтезирующие фермент 2,5-DKG-редуктазу, - преобразовывать 2,5-DKG в 2-KLG.

Использующийся в настоящее время способ получения аскорбиновой кислоты можно усовершенствовать, если исключить из него совместное культивирование указанных микроорганизмов для превращения глюкозы в 2-KLG. К сожалению, такое культивирование имеет свои трудности. Например, используемые микроорганизмы могут иметь разные оптимальные температуры и pH, могут различаться такие состав среды и скорость роста. Иными словами, условия культивирования, оптимальные для одного организма, могут быть неприемлемы для друго-

го, что приводит к снижению скорости «вымытия» и в среде одного из них. Подобных ситуаций можно избежать, используя микроорганизмы последовательно (рис. 12.3), при этом такой процесс трудно будет сделать непрерывным, если для роста микроорганизмов необходимы существенно разные среды. Непрерывным путем из этой ситуации можно было бы создать линию микроорганизмов, синтезирующих все ферменты, необходимые для превращения глюкозы в 2-KLG. Однако *Erwinia herbicola* осуществляет превращение D-глюкозы в 2,5-DKG в несколько стадий, катализируемых разными ферментами, а то время как *Sorbitobaccillus* способен превращать 2,5-DKG в 2-KLG, необходимо только одна стадия. Следовательно, наиболее простой способ synthesis одного микроорганизма, способного превратить D-глюкозу в 2-KLG, состоит в выделении гена 2,5-DKG результаты *Sorbitobaccillus* и введении его в *Erwinia herbicola*.

Первым шагом на этом пути является исследование и синтез 2,5-DKG-редуктазы *Sorbitobaccillus* и определение последовательности ее первых 40 N-концевых аминокислот. Исходя из этих данных были синтезированы для 40-нуклеотидных гибридных рибозимовых зондов, соответствующих разным частям белковой молекулы. Поскольку 71% нуклеотидов ДНК *Sorbitobaccillus* способен связать собой сайты *GA*, *GA*, *GA* сайты синтезировали таким образом, чтобы в третьем положении кодона по возможности находились именно они. Это позволяло минимизировать число рестриктивных оснований между зонами и искомого ДНК.

Синтезирующиеся живые гибридные зонды скрининга банка клонов ДНК *Sorbitobaccillus* клоны, гибридизующиеся только с одним из зондов, исключали из дальнейшего рассмотрения, считая, что соответствующая ДНК не является искомым. Выделили клон, содержащий ген 2,5-DKG-редуктазы, и секвенировали его. Нуклеотидные последовательности, расположенные до стартового кодона ATG, вырезали и вносили их в зонды транскрипции и трансляции, функционирующие в *E. coli*, поскольку регуляторные последовательности эукариотических микроорганизмов типа *Sorbitobaccillus* фермент функционирует в клетках этого микроорганизма. Полученную конструкцию вводили в

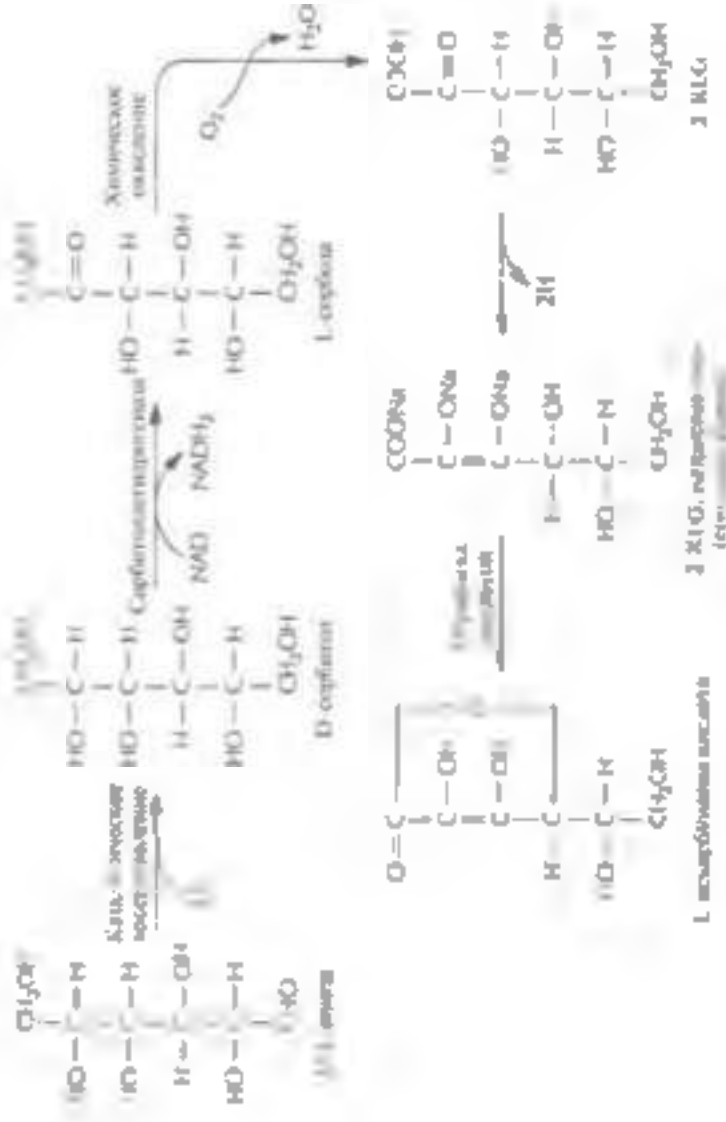


рис. 12.7. Прямая стрелка 1 и вырванный край стрелки 2 — это ингибиторы активности ДНК-полимеразы в 1 субфазе клеточного цикла. Остальные стрелки представляют собой часть хромосомной репликации

E. coli (при этом синтезировалась активная 2,5-DKG-редуктаза), а затем переместилась в секторе с широким кругом ходов и трансформировалась в *Escherichia herbolica*.

Трансформированные клетки *Escherichia* активно превращали D-глюкозу непосредственно в 2-KLG, при этом собственные ферменты *Escherichia*, локализованные во внутренней мембране бактериальной клетки, преобразовывали глюкозу в 2,5-DKG, а 2,5-DKG-редуктаза, локализованная в цитоплазме, катализирует превращение 2,5-DKG в 2-KLG (рис. 12.4). Таким образом, с помощью генетически манипулиций метаболические реакции, протекающие в столь разных микроорганизмах, удалось осуществить в одном из них. Этот гибрид приобрел способность синтезировать конечный продукт комбинированного метаболического пути. Такой организм можно использовать как фабрику для производства 2-KLG, заменивщую первые три стадии в этом процессе получения L-аскорбиновой кис-

лоты, который используется в настоящее время (рис. 12.2).

Коммерческую ценность 2,5-DKG-редуктазы можно повысить, если повысить аминокислотные замены, повышающие каталитическую активность фермента и его термостабильность. В то время, когда был идентифицирован ген 2,5-DKG-редуктазы, аминокислотные остатки, участвующие в образовании активного центра этого фермента, еще не были установлены. Однако, исходя из данных об аминокислотной последовательности фермента, была высказана его вторичная структура, состоящая из восьми тесно расположенных параллельных β -слоев, пересекающихся попарно α -спиралями, которые соединялись с β -слоями петлями разной длины (рис. 12.5). Такой характер укладки полипептидной цепи был установлен для 17 других ферментов с уже известной β -баррельной структурой, а это означало, что они были идентифицированы три петли, возможно участвующие в связывании субстрата. С помо-

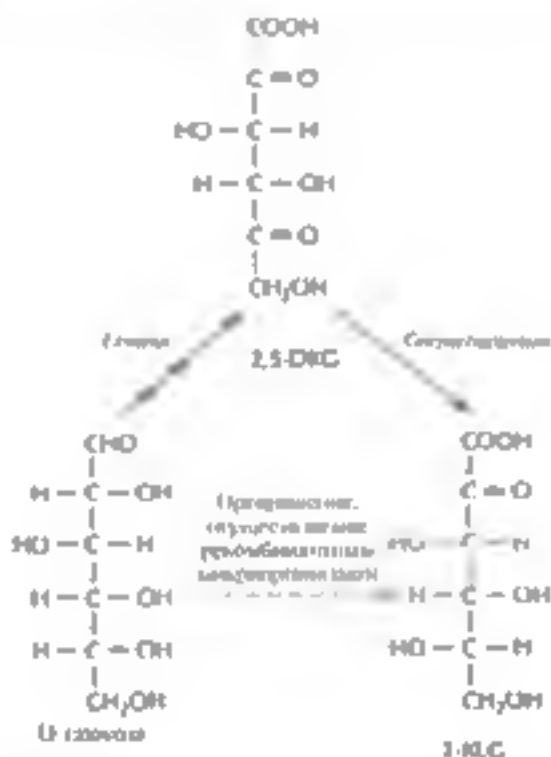


Рис. 12.3. Мы робили шаг к синтезу 2-KLG. *Escherichia coli* имеет три фермента, обеспечивающих синтез 2,5-DKG: пи-D-пиноксид, а конститутивный фермент, катализирующий превращение 2,5-DKG в 2-KLG. Тем же образом, 2-KLG непосредственно превращается в ацетилсукциновой кислоты, можно синтезировать пи-D-пиноксид совместно культивируемым штамм *Escherichia coli*. Альтернативный подход состоит в выделении гомологичности фактора *Escherichia coli* (представленного на соответствующем ферменте *Escherichia coli*)

одно или два гомолога непосредственно синтезируются без получения 12 мутированных белков, каждая из которых содержала одну аминокислотную замену в одной из цепей. 11 мутированных форм 2,5-DKG результаты обладали более низкой скоростью активности, чем дикотидный фермент, а 12 и, у которой остаток глутамин в положении 192 был заменен на аргинин, была примерно в два раза более активной. По данным кинетических исследований, максимальная активность была связана с увеличением в 1,8 раз максимальной скорости (V_{max}) и уменьшением (на 25%) константы Михаэлиса (K_m) реакции, катализируемой ферментом. Замена глутамина остатком в положении

192 на 57 (в ацетиловых остатках) получить более термостабильный фермент по сравнению с нативной формой. Дальнейшие исследования будут, вероятно, направлены на получение фермента, сочетающего оба этих свойства.

Синтез углеводов

Множество бактерий, особенно бактерии типа *Escherichia coli*, способны утилизировать различные органические соединения типа нафталина, толуола, ксилола и фенола, которые являются для них единственным источником углерода. Очень часто семьи ферментов, катализирующих расщепление этих органических соединений, растворяются в группах природных видов для (длиной 50-200 т.п.). Чтобы ставить эти эксперименты с этими бактериями, в частности проводить целенаправленную модификацию генов ферментов, катализирующих те или иные метаболические реакции, приходится предпринимать детальные генетические и биохимические исследования, и нередко в ходе этих исследований делаются неожиданные и весьма интересные открытия. Рассмотрим следующий пример. Плазмиды NA17 содержат два разных оперона, которые позволяют использовать ее псевдомонадам *Escherichia coli* как единственный источник углерода. Для характеристики соответствующих генов расщепили плазмидную ДНК с помощью *Hind*III и получили фрагменты с линейными *Hind*III плазмидой pBR322. Полученные гибридные молекулы ввели в клетки *E. coli* и выбрали трансформантов, устойчивых к ампициллину, но чувствительных к тетрациклину. Затем проверили всех трансформантов на способность образовывать колонии на неаэробных питательных средах, содержащих различные метаболиты того нафталина.

При исследовании одного из трансформантов, содержащего оставку длиной 10,5 к.п. и способного превратить нафталин в салicyловую кислоту, обнаружилось, что минимальная ростовая среда, содержащая триптофан, при обретает синюю окраску. Известный анализ этого явления показал, что трансформированные клетки *E. coli* синтезировали фрескел, мидито. Синтез аминокислот в четыре стадии (рис. 12.6)

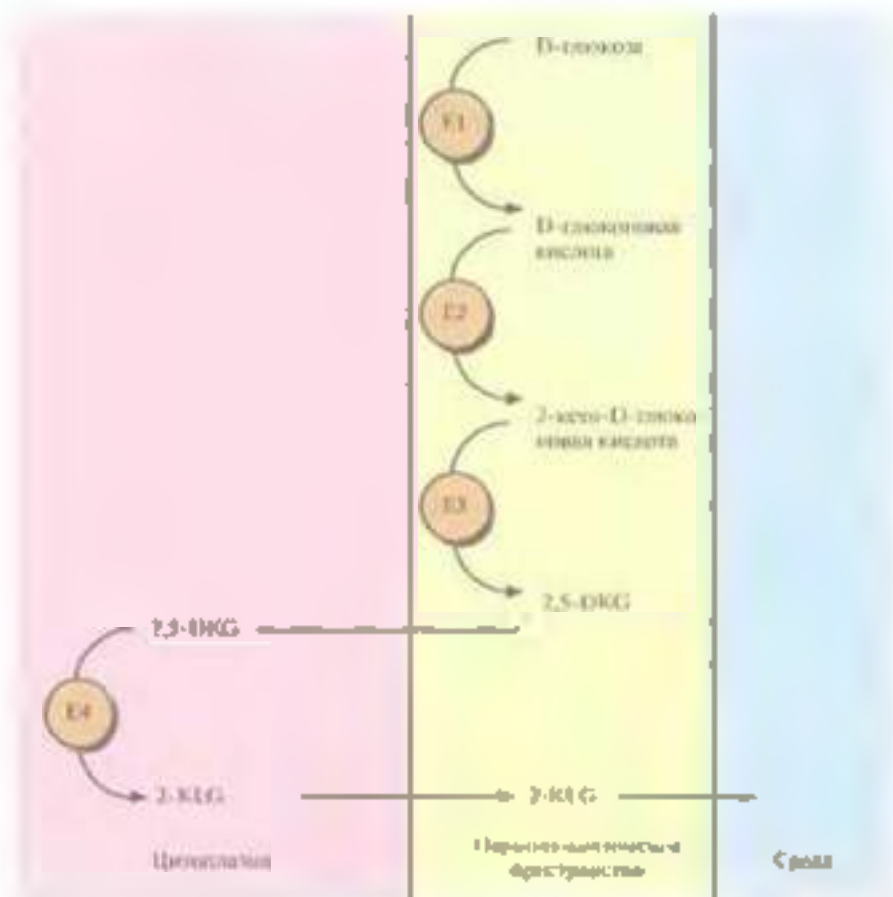


Рис. 12.4. Превращение D-глюкозы в 2,3-ДГФ в цитоплазме бактерий *Escherichia coli*. Все участвующие в этом процессе ферменты обозначены буквой E и последовательно пронумерованы, за исключением E4, локализованного в мембране (ионы)

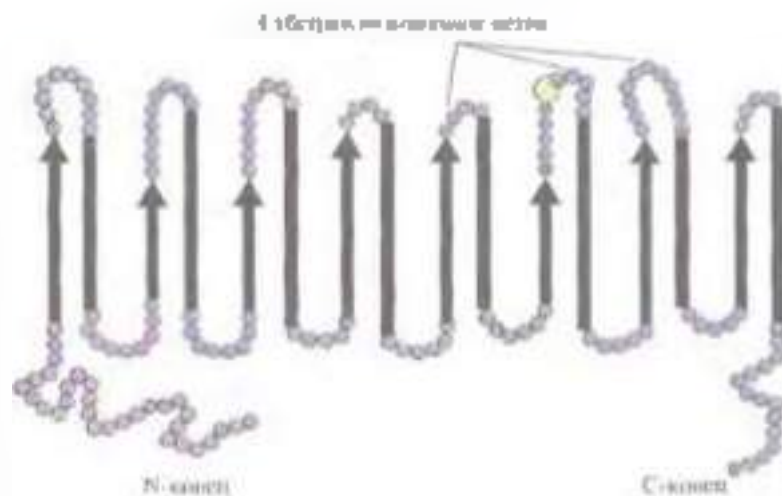
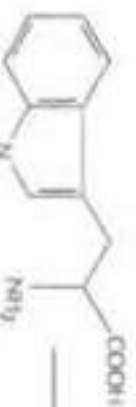


Рис. 12.5. Структура 2,5-ДГФ в действительности, высказываемая идея на ее линейные цепи (последовательность). Стрелки – β-слои, спирали и спиральные участки, образуют высококислотные островки, содержащиеся на N и C концы молекулы или соединяющие β-слои и α-спирали. Показаны три острова, островок (на), участвующий в стабилизации субстрата. Желтый кружок – 102 аминокислотный островок.

- 1 Прерывание триптофана в нислге с применением триптофан-4-ча, который синтезируется в мидельских клетках *E. coli*;
- 2 Окисление нислге до 5-гидрокси-2,3-дигидроиндола или действиями гидрокси-диокси-гена, который кодируется ДНК, перестроенной из плазмиды NAH7;
- 3 Стопганная депурпация;
- 4 Окисление на воздухе с образованием нислге.

Такая обработка, комбинация ферментов двух разных метаболических путей двух разных организмов привела к неожиданному синтезу кристалли нислге. Выделение в *E. coli* гена ксантиноксидазы, содержащегося в плазмиде ТСО1, может обеспечить прерывание триптофана в нислге, спонтанно окисляющийся до нислге (рис. 12.6).

Нислге, синтез которого, который применяется для окрашивания желтка и шерсти, был



Триптофан



используя *Salmonella typhimurium* для получения путём кумуляции в мидельских клетках *E. coli* индикатора, который производится примерно $1,5 \cdot 10^7$ кг этого кристалла на сушку около 200 млн. тонн. Нислге окисляется до нислге, и объем его производства велик, чем до этого уровня. Возможно получение нислге с помощью микробной ферментации, позволяющей избежать эфемерности и экологически кризисности традиционных биологических способов его производства, что дает возможность обойти без использования таких токсичных веществ, как индиго, ферулы и т.д. и т.д., которые необходимы при химическом синтезе нислге. В настоящее время биотехнологии позволяют получать оптимальные условия выращивания больших количества штамма *E. coli*, способного к синтезу нислге. Среди плазмидных препаратов — тетрациклин, pH и количество триптофана в среде, обеспечивающее максимальный выход

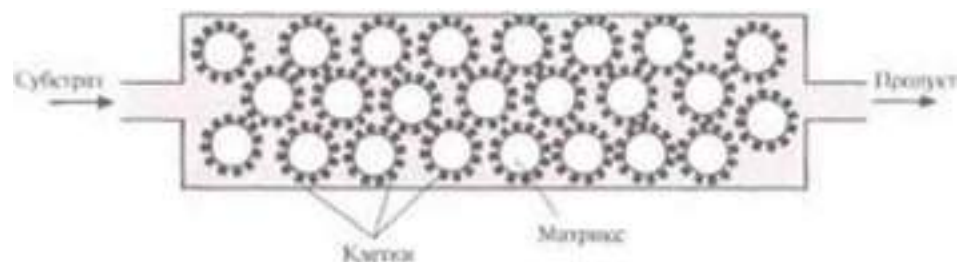


Рис. 12.7. Схематическое изображение биореактора, в котором можно было бы осуществлять синтез метаболита с использованием рекомбинантных клеток *E. coli*. Клетки иммобилизованы на частицах пористой матрицы. В реактор непрерывно подается субстрат (глюкоза) и непрерывно выводится продукт (глюкоза). Субстрат поступает через решетки (показаны сверху) и выходит через решетки (показаны снизу)

продукта. Эта система еще не готова для коммерческого использования, но уже ясно, что микробная биотехнология может быть применена в биореакторе, в котором рекомбинантные *E. coli* химически иммобилизованы на твердой матрице (например, на целлюлозе или силикагеле). Реактор мог бы работать в непрерывном режиме, с поступлением триптофана с одной его стороны и удалением индикатора с другой (рис. 12.7).

Синтез аминокислот

Аминокислоты широко применяются в пищевой промышленности — в качестве усилителей вкуса и аромата, антиоксидантов и пищевых добавок, в сельском хозяйстве — в качестве кормовых добавок; в медицине для терапии наследственных заболеваний; в химической промышленности — в качестве исходных веществ при синтезе полимеров и производстве косметических средств (табл. 12.1). По оценкам, ежегодно в мире производится более 800 000 т аминокислот стоимостью более 5 млрд долларов. При этом наиболее популярны общие объемы производства приходится на лизин L-глутаминовой кислоты, который используется для получения широко известного усилителя вкуса и аромата — глутамата натрия.

В промышленном масштабе аминокислоты получают в основном либо экстракцией из белковых экстрактов, либо как продукты метаболизма двух несепарирующихся симбиотических почвенных бактерий *Corynebacterium* или *Streptococcus* spp. Обычно для повышения продуктивности этих микроорганизмов используют

их мутации с последующим отбором штаммов сверхпродукторов определенных аминокислот. Однако такой способ получения штаммов требует много времени, и эффективность его невысока. Альтернативный подход мог бы состоять в выделении и изменении специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций, на основании данных высаймических планов об этих ферментах. Впрочем, такой генноинженерный подход может оказаться не столь простым. Так, в биосинтезе некоторых аминокислот могут участвовать несколько ферментов, которые ингибируются или ингибируются различными метаболитами, присутствующими в клетке. В таких ситуациях также определить, какой фермент нужно модифицировать, чтобы увеличить выход конечного продукта. Кроме того, ученые пока не располагают исчерпывающими данными о биохимических свойствах указанных выше микроорганизмов, а следовательно, генетическим мутациям подлежат не только рядовые бактерии. В частности, только со временем уже существующие методы и методики трансформации для триболофильных организмов типа *Corynebacterium* и *Streptococcus* spp.

Большинство плазмидных векторов с широким кругом хозяев реплицируются только в граматрицеллярных микроорганизмах, поэтому необходимо создать векторы, специально предназначенные для экспрессии в *Corynebacterium* и *Streptococcus* spp. Это могли бы быть членичные векторы *E. coli*-*Corynebacterium*. То же самое, которое происходит из плазмид *E. coli*, может со-

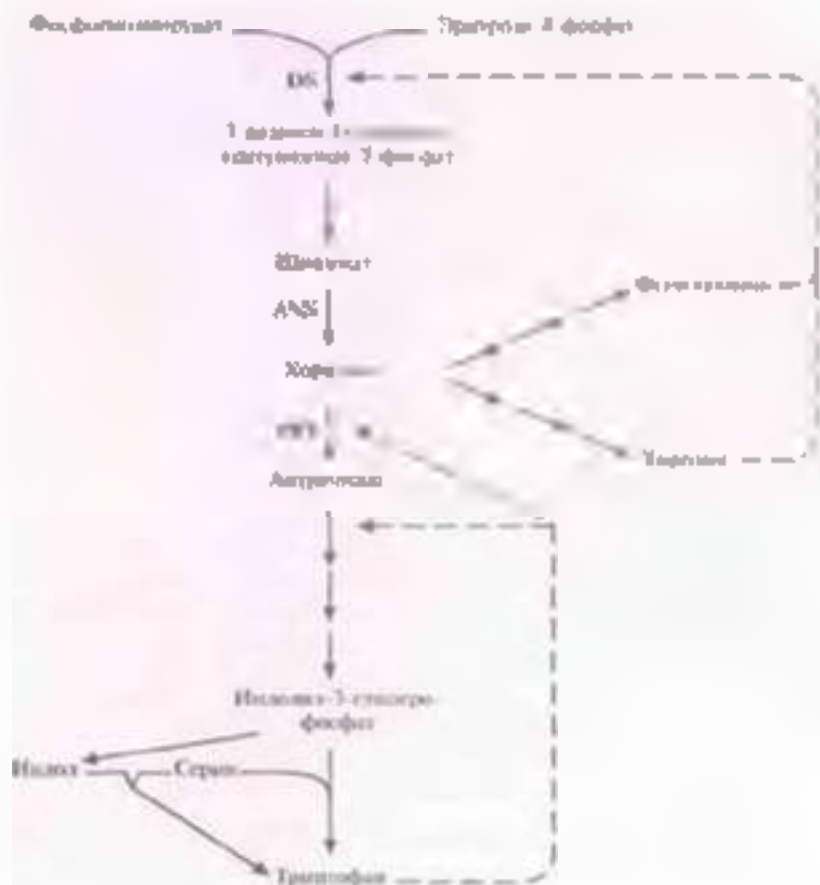


Рис. 12.8. Упрощенная схема биосинтеза триптофана в клетках *S. dysenteriae*. Сплошные линии биосинтетические реакции, пунктирные — регуляторные по типу обратной связи. В качестве побочного продукта образуется этилацетил, который превращается в триптофан под действием триптофаназы II (X³ — декарбоксилационная декарбоксилаза). ADK — ацетилдегидрогеназа. PFK — фермент, катализирующий фосфорилирование

риванный зерн практически полностью выстывала. Низкая способность мутированию возымма сыгнелу ричель-трип. Однако эффект введения этого зерна в цпидым дикого типа был еще сильнее: уровень синтеза триптофана в этом случае увеличился примерно до 130%, что связано с более эффективным использованием доступных предпестемников. Еще более высокая уровень синтеза триптофана достигли при введении в клетки *S. dysenteriae* мажифицированные гены (рекламный ферментокс-3-декарбоксилационная декарбоксилаза, ацетилдегидрогеназа и ацетилдегидрогеназа) и трансферны. Гены, кодирующие эти ферменты, были получены из клет мутираным штамм нечувствительным к ингибированию конечным продуктом (ингибирование по типу обратной связи).

В качестве альтернативы для синтеза анионоислел кислоты использовать *E. coli*. Этот микро-

организм хорошо изучен, и генетические методы работы с ним более или менее детально разработаны.

Антибиотики

Со времени открытия пенициллина в конце 1920-х годов из различных микроорганизмов были выделены более 6000 антибиотиков, обладающих разной специфичностью и разным механизмом действия. Их широкое применение для лечения инфекционных заболеваний помогло сократить масштабы жизни. Понимание биологической основы антибиотиков было важным в фармакологической и медицинской бактериологии. Антибиотики, как правило, производятся грибами и другими микроорганизмами и действуют на чувствительные бактерии. Ежегодно во всем мире производится 100 (100) т антибиотиков на сумму

примерно 5 млрд долларов, в том числе более 100 млрд долларов приходится на долю антибиотиков. Общепризнаны в мире сычу и качестве добавки или усилителей роста.

По оценкам, каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых антибиотиков. Прежде всего в рамках обширных исследовательских программ по поиску среди тысяч различных микроорганизмов тех, которые синтезируют новые уникальные антибиотики. Получение и клинические испытания новых препаратов обходятся очень дорого, и в продажу поступают только те из них, которые имеют большую терапевтическую ценность и представляют экономический интерес. На их долю приходится 1–2% всех обнаруживаемых антибиотиков. Большой эффект здесь может дать технология рекомбинантной ДНК. Во-первых, с ее помощью можно синтезировать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Во-вторых, генетически модифицированные микроорганизмы для увеличения выходов антибиотиков и соответственно для снижения стоимости их производства.

При создании рекомбинантных штаммов *Streptomyces* используются мутационные, селекционные для выделения антибиотиков, методы питания, что при трансформации и отбор трансформированных клеток не должны быть слишком сложными. Штамм в качестве от *E. coli* *Streptomyces* существует не в виде клонированных клеток, а в виде прикрепленных мицелий. Именно перед трансформацией (необходимо разрушить клеточную стенку и выделить протопласты (рис. 12.9). Без этого будет невозможно отличить трансформированные клетки от не трансформированных, поскольку питательные вещества на твердой среде будут образовываться на группы клеток, а не на индивидуальную клетку; следовательно, выжившие, растущие в присутствии селективной антибиотика, будут представлять собой смесь трансформированных и не трансформированных клеток. Принципом введения плазмидной ДНК в протопласты *Streptomyces* осуществляется в присутствии калийфосфата. После трансформации протопласты смешивают с семенем на твердую среду, чтобы образовалась



Рис. 12.9. Схема трансформации и отбора рекомбинантных штаммов. Трансформированные клетки обозначены розовыми кружками, нетрансформированные – желтыми. ПЭГ – поливинилпирролидон.

клеточная стенка, в этом для отбора трансформированных клеток необходимо использовать селективную среду, обычно содержащую либо пенициллин, либо тимостриптин.

Клонирование генов биосинтеза антибиотиков

Процесс биосинтеза генов антибиотиков может состоять из 10–30 ферментативных реакций, так что клонирование всех генов его биосинтеза крайне нецелесообразно. Для их получения в виде отдельных генов набора генов генов можно использовать трансформации одних или нескольких мутантных штаммов, не способных синтезировать антибиотик, банксом штаммов, созданным из хромосомной ДНК штамма дикого типа. После введения биосинтетических генов в мутантные клетки проводят отбор трансформантов, способных синтезировать антибиотик. Этот метод позволяет выявить (или ДНК-клетки, содержащие функциональный экспрессирующийся ген антибиотика (т. е. ген, способный синтезировать функциональный мутантный штамм штамма), и использовать их в качестве источника для создания других банксом штаммов трансформантов ДНК штамма дикого типа, из которого получают клоны, содержащие мутантные последовательности, которые перекрываются с последовательностями генов. Таким образом идентифицируют, а затем клонируют элементы ДНК, прилегающие к комплементарной последовательности, и используют геномный кластер генов биосинтеза антибиотика. Основания процедуры относятся к случаю, когда эти гены сгруппированы в одном сайте хромосомной ДНК. Если же гены биосинтеза разбросаны в виде небольшого кластера по разным сайтам, то нужно иметь на крайней мере по одному мутанту на кластер, чтобы получить клоны ДНК, с помощью которых можно идентифицировать отдельные гены кластера.

Этот подход с успехом использовался для идентификации некоторых генов биосинтеза тетрациклинами у *Tetracycline colorator* А3 (рис. 12.10). В этом случае комплементарный антибиотиком является на средах на цвет шимиди: мутанты микробиотиков дикого типа имеют красный цвет, а колонии мутантных микробиотиков кремовые. Таким образом, в результате мутации образуется красная колония.

Помимо комплементарности, для идентификации генов биосинтеза антибиотиков могут использоваться и более простые методы, с

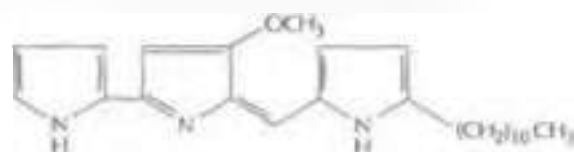


Рис. 12.10. С (структура тетрациклина с метоксигруппой).

помощью генетических или биохимических экспериментов можно идентифицировать, а затем выделить один или несколько ключевых ферментов биосинтеза, определить их N-концевые аминокислотные последовательности и использовать для дизайна, синтезировать соответствующие молекулы. Этот подход использовался для выделения из *Penicillium chrysogenum* генов синтеза и экспрессии А. Этот фермент катализирует окислительную конденсацию β(1-6)-аминоацидов I (структура I) в аланин в аминокислоты N, которые являются основой биосинтеза пенициллина, ацилосартана и перформина (рис. 12.11).

Синтез новых антибиотиков

Новые антибиотики с уникальными свойствами и специфичностью можно получить, комбинируя различные мутанты штаммов с геном, участвующим в биосинтезе уже известных антибиотиков (См. из главы экспериментальной, в том же случае был исключен какой-либо антибиотик, состоял в объединении в одном микробиотике двух генов, отвечающих путям биосинтеза антибиотика.

Снова из штамма *Streptomyces* p12310, который формирует хромосомную ДНК в штамме длиной 12,5 т.п.н., содержат все гены ферментов, ответственных за биосинтез и цвет тетрациклина активированна, представители семейства и каротиноидных антибиотиков (рис. 12.12). Целую штамму и различные субклоны, несущие части 12,5 т.п.н.-фрагмента (например, p12315), вводили либо в штамм AM-7161 *Streptomyces* sp., синтезирующий родственный антибиотик челеридин, либо в штамм В1140 или 10223 *Streptomyces*, синтезирующие родственные антибиотики тропетинин и дигидротропетинин.

Все указанные антибиотики являются β-лактам-пептидными антибиотиками, которые при-

Таблица 12.1 Активность, специфичность и кинетические параметры ферментов, кодируемых генами *glcA* и *glcB*¹⁴

Ген/вариант гена	Источники сырья		Активность, ед
	карбонильный	гидрокси-эфир	
<i>glcA</i> wild type	Фруктовый	Сырный	Альдолаза/амилаза
<i>glcA</i> mutant 1p	Желтый	Углеродный	Альдолаза/амилаза
<i>glcA</i> mutant 2p /p12411	Красный	Сырный	Мальтогенная альдолаза/амилаза
<i>glcA</i> mutant 3p /p12511	—	Фруктовый	Мальтогенная альдолаза/амилаза
<i>glcA</i> mutant 4p 1140	—	—	Вариант 1140, не ферментативный
<i>glcA</i> mutant 5p 1140/p12301	—	—	Вариант 1140 (не ферментативный), вариант 12301, ферментативный
<i>glcA</i> mutant 6p 1413	—	—	Фруктовый, не ферментативный
<i>glcA</i> mutant 7p 1422/p12301	—	—	Фруктовый/сырный, альдолаза/амилаза

¹⁴ По данным: Mergulha et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60: 2664-2671

последовательности ферментативной комбинации карбонильной и/или гидроксильной групп. Исклечение поликетидных антибиотиков синтезируются растениями и грибами, но большая их часть образуется эвкарйотными и чаще вторичных метаболитов. Прежде чем проводить манипуляции с геном, кодирующим ферменты биосинтеза пенициллина антибиотиков, необходимо выяснить механизм действия этих ферментов.

Поликетидные антибиотики синтезируются по пути, что и длинноцепочечные жирные кислоты. В результате каждой реакции конденсации к растущей углеводной цепи добавляется β -кеторезида. Процесс состоит из ряда последующих стадий, включающих последовательные метилации, децилтации и поочередное β окисление групп в растущей линейчатой цепи. Существуют два класса поликетидсинтеза: ферментный комплекс, ответственный за синтез поликетидных антибиотиков (рис. 12.13). Первый класс состоит из пяти, а также и другие различные биокатализаторы, катализирующие реакцию конденсации, каждая из которых представляет собой один поликетид с одним активным центром, который последовательно катализирует биосинтетические реакции (рис. 12.13, А). Второй класс включает сайты, образованные несвязанными модулями (А-Е на рис. 12.13, Б); каждый из них имеет свой активный центр и обладает специфической ферментативной активностью, катализирующей определенную реакцию биосинтеза.

Если какой-либо элемент линейчатой функциональной комбинации, обладающей ферментативной активностью, катализирует определенную реакцию, то знание природы активности определяет тем самым реакцию биосинтеза, а изменение последовательности функции приводит к предсказуемым изменениям структуры синтезируемого антибиотика. Так, летально вучию генетическим и биохимическим составленным биокатализаторами, кодирующим в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, удалением специфических изменений в геме, кодирующим с биосинтезом этого антибиотика, и синтезе выявить пригипидные эритромицины с другими свойствами. Выявлено были определены «критичная» структура фермента ДНК 5' область длиной 567 н. п., содержащая кластер генов *eryA*, имея размерами 500-600 н. п. молифицировано и трансформировано гистидинами. Для цепи 1) удаляя участок ДНК, кодирующий β -кеторезида, либо 2) изменив изменение в участке ДНК, кодирующий энзимрезультазу. Именно β -кеторезида геном гена проводила к увеличению промежуточного продукта, в котором к С-5 атому кетонной была присоединены карбонильной группа, а не гидроксилированной (рис. 12.14), а удаляя в гене энзимрезультазу — к обратному двойной связи между атомами С-6 и С-7 (рис. 12.14). Исходя из экспериментов следует, что если «критичная» область и характеризуется кластер генов, кодирующих ферменты биосинтеза определенно поликетидного антибиотика, то, являясь

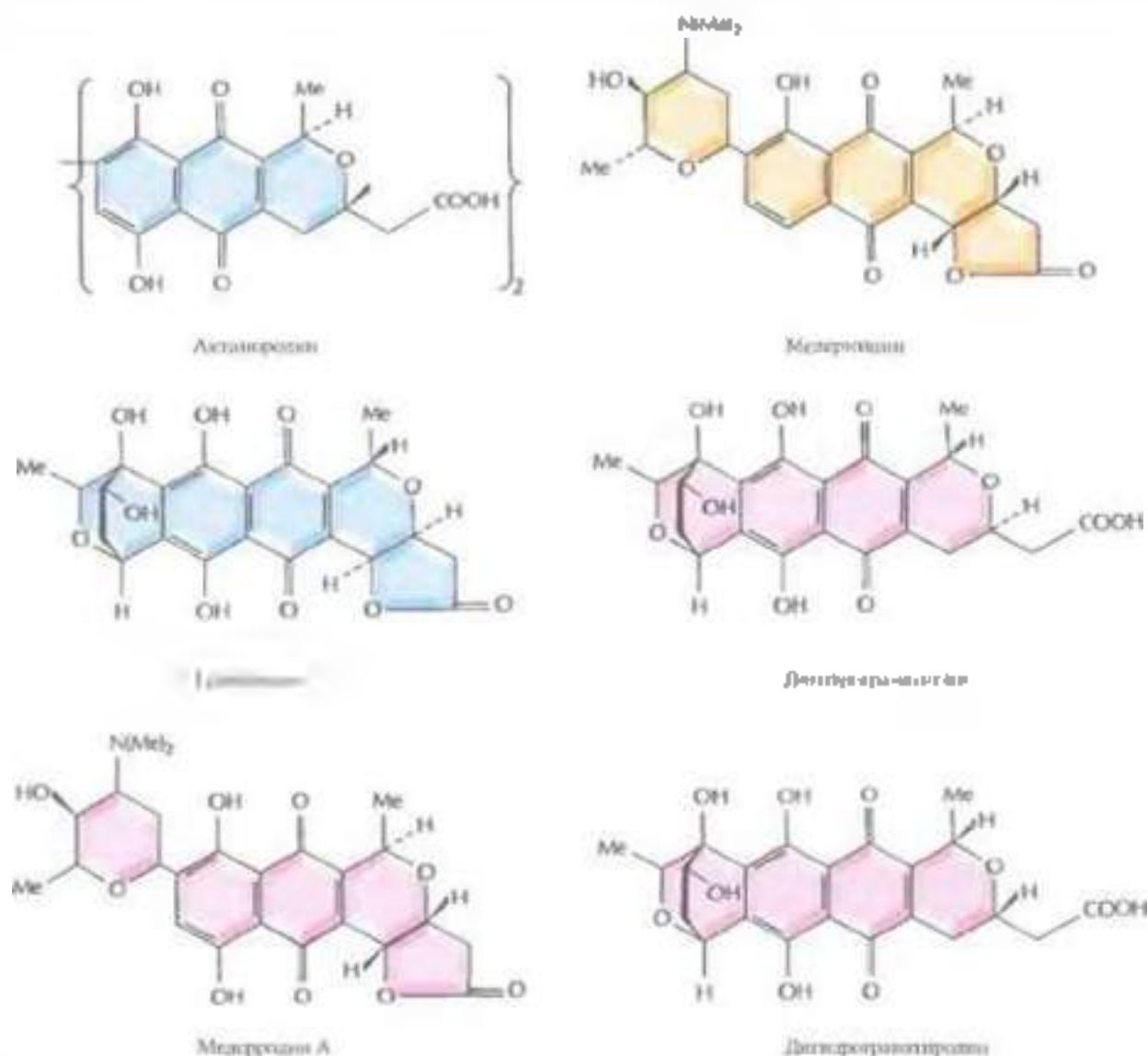


Рис. 12.12. Структурные формулы различным изобретениям в области антибиотиков, синтезированных в лаборатории Мерк и в *S. globosus* (голубого цвета) и в *S. lividus* (розового цвета) в качестве рДНК, кодирующей аксетациклин; метациклин; демеклоциклин; меклоциклин А и демеклоциклин.

ния специфические изменения, можно будет направленно изменять структуру антибиотика. Кроме того, выработка и экспорт из нее иных участков ДНК, можно переписать данные участки в плазмиды и выучить новые поликетидные антибиотики.

Все кластеры генов арматрически локализованы сферидотри гена, кодирующая так называ-

емую минимальную поликетидсинтазу. Этот ферментный комплекс кодирует кетосинтазу (с трансферазным доменом), фактор, определяющий длину цепи, и дигидроксилирование. Минимальная поликетидсинтаза отвечает за синтез ароматических поликетидов оцтова, а его модификации осуществляются другими ферментами, действующими совместно

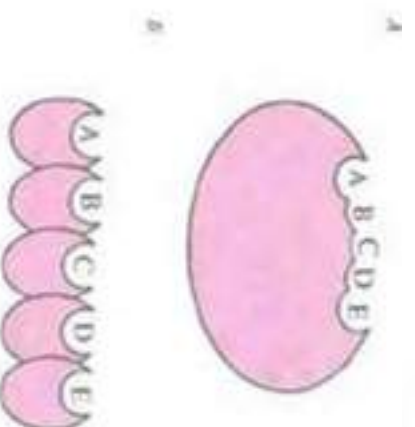


Рис. 12.13. Схематическое изображение структуры проактивных ароматических аминокислот, у которых активный центр находится в одной проактивной (А), в неактивных аминокислотах, представляющих собой комбинацию неактивных аминокислот с резкими активными выступами (Б). Функция обеих типов структур неодинакова (А-Е), каждый из которых обладает собственной ферментативной активностью.

отною с неф. Гены, кодирующие все эти ферменты, обычно организованы в один кластер (рис. 12.15). Каждый кластер генов кодирует синтез определенного антибиотика. С помощью обмена генами между кластерами были синтезированы для новых ароматических полициклических антибиотиков (рис. 12.16), что свиде-

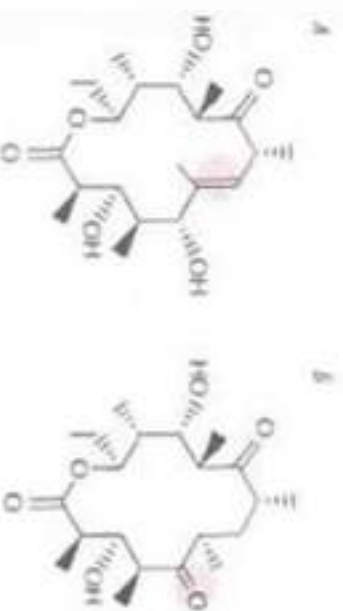


Рис. 12.14. Промежуточные структуры, полученные при синтезе ароматических аминокислот. А В результате обмена генами структурных элементов спектров с линейной структурой ароматических С-6 и С-7 (цветной структурой). В. Длинная β-актиновая структура образована взаимодействием с С-5-карбонильной, а не карбоксильной группой (цветной структурой). (По данным работы Katz, Donato, Ann. Rev. Microbiol. 47: 875-912, 1993.)

тв. позволяет возможность генов «ездить» по геному.

Синтетические полициклические антибиотики

С помощью генов инженерия можно не только создавать новые антибиотики, но и увеличивать эффективность синтеза уже известных. Липидный фактором в промоделировании производства антибиотиков с помощью *Streptomyces* spp. часто является количество доступного клеткам кислорода. Ветвление плесени растительности кислорода в поле и высокой плотности клеточной *Streptomyces* его часто оказывается недостаточным, рост клеток замедляется и выход антибиотика снижается. Чтобы решить эту проблему, можно, по-прежнему, изменить конструкцию ферментов, которые синтезируют клеточный кислород, и увеличить количество их. Это можно сделать с помощью генной инженерии.

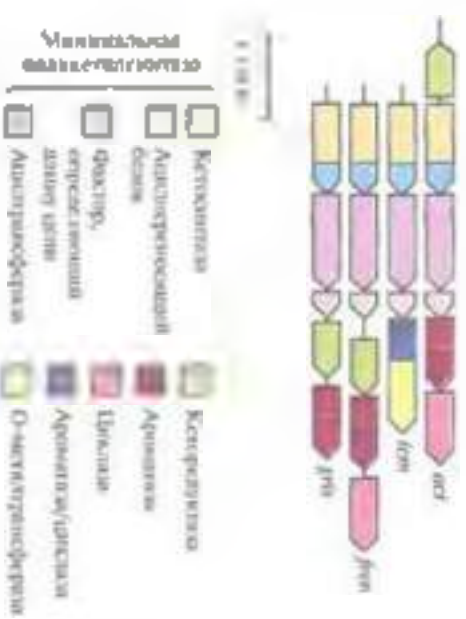


Рис. 12.15. Кластер генов биосинтеза ароматических полициклических антибиотиков актиноидов (*act*), терпеноидов (*fms*), фенолидов (*fmo*) и глюкозидов (*gen*). Каждый кластер кодирует гены, кодирующие различные полициклические антибиотики, которые синтезируются в клетках микроорганизмов. Функции, кодирующие другие гены, кодирующие реакцию его модификации. Сужающийся сектор гена указывает на привнесение его гомологами.

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Получение 2-кето-1-гулоновой — промежуточного продукта синтеза L-аскорбиновой кислоты — с помощью рекомбинантной бактерии *Erwinia herbicola*S. Anderson, C. H. Marks, R. Lazala, J. Miller, K. Stafford, J. Ferguson, D. Labin, W. Kusterer, D. Linn
Summer 290: 144-149, 1985

Для эффективного и экономичного производства синтезируемых определенных метаболитов, в частности селена, в первую очередь необходимо активировать или стабилизировать один или несколько ферментов того или иного биосинтетического пути с тем, чтобы увеличить эффективность новых метаболитов. Во-вторых, в ферментативном синтезе важно обеспечить чистоту сырьевых тел, контролировать ферменты, которые, используя в качестве субстрата, обеспечивают синтез метаболита, иными словами продуцирующими конечный продукт. Таким путем можно значительно увеличить количество продукта, получаемого из сырья.

Здесь мы хотим изложить некоторые наши результаты по созданию для этой цели бактерий.

Чтобы сырьевые бактерии синтезировали 2-кето-1-гулоновую кислоту, исследовали синтез предшественника витамина С в природных условиях (рис. 1). Это было возможно благодаря тому, что у бактерий, синтезирующих 2-кето-1-гулоновую кислоту в 2-клеточной культуре, отсутствовали ферменты, катализирующие превращение 2,5-дигидро-2-гидроксимой кислоты в 2-кето-1-гулоновую кислоту, и были отсутствовали в клетках *Erwinia* от бактерий синтезирующих 2,5-дигидро-2-гидроксимой кислоту и D-гулонолактон. Исследования этого вопроса показали, что эти ферменты присутствуют не в виде отдельных

генов образцов, прежде чем провести ферментацию. Это можно было объяснить отсутствием белков в частности стабилизировать это, а затем на основании данных об эффективности исследований количества сырья для ферментации.

Это была первая из первых работ, опубликованных в этой области исследований, которую мы издали. Мы получили интересные метаболиты. В 1980 году работах по созданию микроорганизмов в другой части нашей страны, независимо и параллельно с нашей метаболитическим путем, так что можно предположить, что мы достигли способности синтезировать этот метаболит.

при низком содержании растворимого аскорбида (примерно 5% от установленной концентрации), синтезировали в 10 раз больше витамина, чем в 1 г сухой клеточной массы и имели большую скорость роста, чем нетрансформированные. Этот метод можно использовать и для обеспечения культуры других микроорганизмов, растущих в условиях недостатка аскорбида.

Нашим материалом при химическом синтезе некоторых цефалоспоринов антибиотиков обладали незначительным побочным эффектом и активная в отношении множеств бактерий, является 7-аминоцефалоспориновая кислота (7ACA), которая в свою очередь синтезируется из антибиотика цефалоспорины C (рис. 12.11). К сожалению, природный микроорганизм, способный синтезировать 7ACA, до сих пор не выявлен. Новый путь биосинтеза 7ACA был сконструирован включением специфических генов в плазмиду гриба *Aspergillus nidulans*, который обычно синтезирует только

ли цефалоспорины C. Один из этих генов был представлен в ДНК гриба *Fusarium solani*, кодирующий оксидазу D-аминокислот, в другой — кодирует геномной ДНК *Penicillium chrysogenum* кодирует деацетилазину. В клеточные гены включались под контролем промотора *A. nidulans*. На первом этапе нового биосинтетического пути цефалоспорины C превращаются в 7-β-(5-карбоксит-5-оксипентанамид)дефоспоринную кислоту (мето-AD-7ACA) при помощи оксидазы D-аминокислот (рис. 12.17). Часть этого продукта, вступающая в реакцию с перекисью водорода, одним из побочных продуктов, превращается в 7-β-(4-карбоксит-5-оксипентанамид)дефоспоринную кислоту (G1-7ACA). И цефалоспорины C, и мето-AD-7ACA, и G1-7ACA могут конвергировать в единую цефалоспориновую кислоту с образованием 7ACA, однако только 5% цефалоспорины C напрямую гидролизуются до 7ACA. Следовательно, для образования 7ACA с высоким выходом необходимы оба фермента

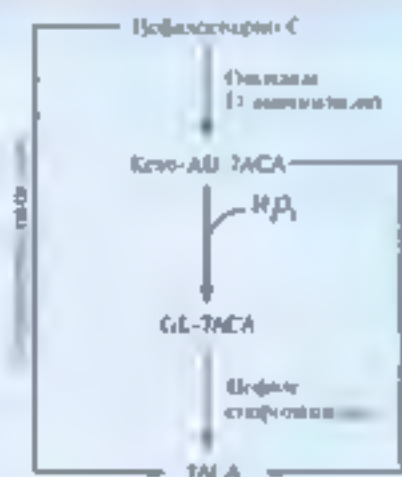


Рис. 12.17. Генетически сконструированная му- тация в 7-аминокапроновой кислоте (7-ACA) из пенициллина G (pen) осуществ- ляется с помощью фермента из штамма *E. coli*, в генетически модифицированном из бактерии *E. coli*.

Биопластимеры

Биопластимеры - это высокомолекулярные соединения, синтезируемые химиями организмами. Полимеры из них являются ценными физическими и химическими веществами и могут использоваться в пищевой, переработки нефти и фармацевтической промышленности. С появлением генноинженерной рекомбинантной ДНК появилась возможность создавать новые биопластимеры, выселять синтетические продукты их биомолекулярными выделками, модифицировать уже существующие биопластимеры с целью улучшения их физических и структурных характеристик, повысить эффективность соответствующих промышленных процессов, уменьшить их стоимость.

Создание рекомбинантной бактерии *Lactobacillus casei* с целью получения казеиновой слизи

Lactobacillus casei - трансформированная штаммом дрожжей молочная бактерия, синтезирующая ценный коммерческий биопластимер казеиновую слизь, высокомолекулярный живучий полисахарид. Его структурный скелет состоит из линейной полимерной цепи из молекул галактозы. К каждому второму галактозному остатку присоединена трансформированная боковая цепь, состоящая из одного остатка галактозидовой кислоты и двух остатков маннозы (рис. 12.18). Казеиновая

слизь имеет вязкую консистенцию, не разрушается в агрессивных физических и химических средах и по физическим и химическим свойствам имитирует казеин. В частности, ее можно использовать как стабилизаторы, эмульгаторы, загустители или сгущающие агенты. Для успешного коммерческого применения казеиновой слизи необходимо выращивать *L. casei* на педальном и доступном источнике углерода. *L. casei* предпочитает дикий тип ферментации (уплощение, сычужку и сквашивание), но не ферментацию. При ферментации сыра в больших количествах образуется такой побочный продукт, как сычужок. Она состоит из воды (94-95%), лактозы (1,5-4%) и небольшого количества белка, минеральных веществ и низкомолекулярных органических соединений. Огромные количества сычужка дает молочная промышленность, и ее утилизация - это большая проблема. Часто сычужок сливают в реки и озера, что приводит к загрязнению и кина количества доступного кислорода и ингибирует многих организмов. Трансформировка сычужка в местный источник сырья решает проблему сычужка очень хорошо, в том же случае эту проблему решает роль дрожжевой ферментации. Наконец, большое количество углерода из углерода ферментации казеиновой слизи. Все это заставляет промышленность искать способы выделкой переработки сычужка.

Сычужку можно использовать как источник углерода при выращивании ценных промышленных

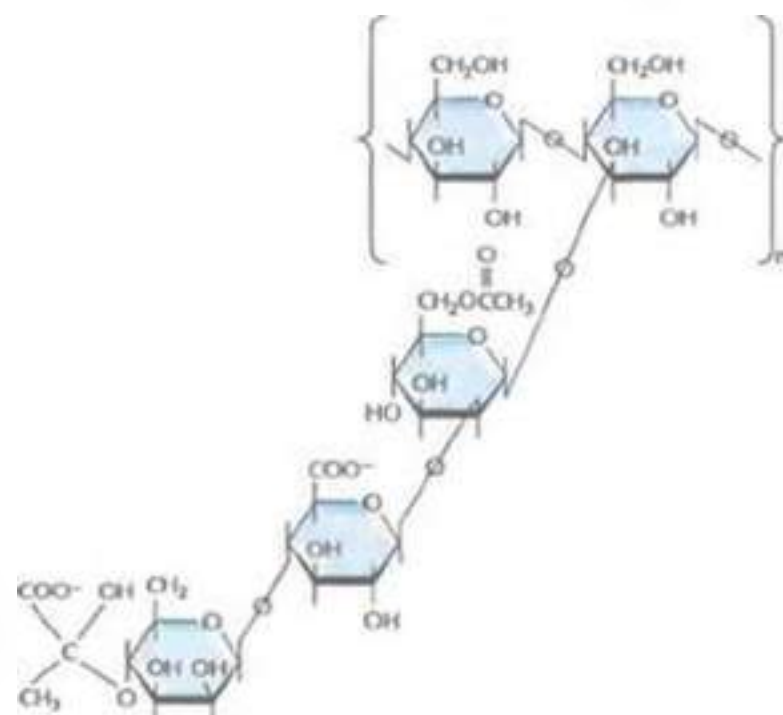


Рис. 12.18. 1 Структурная формула полисахарида галактогенного кислотного типа. Карбон составляет линейный полимерный скелет из мезо- и экзо-формы. К каждому атому-углероду присоединены трансформированные группы.

ных микроорганизмов. Чтобы *A. gossypii* приобрела способность расти на сахарозе, было придумано следующее. Ген *lacZYF. gal*, кодирующий ферменты β -галактозидазу и лактозопероксидазу, встроили в плазмиду с широким кругом хозяев так, чтобы она находилась под транскрипционным контролем промотора *lac* из бактерии *E. coli*. Эту конструкцию ввели в *E. coli*, а затем перенесли из *E. coli* в *A. gossypii* тройным векторным методом. Трансформанта, содержащие плазмиду, синтезируют β -галактозидазу и лактозопероксидазу, используют лактозу как единственный источник углерода, а также индуцировали в больших количествах экспрессию с.н.ч. используя в качестве источника углерода глюкозу, лактозу и сыпорожку (табл. 12.4). Подчеркнем еще раз, что *A. gossypii* такого типа синтезирует только кислотного типа, только одну (раст) из глюкозы.

Выделение легкой биомассы меланина

Меланины образуют многочисленное семейство различных полициклических азот-биогенных соединений, которые встречаются животным, растениям, бактериям и грибом. Эти пигменты можно было бы использо-

вать при изготовлении солнцезащитных кремов и парфюмерии, а также как добавки в косметических средствах. В настоящее время меланины получают в небольших количествах либо экстракцией из природных источников, либо путем химического синтеза. С помощью технологий рекомбинантных ДНК, возможно, удастся создать недорогие крупномасштабные производства меланинов с различными физическими свойствами.

Таблица 12.4. Сравнение количества клеток в трансформированных клетках *A. gossypii* и клетках-хозяевах *E. coli*, доступных в среде с различным источником углерода¹⁾

<i>A. gossypii</i>	Количество клеток/мл в среде, 10^8 клеток/мл		
	0,4% сахара	0,4% сахара	0,4% сахара
Донорный	1530	345	234
Трансформант	3711	3005	4311

¹⁾ На основе данных из работы [1]. Книга *Appl. Genetics*, 1987, 9(1): 97-101, 1988.

²⁾ На основе данных из работы [1]. Книга *Appl. Genetics*, 1987, 9(1): 97-101, 1988.

Меланины — это сверхкрупные полимеры, состоящие из остатков нидина, бензильнола и аминопиридола. Первый этап их биосинтеза катализируется меланоколеразным ферментом монооксигеназой тирозиназы и представляет собой окисление тирозина до дицидроксибензилаланина. Последние этапы полимеризации не являются каталитическими процессами и в зависимости от типичной природы искомого соединения, включаются в различные ферменты. дают конечные продукты разных цветов: черного, коричневого, желтого, красного или фиолетового.

Выделены и охарактеризованы гены биосинтеза меланина в бактериальных клетках *Mutatumet amylobovis* (они содержат две открытые рамки считывания (ORF), одна из которых кодирует тирозиназу (тиа, масса 40 кД), а вторая (ORF438) — белок (молекулярная масса примерно 14 кД) с окислительными функциями. Чтобы пролить, нужны для оба этих гена для синтеза меланина, гены сначала переклонированы в экспрессирующий вектор *E. coli*, при этом одна конструкция содержит только ген тирозиназы, а другая — ген тирозиназы и ORF438 (рис. 12.19). Векторы, носители ген тирозиназы, обеспечивают синтез больших количества тирозиназы, чем вектор, содержащий оба указанных гена. Однако выяснилось, что уровень тирозиназы не имеет особого значения, а для биосинтеза меланина необходимы продукты обоих генов. Возможно, белок, кодируемый ORF438, поставляется мимически неактивному предшественнику тирозиназы или тирозиназе, которой активируется в их присутствии. В естественных условиях после образования липидоцифенила аминокислота при участии тирозиназы в полимер включается раз-

личные низкомолекулярные соединения (пигменты). С учетом этого можно изменить химические и физические свойства меланина, синтезируемого в клетках *E. coli* с высказанными в них к другим генам биосинтеза этого пигмента, если добавить в среду определенные низкомолекулярные соединения в разных количествах.

Макробиоцимический синтез животного биополимера с адгезивными свойствами

Несколько перспективных представляется также разработка недорогого способа получения белков с адгезивными свойствами, например выделение из мелани *Mutibis abalis*. Этот микроорганизм способен образует очень прочные нити, с помощью которых мушкетеры прикреплялись к различным поверхностям. Сразу после секретами биополимера так называемой биостальной железой между полимерными цепями образуются многочисленные водородные связи, что затрудняет определение аминокислотной последовательности. Это в свою очередь не позволяет установить мушкетерную последовательность кодирующей на генон и синтезировать гибридные животные гены. К счастью, удалось выделить мушкетерный предшественник адгезивного белка (130 кДа-предшественник). Как показали биохимические исследования, он богат серином, треонином, янином, пролином и пирролином (70 до 70% этих аминокислот содержит гидроксиламино группу), при этом большинство остатков пролина и (пролин гидроксиламин) до 3- или 4-гидроксипролина (Hyp) в 3,4-дицидроксибензилаланина (L-DOPA) соответственно. Кроме того, после определения аминокислотной последовательности выяснилось, что предшественник состоит в основном из концентрированных остатков

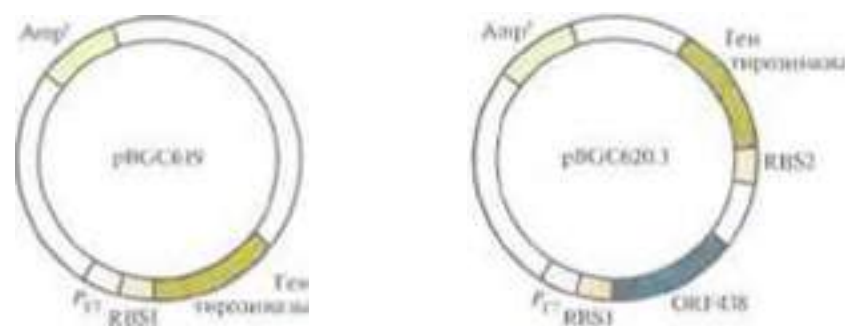


Рис. 12.19. Экспрессирующие плазмиды *E. coli*, содержащие гены биосинтеза меланина. pBGC619 содержит ген тирозиназы, а pBGC620.3 — ген тирозиназы, гены считывания (ORF438) для синтеза меланина в ген тирозиназы. Гликозилирование контролируется с помощью белка фактора транскрипции γ RBS1 + RBS2 для их включения стандартным способом. Оба плазмиды имеют ген устойчивости к тетрациклину (Amp^r)

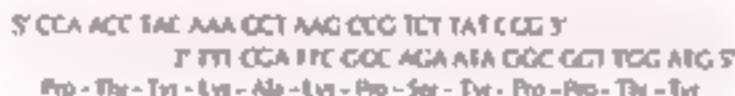


Рис. 12.18. Синтетический олигонуклеотид, получающий контроль для создания темп адгезивного белка, с использованием матрицы *M. luteus*. Изображение синтетический олигонуклеотид был синтезирован таким образом, чтобы было подобно с первым олигонуклеотидом фразы кодирования ДНК с другим началом. Исследующие не совпадают с началом в ДНК матрицы фазы T4 (приведен и образованного линейного ДНК, состоящего из представлений на рисунке центром). Изображение является результатом исследования последовательности олигонуклеотида, адгезивного темп адгезивного

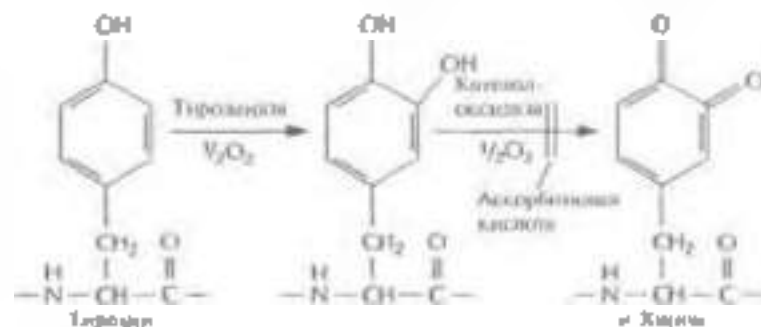
дон Ala Tyr-(Phe или Tyr)-Ser-(Tyr или IXPRA)-Tyr-Tyr-Thr-GXPA-Lys

Из библиотек кДНК, которые были получены на основе мРНК, выделенных из висцеральной железы, была клонирована кДНК 130 кДб предшественника адгезивного белка. И адгезивный белок, и его кДНК обладают весьма необычными свойствами, затрудняющими клонирование и экспрессию соответствующим образом и получаемые функционального адгезивного белка. Во первых, кДНК содержит большое число повторов, что повышает частоту гомологичной рекомбинации и вероятность утраты части клонированной последовательности. Во-вторых, так как только примерно 70% всех выделенных белков приносятся на долю приваива, линия и термин, вряд ли его удастся получить в большом количестве вследствие ограниченности внутриклеточного пула аминокислот-тРНК.

Чтобы преодолеть все эти трудности, являю размерную кДНК адгезивного белка или ее фрагменты встроили и прожигание экспрессии в векторы и ввели эти векторы в дрожжевые клетки. После экспрессии были получены новые активные формы адгезивного белка мол. массой от 20 до 100 кДб, причем на их долю

приходилось от 2 до 5% суммарного количества клеточных белков. Значительно более высокие уровни экспрессии удалось достичь после того, как был химически синтезирован сегмент адгезивного белка (рис. 12.20). Используя повторы ДНК, кодирующие десятикратное адгезивного белка, создали синтетический сегмент длиной 600 п. н., который кодирует белок мол. массой примерно 25 кДб. Его основная повторяющаяся единица имеет длину 10 п н и состоит из кодирующей оптимальным для экспрессии в *S. cerevisiae* и фиделитивных экспрессии промоторных, когда он находится под контролем промотора фазы 17. Большинство микробных организмов обладают лишь ограниченной способностью осуществлять посттрансляционные гидроксилирование аминокислот, так что образующийся белок будет не до конца гидроксилирован. Так, некоторые из его гидроксильных остатков не преобразуются в IXPA, что снижает число образующихся поперечных связей. Чтобы решить эту проблему, было создано система гидроксилирования in vitro, в которой бактерии являю матрицей в присутствии аскорбиновой кислоты гидроксилируют остатки тирамина (рис. 12.21). Аскорбиновую кислоту добавляли в реакционную смесь для того, чтобы предотвратить

Рис. 12.21. Посттрансляционное гидроксилирование in vitro с использованием тирозиназ. Остатки адгезивного белка *M. luteus*. При участии тирозиназы тирозин преобразуется в IXPA, так как это не может быть сделано до в начале гидроксилирования in vivo (приведенный Смит-Эддингс метод предотвращает лабораторную аскорбиновую кислоту



нуть окисление остатков ДХФА в р-тине. Этот процесс должен строго контролироваться, поскольку он приводит к снижению субстратной активности белка. Как и многие другие белки или ферменты, белок необходимо активировать непосредственно перед использованием.

При совместном присутствии как эукариотического белка и образования естественных связей с рибосомами можно имитировать из стекла, полистирола, ксилита и т. д. Прочность и специфичность соединений можно изменить добавлением к смеси адгезивных белков до окисления и образования естественных связей. Это позволяет создавать белки с функциональными структурами, в том числе и в виде, которые можно будет использовать в медицине, в частности в стоматологии.

Микробиологический синтез каучука

Натуральный каучук, или 1,4 полиизопрен, это широко используемый биополимер, который получают из различных растений. Его биосинтез начинается с превращения простых сахаров в изоопентил 17 ферментативных реакций. В ходе последующих стадий происходит полимеризация изоопентенилпирофосфата с образованием аденилпирофосфата.

Являясь большой коммерческой ценностью каучука были проведены исследования, направленные на то, чтобы выяснить, можно ли использовать для его получения рекомбинантные микроорганизмы. Прежде всего с помощью мРНК из растения *Hevea brasiliensis*, синтезирующего каучук, была создана соответствующая кДНК-библиотека. Затем проведена гибридизация с коротким ДНК-зондом, синтезированным исходя из данных об аминокислотной последовательности одного из рибосомальных белков полимераза каучука. Для того чтобы доказать, что клонированная кДНК действительно кодирует этот фермент, использовали антигена с очищенному ферменту. Теперь используют этот клон кДНК, а также, возможно, другие гены биосинтеза каучука, чтобы конструировать синтезирующие натуральный каучук микробиологическими методами. С другой стороны, с помощью клон кДНК можно также получить генетическую каучука и создать

эукариотическую систему *in vitro*. В любом случае исследования, которые могли бы привести к разработке нового пути биосинтеза каучука, имеет смысл продолжать.

Микробиологический синтез полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты это биосинтезируемые полимеры, синтезируемые микроорганизмами различных родов (роды *Alcaligenes eutrophus* и использовались ими как внутривидовый источник углерода и энергии). Они обладают рядом преимуществ и зависят от состава могут применяться для изучения биосинтезируемых пластмасс, используются, например, для изготовления упаковочного материала. По окискам, полной объем урожая биосинтезируемых пластмасс составляет примерно 1,3 млрд для дрож.

Из всех окисляемых углеводородов наиболее полно изучены и охарактеризованы поли(3-гидроксибутираты). Это относится как к самому полимеру, так и к кодирующим его генам *A. eutrophus*. Поли(3-гидроксибутират-60 3-гидроксиоктат-40) и другой полиоксиполефины, поли(3-гидроксибутират-60 3-гидроксиоктат-40) и другой полиоксиполефины, получают в лабораторных и промышленном масштабе ферментацией при гетеротрофии *A. eutrophus*.

Сначала этот микроорганизм растет опосредованно медленно и некоротко, а затем с группировкой клеток источником углерода, что делает процесс весьма дорогостоящим. Можно использовать другой путь при переносе генов биосинтеза этого полимера в *E. coli* получают быстрорастущие трансформанты, адаптированные к большому количеству (до 45% сухой массы клетки) поли(3-гидроксибутират-60 3-гидроксиоктат-40) кислоты). Поли(3-гидроксибутират-60 3-гидроксиоктат-40) синтезируются из смеси С₁₂А в три стадии, характеризующиеся тремя разными ферментными (рис. 12.22). Сначала, кодирующая эти гены, был встроена в плазмиду в составе фрагмента длиной 5,2 т.п.н., однако в отсутствие селективного давления, например при росте в отсутствие антибиотиков, примерно половина клеток *E. coli* теряла данную плазмиду уже после 30 поколений. Это не очень естественно, когда масштабы культивирования малы, но становится

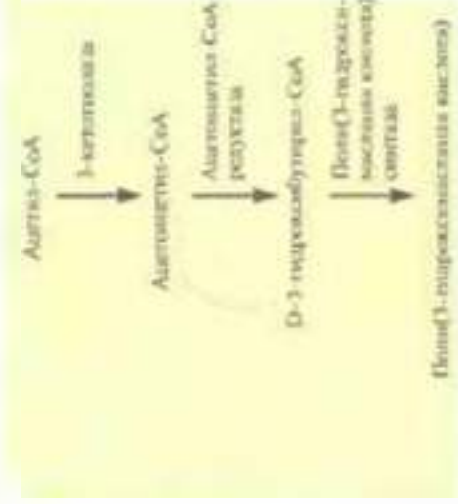


Рис. 12.22. Синтез поли(3-гидроксиоксимасляной кислоты) из ацетил-CoA. Справа от стрелок указаны ферменты, катализирующие соответствующие реакции.

с серьезной проблемой при крупномасштабной непрерывной ферментации (см. Рис. 16). Чтобы обойти эту трудность, в плазмиде *placZ* оперона *poli(3-гидроксиоксимасляной кислоты)* встроили locus *regB* из другой плазмиды, который обеспечивал стабильность системы в клетках-хозяевах, не способных к образованию окислительной энергии при анаэробном синтезе поли(3-гидроксиоксимасляной кислоты). Трансформация *E. coli* с помощью плазмиды, обеспечивающей стабильность системы, позволила увеличить количество клеток, выживающих в культуре, по-видимому, вследствие

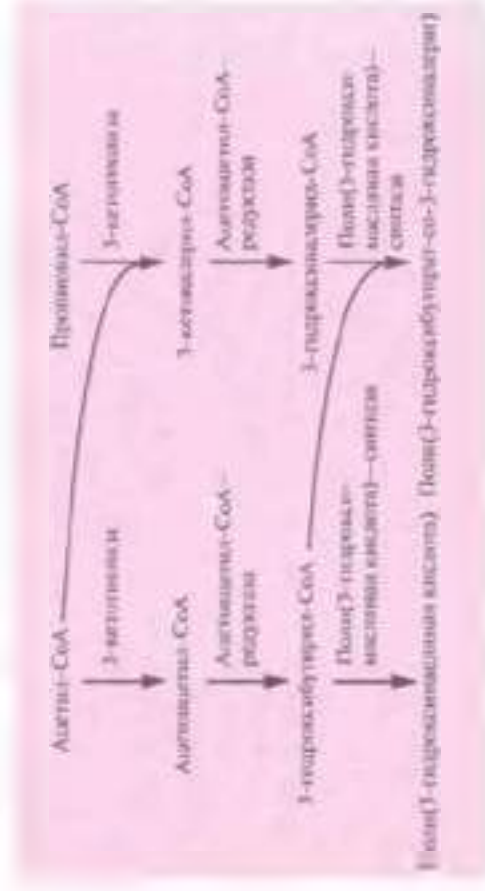


Рис. 12.23. Микробиологический синтез поли(3-гидроксибутират-co-3-гидроксиоксимасляной кислоты).

того, что весь избыточный ацетил-CoA преобразовался в поли(3-гидроксиоксимасляную кислоту), а не в ацетат. Еще одно преимущество синтеза поли(3-гидроксиоксимасляной кислоты) в *E. coli* состоит в том, что когда ее экстрагируют целочелюстным раствором хлороформистоголового натрия (клетки), то она разлагается в меньшей степени, чем при экстракции из *A. vinifoliae*. По-видимому, это связано с тем, что большая часть полимера, синтезируемого в *E. coli*, находится в кристаллическом виде, в то время как в *A. vinifoliae* — в аморфном. При этом полимеры, полученные этими двумя способами, идентичны.

Поли(3-гидроксибутират-co-3-гидроксиоксимасляная кислота) аналогичен по своим свойствам широко используемому полипропилену, так что получение его микробиологическими методами может представлять коммерческий интерес. Однако штаммы *E. coli*, в которых экспрессируются гены биосинтеза полимера, синтезируют только поли(3-гидроксиоксимасляную кислоту), а не сополимер. Эту проблему можно решить, используя для экспрессии класты *E. coli*, несущие мутации в locus *fadR* и *alcS*. *fadR* отвечает за негативную регуляцию биосинтеза жирных кислот, а *alcS* — за позитивную регуляцию их поглощения. Роль locus *fadR* в индуции биосинтеза сополимера неясна, но продукт гена *alcS* влияет на синтез белков, кодируемых генами *alcA* и *alcB* и обеспечивающих положительное бактериальное проницаемость из культуральной среды. Последний преобразуется в пропионил-CoA и затем реагирует с ацетил-CoA с образованием 3-

клетки *Escherichia coli* в среде «искусственной минеральной питательной среды» и 2-изопропанол-1-С₁₂А, метилметионин и соевый лецитин (рис. 12.23).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстро можно не только «создать» или «добыть» для синтеза белков типа «структур», но и получать с их помощью новые продукты, изменяя метаболизм бактериальных клеток. Введением в них «зажаренных» генов или модифицированных уже существующих. Можно создавать рекомбинантные микроорганизмы, способные синтезировать самые разные низкомолекулярные соединения: 1-аскорбиновую кислоту, витамин Е, витамин В₁₂, витамин К, витамин С, витамин Р, витамин Р₁, витамин Р₂, витамин Р₃, витамин Р₄, витамин Р₅, витамин Р₆, витамин Р₇, витамин Р₈, витамин Р₉, витамин Р₁₀, витамин Р₁₁, витамин Р₁₂, витамин Р₁₃, витамин Р₁₄, витамин Р₁₅, витамин Р₁₆, витамин Р₁₇, витамин Р₁₈, витамин Р₁₉, витамин Р₂₀, витамин Р₂₁, витамин Р₂₂, витамин Р₂₃, витамин Р₂₄, витамин Р₂₅, витамин Р₂₆, витамин Р₂₇, витамин Р₂₈, витамин Р₂₉, витамин Р₃₀, витамин Р₃₁, витамин Р₃₂, витамин Р₃₃, витамин Р₃₄, витамин Р₃₅, витамин Р₃₆, витамин Р₃₇, витамин Р₃₈, витамин Р₃₉, витамин Р₄₀, витамин Р₄₁, витамин Р₄₂, витамин Р₄₃, витамин Р₄₄, витамин Р₄₅, витамин Р₄₆, витамин Р₄₇, витамин Р₄₈, витамин Р₄₉, витамин Р₅₀, витамин Р₅₁, витамин Р₅₂, витамин Р₅₃, витамин Р₅₄, витамин Р₅₅, витамин Р₅₆, витамин Р₅₇, витамин Р₅₈, витамин Р₅₉, витамин Р₆₀, витамин Р₆₁, витамин Р₆₂, витамин Р₆₃, витамин Р₆₄, витамин Р₆₅, витамин Р₆₆, витамин Р₆₇, витамин Р₆₈, витамин Р₆₉, витамин Р₇₀, витамин Р₇₁, витамин Р₇₂, витамин Р₇₃, витамин Р₇₄, витамин Р₇₅, витамин Р₇₆, витамин Р₇₇, витамин Р₇₈, витамин Р₇₉, витамин Р₈₀, витамин Р₈₁, витамин Р₈₂, витамин Р₈₃, витамин Р₈₄, витамин Р₈₅, витамин Р₈₆, витамин Р₈₇, витамин Р₈₈, витамин Р₈₉, витамин Р₉₀, витамин Р₉₁, витамин Р₉₂, витамин Р₉₃, витамин Р₉₄, витамин Р₉₅, витамин Р₉₆, витамин Р₉₇, витамин Р₉₈, витамин Р₉₉, витамин Р₁₀₀.

ЛИТЕРАТУРА

Anderson S., C. B. Marler, R. Lazera, J. Miller, K. Stafford, J. Seymour, D. Light, W. Rastetter, D. Faltz. 1985. Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* 230: 144-149.

Valley J. E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252: 1668-1675.

Berry A. 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* 14: 250-256.

Brooks J. E., P. D. Nathan, D. Lando, L. A. Snyder, P. Waltz-Ress, C. L. Yen, L. S. Moras, B. E. Sletko, J. E. Bennett. 1991. Characterization of the cloned BamHI restriction modification sys-

tem: its nucleotide sequence, properties of the methylase, and expression in heterologous hosts. *Nucleic Acids Res.* 19: 841-850.

Cohen G., D. Sambrook, M. Maniatis, Y. Avaronowitz. 1990. Microbial operon-carrying N-synthetic genes: structure, function, diversity and evolution. *Trends Biotechnol.* 8: 105-111.

de la-Corona G., S. J. Garper, G. G. Swallow, T. H. Torges, L. K. Gibl. 1990. Metamorphosis of *Escherichia coli* from a cloned pyruvate gene. *Biotechnology* 8: 634-638.

Lindley H. D., W. J. Rastkin, J. H. Oswald, M. J. Simo, L. P. Wackett, H. T. Gibson. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222: 167-169.

Hines K., J. Xiao, A. Berry, F. Holtz, F. Valle. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14: 620-623.

Flores H. G. 1987. Hybrid antibiotics—the combination of the new gene combinations. *Trends Biotechnol.* 5: 111-115.

Lu J.-P., V.-H. Tseng. 1990. Construction of lactose-utilizing *Rhodospirillum rubrum* and production of xanthan gum from whey. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 919-923.

Hahn S. K., Y. K. Chang, S. Y. Lee. 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 34-39.

Hilleman D., A. Poldos, W. Wolchen. 1991. Gene disruption and gene replacement in *Streptomyces* via single stranded DNA transformation of integration vectors. *Nucleic Acids Res.* 19: 727-731.

Howard D. A., M. J. Bibb, C. J. Bruton, K. F. Chatter, J. S. Feltson, J. A. Gil. 1983. Cloning *Streptomyces* genes for antibiotic production. *Trends Biotechnol.* 1: 42-48.

Howard D. A., F. Malpartida, H. M. Kleser, H. Ikeda, J. Damon, I. Iqbal, B. A. M. Rudd, H. G. Flores, S. Okamoto. 1985. Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature* 314: 642-644.

Howard K. A., C. Card, J. S. Benson, H. I. Callahan, R. Magnus, K. Silber, G. Wilson, J. E. Brooks. 1986. Cloning the *SalI* restriction-

- modification system using a two-step method. *Nucleic Acids Res* 14: 7939-7951.
- Hutchinson C. R., H. Decker, K. Madduri, S. J. Chen, I. Tang. 1993 Genetic control of polyketide biosynthesis in the genus *Streptomyces*. *Antonie Leeuwenhoek* 64: 165-176.
- Hutchinson C. R. 1994 Drug synthesis by genetically engineering microorganisms. *Bio/Technology* 12: 375-380.
- Hutchinson C. R., I. Fojt. 1995 Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 49: 201-228.
- Iida M., K. Nakashiki, K. Iida, R. Katsumata. 1994 Tentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Biotec Biotechnol Biochem* 58: 674-678.
- Ichida M., K. Miwa, S. Nakamura, A. Sano. December 1989. Process for producing L-tryptophan. U.S. patent 4,885,745.
- Izumi T., M. Fukayama, I. Asanori, M. Iwano, H. Kato, I. Oho, Y. Ieda, M. Kabeaka, JI. Imumaki. 1991 Construction of a 7 aminocyclohexanecarboxylic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Artemonium chrystepium*. *Bio/Technology* 9: 188-191.
- Katz L., S. Donadini. 1993 Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol* 47: 875-912.
- Kleinlauf H., H. von Döhren. 1990 Anti-biotics-cloning of biosynthetic pathways. *FEBS Lett* 268: 405-407.
- Kröner H. 1996. Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J. Biotechnol* 45: 1-21.
- Lazarus R. A., M. Harle, S. Anderson, H. B. Powers. December 1990 Enzymes for the production of 2 keto L-gulonate acid. U.S. patent 5,376,544.
- Lee S. Y., H. N. Chang, Y. K. Chang. 1994. Production of poly(β hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 721: 43-53.
- Lee S. Y., K. S. Yim, H. N. Chang, Y. K. Chang. 1994 Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(β hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol* 32: 203-211.
- Lee S. Y., H. N. Chang. 1995 Production of poly(β -hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* using genetic and fermentation studies. *Can. J. Microbiol* 41: 207-219.
- Majumdar S. K., D. J. Levintaphang, J. A. DeMichele, J. F. Curtis, J. E. Blum, J. I. Galazo, D. E. Hughes. 1991 Actinophidin production by *Streptomyces rochei* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemagglutinin. *Bio/Technology* 9: 473-476.
- Martin J. F. 1987. Cloning of genes involved in penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Trends Biotechnol* 5: 306-308.
- McDaniel R., S. Fleet-Khosla, D. A. Hopwood, C. Khosla. 1995. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature* 375: 549-554.
- Mermel N., S. Harayama, A. N. Thomas. 1986 New route to bacterial production of indigo. *Bio/Technology* 4: 321-324.
- Ozaki A., R. Katsurata, T. Oka. October 1989. Process for producing tryptophan. U.S. patent 4,874,698.
- Pickartowicz A., K. Yuan, H. C. Stein. 1991. A new method for the rapid identification of genes encoding restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Res* 19: 1831-1835.
- Rhie H. G., B. Dennis. 1995 Role of *fadR* and *atoC*(Con) mutations in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *pho P Escherichia coli*. *Appl Environ. Microbiol* 61: 2467-2467.
- Sakano A. J., I. Goldberg. 1993. Cloning, expression, and characterization of a synthetic analog to the broad-specificity protein of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 38: 721-726.
- Schwarzer A., A. Puhler. 1991 Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* 9: 54-57.
- Sikora L. A. January 1991. DNA fragment encoding a rubber polymerase and its use. U.S. patent 4,983,739.
- Stachelhaus T., A. Schürleier, M. A. Marshiel. 1995. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* 269: 69-72.

- Stroobey R. L., R. P. J. de. 1990. Protein-based medical adhesives. *Trends Biotechnol.* 8: 53–57.
- Teramata M., M. Fukuhara, Y. Kuroki, H. Yokota. 1990. L-Tryptophan production by the application of high expressed tryptophanase in *Escherichia coli*. *Process Biochem. Int.* 25: 172–175.
- Walker R. V., J. L. Hartley, J. C. Donohue, J. A. Walker. 1981. Cloning and expression of the *PvuII* restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1503–1507.
- Weber J. M., J. O. Jørgen, S. J. Swanson, K. B. Laker, J. B. McAlpine. 1991. An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. *Science* 252: 114–117.
- Yim K. S., S. Y. Lee, H. N. Chang. 1996. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 495–503.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите стратегию выделения гена эндоуклеазы рестрикции *EcoRI*.
2. Опишите стратегию клонирования гена 2,5-DKG-редуктазы *Corynebacterium* и *Erwinia*. Почему это представляло интерес?

3. Предложите стратегию повышения удельной активности клонированного гена 2,5-DKG-редуктазы.
4. Как синтезировать инанто в *E. coli*?
5. Как повысить количество триптофана, синтезируемого *Corynebacterium glutamicum*?
6. Предложите стратегию выделения гена, участвующего в биосинтезе антибиотика уродостригеницина, который обычно синтезируется в *Sterigmatocystis conicola*.
7. У чем состоит трудность триондифирации различных ризонидностей *Sterigmatocystis*? Как ее преодолеть?
8. Как с помощью генов инкапсуляции увеличить производство антибиотика авицином инантом *Sterigmatocystis*?
9. Сформулируйте один из подходов к созданию модифицированных вариантов неароматического поликетидных антибиотиков типа триптомицина.
10. Как азотсодержащие белки, обычно синтезируемые жидкой *Ashbya gossypii*, можно синтезировать в *E. coli*?
11. Опишите схему синтеза жидкой (3-гидроксимасляной кислоты) в *E. coli*.
12. Что такое сыпороксыл? Какие вещества в промышленности являются соединениями жидкой из них получить и каковы образцы?

Биодegradация токсичных соединений и утилизация биомассы

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

В настоящее время прозрели примеры целого ряда технологий, в том числе и биотехнологических, подходов, с помощью которых, возможно, удастся перерабатывать большие количества отходов (лигнин, целлюлоза) и токсичные вещества. Предпринимаются попытки кооперировать те предприятия, которые перерабатывают отходы промышленности и повторно использовать их сырьем в этих же отраслях.

Универсальной или почти универсальной «биодegradации» относится к процессу разрушения отходов, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов, а термин «бионция» ко всей совокупности веществ и материалов побочным продуктом пищевой и перерабатывающей промышленности, — которые раньше считались отходами, и теперь могут служить сырьем для производства многих экономически важных продуктов.

Деградация ксенобiotиков с помощью микроорганизмов

Проблема утилизации токсичных отходов сейчас стоит очень остро. В 1985 г. миром принято решение о запрете на производство и использование химического пестицида, составляло более 50 000 т. Ранее незначительное количество разрушилось, однако при обработке других химикатов, однако это тоже привело к загрязнению окружающей среды, а кроме того, обнаружены почвенные микроорганизмы, способные к деградации ксенобiotиков (неприродных, синтетических химических веществ; инсекты, грибы, жуки) — тербутилы, пестициды, хлориды, растворители и т. д. Это открытие подтвердило предположение о том, что микроорганизмы можно использовать для экономичного и эффективно разрушения токсичных отходов.

Основная группа почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобiotики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*. Биохимические исследования показали, что разные штаммы *Pseudomonas* способны разложить более 100 органических соединений. Нередко один штамм использует в качестве источника углерода несколько родственных соединений.

В биодegradации сложной углеводородной молекулы обычно участвуют несколько разных ферментов. Колориметрические тесты могут иметь хромофорную реакцию, но чаще входят в состав крупинки (50–200 т в, в.) пластики (табл. 13.1), а

Таблица 17.1. Цепочки *Acetyl-CoA*, на примере их взаимодействия с жирными кислотами метаболитическими путями ферментов¹

Инициалы*	Путь/фермент	Роль/номер фермента, г-н
3A1	Синтаза	68
3A2	Синтаза	77
3A3	Синтаза	83
101	Кеталаза	113
1P1	3-Аксилтрансфераза/ацетил-СФА	87
1P2	3-Аксилтрансфераза/ацетил-СФА	94
1P3	3-Аксилтрансфераза/ацетил-СФА	78
САМ	Фермент	23
ХУ1	Кеталаза	14
1PС11	1-Аксилтрансфераза	108
1PС21	1-Аксилтрансфераза	103
1PС31	Кеталаза/ацетил-СФА	136
1PД1	Кеталаза	69
ХУ1А	Кеталаза/ацетил-СФА	135

* Инициалы: 1 – фермент АА; 10 – фермент 1; 1 – фермент 1; 46 – фермент 46.

¹ 1) и 2) – ферменты, участвующие в синтезе жирных кислот; 3) и 4) – ферменты, участвующие в синтезе жирных кислот; 5) и 6) – ферменты, участвующие в синтезе жирных кислот.

могут обнаруживаться как в хромосомах, так и в плазмидной ДНК.

Быстрые, порушающие негалогенированные ароматические соединения, как триптофан, превращены в катехол (рис. 13.1) или протокатехол (рис. 13.2), в шток, в ходе нескольких реакций окислительного расщепления. — в ацетил-СОА и сульфид (рис. 13.3) или пирuvat и ацетальдегид (рис. 13.4). Эти последние соединения метаболизируются практически всеми микроорганизмами. Галогенированные ароматические соединения, являющиеся компонентами большинства пестицидов и гербицидов, с помощью тех же ферментов расщепляются до ацетальдегида, протокатехола, гидрохинона или их галогенированных производных, причем скорость их деградации обратно пропорциональна числу атомов галогена в неактивном состоянии. Легкооспиритные (или безвредные замещающие атомы галогена на органической молекуле), необходимые для детоксикации соединения часто осуществляются в ходе неспецифической диксинтезирования реакций, путем замещения галогена

в бензольном кольце на гидроксибензил (группу). Эта реакция может происходить как в ходе биодетоксикации, так и в ходе биотрансформации с образованием, так и в шток.

Метаболические пути биотрансформации ксенобиотиков, созданные методами генной инженерии

Некоторые микроорганизмы способны переработать ксенобиотик в ациридин различных ксенобиотиков, однако следует иметь в виду, что: 1) они могут иметь не только одну или две специфические способности; 2) различные организмы способны в разной концентрации осуществлять функции гидролиза или расщепляющих микроорганизмов; 3) большинство штаммов штаммов способны смешивать штаммы, способные гидролизовать или несколько ее компонентов, может иметься несколько компонентов; 4) многие микроорганизмы способны поглощаться частными линиями и становятся менее доступными; 5) биотрансформация происходит специфически часто трансформация полностью медленно. Часть лишь проблем можно решить, осуществив комбинацию штаммов переносчиков, которые копируют ферменты разных каталитических путей, в один реципиентный штамм (рис. 13.5). Если две штаммы содержат гомологичные участки, то между ними может происходить рекомбинация с образованием гибридных штаммов, которые имеют большие размеры и область симпатии ксенобиотика. Если же две штаммы не содержат гомологичных участков и относятся к разным группам несовместимости, то они могут сосуществовать в одной культуре.

Перенос плазмид

В 1970 г. Чарльзарт и его коллегами был создан первый бактериальный штамм, обладающий более широкими каталитическими возможностями. Он расщепляет большинство углеводородных нефти и был назван «супербактерией». Для его изучения использовались плазмиды, клонированные штаммы контролирующие ферменты, расщепляющие специфический класс углеводородов, плазмиды САМ детерминировали деградацию катехола, ОСТ оксиды, НАН гидроксилазы. ХУ1 – кеталаза (рис. 13.5). Сначала путем конъюгации перс-

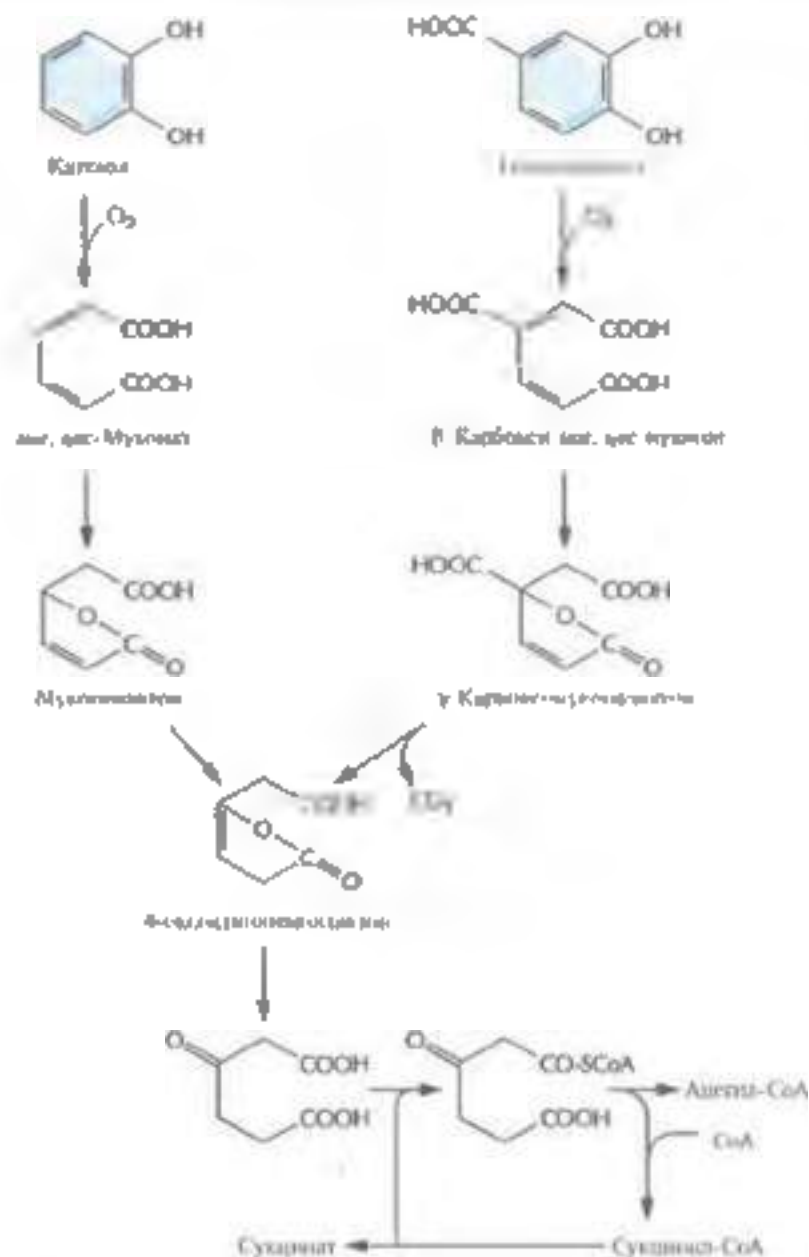


Рис. 13.9. Путь *этно-ферментации* при ферментативном превращении катехола в производное *α*-кетил-СoA и сукцинат

несли плазмиду SAM в штамм, несущий плазмиду OCT. Эти две плазмиды несовместимы (не могут существовать в одной клетке в виде отдельных плазмид), но в результате происходящей между ними рекомбинации образуется одна плазида, объединяющая их функции. Затем аналогичным путем плазмиду NAM перенесли в штамм, несущий плазмиду XVI. Эти плазмиды совместимы и могут сосуществовать в одной

клетке штамма H. volcanius, гибридную плазмиду перенесли в штамм, несущий плазмиду NAM и XVI. В результате всех этих манипуляций получили штамм, который растет на неочищенной нефти лучше исходных штаммов, взятых по отдельности или вместе.

Когда сам этот штамм не использовался для ликвидации нефтяных загрязнений, он сыграл важную роль в стабильном биотехнологиче-

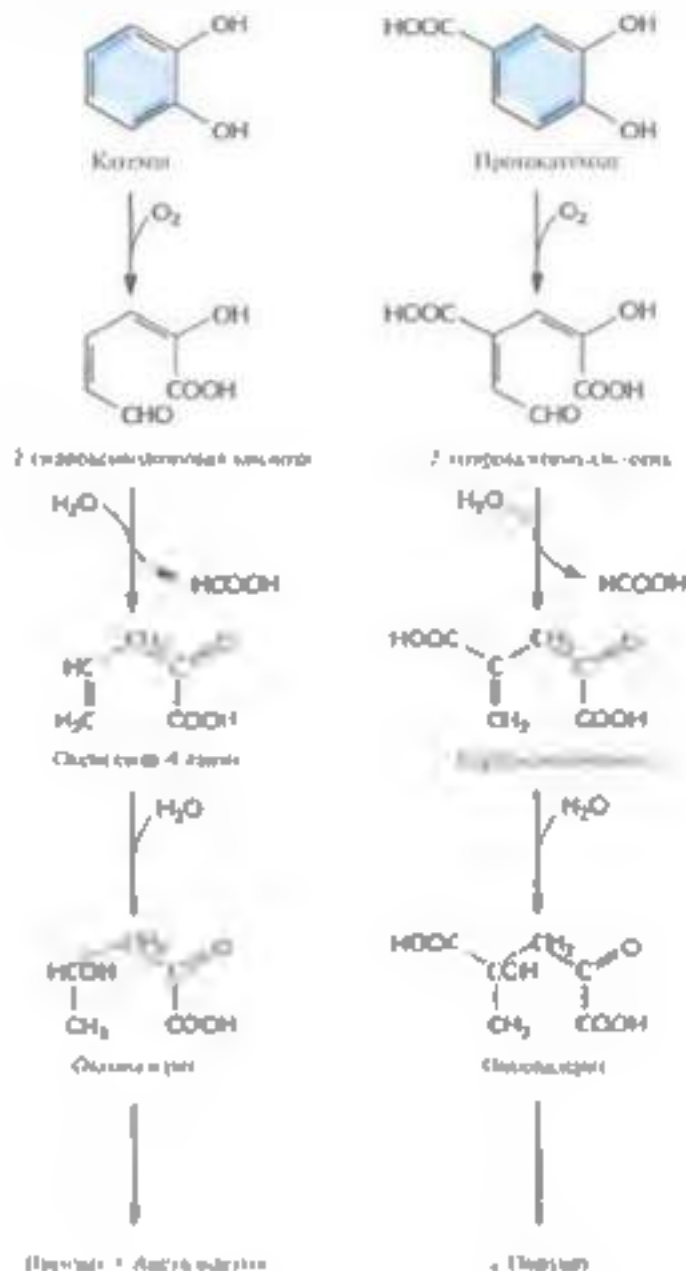


Рис. 13.4 Путь метилгидроксилирования при ферментативном превращении катехола и протокатехового в пенициллин

ской промышленности. Изобретатель «суицида» получил патент (ША, описывающий структуру линейного пептида и возможность его применения). Это был первый патент, выданный за создание генетически модифицированной микроорганизма и подтвержденный Верховным судом США, который продемонстрировал, что биотехнологические компании могут защищать

свои и изобретение (такой же, как химические и фармацевтические).

Большинство разбуживших ксенобиотиков бактерий, модифицированных путем переноса плазмид, являются мезофильными мезоаэрофильными (любили влагу) при 20–40 °С, в том же ряду их можно найти в горячих источниках, океанах и озерах, обычно живут в диапазоне от 0 до 20 °С,

Фиг. 13.2. Состояние системы при температуре, близкой к температуре плавления. При этом происходит разрушение кристаллической решетки, что приводит к образованию жидкого состояния. При этом происходит разрушение кристаллической решетки, что приводит к образованию жидкого состояния. При этом происходит разрушение кристаллической решетки, что приводит к образованию жидкого состояния.

Чтобы прояснить, можно ли считать бактерию обитателем более широкого каталитического диапазона, и в то же время способную расти и развиваться при низких температурах, пламени ТОН (гетерогенно разрушение толлола) мезофильного штамма *Acidithiobacillus ferrooxidans* (с низким температурным оптимумом) штамм, утилизирующий солициклат при температуре, близкой к 0 °С. Трансформированный штамм способен выделенную в него плазму ТОН и объективно плазму SAL, детерминирующую разрушение солициклата, и был способен утилизировать как солициклат, так и толлол в качестве единственного источника углерода при 0 °С (табл. 13.2). Исследованиями штамма показано, что

на (трансформированный) не мог расти при любой температуре, если единственным источником углерода был толлол (толлол). Эти результаты показали принципиальную возможность создания психрофильных штаммов бактерий, эффективно разрушающих катиониты при природных условиях, но для их реального получения необходимо провести дополнительные исследования.

Исключительное

Обеспечение разных метаболических путей в одном микроорганизме с помощью кооперации — это лишь один из способов сошения бактерий с новыми свойствами. Расширить их каталитические возможности можно и другим путем, модифицируя гены, кодирующие ферменты, такие и в

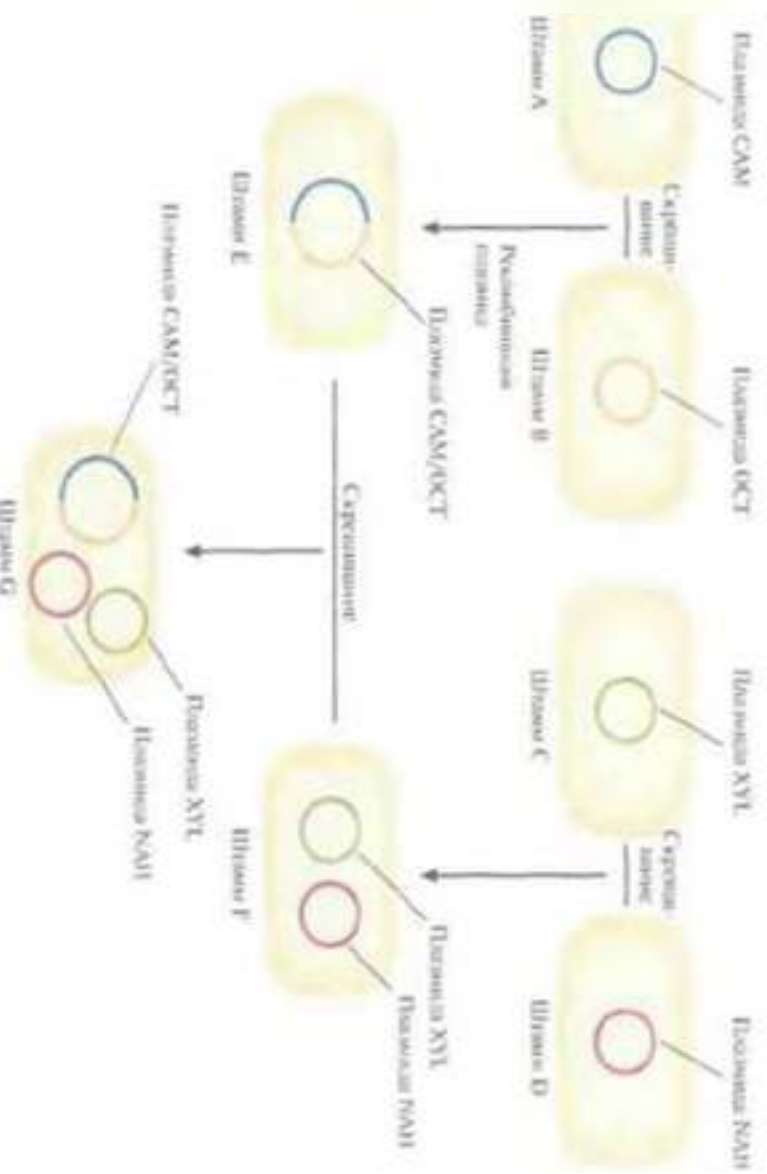


Таблица 13.2 Времени экспоненциального и трансформированного пестрофидельных штаммов *P. putida*, используемых в качестве единственного источника углерода (ацетилен или толуол, при разных температурах)^{1,2}

Температура, °C	Время (часов)		
	экспоненциальный рост на ацетилене ¹	трансформированный штамм, ацетилен	трансформированный штамм, толуол
17	16 (partes)	16 (partes)	16 (partes)
20	2,1	2,5	2,8
25	1,1	1,2	1,3
28	3,6	3,8	1,9
33	3,2	—	3,9
36	6,1	5,8	3,3
39	11,9	12,9	13,2
41	18,6	18,1	16,4

¹ Изучено Вайсман и др. *Environ. Microbiol.* 56:539–541, 1988. — переводимый

² Штамм *putida* был использован для измерения времени экспоненциального роста при разных температурах. Скорость роста трансформированного штамма — переводимый

иного метаболического пути. Осуществимость этого подхода проверили на примере плазмиды *pWAC*, 12 генов которой кодируют метил-гидроксиацетил-тиолазы и кетолы. Обладатели этой плазмиды последовательно могут использовать в качестве источника углерода ацилбензоаты (рис. 13.6). Указанные гены входят в состав одного *lux*-оперона, находящегося под контролем P_{lux} -промотора. Транскрипционная активность последнего находится под стативным контролем продукта гена *luxS*, активирующая почти всеми субстратами дивергент метаболического пути (например, бензоатом и 3-метилбензоатом) (рис. 13.6). Детальный биохимический и генетический анализ показал, что плазмиды *pWAC* (плазмиды бактрии) могут расщеплять 4-этилбензоат только до 4-этилацетата, который ингибирует один из основных ферментов данного метаболического пути, катехол-2,3-диоксигеназу, являющуюся продуктом гена *luxE*, и поэтому не разрушается и накапливается в среде. Кроме того, 4-этилбензоат, в отличие от остальных ацилбензоатов, не активирует *luxS*-белок; поэтому, если он является единственным субстратом, *lux*-оперон не транскрибируется. Для усовершенствования природной системы метаболизма ацилбензоатов необходимо решить две основные задачи: 1) предотвратить ингибирование катехол-2,3-диоксигеназы 4-этилбензоатом; 2) ингибировать транскрипцию генов *lux*-оперона в том случае, если единственным субстратом является 4-этилбензоат.

Для решения второй задачи был проведен поиск мутантной плазмиды. Для этого в ацилбензоату, несущую ген устойчивости к ампициллину, встроили ген устойчивости к тетрациклину, находящийся под контролем P_{tet} -промотора Вайсман и др. (рис. 13.7, А), несущую ген устойчивости к канамидину, встроили ген *luxS*. Полученными конструкциями трансформировали *E. coli*, отбрали клетки, содержащие обе плазмиды, по признаку устойчивости к ампициллину и канамидину (рис. 13.7, А), обработали их мутационным этилметансульфонатом и вывелили на среде, содержащей тетрациклин и 4-этилбензоат. Получили на этой среде клетки, содержащие мутантный ген *luxS* и продуцирующий измененный *luxS*-белок (S^*), который способен взаимодействовать с 4-этилбензоатом и активировать транскрипцию гена устойчивости к тетрациклину. Чтобы решить проблему ингибирования катехол-2,3-диоксигеназы мутантным ген *luxS* встроили в плазмиду с индикаторным геном, несущую ген устойчивости к клиндамицину, в ядро ее в клетки *P. putida*, содержащие плазмиду *pWAC* (рис. 13.7, Б). Трансформированные клетки высеяли с высокой плотностью на чашки с минимальной средой, содержащей 4-этилбензоат в качестве единственного источника углерода, канамидин для отбора клеток с плазмидой и этилметансульфонат. Клетки, растущие на этой среде, выделяли измененную катехол-2,3-диоксигеназу, которая не ингибируется 4-этилбензоатом. Дополнительный анализ подтвер-

α.

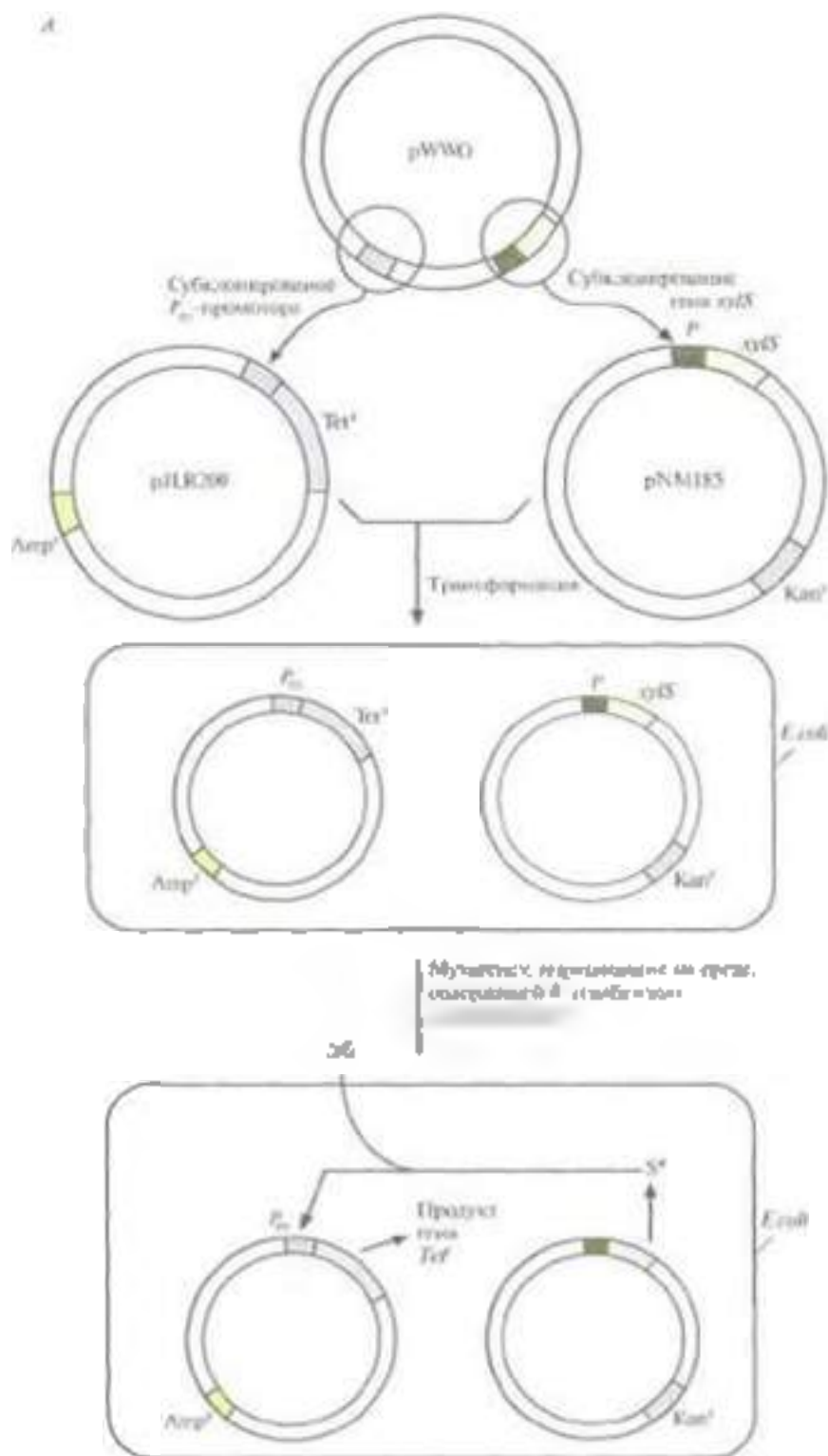


Рис. 13.3. А. Собираем circuit на основе λgt10. Вектор pWVO (зеленая область) превращается в вектор pLRC200 (зеленая область - ген tetR) и вектор pNM185 (серая область - промотор P). Затем в E. coli с помощью трансформации вносим оба вектора. Получившиеся клетки содержат трансформированную E. coli. Отбирают трансформированные клетки на среде с тетрациклином и канамицином и индуцируют стрептомином. В клетках, содержащих вектор tetR (Tet^r), λgt10 (S^r). λgt10 кодирует белок λgt10 (λgt10) и кодирует белок λgt10 (λgt10). В клетках, содержащих вектор pLRC200 (Tet^r), λgt10 (S^r). λgt10 кодирует белок λgt10 (λgt10) и кодирует белок λgt10 (λgt10). В клетках, содержащих вектор pNM185 (P, λgt10, Kan^r), λgt10 кодирует белок λgt10 (λgt10) и кодирует белок λgt10 (λgt10).

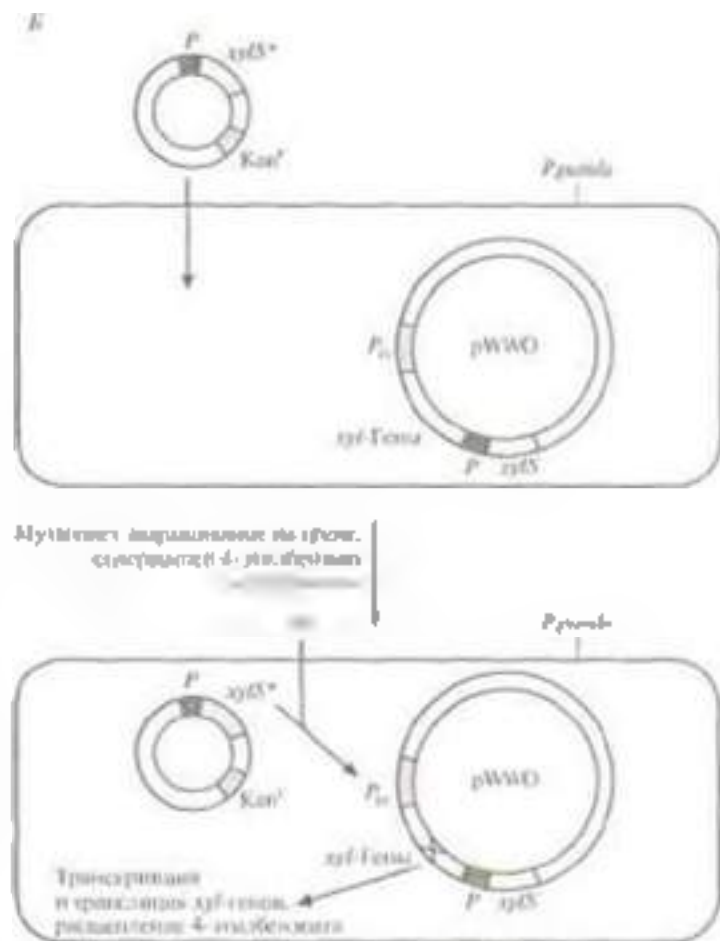


Рис. 13.3. *Agrobacterium* & *S. typhimurium* системы системы модификации клеток 2,3-диоксибензоата, которая не взаимодействует с 4-гидроксибензоатом. Штамм *P. putida*, содержащий плазмиду pWAO, трансформирован и взаимодействует с системой клетки хозяина, содержащей мутантный ген xylS, приводит к тому, что активируется P_{WAO} промотор (Промотор) хлоропластной трансформации xyl-генов и вырабатывает он (он имеет мутацию в гене, содержащий 4-гидроксибензоат и катионный Кан^r), растущие на этой среде, содержащий мутантный ген xylS (2,3-диоксибензоат) (мутация X в середине xyl-оперона).

ла, достаточно лишь толуюдиоксибензоата, которая в норме катализирует реакцию окисления толуюдиоксибензоата до 4-гидроксибензоата.

Офреконовые функциональные полиардиоксибензоаты кодируются четырьмя генами (рис. 13.5, А). Их выделение и клонирование в *E. coli* под контролем типичного индуцибельного lac-промотора, который активируется изопропанол-β-D-тиоальфа-галлопиранозидом (IPTG), в результате чего транскрипция развивается до безразличной скорости. Исходная скорость экспрессии транскрипции в *E. coli* ниже, чем в *P. putida*, но она снижается в *E. coli* до максимума. С этим различием может быть связано то, что, чем в *P. putida*, мустанте гена *l. coli* и его преобладающему действию транскрипции.

В одном из вариантов этой экспериментальной системы использовались гены *Pseudomonas*, в которых были определены элементы двух разных метаболических путей бактериального цикла, способные разрушить бифенил, содержащий бифенилдиоксибензоат. В состав этого ферментного комплекса входят компоненты из двух субъединиц терминальной оксигеназы, ферредоксин и ферредоксинредуктаза. По своей структуре и функции бифенилдиоксибензоата сходна с полиардиоксибензоатом, однако утяжеленные бифенил оксидогенезы не могут расти на толуюди, в значительной степени толуюди, не растут на бифениле. После того как и гены *K1715 P. putida* ген *brkA1*, кодирующие гомодульную субъединицу бифенилдиоксибензоата, была

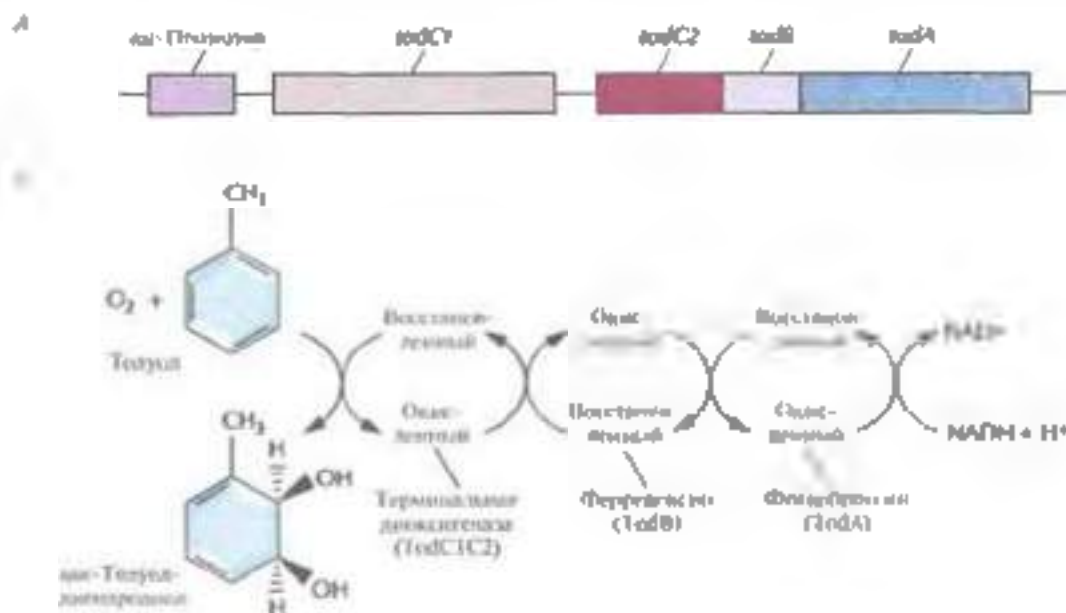


Рис. 13.9 A Клонированный оперон толуолдиоксигеназы, включающий пять копий генов для промотора *P. todI* (Кермичингу) и генов толуолдиоксигеназы (обозначены четыре гена (*todA*, *todB*, *todC1*) и *todC2*). Ген *todA* кодирует ферредоксин, который взаимодействует с восстановленным ферредоксином (FeO) и окисляет его на ферредоксин. Последний кодируется геном *todB* и восстанавливает терминальную диоксигеназу, кодируемую генами *todC1* и *todC2*. Эти гены кодируют ферменты (гены *todC1/2*) (рис. 13.6, Б) и участвуют в толуолизе и окислении толуола в результате совместного действия TodA и TodB (рис. 13.6, В).

заменен с помощью гомологичной рекомбинации на кодирующий большую субъединицу эволюционированной гены *todC1* из штамма F1 *P. putida*, получили штаммы, способный эффективно разлагать трихлорэтилен (табл. 13.3). Кроме того, при штамм растет на многих ароматических соединениях, а следовательно, есть возможность создания микроорганизма, способного разлагать сразу несколько разных соединений.

Утилизация крахмала и сахара

Крахмал, основной резервный полисахарид растений, представляет собой смесь полимеров D-глюкозы — как линейных (амилоза), так и разветвленных (амилопектин). Миллионы звеньев состоят из $1 \cdot 10^2 - 4 \cdot 10^5$ остатков D-глюкозы, соединенных α -1,4-связями (рис. 13.9, А), а амилопектин — из коротких (17–23 остатков D-глюкозы, соединенных

Таблица 13.3 Рост разветвленного и эволюционированного штамма *Pseudomonas* на разных ароматических соединениях¹¹

Штамм	Соединения		Рост (см ³)	Биомасса	гравиметрия
	линейные	разветвленные			
<i>P. putida</i> KF715	+++	---			
<i>P. putida</i> F1			+++	+++	+
<i>P. putida</i> KF715-D5 ¹⁰	++	+	+++	+++	

¹¹ В. В. Руденко, В. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко.

¹⁰ В. В. Руденко, В. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко.

11 В. В. Руденко, В. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко, Г. В. Руденко.

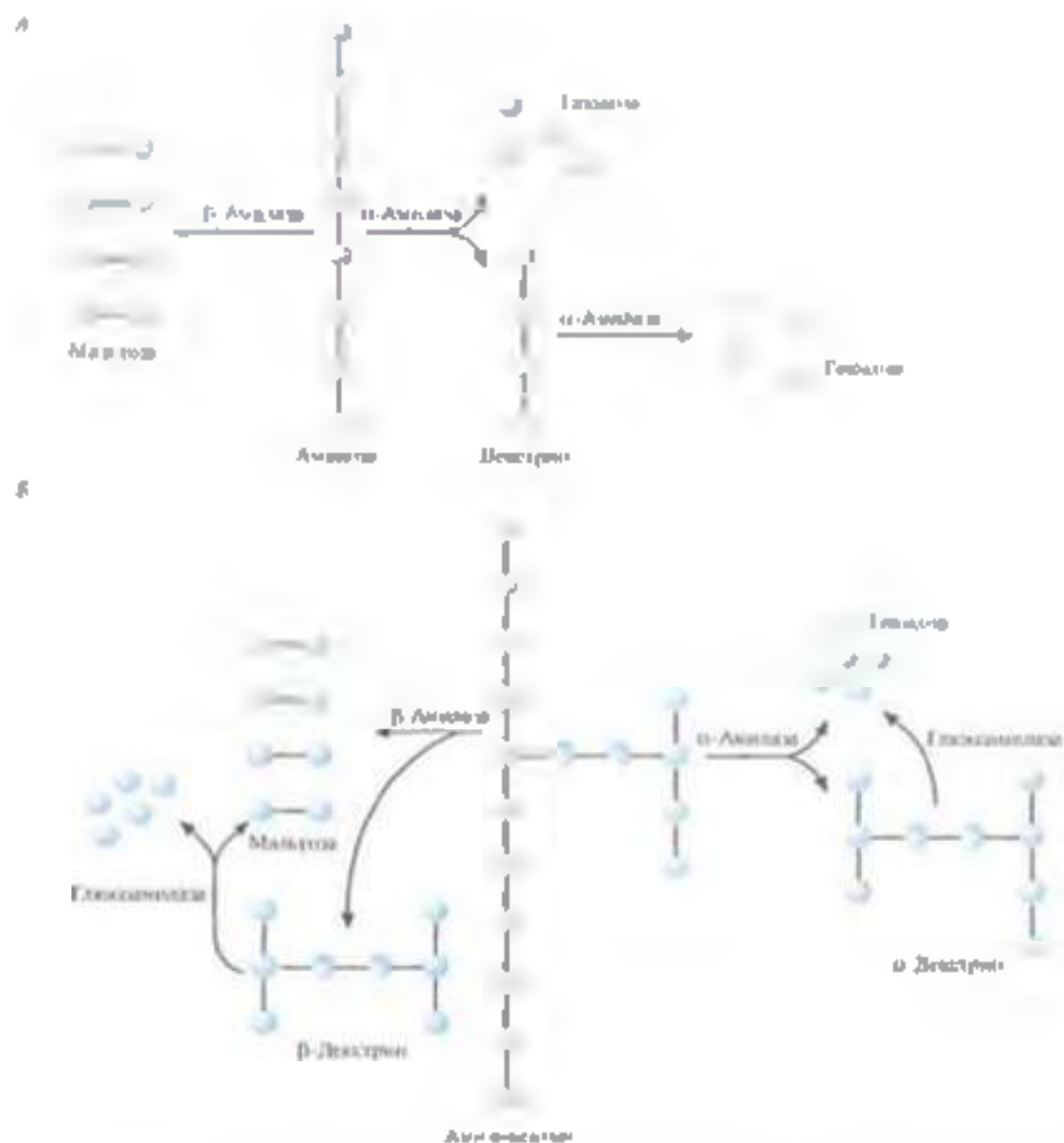


Рис. 13.9. *А* Формирование α -D-глюкопиранозил фруктанов. *Б* Формирование гидроксиэтилцеллюлозы. Голубые кружки – остатки D-глюкозы

α -[1,4-связями] линейных цепей, соединенных 1,6- и 1,3-связями и формирующих сильно разветвленную структуру, содержащую $1 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^7$ остатков глюкозы (рис. 13.9, *Б*). Степень разветвления и соотношение между амилозой и амилопектином варьирует в зависимости от вида и возраста растения, из которого был получен крахмал.

Прямые цепочки при инверсии фруктозы и глюкозы

Крахмал широко используется в пищевой промышленности и сельском хозяйстве; при этом его структура гидролизуют до низкомolecularных компонентов, а затем преобразуют в другие соединения, преимущественно во фруктозу и глюкозу. Станд-

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Получение мультилатеральных микрорганализмов, способных утилизировать несколько соединений

А. М. Чакрабарти

L. S. pages 4, 279-284, 1981

до появления возможности рекомбинации ДНК одним из способов переноса генетического материала между микроорганизмами другим была мутация. Так же мутации обеспечивала перенос из клетки в клетку плазмиды или плазмиды. Исследования по мутации плазмиды - разрушительная в E. coli, позволили обнаружить все ферменты пути биодegradации (предельного соединения, связывающего ионы, содержащий альдегиды, кетон, гликоли, карбоксилат и катионные группы) ферменты являются каталитическим

путем разрушали определенные органические соединения. В настоящее время бактерии, которые способны микрорганализм, со специфичностью, которые обуславливают деградацию амфиарии, октади, салицилата и нефтяны. Эти работы были новаторской и очень интересной не только с научной точки зрения, но и с точки зрения, что они были проведены раньше 1970 г. до появления большинства генноинженерных методов. Они сыграли ключевую роль в формировании принципов биотехнологии, поскольку являлось

буквально получено в марте 1981 г., когда через десять лет с момента изобретения, институт США. После того как Верховный суд США принял решение в пользу Чакрабарти создание микрорганализмов с помощью генноинженерных методов было признано изобретением, которое должно было патентовать изобретение с юридическим. Это решение судьи послужило важным фактором стимулирования развития биотехнологической промышленности

ней. Основная функция глюкоамилазы - расщепление полимерных единиц в молекуле крахмала с превращением его в глюкозу. Этот и другие ферменты используются для уменьшения длины углеводов (клетчатки) и органических соединений и получения так называемых светлых и сухих сортов. Обработку глюкоамилазой обычно проводят перед ферментацией, однако это два процесса можно объединить. Глюкоамилазу синтезируют многие микроорганизмы, но обычно ее получают из грибов *Aspergillus niger*.

Повышение эффективности производства ферментов и углеводов

С целью при издании этилового или фруктового изюма зерно в основном определяется специфическими ферментами, которые обычно используют для производства. Поэтому разработка новых методов неограниченно повышает эффективность этих ферментов может существенно снизить стоимость конечных продуктов. Этого можно достичь несколькими способами.

- Использовать для ферментации ферменты быстрого действия рекомбинантные микрорганализмы, утилизирующие недорогой

субстрат. Это будет зависеть, чем получить ферменты из природных микроорганизмов.

- Использовать рациональные и оптимальные (встречающиеся в природе или созданные искусственным путем) условия, которые обеспечивают более высокие активности и стабильность ферментов окисление при 30-50 °C. Это уменьшит затраты аглирированных крахмала и сэкономит энергию, расходуемую на его охлаждение до температуры, при которой обычно проводится гидролиз.
- Акклиматизировать гены ферментов и глюкоамилазы новым образом, чтобы культивируемые или ферменты имели оптимальные условия температуры и pH. Это позволит совместить условия окисления и гидролиза.
- Найти ген созданы ферменты, который будет эффективно расщеплять необработанный крахмал, что позволит исключить этап величина и сэкономить большие количества энергии.
- Создать такой микрорганализм для ферментации, который будет синтезировать и секретируют специфическую, что устранит необходимость ее добавления в процессе ферментации.

В настоящее время проводятся исследования, которые позволяют, возможно, не разработать таких штаммов.

Гены, кодирующие σ -факторы, были выделены из микотых микроспорангиозитов, в том числе из *B. subtilis* и термофильной бактерии *B. pasteurianus*. Для этого экстрагировали из дрожжевой ДНК, как и при индукции ее рестрицирующей нуклеазой *Xba*I и встроили в гибридный вектор рестриктазы *Bam*HI (связанную с ϕ U110), который содержит универсальный *lac*OH-сайт и носитель устойчивости к кадамцину. Полученными банками в *in vitro* трансформировали не обладающие α -амилазной активностью клетки *B. subtilis*, отбирали трансформированные клетки по признаку устойчивости к кадамцину и тестировали их на способность к синтезу и секреции α -амилазы при помощи индикаторного теста. Для этого клетки с колониями, образующими трансформанты при 65 °C на содержащей артемизин среде, поместили в парчовый контейнер, продуцирующий σ -фактор, были сформулированы следующие выводы, что свидетельствовало о индукции крахмала дрожжами. Положительный индикаторный тест указывает на транскрипцию гена α -амилазы под контролем своего промотора (вектор не содержит промотора) и на наличие сигнала, необходимого для секреции (молекулы субстрата не могут проникнуть в клетку). Возможность включения генов α -амилазы в различные микотоксины позволила исследователям внести в них изменения, необходимые для того, чтобы эти гены можно было использовать в конкретных промышленном процессе.

Возможность включения генов α -амилазы при промоторе глутамата из крахмала была доказана следующим образом. Выделенную от грибов *Aspergillus oryzae* поликомплемента ДНК клонировали встроили в одну из плазмид *Sac*II-ориентированную, чтобы она находилась под контролем промотора и регуляторных последовательностей терминирующей транскрипции гена спонсоры дрожжей (*LSO*). «Лабораторный» штамм *S. cerevisiae*, трансформированный этой плазмидой, приобрел ферментативную активность и мог индуцировать рН крахмала в дрожжах.

К сожалению, некоторые свойства этого штамма (чувствительность к высокой концентрации глутамата, неэффективность экспрессии ДНК клонированная, поддержание (плавильный) при определенном диапазоне (сбора) делового неопределенным для промышленного использования). Однако эти недостатки удалось устранить. Во-первых, продуцирующая поликомплемента штаммы примерно в 3 раз, удалив из плазмиды область терминирующей последовательности *LSO* (примотора длиной 175 п. и во-вторых, из плазмиды удалили «дражжестивный» сайт индукции рибозими и встроили в носитель ДНК, гомологичный участку дрожжевой хромосомы, преферирующей σ -факторы и индуцирующей вектор, который встраивается в дрожжевую хромосому и стабильно поддерживается в клетке. В третьих, в качестве клетки-хозяина для модифицированной таким образом плазмиды использовали другой штамм *S. cerevisiae* (индустриальный), устойчивый к высокой концентрации глутамата.

В результате получили два новых штамма дрожжей, которые продуцируют и ферментируют растворимый крахмал более эффективно, чем близкие к *S. cerevisiae* природные аналогичные штаммы (табл. 13.4). «Пиковый» штамм *S. cerevisiae* с модифицированной хромосомой веном (индикаторная) действовала более эффективно, чем «лабораторный» с тем же геном в составе модифицированной плазмиды, что, возможно, свидетельствует о ее нестабильности и утрате некоторого гена-кофактора. Как «лабораторный», так и «индустриальный» штаммы *S. cerevisiae* на последнем и негидролизующем этапе ферментации крахмала. Плазмидная и индикаторная ДНК клонировали *A. oryzae* находилась под контролем регуляторных последовательностей гена *LSO*, откуда было удалено область терминирующей последовательности 175 п. и. Для индукции плазмиды создавалась определенное селективное давление.

Для повышения продуктивности гомологичной хромосомы ДНК грибов *A. niger* встроили терминирующую последовательность. Следует отметить, что эффективность гомологичной не коррелирует с числом копий гена, но сильно зависит от того, в какой участок хромосомы они были встроены. Таким образом, простого увеличения числа копий гена

Таблица 13.3 Активность ксилитол/галактозопроксидазы *T. thermophilus* в разных субстратах¹

Субстрат ²	Уровень активности	Примеры	Ссылка на публикацию с данными	Промышленное значение ³
<i>T. thermophilus</i>	100	<i>T. thermophilus</i>	<i>T. thermophilus</i>	30
<i>S. cerevisiae</i>	200	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. thermophilus</i>	150
<i>S. cerevisiae</i>	30	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	1700
<i>S. cerevisiae</i>	20	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	2100
<i>S. cerevisiae</i>	30	Ферментация	<i>S. cerevisiae</i>	1000
<i>S. cerevisiae</i>	30	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. thermophilus</i>	1400
<i>S. cerevisiae</i>	20	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	25000

¹ По данным: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 727 (1992), не опубликовано.

² Данные приведены в порядке убывания активности ксилитол/галактозопроксидазы. По оценочным данным получены значения активности ксилитол/галактозопроксидазы в отношении ксилитол/галактозопроксидазы *T. thermophilus* в отношении ксилитол/галактозопроксидазы *T. thermophilus*.

Таблица 13.4 Катаболическая эффективность ферментации и вытравливания датом ксилитол/галактозопроксидазы в *S. thermophilus*

Уровень активности	Катаболическая эффективность	
	k_{cat}/k_m , мин ⁻¹	Ферментация
100 (применение)	3,5	97,2
100 (30 - 100)	15	13,6
30 (100 - 10)	9,7	10,4
10 (10 - 100/100 - 100 - 100)	22,9	21,6

По данным: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 (5): 603-605 (1992), не опубликовано.

показатели ксилитол снижаются в 4,5 раза. Таким образом, активная сторона принята в том, что фермент, который можно было в 17 раз активнее в отношении ксилитол, стал в 1,5 раза активнее в отношении глюкозы. Изменение специфичности и кинетические термостабильности ксилитол/галактозопроксидазы, которые удалось достичь, позволяют использовать ее для промышленной переработки глюкозы во фруктозу.

Zygomycetes mobilis

Сбраживание субстрата при промышленном производстве изюма осуществляется по схеме с помощью *S. cerevisiae*, но можно все же можно было бы использовать бактерии *Zygomycetes mobilis*. Эти грибок-протистеи способны, в паре сбраживают глюкозу, фруктозу и сахарозу с относительно высокой скоростью (табл. 13.7). По сравнению с дрожжами (применения биомассы) в ходе ферментации и уменьшением активности

используемого для них субстрата, который тем самым не образуют этикетки. Работоспособны 1 моль глюкозы, дрожжи вырабатывают 2 моль АТФ, а ксилитол/галактозопроксидаза вырабатывает 1 моль. Исторически сложилось так, что *Zygomycetes mobilis* использовался для ферментации при производстве алкогольных напитков и промышленных спиртов (например, в Мельбурне для производства спирта, но также и для пива, который содержит 3-5% сахара и вырабатывается в 10-15% объема).

Основное различие между *Zygomycetes mobilis* и *S. cerevisiae* как промышленными дрожжами заключается в скорости его образования. У *Zygomycetes mobilis* она в 10 раз выше (табл. 13.7). Однако существуют некоторые биологические и технические ограничения.

Таблица 13.7 Сравнение *Z. mobilis* и *S. cerevisiae* как промышленных дрожжей¹

Показатель ²	Значения для	
	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Промышленные дрожжи (табл. 9)	96	96
Минимальная температура (табл. 9)	17	12
Максимальная температура (табл. 9)	3,67	0,61
Средняя температура (табл. 9)	20	20
Допустимая температура (табл. 9)	1-40	1-40
Длина цикла	1,5-2	1-6,5
Оптимальная температура, °C	25-30	30-35

¹ По данным: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 727 (1992), не опубликовано.

² Сравнение *Zygomycetes mobilis* и *S. cerevisiae* в отношении ксилитол/галактозопроксидазы. По оценочным данным получены значения активности ксилитол/галактозопроксидазы в отношении ксилитол/галактозопроксидазы *Zygomycetes mobilis* в отношении ксилитол/галактозопроксидазы *S. cerevisiae*.

челю, не выщелачивая кислотными. Это позволило для промышленного производства лимонной кислоты увеличить число универсальных субстратов, которые она может окислять вплоть до глюкозы. Это особенно важно как при поддержании и неограниченной культуры с другими видами, в том числе и микоризными грибами. Это позволило устойчиво к воздействию различных ингибиторов, что не позволяет при проведении экспериментов по биотрансформации использовать стандартные системы устойчивости к ингибиторам.

Несмотря на все это ученые удались встроить и экспрессировать в *Zygospora* некоторые чужеродные гены. Благодаря этому промышленные ферменты были введены на рынок в виде смеси из утилизующих их субстратов. Так, в *Zygospora* были введены гены ферментов, гидролизующих лактозу, крахмал, целлюлозу, крахмал и пектиноподобные вещества. Благодаря этому все эти гены, но в биотрансформации случаев не могли использоваться перечисленные выше субстраты в качестве единственного источника углерода. При этом *Zygospora* также способна гидролизовать сыпучие материалы, такие как древесина, или их крайнюю часть в случае удаления целлюлозы. Это модифицировано для получения энергии из отходов, содержащих целлюлозу.

И сейчас ученые работают по созданию штаммов *Z. mobilis*, способных расти и продуцировать

этилол с использованием целлюлозы в качестве субстрата, в эту бактерию ввели гены глюкозо/кислородоксидазы и митохондриальные ферменты, необходимые для утилизации целлюлозы. Но полученные трансформанты не могли использовать субстраты при расширении культуры пептоны (кислотост-3-фосфат, рибулозо-3-фосфат и рибозо-3-фосфат). По этому на следующем этапе в *Z. mobilis* ввели плазмиду, несущую два сцепленных оператора, один из которых кодирует два фермента, расщепляющих целлюлозу, а другой – два фермента, стабилизирующих пептоны (транскаротино и транскальбинозу) (рис. 13.11). Транскаротино генам ферментов оперону позволяло при контроле сильного количества генов протофора гена глюкозальтега-3-фосфатредуктазы *Z. mobilis* в котором под контролем промотора гена сигнала *Z. mobilis*. Это для синтетических операторов встраивают в чужеродный вектор *P. coli-Z. mobilis*, которым в трансформации *Z. mobilis*. Как и ожидалось, трансформированные клетки утилизировали целлюлозу и преобразовывали пептоны до фруктозо-6-фосфата и глюкозальтега-3-фосфата, которые затем превращались в этанол по пути Энгелера-Дудороффа. Кроме того, трансформанты эффективно росли на глюкозе, целлюлозе и их смеси и продуцируя целлюлозу и этанол в больших количествах последовательно. Эта работа продемонстрировала возможность генетической пер-

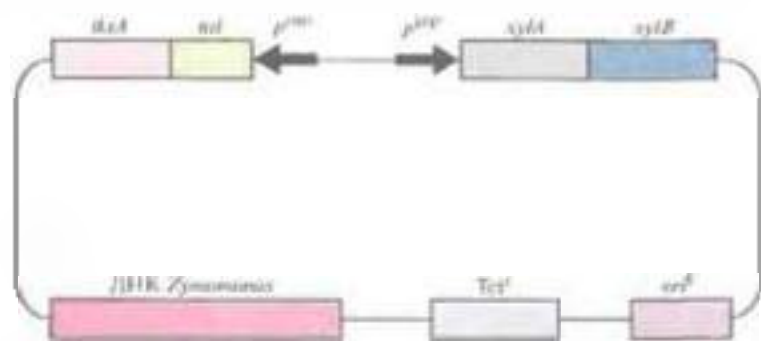


Рис. 13.11. Чужеродный вектор *Zygospora P. coli*, несущий два оператора, один из которых содержит гены ферментов, необходимые для утилизации целлюлозы (*xyIA* и *xyIB*), и другой – гены ферментов, участвующих в метаболизме пептонов (*cat* и *TetR*). Связанные участки и операторы взаимодействуют с сигналом промотора гена глюкозы, *p^{SPV}* – промотор гена гидролизующего 3-фосфатглицеральдегида, *xyIA* – ген целлюлозы окислитель, *xyIB* – ген целлюлозы окислитель, *P. coli* – ген транскаротино, *TetR* – ген устойчивости к тетрациклину, *cat* – генами окислитель ретиноламин *E. coli*. ДНК *Zygospora* содержит собственную *pUC* и индикаторную резистивность.

ной модификации *Z. mobilis* для создания микрорганнизма-продуцента этанола, который использовал бы в качестве источника углерода клеточы, побочный продукт деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

Получение сыра

Такие сельскохозяйственные культуры, как кормовые злаки, кукуруза и люцерна, широко используются в качестве корма для скота, поэтому очень важно обеспечить приемлемые условия их хранения в течение многих месяцев. Традиционно для этого применяют природные молочнокислые бактерии, для которых растительная масса служит субстратом при синтезе молочной и уксусной кислот. Эти кислоты подавляют ряд других микроорганизмов, следовательно, способствуют развитию молочной кислоты (сырка). Если молочнокислые бактерии присутствуют на свежем растительном материале в достаточном количестве, вредные микроорганизмы не способны развиваться (обычно *Lactobacillus plantarum*). К сожалению, эти виды оказываются недостаточно эффективными в том случае, когда растительная культура содержит недостаточное для подавления роста бактерий и производства молочной кислоты количество кислотпродуцирующих углеводов.

Для создания бактерий, способной осуществлять «эффективную» ферментацию растительного материала, введены ген α («защитный ген силовости») штамма *L. plantarum* в хромосомный ген комплементарной гидролиза желчных кислот (*hly*) штамма из штамма *L. plantarum* (рис. 13.12). Этот ген кодирует фермент, который активируется при попадании бактерий в кишечник животного и, следовательно, не нужен при образовании сыра. Другим важным преимуществом такой защиты является то, что штамм *L. plantarum*, способствующий более «эффективному» образованию сыра из сельскохозяйственных культур, содержит много крахмала, так как ячмень

Увеличение влажности

Структурный каркас почти всех наземных растений состоит из полисахаридов: лигнина, целлюлозы и пектина. Объединившись в жесткие

Таблица 13.8 Состав сырья животного происхождения (материалы)¹⁾

Сырье	Состав, %		
	Влага	Белок	Жиры
Составное животное	72,8	41,0	26,8
Верхняя древесина	19,3	49,8	49,0
Ботва со составного растения	18,9	31,4	49,0
Растительная масса	17,3	42,1	29,0
Дрожжи	Неиспользуем	80-95	3-20

¹⁾ Data of J. van Soest, J. van Soest, 1981

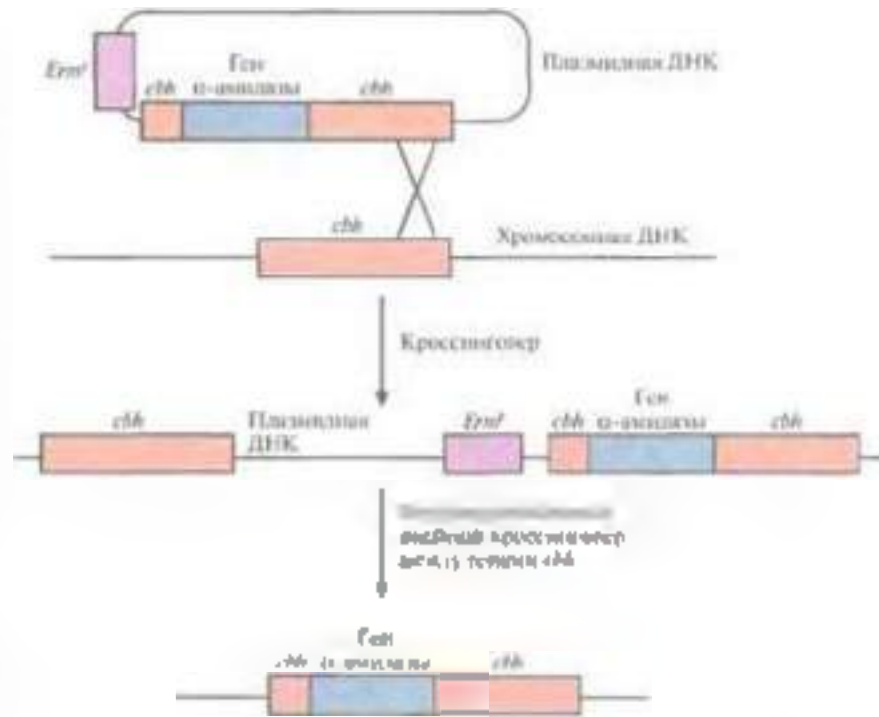
структуры, они образуют лигноцеллюлозные материалы (табл. 13.8), на долю которых приходится основная часть биомассы, остающейся в огромном количестве в виде отходов сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и других отраслей хозяйственной деятельности человека. Эти отходы необходимо переработать или использовать в качестве промышленного сырья. С этой целью весьма интересными являются материалы, способные разлагать эти классы.

- Семи растительные, специально выращенные для получения кормовых, ситчатых и мясных кормов для скота (злаки, древесина, ботва).
- Растительные отходы, оставшиеся после уборки и переработки урожая и после обработки древесины (солома, рисовая шелуха, ботва сахарного тростника, древесная щепа, опилки и т. д.).
- Битовые отходы (целлюлозные бумажные, картон и т. д.).

Компоненты лигноцеллюлозы

Лигнин – сложнейший (нерегулярный) неароматический полимер (мол. масса >10 000), состоящий из остатков фенилпропана (рис. 13.13). Молекулы этого полимерического вещества при образовании лигнина соединяются друг с другом случайным образом с помощью разных химических связей, не поддающихся ферментативному гидролизу или химическому разложению. У расте-

Рис. 13.13. Иллюстрация цепи событий в хромосоме *E. coli* после трансформации. Если плазмиды не реплицируются в клетке *E. coli* (чужеродная ДНК), то они не реплицируются. Однако, если плазмиды реплицируются, то они могут интегрироваться в хромосомную ДНК. В результате кроссинговера между *cbh*-локусами плазмидной и хромосомной ДНК образуются клоны *E. coli*, устойчивые к трифтороуксусной кислоте и обладающие *cbh*-генотипом. При выращивании трансформированных клеток в течение нескольких дней (не менее 30 поколений) и последующим разделением клеток (применение внутривидовых переносов) происходит кроссинговер, приводящий к отщеплению цепи устойчивости к трифтороуксусной кислоте и плазмидной ДНК.



такой линии образуют комплекс с гемидезиолозой, в которой исключены проводящие пучки. Линия обуславливает ризомность растений, в том же их устойчивости к механическим повреждениям и воздействию микробов.

Гемидезиолозы – это короткоцепочечные (тетрамерные) полимеры, состоящие из сахарозы (шестью атомами сахара, такие как глюкоза, мальтоза и лактоза) и пентозных (пятиуглеродные сахара, такие как ксилоза и арабиноза) единиц. Все гемидезиолозы можно разделить на три основных типа: кислоты, основ которых состоит из молекулы поли- β -1,4-кислота с присоединением к ней арабинозы, глюкуроновой и арабиногалактуроновой кислотами, маннаны, состоящие из глюкозаминной и галактозаминной; арабиногалактаны. Тип гемидезиолозы обычно зависит от ее происхождения; так, кислоты обычно содержатся в твердых сортах древесины, а глюкоманнаны – в лиственнице.

Кислоты, наиболее простой компонент «лигноцеллюлозы», является самым распространенным природным полимером. Его длинные

цепи состоят из остатков D-глюкозы соединенных β -1,4-связями (рис. 13.14). При выделении из целлюлозы, как и из крахмала, образуется глюкоза, но сами эти исходные вещества имеют разное строение. Крахмал – это полимеры молекул, остатки которых соединены так, что полимерные цепи не могут располагаться упорядоченно и образуют четкую структуру, легко притягивающую воду; поэтому он растворяется в воде и легко гидролизуется амлазази и глюкоманнази. В целлюлозе полимерные цепи упакованы так, что образуется кристаллоподобная структура, непроницаемая для воды; поэтому целлюлоза не растворяется в воде и устойчива к гидролизу.

Целлюлоза – очень ценный материал, из которого можно получить множество продуктов (например, этиanol). Но сначала необходимо высвободить ее из комплекса с лигнином и гемидезиолозом. Для этого можно обработать лигноцеллюлозный материал сильной кислотой или сильной щелочью либо подвергнуть ее действию высокой температуры и давления. В жид-

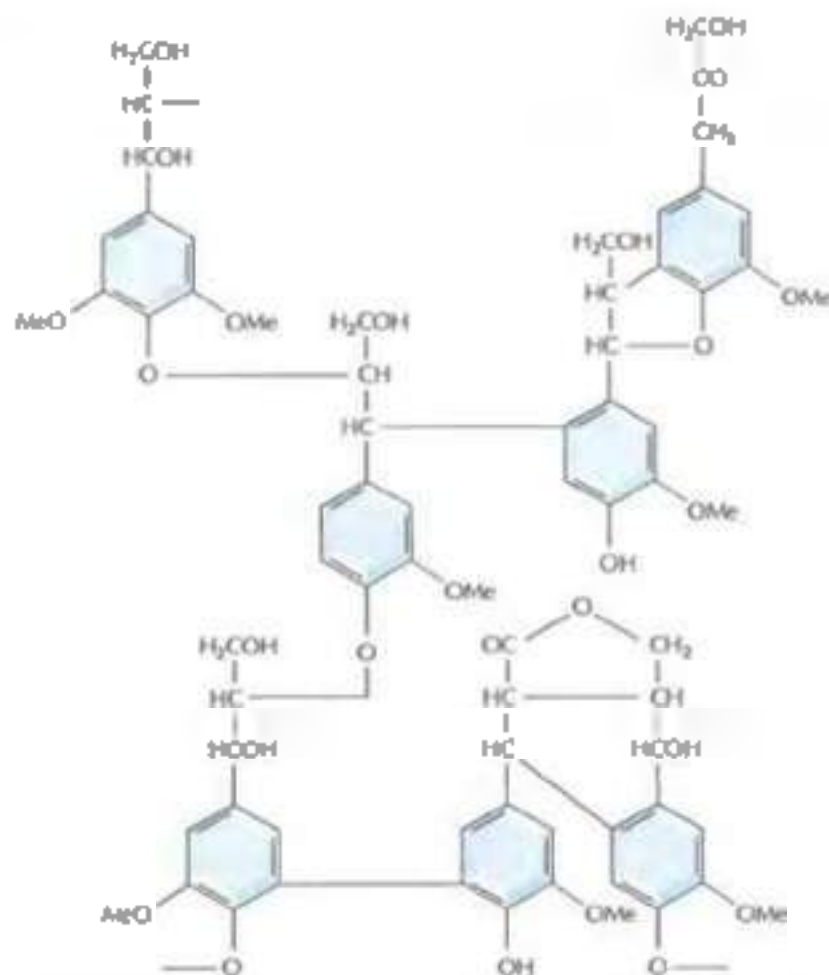


Рис. 13.13. Структура алианина. Представлены лишь некоторые из возможных связей окисления остатков фенолпропана (вместительного ароматического соединения, содержащего винильную группу)

бны случаи необходимые для этого исключительские затраты существенно превысят стоимость конечного продукта.

Головоц промышленности лигноцеллюлозы огромно, поэтому ведется непрерывный поиск более эффективных способов ферментативного расщепления целлюлозы (и, в меньшей степени, гемицеллюлозы). Кроме того разрабатываются

методы непрерывного химического и ферментативного расщепления лигнина.

Выделение прокаротиновых целлюлазных генов

Многие бактерии и грибы способны расщеплять целлюлозу благодаря совместному действию нескольких ферментов, называемых целлюлазами

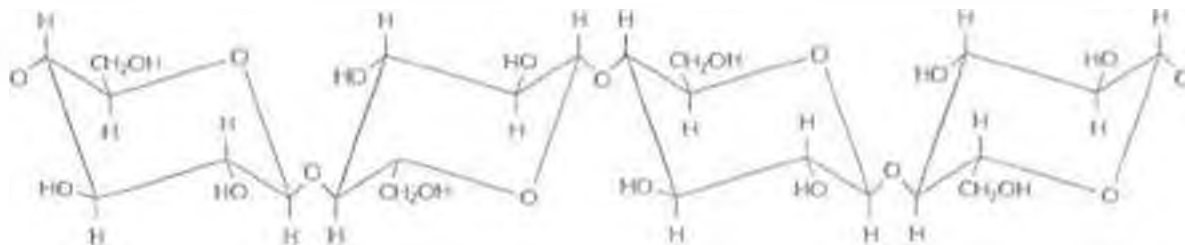


Рис. 13.14. Сцепки полимерной цепи целлюлозы. Остатки глюкозы соединены β -1,4-связями «головы к хвосту».

У некоторых микроорганизмов они входят в состав целлюлозы - белкового комплекса, находящегося на клеточной поверхности. Эти ферменты следующие:

- целлюлозаза, которая гидролизует β -1,4-связи между соседними остатками глюкозы и неплотно упакованными областями целлюлозы, образуя рваные и средние цепи (рис. 13.15)

- целлюлозаза, которая расщепляет разорванные целлюлозные цепи с разрушением концы с образованием глюкозы, целлюлозы (два остатка глюкозы) и целлюлозы (три остатка глюкозы)
- целлюлозазаза, которая часто присутствует в целлюлолитических грибах и является разновидностью целлюлозаза, выделяющая ферменты из 10 и большее число ос-

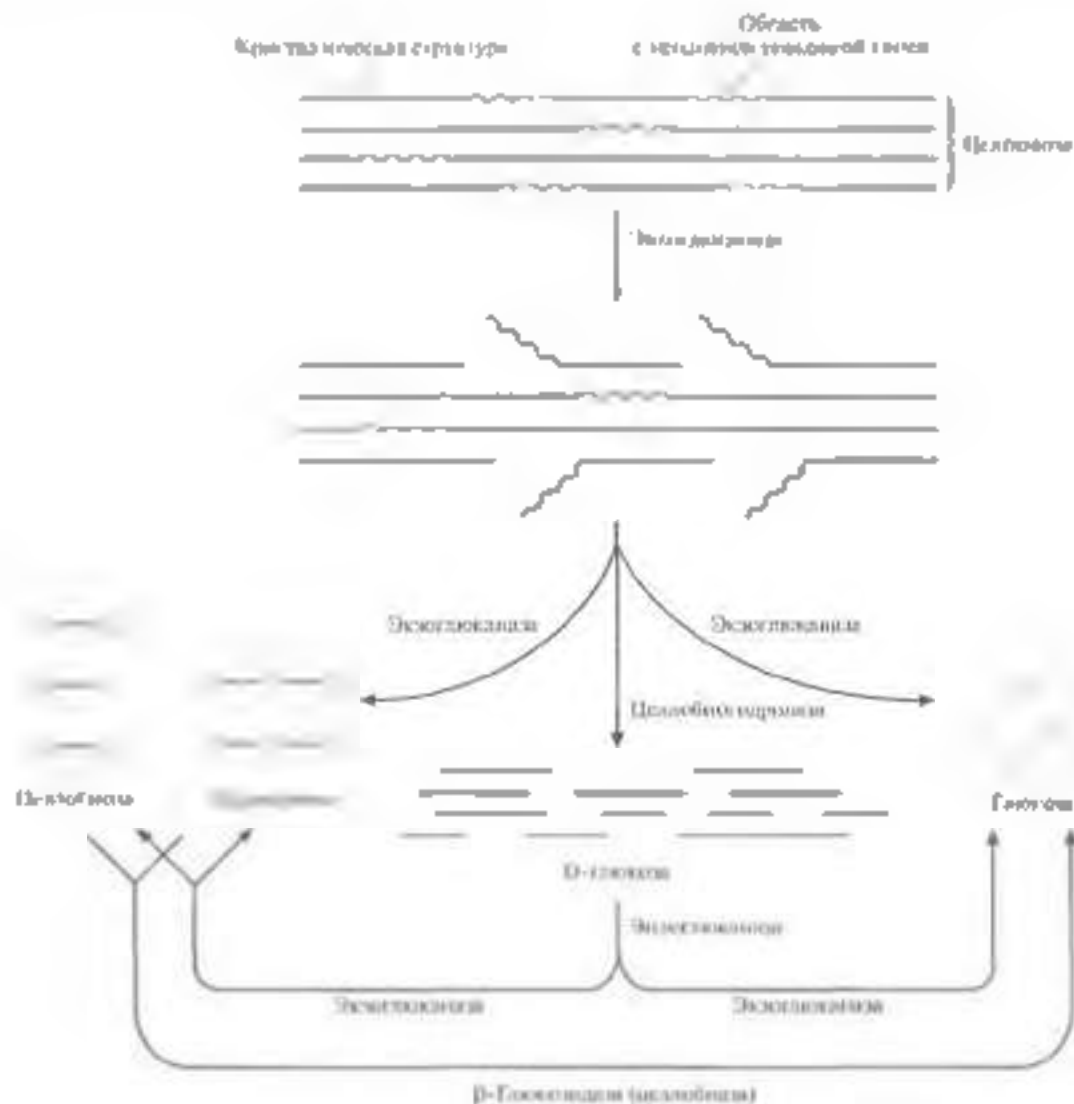


Рис. 13.15. Биохимические пути расщепления целлюлозы. Процесс начинается с расщепления целлюлозы β-1,4-связей в неплотно упакованных областях. Затем целлюлозазаза (ex) и целлюлозазазаза (en) гидролизуют разорванные концы частично гидролизованной целлюлозы. Далее β-глюкозидаза гидролизует промежуточные целлобиозы и целлюлозы в глюкозу.

среду, содержащую колонии на поверхности

- В зависимости от цели работы, которая выполняется, могут использоваться различные методы (рис. 13.15).

Расширение возможностей с помощью целлюлозных микроорганизмов происходит посредством измерения и часто не до конца. Поэтому были предприняты попытки создать с помощью генной инженерии микроорганизмы, обладающие более высокой целлюлозной активностью. Для этого выделили про- и эукариотические гены, кодирующие отдельные ферменты целлюлазно-токоликсы.

Прокариотические эндотоксины гены клонировали и идентифицировали с помощью следующего протокола, но эффективного подхода.

1. Клонирование в *E. coli* с использованием ДНК-зондов целлюлозного прокаротиотического организма и выделением рекомбинантных клеток в течение 12 ч на твердой среде, содержащей селективный антибиотик.
2. Образовавшиеся колонии покрывали слоем агара, содержащего карбоксиметилцеллюлозу (КМК), растворимое пролонгированное целлюлозу, и инкубировали при 37 °C еще несколько часов. За это время произошло частичное расщепление молекул КМК, образовавшиеся вихри колоний, которые синтезируют и секретируют эндотоксины. Трансформированные клетки, синтезирующие, но не секретирующие эндотоксины, не способны расщеплять длинный субстрат, молекулы которого не-за бокового расщепления не проникают в клетку.

3. Те области, где проникает излучение КМК, выделены с помощью не токсичного для бактерий красителя конго красное и раствора хлорида натрия. Конго красной избирательно связывается с целлюлозой, окрашивая ее в красный цвет, и слабо связывается с гидролизованной сахарозой, окрашивая их в желтый цвет. Обработка хлоридом натрия стабилизирует цвет. Колонии, продуцирующие секретируемую целлюлазу, были окрашены желтым цветом, а фон, содержащий нерасщепленную КМК, имел красный цвет.

С помощью этого подхода были выделены гены эндотоксины из *Serratia*, *Clostridium*, *Thermotomobacter*, *Thermotoga*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Cellobiobacter*, *Camponema*, *Cellobiobacter*, *Fibrobacter* и *Bacillus*.

Для вычисления рекомбинантных клонов, синтезирующих экзоцеллюлазу, использовался следующий скрининг, позволяющий идентифицировать белок-мишень с помощью специфичных к нему антител; образовавшиеся при этом комплексы. Рекомбинантные клетки анализируют *in situ* (период хлороформа), перенесли цитоплазматические белки на нитроцеллюлозу или нитроцеллюлозный фильтр и провели иммуноблоттинговый тест. Нитроцеллюлозный при этом жидкий раствор позволял сушить жизнеспособные клетки для дальнейшего исследования.

Прокариотические β-глюкозидазные гены выделяли с помощью трансформации *E. coli* бактериями ДНК-клона, полученными из продуцирующей липиды фермент микроорганизма, и отбора трансформантов, способных расти на минимальной среде с целлюлозой в качестве единственного источника углерода. Клоны, продуцирующие β-глюкозидазную активность, можно также выделить с помощью среды, содержащей хромогенный субстрат (например, 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкозилпириносид), или целлюлозного агара Мак-Койна; в этих условиях колонии окрашиваются в красный цвет.

Выделение эукариотических целлюлозных генов

Скрининг кДНК- или геномных библиотек с помощью гибридных с гетерологичным хозяином не очень эффективны при идентификации целлюлозных генов, поскольку их трудно выделить вследствие сложности выделения сильно различающейся у разных организмов. Поэтому нужна новая процедура для выделения мРНК целлюлозных ферментов из грибов или растений. К сожалению, эти мРНК содержат лишь небольшие участки суммарной мРНК, поэтому приходится обогатить библиотечки эти мРНК или кДНК и затем использовать кДНК-клоны, не используя последовательности-мишеней. Для выделения некоторых генов эукариотических целлюлоз использовались метод «интерференциальной гибридомы», суть которого состоит в следующем (рис. 13.16).



Рис. 13.16. Насыщение сДНК-клонов, кодирующих эукариотические белки, с помощью дифференциальной индукции

1. Выделяют мРНК из клеток, выращенных в среде без индуктора (неиндуцированных клеток), и клеток, которые для увеличения продукции белка были выращены в присутствии индуктора или ее производных (индуцированных клеток).
2. Каждую популяцию мРНК фракционируют в градиенте плотности сахаразы. Проводят транскрипцию мРНК каждой фракции в бесклеточной системе на основе ретикулоцитарного кролика или зародыша мыши. Они разделяют мол. массу соответствующих белков и проводят иммунологический тест, с тем чтобы идентифицировать фракцию (или фракции), содержащую мРНК целлюлозы. Разделяют продукты транскрипции в полиакриламидном геле и выделают полосы, происходящие от индуцированных клеток и отсутствующие для неиндуцированных; на-

- терши эти полосы и представляет собой белки. синтез которых был индуцирован целлюлозой.
3. мРНК-фракции индуцированных клеток, соответствующие синтезу целлюлозы, и их «партеры» в транскрипционной системе сахаразы мРНК неиндуцированных клеток по отдельности используют в качестве матрицы для синтеза сДНК.
4. сДНК индуцированных клеток клонируют в плазмидном или фagosом векторе, вводят в E. coli, выселяют на чашках. делают рестрикт и проводят скрининг, используя в качестве гибридомных зондов радиоактивно меченую сДНК фракции из индуцированных и неиндуцированных клеток. Клон, гибридизующийся с сДНК индуцированных и негибридизующийся с сДНК неиндуцированных клеток, могут содержать целлюлозные

гены, поэтому проводят не длительные исследования.

5. Чтобы доказать, что рекомбинантные β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ действительно кодируются клетками, их ДНК ингибируют с помощью мРНК из инородных клеток. Проводят транскрипцию гибрида кодирующей мРНК из чужеродной системы и идентифицируют получившиеся продукты с помощью антител, специфичных к ферментным последовательностям.
6. Определяют нуклеотидную последовательность кодирующей мРНК-гена и устанавливают, какие клетки кодируют данную последовательность. В качестве примера были использованы клетки дрожжей.

Эту схему можно использовать для выделения любых индивидуальных эукариотических генов.

Манипуляции с целлюлозными генами

Клонированные целлюлязные гены можно использовать в разных целях: для обеспечения чистоты рекомбинантных белков с помощью специально разработанных методов; для получения коммерческих продуктов (например, углеводов) из целлюлозных отходов с помощью микроорганизмов, в которые встроены целлюлязные гены.

Молекула целлюлазы обычно состоит из трех доменов: каталитического, структурного, часто пептиденной остатками пролина, серина и треонина, и связывающего целлюлозу. Каталитический и связывающий домены функционируют независимо друг от друга. Такое разделение функций можно использовать, включая нуклеотидную последовательность связывающего целлюлозу домена в состав химерного гена, другая часть которого кодирует представляющую коммерческий интерес белок. Чтобы очистить полученный белок, его экстракт пропускают через колонку, набитую целлюлозой. С целлюлозой связывается только гибридный белок: его элюируют и удаляют «целлюлозный» домен протеканием. Это система сходна с иммобилизованной хроматографией, но обходится дешевле.

Большинство целлюлязных генов можно клонировать и экспрессировать в *E. coli*, но их можно ввести в дрожис микрорганизмы и полу-

чить новые штаммы с полезными свойствами. Так, *S. cerevisiae* и *Z. mobilis*, эффективно производящие в этанол простые сахара (например, глюкозу) после окисления им целлюлозы (сено, солома) бы превращать ее в алкоголь непосредственно в этанол. Для проверки этой гипотезы провели ряд исследований.

В одной из серий экспериментов гены целлюлозы клонировали в векторы *Cellulomonas fimi*, каждый из которых имелся под контролем промотора в определенной последовательности *S. cerevisiae*, субклонировали в соответствующий вектор и ввели в *S. cerevisiae*. Несколько генетических конструкций создали для ферментации культуры среды с эффективностью примерно 70% и частично расщепили их целлюлозу, добавив в состав ферментальной буфы и предварительно обработанную древесную стружку. Скорость и степень гидролиза этих субстратов измеряли при добавлении в смесь β -глюкозидазы, расщепляющей целлюлозу до глюкозы, но полного гидролиза целлюлозы не происходило. Это связано с отсутствием двух регуляторных механизмов, отсутствующих по принятому образцу штамма. Добавлявшаяся целлюлоза ингибирует гидролиз целлюлозы, а глюкоза ингибирует расщепление целлюлозы. Гены β -глюкозидазы выделены из грибов *Trichoderma reesei*, клонировали в четырехклеточной плазмиде и ввели в *Z. mobilis*. Трансформированный штамм продуцировал β -глюкозидазу в 5,5-кратном избытке и расщеплял протравленное целлюлозы эвгенил (Avicel) на 13% быстрее, чем нетрансформированный тот же штамм. Это подтверждает данные о том, что β -глюкозидазы облегчает ферментативное расщепление целлюлозы, и позволяет предположить, что для создания более эффективных целлюлолитических микроорганизмов нужно встроить в уже существующие штаммы гены β -глюкозидазы.

Энзимоклазные гены можно использовать не только для получения из целлюлозных отходов полезных веществ, но и для других целей. Если ввести тем микроорганизмам, находящимся под контролем конститутивного промотора экзотичные гены дрожжей, в эти дрожжи можно внести продукт получаемого гена. Это связано с повышением содержания в нем как читаями (1) доступя соединений, в том числе

нового субстрата. В 1979 г. был построен завод с самым большим в мире рабочим и непрерывным режимом эрлифтного ферментера, способным производить до 50 000 т БОУ в год. Но несмотря на инвестиции ИС, составившие более 200 млн. долл., и серьезные инженерные и биотехнологические успехи, к 1987 г. на этом участке было произведено лишь незначительное количество БОУ, поскольку его получение с помощью *M. thermophilus* оказалось невыгодным.

В последние время интерес к БОУ пополнился новыми данными (например, исследования и сыроварения) В одном случае предполагается использовать природные микроорганизмы, а другим — микроорганизмы, созданные методами геной инженерии. Но так или иначе, перспективы развития производства БОУ будут определяться не природой микроорганизмов, а экономическими соображениями. Возможно, рентабельность производства удастся повысить, если БОУ будут получать из побочных продуктов утилизации отходов. Для того чтобы разработать экономичный процесс производства БОУ и отходов, необходимо изучить кинетику роста, метаболизм, взаимосвязи генетического манипулирования и безопасность микробиотипов, а также реальные качества синтезируемых ими продуктов.

Разработкой новых плазид, с помощью которых можно будет обеспечивать крупный рогатый скот белками, аминокислотами незаменимыми аминокислотами. Простое добавление белков в корма — дорогое удовольствие и не особенно эффективный способ, поскольку белки и аминокислоты разрушаются бактериями рубца еще до того, как животное успеет их использовать. Кроме того, основные количества белка или получают не с кормом, а поступают присутствующим в рубце микроорганизмы. Рацион животных можно обогатить, если искусственно модифицировать эти бактерии. Для этого сначала был синтезирован белок с высоким содержанием остатков цистеина, пролина, глицина и лейцина. Он состоит из 100 аминокислот, 57 из которых были незаменимыми, и имел стабилизирующую структуру. Затем с помощью 14 час. тично перерабатывались аминокислотами синтезировать его ген и синтез его с геном бел-

ка, связывающего乳汁; полученный гибридный ген интроецировали в *E. coli* под транскрипционным контролем *lac*-промотора. На долю гибридного белка приходилось примерно 12% суммарного интроецированного белка. Теперь нужно выяснить, будет ли этот белок синтезироваться в достаточном количестве присутствующими в рубце бактериями. Если этот подход окажется успешным, то он станет основой значительной системы непрерывного обеспечения крупного рогатого скота незаменимыми аминокислотами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биотехнология — это процесс разведения микроорганизмов в искусственно созданных условиях среды. Многие бактерии рода *Escherichia coli* могут продуцировать ферменты, которые катализируют расщепление азотсодержащих и углеводородных органических соединений. В большинстве случаев они (штаммы) содержат гены ферментов одного специфического катаболического пути. Объединяя штаммы разных типовых *Escherichia coli* в одном штамме, можно создать организм, способный к аэробному расщеплению соединений. Кроме того, с помощью генетических манипуляций можно расширить спектр субстратов, разрушаемых с помощью определенных ферментативных путей.

Поскольку сейчас принимается вся сырьевая масса и материалы, побочные продукты индустрии и перерабатывающей промышленности, которая может служить сырьем для получения ценных продуктов. Производятся лимонная или фруктовая и молочная кислоты, прокатанная и несколько ферментативных стадий. Улучшающиеся эти процессы ферменты часто используются односторонне. Чтобы повысить эффективность ферментативных реакций и снизить стоимость процессов, исследователи занимаются клонированием и исследованием свойств бактериальных генов, кодирующих термостабильные, обладающие высокой каталитической активностью и устойчивые к действию сильных ферментов.

Для повышения эффективности промышленности необходимо ориентироваться на штаммы в бактерию

Zyomonas mobilis были выделены гены, функции которых экспрессию которых они могут использовать в качестве естественных углеродных источников. Предприняты попытки найти тот путь создания штаммов *Lactobacillus plantarum*, способный эффективно расщеплять крахмал, содержащийся в большом количестве в твердой тающей соевомолочной культуре, как жиры.

При переработке растительного материала часто образуются большие количества дигидроксиацетона, которые раньше не находили применения. Сейчас гидроксиацетон служит сырьем для получения этаноладегидратации солей, а первую очередь глюкозы, которая может использоваться в других процессах. Липиды используются для синтеза и лития, синтеза липидов и углеводов, как подкормочный субстрат или ферментов без предварительной обработки. Продолжая в последнее время исследования были направлены в основном на изучение новых штаммов расщепления целлюлозы с образованием глюкозы. Клонирование и характеристиками (с помощью доклада, Жилиныны) и β-галактозидазы микроорганизмов, но пока не осуществлен выбор ферментов, осуществить плановое масштабное эффективное расщепление целлюлозы in vivo.

Некоторые виды биомассы (например, сыроежки, целлюлозные отходы) и продукты переработки нефти могут служить субстратами при выращивании микроорганизмов. Предполагается, что эти чистые культуры, а также их продукты (так называемый белок одноклеточных животных, БОК) можно будет использовать в качестве подкормки рыбам или кормов для свиней. К сожалению, вследствие дорочивым получением продукта, их несколько ухудшить качество, а также и токсичности промышленно БОК оказались экономически невыгодными. Однако есть надежда, что с помощью генетически манипуляции асс-таким образом создать систему, позволяющую получать дешёвые биологические продукты на основе БОК.

ЛИТЕРАТУРА

- Barnett C. C. 1991 Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology* 9: 562-567.
- Beauregard M., C. Dupont, R. M. Teather, M. A. Helford 1995. Design, expression, and initial characterization of N(3), a de novo protein enriched in essential amino acids. *Bio/Technology* 13: 974-981.
- Degun P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 219-248.
- From D. F. 1983. Lignocellulose hydrolysis. *Phytochem. Trans. R. Soc. Lond.* 4: 300-322.
- Burkholz S. E., M. M. Dooley, D. E. Eveleigh. 1987. *Zyomonas*: an alcoholic enigma. *Trends Biotechnol.* 5: 199-206.
- Burkholz S. E., D. E. Eveleigh. 1990. Genetic modification of *Zyomonas mobilis*. *Biotechnol. Adv.* 8: 547-551.
- Chakrabarty A. M. March 1981. Microorganisms having multiple compatible degradative energy-generating plasmids and preparation (United States patent 4,259,444).
- Cole G. E., P. C. McCabe, D. Innes, D. H. Gelfand, A. Ben-David, M. A. Iank. 1988. Stable expression of *Aspergillus niger* glucoamylase in distiller's yeast. *Bio/Technology* 6: 417-421.
- Cork D. J., J. P. Kraeger. 1991. Microbial production of herbicides and pesticides. *Adv. Appl. Microbiol.* 36: 1-46.
- Decker K., A. Suguro, H. Yamagata, A. Sakaguchi, S. I. Iida. 1992. Efficient production of thermostable *Thermotoga thermophila* xylanase in *Escherichia coli* and *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 727-732.
- Eveleigh D. E. 1987. Cellufase: a perspective. *Phytochem. Trans. R. Soc. Lond.* 321: 435-447.
- Fitzsimons A., P. Hols, J. Jore, R. J. Lee, M. O'Connell, J. DeGroot. 1994. Development of an amyolytic *Lactobacillus plantarum* strain expressing the *Lactobacillus amylovarus* α-amylase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3529-3535.
- Gibson D., I.-S. You, D. K. Chatterjee, A. M. Chakrabarty. 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science* 228: 135-142.
- Glick B. R., J. J. Pasternak. 1989. Isolation, characterization and manipulation of cellulase genes. *Biotechnol. Adv.* 7: 361-386.
- Iank M. A., M. J. Holland, P. C. McCabe, G. E. Cole, V. P. Williams, R. Tal, K. W. K. Walt,

- D. H. Gilland, J. P. Holland, J. H. Meade. 1985. Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucosyltransferase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 228: 21-26.
- Kallio P., A. Palva, I. Palva. 1987. Enhancement of α -amylase production by integrating and amplifying the α -amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 27: 64-71.
- Kearney J. F., V. M. Caballo, C. A. White. 1984. Enzymic starch utilization and genetic engineering. *Trends Biotechnol* 6: 184-189.
- Kawles J., P. Lehtosari, T. Teeri. 1987. Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol* 5: 255-261.
- Klein R. J., W. E. Jants, B. K. Ghich, C. W. Robinson, C. I. Mayfield. 1985. Transfer and expression of mesophilic plasmid-mediated degradative capacity in a psychrotrophic bacterium. *Appl Environ. Microbiol.* 54: 638-643.
- Kumar V., S. Ramakrishnan, T. T. Teeri, J. K. C. Knowles, B. S. Hartley. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* β -galactosidase grow on whey permeate. *Bio/Technology* 10: 82-85.
- Lamed R., J. Nalmark, E. Morgenstern, F. A. Bayer. 1987. Specialized cell surface structures in cellulosytic bacteria. *J. Bacteriol.* 169: 3192-3200.
- Lynd L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols, C. E. Wyman. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 251: 1318-1323.
- Meng M., C. Lee, M. Bagdasarian, J. G. Zeikus. 1991. Switching substrate preference of thermophilic xylose isomerase from D-xylose to D-glucose by redesigning the substrate binding pocket. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4015-4019.
- Perez-Gonzales J. A., R. Gonzalez, A. Querol, J. Saez, D. Ramon. 1993. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl Environ Microbiol* 59: 2801-2806.
- Qua W. J., S. F. Mabel, R. G. M. Laiten, P. W. Schaeberlein, P. Stanssens, I. Laster. 1991. Enhancing the thermostability of glucose isomerase by protein engineering. *Bio/Technology* 9: 738-742.
- Ramos J. L., A. Wapner, A. Rowe, K. N. Timmis. 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkyl-benzonates. *Science* 235: 593-596.
- Sayano A., R. Iwakiri, N. Kinoshita, A. Nishi, A. Nakamura, K. Furukawa. 1996. Engineering hybrid pseudomonads capable of utilizing a wide range of aromatic hydrocarbons and of efficient degradation of trichlorobenzene. *J. Bacteriol* 178: 4039-4046.
- Timmis K. N., R. J. Steffan, R. Linterman. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 525-557.
- Verduyn J. C., A. D. van Haperlingen, P. J. Punt, A. J. M. Debets, A. H. Stammer, C. A. M. J. J. van der Hondel. 1994. Evaluation of molecular and genetic approaches to generate glucosyltransferase overproducing strains of *Aspergillus niger*. *J. Bacteriol* 176: 165-175.
- Watanabe M., S. Iino, K. Oono. 1992. Bioconversion of waste paper to ethanol. *Process Biochem* 27: 239-245.
- Wondra J. D., M. J. Worley, E. M. Pfohl, D. Pfohl, P. T. Barth, S. T. Asherton, I. C. Dart, D. Bryant, A. Powell, P. J. Senior. 1990. Improved conversion of methanol to single cell protein by *Methanophilus methylotrophus*. *Novus* 287: 396-401.
- Winter R. B., K.-M. Yeo, H. D. Foster. 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 7: 282-285.
- Witholt B., M.-J. de Saet, J. Kiengas, J. R. van Rielm, M. Koh, H. G. Lagerec, G. Eggink. 1990. Biodegradations of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in emulsion bioreactors: background and economic potential. *Trends Biotechnol* 8: 46-52.
- Wong W. S. K., C. Carr, R. S. Durett, S. R. Porek, M. Wayman, R. W. Davies, D. G. Kilburn, N. Skipper. 1990. Wood hydriolysis by *Caldanopsis fiji* endoglucanase and endoglucanase coexpressed as secreted enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* 8: 713-719.
- Zhang M., C. Fddy, K. Ikeda, M. Flohert, S. Westaggle. 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267: 240-243.

Zyden G. J., L. P. Wickett, D. T. Gibson. 1989. Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 soluble dihalogenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3162-3166

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как следует модифицировать *P. putida*, чтобы получился штамм, эффективно разрушающий трихлорэтилен?
2. Опишите процедуру клинирования целлюлозы женой грибом.
3. Как используются α -ликазы и глюкозилызы в биомассовом производстве глюкозы? Какие манипуляции с кодирующими эти ферменты генами следует провести, чтобы повысить эффективность процесса?
4. Что представляет собой фермент галактинамераза? В чем состоит ее ценность? Как и чем можно модифицировать кодирующий ее ген?
5. (минимум два компонента и не менее три использования) *Zymomonas mobilis* вместо *Saccharomyces cerevisiae* при производстве этанола. Как повысить эффективность процесса этанола, используя штамм *Z. mobilis*?
6. Как с помощью женой-клеточных методов модифицировать *Z. mobilis*, чтобы можно было использовать этот микроорганизм для производства этанола из кизила?
7. Как три штамма *Pseudomonas*, один из которых использует фенол в качестве единственного источника углерода при 0 °C, другой редуцирует железо с использованием железа при 35 °C, и третий расщепляет α -кетонид с использованием аминокислот при 35 °C, применить стратегия создания штамма, который сможет использовать в качестве единственного источника углерода фенол, железо или α -кетонид при 0 °C?
8. Как модифицировать штамм *Pseudomonas*, несущий (линии) рН-УО и не способный расти на 4-гидроксибензоате, чтобы он мог утилизировать это соединение?
9. Предложите стратегии выделения прокаротиноидов из штамма *Yarrowia lipolytica* и β -глюкозидазы генов.
10. Что такое «супербактерия»?
11. Как повысить эффективность образования силоса, применяя модификацию с *Lactobacillus plantarum*?
12. Как следует модифицировать факториальную культуру, чтобы она обеспечивала крупный рост в среде с измененными температурными?

обложившим им биологически активное вещество соседящие клетки закисляют и нуклеотидов; предварительно этот должен быть включен в состав вещества (фиксирован). Это требует больших энергетических затрат, поскольку тройная связь в молекуле $(N \equiv N)$, которую необходимо предварительно разорвать, чрезвычайно прочная. Энергия для биологической фиксации азота высвобождается при гидролизе биотинилированного азотозигнотриоксида (АТФ). Для химического (промышленного) преобразования N_2 в аммиак используют высокие температуры и давление.

Для удовлетворения потребностей низкого промышленной и сельскохозяйственной промышленности ежегодно требуется более 100 млн. т соединений азота. Примерно половину этого количества составляют синтетические (химически синтезированные) удобрения, а большую часть второй половины растений получают от азотфиксирующих (дiazотрофных) бактерий типа *Rhizobium*, *Frankia*, *Acetivibrium*, *Azotobacter* и цианобактерий. Ни один из физиологических организмов не способен связывать азот.

Тем не менее применение химических удобрений удалось значительно повысить урожайность сельскохозяйственных культур, однако их производство и использование приводит к загрязнению почвы и истощению запасов полезных веществ. В то же время химические удобрения снижаются все больше и больше. Все это стимулировало поиск альтернативных источников азота, в частности соединений азотфиксирующих микроорганизмов, которые могли бы служить «бактериальными удобрениями».

Способностью к фиксации азота обладают самые разные бактерии, и многие из них в принципе могут использоваться как удобрения. Однако до тех пор, пока не будет показано, что бактериальные удобрения столь же эффективны, как и химические, вряд ли удастся преодолеть дилемму между производством сельскохозяйственной продукции и уменьшением используемых и истощаемых запасов. Например, вторая половина экономической значимости и во многих случаях плодородия сельскохозяйственных культур в США все еще формируется симбиотическими отношениями с бактерией *Bradyrhizobium japonicum*. В

результате такого симбиоза бактерии обеспечивают растению соединения азота, в свою очередь от него легко усваиваемые формы азота, образующиеся при фиксации. После инкубации растений неспецифичными штаммами *B. japonicum* конечный выход растительной биомассы может достигать 25–50% и никак не добавляет химически связанного азота больше не потребует. Примерно 50% сои выращивается в нескольких штатах США, при этом везде используется в общем сходная технология. Но лишь небольшая часть этой культуры в настоящее время обрабатывается *B. japonicum*. Фермеры до сих пор полагаются на природные запасы *B. japonicum* и химические удобрения.

Результаты бактериальных удобрений весьма сомнительны. В 1950-х годах в СССР более 10 млн. га сельскохозяйственных угодий обрабатывались смесью дiazотрофных бактерий, состоящей в основном из *Acetivibrium cloacicum* и *Bradyrhizobium*. При этом примерно в 60% случаев урожайность различных культур выросла на 10–20%. Однако эти положительные результаты оказались некорректными и невоспроизводимыми; многие исследователи подвергли сомнению в правильности полученных результатов, и исключительно бактериальные инокуляторы в качестве удобрений не получили развития. Однако проблемы экономического характера, необходимость предотвращения загрязнения окружающей среды, повышение уровня биологической прираща к тому, что ученые начали обратились к изучению возможности использования бактериальных удобрений.

Микроорганизмы, которые применяются в настоящее время в сельском хозяйстве, принадлежат в основном к двум родам: *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Это преимущественно палочкообразные азотфиксирующие бактерии, находящиеся в симбиозе с бобовыми. Каждый вид *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* специфичен и относителен лишь небольшому числу видов растений и не взаимодействует с растениями, не являющимися его природными хозяевами (табл. 14.1).

На определенной стадии взаимодействия между *Rhizobium* проникает в клетки корня растения и инципирует образование клубеньков, приводящих к формированию корневых клубеньков. Бактерии внутри корневых клубеньков быстро проли-

Помимо фиксации азота, нитраты также фиксирует также восстановление нитратов до аммиака:



Определяя с помощью газовой хроматографии количество синтезированной этилена можно оценить активность нитрификации. Определение можно проводить на целых клетках в растворе (рис. 14.2), на бактериях, ассо-

циированных с корнями растений, на трубах членистых клеток или на высокоочищенных препаратах фермента. Компонент I катализирует собственно восстановление N_2 , а компонент II служит донором электронов. Оба они чрезвычайно чувствительны к кислороду и при самом высоком его концентрации быстро и необратимо инактивируются. Функционирование нитрификации зависит также от 15-20 различных белков. Роль некоторых из них состоит в передаче электронов

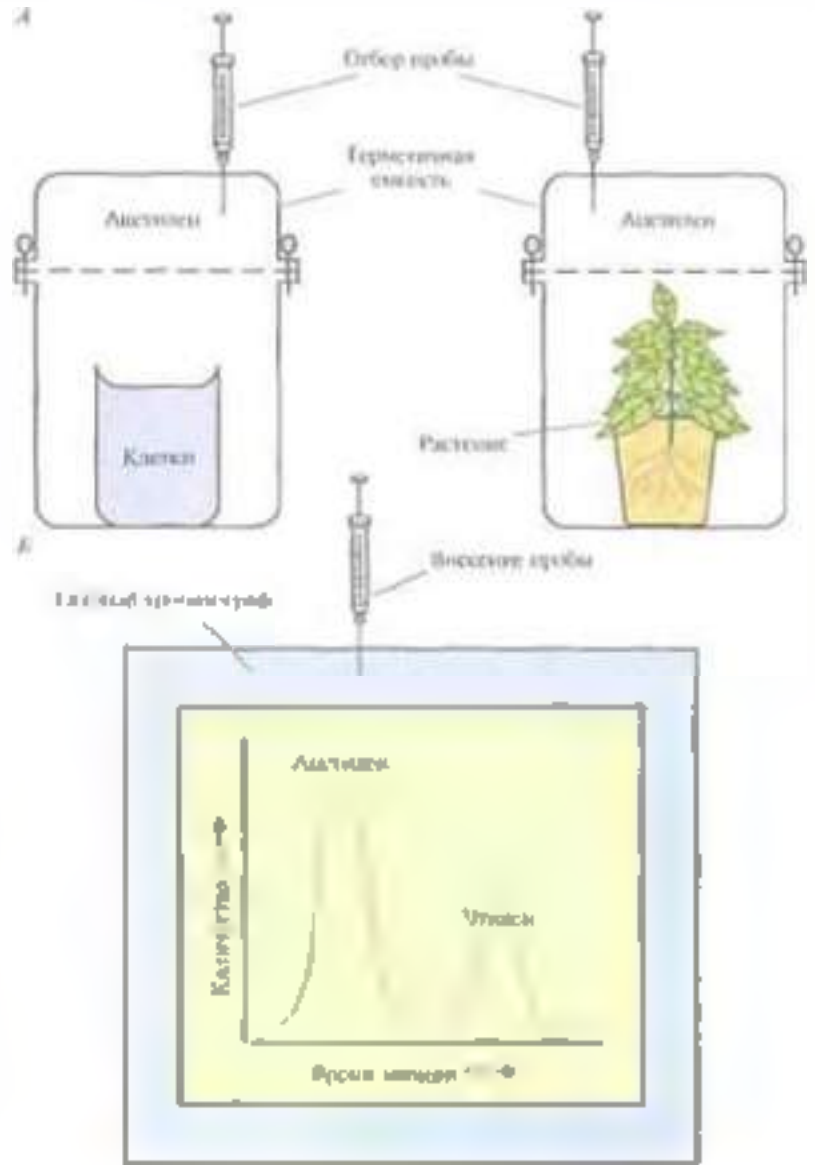


Рис. 14.2. Определение активности нитрификации по восстановлению азота до этилена. А - бактерии (в культуре или ассоциированные с корнями растений), синтезирующие нитраты, либо препарат очищенного фермента (не привязанной нитрификатор в герметичную смесь с атмосферой метана); Б - смесь в герметичности образуют пробы и методом газовой хроматографии на экраны количества этилена в смеси. Активность нитрификации характеризуется количеством образовавшегося этилена.

компоненту Nif , в так же и фиксацию азота микробного фактора.

Генная инженерия азотфиксирующей нитрогеназы

Фиксация азота — очень сложный процесс, требующий согласованного действия множества разных факторов. Поэтому вряд ли можно было ожидать, что вся генетическая информация, необходимая для фиксации азота, будет содержаться в каком-то одном фрагменте ДНК и что этот фрагмент удастся вычленисть из генома или геномного микроорганотзма и перенести в недиазотрофный организм. Следует еще учесть, что фиксация азота осуществляется в организме растения должны быть необходимые для фиксации азота ферменты азотфиксирующей нитрогеназы более приемлемый способ выделения генов азотфиксации (*nif*-генов) состоял в том, чтобы идентифицировать и охарактеризовать те клоны библиотеки ДНК дикого типа, которые экспонируются способностью различных мутантов дикого микроорганизма фиксировать азот. Такой метод называется (генетической) минимизацией.

Первые *nif*-гены, идентифицированные методом комплементации, были выделены из бактерии азотфиксирующей бактерии *Klebsiella fragiliformis*. Эти бактерии изучены антимикробными, которые обнаруживаются в почве и воде, а также в кишечнике человека. Схема выделения генов в следующем (рис. 14.3).

1. Клетки *A. rhizobium* обрабатывают такой дозой мутагена, чтобы вынашиваемость составила примерно $0,1 \times 10^6$. Некоторые из мутантных клеток, синтезирующие гены на минимальной среде, содержащей источник связанного азота типа NH_4Cl , но не в отсутствие связанного азота, перенести, мисут мутантный *nif*-ген; их обозначают Nif^- .
2. Используя экспрессирующие плазмидные векторы с широкой арсеналы сайтов, создают банк клонов хромосомной ДНК *A. rhizobium* внешнего типа (Nif^+) и индуктивно его в *E. coli*.
3. Пропускают конъюгацию Nif^- клеток *A. rhizobium* с клетками *E. coli*, несущими банк клонов в плазмидных векторах.
4. Трансформированные клетки *A. rhizobium*, приобретающие фенотип Nif^+ , отбирают, высе-

вая их на минимальную среду, не содержащую источника связанного азота. В этих условиях растут только Nif^+ клетки *A. rhizobium* и с плазмидой, кодирующей белок, который отсутствует или не функционирует в Nif^- мутанте.

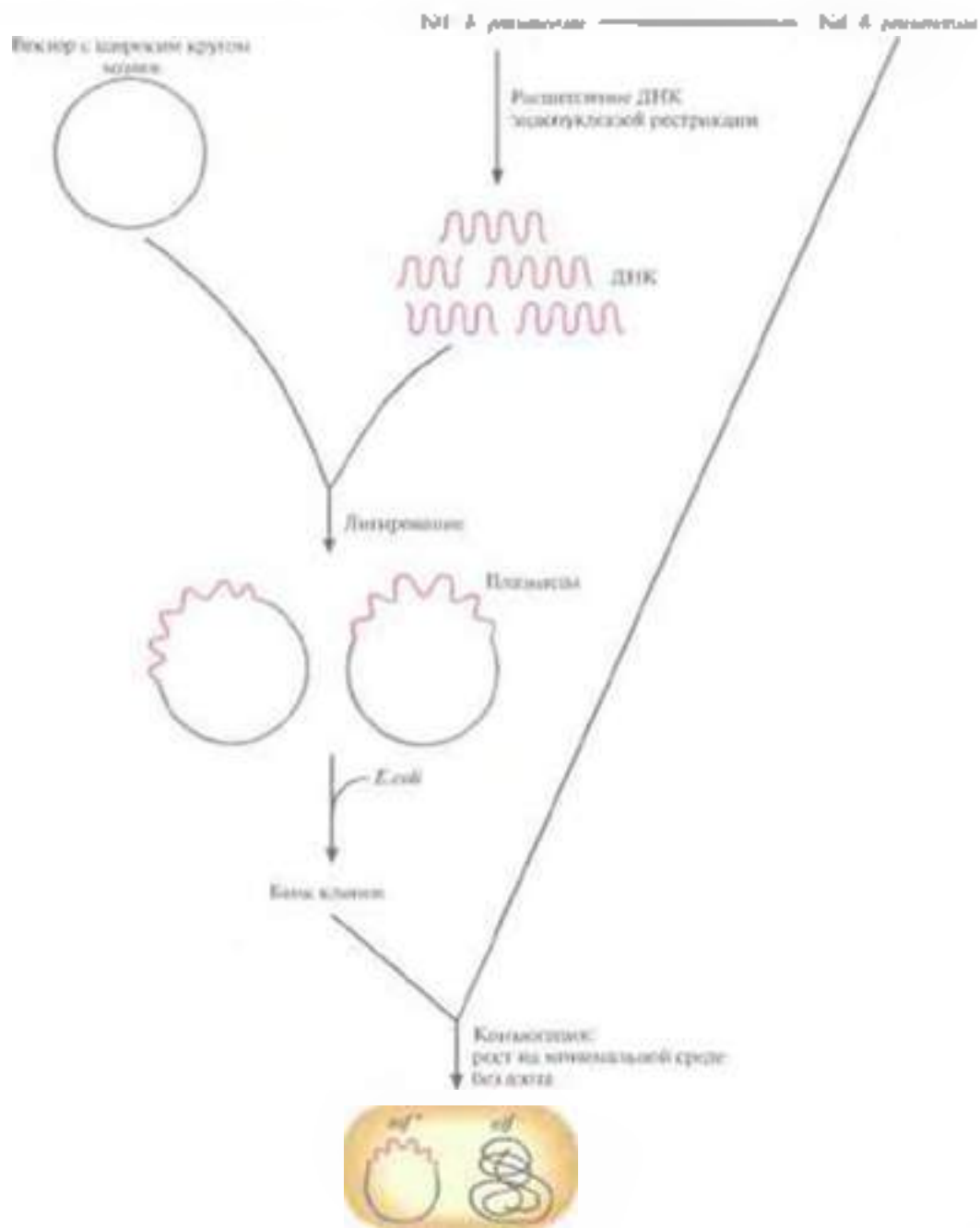
Фрагмент ДНК в плазмиде, комплементирующий исходную мутацию Nif^- , содержат *nif*-ген, который можно детально охарактеризовать и использовать для выделения других *nif*-генов.

Для выделения других генов, участвующих в фиксации азота, применили два подхода. Во-первых, использовали банк клонов *A. rhizobium* для комплементации не выделенных ранее Nif^- мутантов, увеличивая тем самым вероятность того, что в каждом случае будет выделен другой *nif*-ген. Во-вторых, выделенные *nif*-гены использовали в качестве информации о скрининга банка к клонах азотфиксирующей ДНК *A. rhizobium*, используя большие количества (от 7 до 10^7 и более), исходя из того, что прокармат гены одного пути биосинтеза обычно образуют кластеры.

В результате всестороннего исследования был идентифицирован и охарактеризован весь набор *nif*-генов *A. rhizobium*. Эти гены организованы в один кластер длиной примерно 24 kb и (рис. 14.4), который содержит семь отдельных оперонов, кодирующих в общей сложности 20 разных белков (табл. 14.2). Для того чтобы образовалась активная нитрогеназа, все *nif*-гены

Таблица 14.2 Гены *A. rhizobium*, участвующие в фиксации азота, и кодируемые ими белки (ссылка на функцию)

<i>nif</i> Гены	Белки (функции)
<i>D</i>	α-Субединица азотфиксирующей нитрогеназы
<i>A</i>	β-Субединица азотфиксирующей нитрогеназы
<i>H</i>	Вспомогательная нитрогеназы
<i>F</i>	Флавопротеин
<i>J</i>	Фермент фиксации азота, кодируемый
<i>G, K, L, E, I</i>	Синтез железина
<i>M</i>	Фермент для разложения инертных соединений
<i>G</i>	Азотазид
<i>L</i>	Фермент
<i>S</i>	Синтезирующая нитрогеназа I
<i>N, C, T, P, X</i>	Другие, менее определенные функции



Трансформанты NiI⁺ и NiI⁻

Рис. 14.3 Выделение рДНК методом генетически модифицированных. Для комплементации NiI⁺ штамма A. tumefaciens используется банк клонов ДНК NiI⁺ штамма. Трансформированные клетки агробактерии по их способности расти на минимальной среде, как описывалось ранее, или с добавлением сыворотки являлись

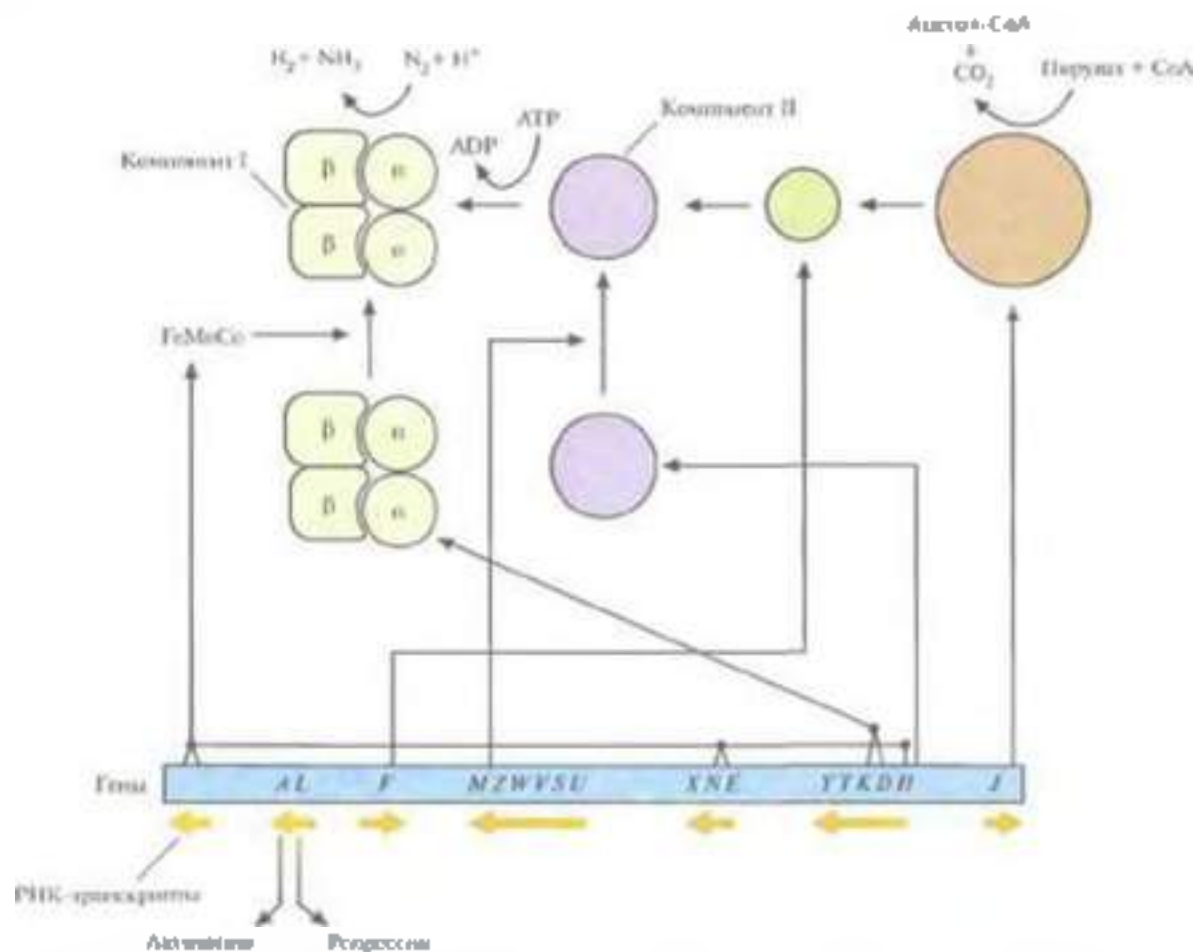


Рис. 14.4. Расположение *nif*-генов и кластеры и некоторые кодируемые ими функции. Гены обозначены цветом иными буквами: в равной стрелка для каждой из групп генов была обозначена специфическая *nif*-функция и указывалась ориентация его транскрипции. С красной стрелкой для обозначения генов, кодирующих, как правило, участие в фиксации азота и/или нитрификации (приведены некоторые из этих генов). *J* — матричный фермент азотфиксирующей системы.

должны транскрибироваться и транслироваться одновременно (под регуляторным контролем *nifA*- и *nifL*-генов). Белок *NifA* — это активатор транскрипции всех *nif*-оперонов, кроме своего собственного. Он связывается со специфической нуклеотидной последовательностью ДНК (5'-TG(-N₁₀-ACA)-3'), которая находится в каждом промоторе каждого *nif*-оперона. Сайт связывания белка *NifA* находится примерно в 30–150 нуклеотидов перед каждым сайтом инициации транскрипции. Перед началом транскрипции с *nif*-промотора связываются с ДНК белок *NifA* и взаимодейст-

вует со специфическим белком инициации транскрипции σ^{54} . Белок *NifL* — репрессор. В присутствии либо кислорода, либо связанного азота он действует как антагонист *NifA* и в результате ингибирует транскрипцию всех других *nif*-генов.

Роль *nif*-оперона в общем биологическом процессе связывания азота не является основной. Поэтому в целях модификации процесса фиксации азота почвенными бактериями представляющими большой интерес с точки зрения стимулирования роста растений, были кло-

интересны и охарактерны гены *nif-1* и *nif-2* и других генов семейства. При этом *nif-1* и *nif-2* не использовались в качестве гибридных зондов для выделения соответствующих генов из баньон клонов других дивергентных членов рода. Большинство дивергентных имеет сходный набор генов, кодирующих этап рет фиксации азота, и пластичность ДНК этих генов у разных штаммов мало различается.

Принимая во внимание результаты микродивергентно-генетических исследований, вероятно, можно повысить уровень фиксации азота дивергентными бактериями, модифицируя *nifA* и *nifD* гены. После выяснения с помощью методов геномной инженерии доминирующих копий *nifA* гена и путем *in vitro* модификации генов, кодируемые этим рекомбинантным штаммом, достигали больших размеров и данали быстрое деление, чем растения, обработанные интранскрипционными штаммом. По-видимому, значительным образом можно поступить с *nifD* геном, так чтобы белок NifD (негативный регуляторный фактор) стал бы менее чувствительным к присутствию свободного азота. При таком нарушении регуляции микрорганитов поставили бы больше азота системе симбиотическому партнеру. Однако имеются данные указывающие на то, что не все аллелирующие организмы синтезируют белок NifD (у некоторых из них увеличиваются области NifD могут быть составной частью NifA), так что подобный подход не является универсальным. Кроме того, увеличение количества азота, которое может фиксировать микрорганиты, приводит к увеличению количества энергии (обычно в форме связанного углерода), необходимой для обеспечения метаболизма. Следовательно, рекомбинантный микрорганит может оказаться неспособным стимулировать рост растений просто в клеточные замедлениями своего роста.

Именно ввиду этой сложности процесса фиксации азота микрорганитами, можно сделать вывод, что простое введение в недифференцированную клетку рекомбинантного или дикого *nif-1* или *nif-2* недостаточно для того, чтобы она приобрела способность связывать азот. Более того, даже введение в штамм растений полного кластера *nif*-генов длиной 24 kb не дает необходимого

эффекта, тем самым при той концентрации азота в почве, которая характерна для растительной клетки, нитрогена не фиксируется. Если же концентрация азота в почве понизится, то растительная клетка вернется к своему нормальному уровню азота, способным связывать азот, требуются различные фундаментальные проблемы транскрипции, трансляции и регуляции. Например, трудно представить, как будет осуществляться регуляция фиксации, поскольку у растений нет промоторов, с которыми связывался бы белок NifA. Следовательно, в таком трансгенном растении транскрипция *nif*-генов не будет инициироваться. Кроме того, чтобы регулировать уровень связанного азота в клетке, все *nif*-гены должны находиться под контролем отдельных промоторов, поскольку растительные клетки неспособны процессировать мультисистемные транскрипты. Учитывая все сказанное выше, приходится констатировать, что создание растений, способных фиксировать азот, вряд ли возможно.

Гипотезы

Нежелательная побочная реакция фиксации азота восстанавливает нитрогенами H^+ до H_2 (19-образный водород), в ходе которой затрачивается энергия (в форме АТФ) расщепления на образующие водород, который в конечном счете просто улетучивается. В результате тратится от 40 до 60% энергии электрона, прошедшего через нитрогеназный комплекс, выделяется же H_2 , что значительно уменьшает эффективность процесса фиксации азота. В принципе, если бы H_2 мог превратиться обратно в H^+ , потери энергии были бы ниже, и процесс фиксации азота стал бы более эффективным. Устранить же эту побочную реакцию прямым путем невозможно, поскольку она обусловлена особенностями химического строения и кинетики нитрогеназного комплекса, и если попытаться блокировать ее, изменив структуру фермента, то неизбежно изменится и уменьшится активность нитрогеназы.

Метаболизм водородов

В середине 1970-х годов было показано, что некоторые штаммы *Acetivibrio* могут расти в микроаэробных условиях (при



Рис. 14.5. Реакции цикла азота в симбиозе клубеньковых бактерий и продукта фиксации азота. Нитрогеназа здесь выполняет обратимую фиксацию азота, используя энергию гидролиза H_2 и ATP , а гидрогеназа катализирует его утилизацию

никой концентрации кислорода), используя в качестве источника энергии водород. Для этого они синтезируют фермент гидрогеназу, способную превращать атмосферный H_2 в H^+ (рис. 14.5).¹¹ Чтобы проверить, можно ли с помощью гена нитазы вызвать на рост сор. растения инфицированы *B. japonicum*, синтезирующим гидрогеназу (Hup^+). Растения давали большую биомассу и усваивали больше азота, чем те, которые были инфицированы штаммом, devoid нитрогеназы на более высоких уровнях нитрогеназной активности последних (табл. 14.3). По результатам этого и выдвинутых из эксперимента выводов можно сделать вывод, что наличие системы фиксации азота у симбиотической азототрофы типа *B. japonicum* повышает их способность стимулировать рост растения, по-видимому, в результате связывания и рециркуляции газообразного азота, образующегося в клубеньках при участии нитрогеназы (рис. 14.5).

Несмотря на методы, которые получает растение от симбиоза с азототрофными микроорганизмами, обладающим системой повторного использования водорода, в природных условиях такая система при участии штаммов *Rhizobium* встречается редко. Согласно результатам тестирования, представленным в табл. 14.4, большинство расщепленных природных штаммов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* имеют фермент Hup . Было проведено по нескольким штаммам каждого из указанных видов, а для *B. japonicum* их было более 1400. Неясно, что как только удастся достаточно подробно изучить генетическую природу гидрогеназной системы и идентифицировать соответствующие гены, коммерческие Hup^+ -штаммы *Rhizobium* будут несомненно канализированы (в соответствии с штаммом с ферментом Hup^+).

Модификация генов клубеньковых

На изучение гидрогеназы как биокатализатора, так и азототрофных микроорганизмов и послед-

Таблица 14.3 Стимулирующая активность нитрогеназы и гидрогеназы и способность *B. japonicum* Hup^+ (SR) и трех Hup^- мутантов (SR1, SR2 и SR3) стимулировать рост растения^{11, 12}

Штамм <i>B. japonicum</i>	Фиксация азота (относительная активность)	Нитрогеназа (относительная активность)	Средняя относительная масса растения	Относительная относительная азота
SR	1,00	1,00	1,00	1,00
SR1	1,37	0,01	0,81	0,91
SR2	1,13	0,01	0,74	0,91
SR3	1,23	0,01	0,65	0,83

¹¹ J. J. Gaudin, A. B. Gaudin et al. Science 203: 1359-1359, 1978

¹² J. J. Gaudin, A. B. Gaudin et al. Science 203: 1359-1359, 1978. Ссылка на эту статью в журнале Science 1978 года в журнале J. Gaudin et al. Science 203: 1359-1359, 1978. Ссылка на эту статью в журнале J. Gaudin et al. Science 203: 1359-1359, 1978.

Таблица 14.4. Данные «протекста» нитрогеназ гидрогенезных бактерий в отношении активности их систем фиксации азота (N-fix)^a

Система	Штаммы N-fix, %
<i>Rhodospirillum rubrum</i> и родственные	9,3
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	21
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> и родственные	8
<i>Bradyrhizobium elaeagnae</i>	8
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	31
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	91

^a H. G. Roberts, F. Lewis et al. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 575-591 (1987)

этих 30 лет было совершенно много усн. вид, и тем не менее строения и функции этих ферментов до конца не установлены. Многие микроорганизмы синтезируют белок (или) нитрогеназу, при этом часто они состоят больше чем из одной полипептидной цепи. Этот гидрогенезный белок сам является атмосферным азотом, в то время как другие при соответствующих условиях могут также синтезировать его. И в связи с этим следует, что если же для преобразования и штаммы N-fix «белки» в N-fix⁺ будет достаточно простого включения в его геном гена одной из гидрогенезных ферментов (или) должна кодировать все субединицы фермента, который должен быть совместим с электрохимическими системами организма-хозяина.

Попытке распространения стратегия выделения генов гидрогенеза – генетическая комбинирование. Первым из таких генов, ген мембраносвязанной гидрогеназы *F. coli*, был идентифицирован методом комбинирования с мутантом *E. coli*, неспособным синтезировать активную гидрогеназу, с использованием банки клонов ДНК *F. coli* такого типа, связанного с помощью плазмиды рВК122. Мутант, содержащий дефектную мембраносвязанную гидрогеназу, не рос на минимальной среде в присутствии (фермента), при этом активность нитрогеназы в клетках трансформированных клеток, способных расти на такой среде, инвертировалась на присутствие в них активной гидрогеназы. Трансформант, у которого активность гидрогеназы восстанавливалась до такого же уровня, как у штамма дикого типа, содействовал развитию, колонизацию ботва мха, мха *soil* (примерно 60 (M) Дл. что соответствует мха,

масса одной (1) субэлементарной мембраны активной гидрогеназы *E. coli*. Данные этого исследования показали, что в гидрогенезной системе *E. coli* входит множество генов.

Затем были идентифицированы гидрогенезные гены (*Nif*) в *azotobacterales*; для этого использовались банк клонов ДНК дикого типа, созданный с помощью кисеичного вектора р1 АТК1 с широким кругом хозяев, и мутанты Nif⁻ в *azotobacterales*. Присутствие гидрогеназы, связывающей атмосферный азот, в трансформированных мутантных клетках Nif⁺ определяли по способности включения фермента посылать метилгруппы азота в атмосферу воздуха. Более детальное исследование показало, что *Nif*-гены *B. japonicum* образуют по крайней мере два, а возможно, и три оперона, охватывающих примерно 15 т.п.н. причем *Nif*-гены *B. japonicum* кодируют активную гидрогеназу *B. japonicum* как в отношении гомологичной нитрогеназы, так и в том, что касается организации генов. Таким образом, идентифицированные *Nif*-гены *B. japonicum* можно использовать в качестве гидродинамичной системы для поиска гомологичных генов в других штаммах *R. leguminosarum*.

После идентификации *Nif*-гена *R. leguminosarum*, несмотря на всю сложность гидрогенезной системы, удалось «переместить» ее на Nif⁻ штамма *R. leguminosarum* в штамм Nif⁺ (табл. 14.5). Растения бобов на которых образуются клубеньки бактериями рекомбинантного Nif⁺ штамма *R. leguminosarum*, росли быстрее и содержали больше азота, чем растения, inocулированные Nif⁻ штаммом (табл. 14.5).

Работы по исследованию генов гидрогенеза не только имеют большой интерес как исследования *nif*-генов, и тем не менее они являются примером использования неспецифичности применения методов (генов) выделения для повышения способности азототрофных микроорганизмов стимулировать рост растений. Теперь можно проверить, приведет ли введение *Nif*-генов в геномы других азототрофных микроорганизмов (как несимбиотических, так и симбиотических) к такому же эффекту.

Гидрогенезная система может применяться не только для формирования эффективности фиксации азота. Так, очищенную гидрогеназу можно использовать для преобразования и мха

Таблица 14.3. Динамика роста и ассимиляция азота клубеньковыми бактериями *Rhizobium meliloti*¹

Фазы	Отношение массы клубеньковой фазы к массе корней	Отношение фазы клубеньковой фазы к массе корней	Отношение фазы клубеньковой фазы к массе корней	Отношение фазы клубеньковой фазы к массе корней
Нач	1,10	1,30	1,30	1,10
Конец	1,35	1,57	1,93	1,15

¹ Цит. по: [10]. Взято из: [10]. С. 5. [10]. С. 5. [10]. С. 5.

ния азотфиксирующей бактерии; регуляторный фактор, принимающий участие в промышленном ферментационном процессе; система специфических химических соединений, требующих участия Н₂ в качестве подстрата, для удаления азота из почвы, в почвах использовались для определения результатов азотной фиксации: два штамма Н₂ из промышленных отходов; получения водорода из водородных топливных ячеек. Однако, несмотря на то что уже идентифицированы и охарактеризованы более тысячи штаммов бактерий, пока не один из них не использовался для промышленной азотфиксации.

Образование клубеньков

Конкуренция среди организмов, образующих клубеньки

Одна из основных задач селективно эффективной биотехнологии – создание с помощью методов генной инженерии штаммов *Rhizobium*, которые превосли бы урожайность растений более эффективно, чем промышленные штаммы. Многие исследователи на рынке штаммов-инкулянтов промышленные азотфиксаторы – были созданы путем мутационного и последующего отбора, однако они в недостаточной степени стимулируют образование клубеньков на хороших растениях в почвах и условиях конкуренции с промышленными штаммами *Rhizobium*, уже присутствующими в почве. В отборе, в отличие промышленных штаммов с целью выверенной конкуренции с азотфиксаторными штаммами, но модифицированы в отношении фиксации азота. Таким образом, для того чтобы можно было реально использовать имеющиеся на рынке промышленные штаммы, необходимо либо повысить их способность образовывать клубеньки, либо устранить природные штаммы *Rhizobium*.

Были применены исследования, направленные на определение генетических основ «конкуренциальной способности» природных штаммов, с тем чтобы затем попытаться ввести селективные гены в штаммы-инкулянты.

Манипуляции с генами образования клубеньков

Для идентификации генов образования клубеньков (nod-генов) были использованы генетические клоны *nod* штаммов. Не специфичными образцами клубеньков (*Nod*) мутантных штаммов *R. meliloti* трансформирован банк клонов промышленной ДНК *R. meliloti* диссоциированными плазмидами, сформировавшие способность образовывать клубеньки на корнях люцерны (рис. 14.6) (стратегия заключается в следующем:

1. С помощью частичного паразита ДНК *R. meliloti* рестриктазой *EcoRI* и экстракцией фрагментов длиной до 40 э. п. н. в участке, кодирующем *nod* штамма *R. meliloti* с помощью *NotI* сайт космиды pLAGFR1 с синтетическим азотом жидко был создан банк клонов хромосомной ДНК *R. meliloti* длиной 1000 (*Nod*⁺).
2. Рекомбинантные плазмиды вводили в частоту фига λ . после и *E. coli*, в затем перенесли в клетки *Nod* штамма *R. meliloti* при помощи конъюгации. Вектор содержал ген устойчивости к тетрациклину, который можно было использовать как селективный маркер в случае *E. coli*, и в случае *R. meliloti*.
3. После конъюгации суспензии, содержащие от 100 до 100 трансформированных клеток *R. meliloti*, проверяли их способность инициировать образование клубеньков у стерильных растений люцерны. Оказалось, что эти способности будут обладать только транс-

- ферилиты, которые несут и экспрессируют ген, кодирующий феруловый дефект образования клубеньков в клетках *R. meliloti*
4. Ни клубеньков, ни азотфиксирующих феруловых клубеньков, а ни бактерии вообще, экспрессируют комплексированный ген (оно кодирует этот ген полностью) оставку пероха (попытки и процесс являются частью плана).
 5. Азотфиксируемые ген образуют клубеньки использовать в качестве хозяина для симбиоза (интегрируются в участок хромосомы ДНК *R. meliloti* в естественном состоянии).

В результате этих весьма трудоемких экспериментов удалось идентифицировать весь набор генов образования клубеньков *R. meliloti*. Дальнейшие биохимические и генетические исследования показали, что образование клубеньков и его регуляция — это сложные процессы, в которых взаимодействуют продукты большого количества генов (примерно 20; табл. 14.6) (Яни

ни эти гены высококонсервативны (сильно консервативны у всех микросимбиотизов, образующих клубеньки), другие видоспецифичны. Их можно сгруппировать в три основных класса: консервативные, видоспецифичные и регуляторные ген *nodD*. Так, *nodABC* (гены азотфиксаторов) есть только у *Rhizobium* и структурно взаимосвязаны; у большинства видов они образуют полипептид.

Установлено, что процесс образования клубеньков включает несколько шагов. Сначала привязка к растению экспрессируется ген *nodD* становится с мутуальной флорой для секретирования клетками корней растения хитина. Флавоноиды — это растительные фенольные соединения, структурную основу которых составляют два ароматических кольца, соединенных друг с другом трансформированным мостиком (или мостиком) в растительном или в функции, в частности спечивают и их функциями и участвуют в синтезе азота и азотфиксируемых. Связанные флавоноиды с белком NodD

Таблица 14.6. Некоторые белки, кодируемые геном образующих клубеньки *Rhizobium*, и их молекулярные функции

Белок	Функциональная роль
<i>NodA</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodB</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodC</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodD</i>	Кодированный, взаимодействует с белком <i>NodE</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodE</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodF</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodH</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodI</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodJ</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodK</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodL</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodM</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodN</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodP</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodQ</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodR</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodS</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodT</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodU</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodV</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodW</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках
<i>NodX</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в регуляции экспрессии генов <i>nodABC</i> и <i>nodX</i> в клубеньках

14.6. Сложные белки, кодируемые геном образующих клубеньки *Rhizobium*, и их молекулярные функции. Взаимодействие белков *NodA* и *NodD* с белком *NodE* и белком *NodF* в клубеньках. Взаимодействие белков *NodB* и *NodD* с белком *NodC* и белком *NodH* в клубеньках. Взаимодействие белков *NodI* и *NodD* с белком *NodJ* и белком *NodK* в клубеньках. Взаимодействие белков *NodL* и *NodD* с белком *NodM* и белком *NodN* в клубеньках. Взаимодействие белков *NodO* и *NodD* с белком *NodP* и белком *NodQ* в клубеньках. Взаимодействие белков *NodR* и *NodD* с белком *NodS* и белком *NodT* в клубеньках. Взаимодействие белков *NodU* и *NodD* с белком *NodV* и белком *NodW* в клубеньках. Взаимодействие белков *NodX* и *NodD* с белком *NodY* и белком *NodZ* в клубеньках.

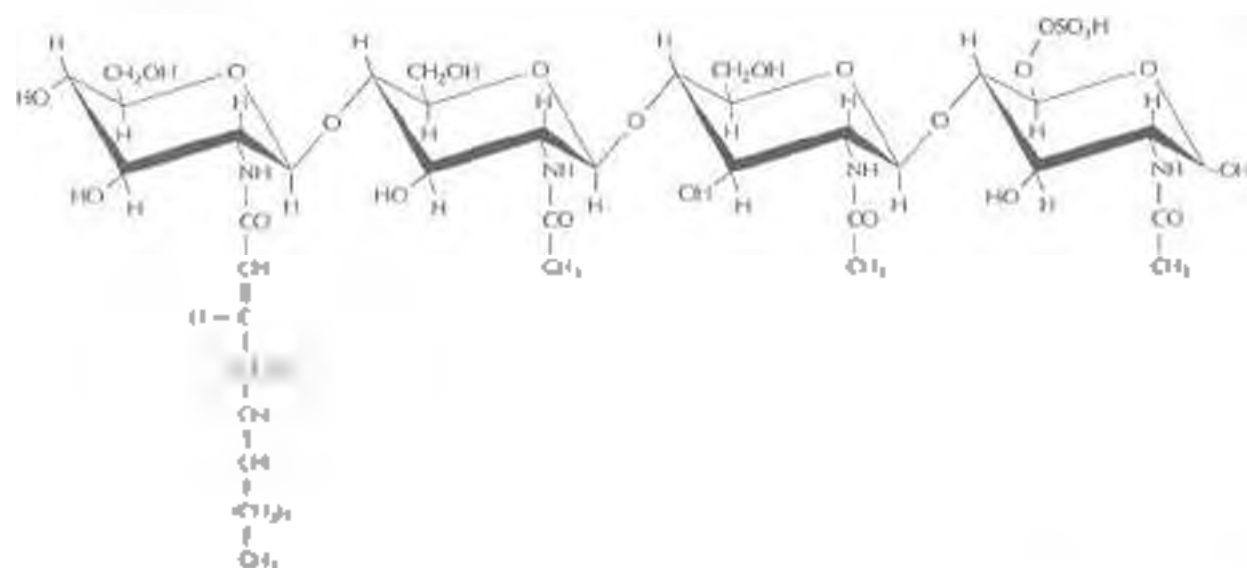


Рис. 14.7. Представлены структура олигосахарина-фактора NodRm-1. Это соединение обуславливает специфичность связи растений-хозяев, в этом случае сформированное и дифференциальное

лосков, что считается первым шагом инфицирования корня растения-хозяина. Вместе растения и бактерии синтезируют некий олигосахаридный фактор, который модифицируется вешным продуктом NodH, в частности, в частности NodQ и NodP. Этот фактор, обозначаемый NodRm-1 (рис. 14.7), обуславливает специфический ответ растения-хозяина, в том числе сформирование и сформирование корня.

В частности от штамма *Rhizobium loti* и *Rhizobium*, в которых корень синтезируется примерно 20 дополнительных продуктов nod-гена. Вместе с некоторыми белками, кодируемыми растением, они участвуют в формировании клубенька.

Нужно выяснить роль каждого из идентифицированных nod-генов, необходимо провести дополнительные исследования; кроме того, не исключено, что со временем обнаружатся новые nod-гены. Например, секвенирование ДНК и компьютерный анализ показали, что у медленно-растущей формы *Rhizobium loti* область ДНК между nodP- и nodA/C-генами содержит открытый рамку считывания, а у быстрорастущей формы этой последовательности нет. Открытая рамка считывания обозначена nodK. При инокуляции растения штаммом *Rhizobium loti* ср. с му-

тажным nodA-геном (NodK) клубеньки на нем начинают образовываться на 5 дней раньше, чем у растений, зараженных штаммом дикого типа; при этом число клубеньков увеличивается, а урожайность растений увеличивается на 120%.

К настоящему времени не удалось разгадать простых генетических головоломок, которые позволили бы использовать nod-гены для повышения конкурентоспособности инкулирующих штаммов *Rhizobium* в природе, а также и повысить специфичность бактерий к хозяину. Однако специфичность в отношении штаммов с узкой специфичностью. Так или иначе, ясно, что образование клубеньков – весьма сложный процесс, и для дальнейшего увеличения конкурентоспособности штаммов *Rhizobium* потребуются дополнительные исследования с использованием методов генной инженерии.

Биоконтроль патогенных микроорганизмов

Бактерии, стимулирующие рост растений могут оказывать еще действие прямо или косвенно. Прямая стимуляция обычно состоит в поставке

растению как чуждого либо соединения, синтезируемого бактерией (это может быть, например, сигнальный шок), или растительного гормона. Кроме того, бактерии могут выделять ингибиторы растений из окружающей среды некими веществами, например железом или фосфором. Кислотная стимуляция заключается в том, что бактерии уменьшают или предотвращают вредное влияние почвы или засохших фитопатогенных организмов (грибов или бактерий). Фитопатогены могут уменьшать урожайность сельскохозяйственных культур на 25–100%, что наносит огромный ущерб. Сильно для борьбы с этими патогенными химикатами. К сожалению, и биологические способы стимулирования растений не предотвращают достаточно долго, до тех пор, пока патогены в окружающей среде не вызовут пролиферацию бактерий и не приведут к быстрому развитию болезней и к уменьшению урожая. Контроль таких обширных эпидемий трудноконтролируем и требует больших денежных затрат.

Многие химикаты, использующиеся для борьбы с фитопатогенными, представляют опасность для животных и человека; они накапливаются в природных экосистемах и даже содержатся в них. Поэтому были бы интересными изменениями химических способов подвешивания (аэрозольная микрофитация биологическими), более «биологичными» для среды. Даны из биологических методов в качестве фитопатогенных веществ и соединений растений, устойчивых к патогену или несколькими патогенными микроорганизмами (этот подход обсуждается в гл. 18). Если также превратить опылки и опылители в качестве инструмента биоконтроля бактерий, стимулирующих рост растений. Также бактерии синтезируют соединения, которые можно использовать для уменьшения ущерба, наносимого растениям фитопатогенами. В настоящее время сифидины и антибиотики, а также различные ферменты. Впрочем, несомненно, и другие ферменты либо ферменты, почти все исследованы пока производятся в лабораторных условиях, ридных культур или в спорежах. Существенный же рынок и рынок той или иной стратегия, основанной на биологических веществах конкретно в отношении, можно будет сделать только после более тщательных исследований.

Сидерофоры

Железо – один из наиболее распространённых на Земле элементов, абсолютно необходимым для жизни организмов. Однако в той форме, в какой железо присутствует в почве, оно не может прямо использоваться микроорганизмами. Дело в том, что оно присутствует в виде оксидной и гидроксидной ионов. На растворимость очень мало при pH 7,4 (на уровне примерно 10^{-19} M), в таких количествах абсолютно недостаточно для поддержания роста микроорганизмов. Чтобы выжить в таких условиях, микроорганизмы синтезируют и секретируют особые низкомолекулярные железосвязывающие соединения или, чаще (например) АСН (НАА). Такие вещества называются сидерофорами (рис. 14.8). Они эффективно связывают $Fe(III)$ и транспортируют его в клетку микроорганизма, где оно связывается с клеточными рецепторами и попадает внутрь клетки. Здесь железо высвобождается и может начать работу микроорганизмом.

Бактерии, стимулирующие рост растений, подвешивают пролиферацию фитопатогенных грибов, синтезируют сидерофоры, которые связывают большую часть $Fe(III)$, выходящую в среду почвы, непосредственно приводящую к ограничению (и ризоферре) фитопатогенных грибов тоже синтезируют сидерофоры, но они обычно обладают более сильным эффектом в железе, чем сидерофоры. Синтезируемые стимулирующими раст. веществами бактериями. Это позволяет использовать сидерофоры в минеральной борьбе с фитопатогенными грибами и патогенными насекомыми.

В отличие от фитопатогенных микроорганизмов, растения, как правило, не страдают от повышенной концентрации железа в почве в результате попадания его бактериями, стимулирующими рост растений. Биологически растения могут рвать при значительной концентрации железа, чем микроорганизмы. Кроме того, есть данные, что железо, связанное бактериями сидерофорами, может ассимилироваться растением и использоваться ими для своих нужд.

Поскольку связывание железа бактериями сидерофорами может одновременно приводить к подавлению пролиферации самих

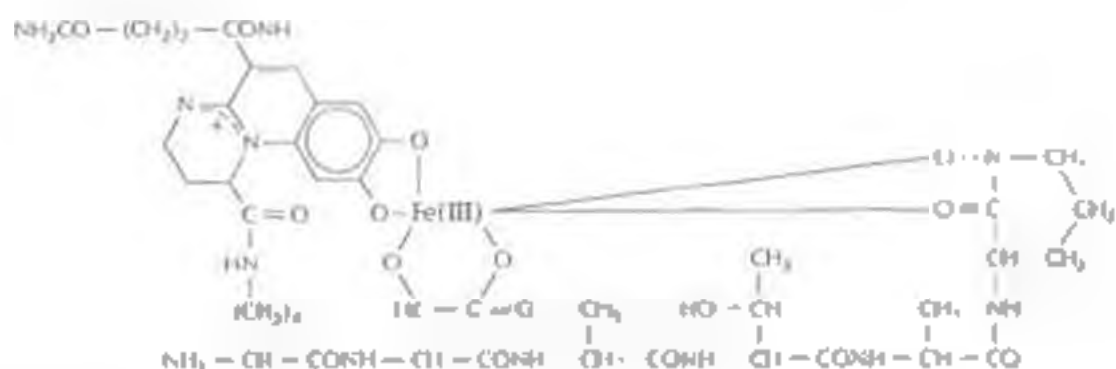


Рис. 14Д. Структура сидерофора псевдомонады, продуцируемого штаммом *Pseudomonas* В10. С основной карбоксильной сидерофорной связью связан один ион $Fe(III)$.

разных фитопатогенных микроорганизмов, не следует забывать использование их для создания более эффективных систем биоконтроля.

Многие стимулирующие раст. системы флуоресцирующие соединения секретируют энтеробактерии, представляющие собой линейный ряд семейства, который состоит из чередующихся I и II-аминных кислот и сериновых флуоресцентного хромофора (рис. 14Б). Один из таких сидерофоров, так называемый псевдомонин, обладает свойствами $Fe(III)$: 10^{22} л. моля⁻¹. Сильные сидерофоры синтезируют все флуоресцирующие псевдомонады.

Предприняты также первые попытки исследовать синтез псевдомонина у стимулированной раст. системы бактерии *Pseudomonas putida* WCSJ58. С помощью мутантов были получены 28 мутантов этой микроорганизма, не способных синтезировать сидерофор. Из отбор полученных по 1) отсутствию флуоресценции в УФ-свете, 2) неспособности к росту в присутствии динитрата — вещества, снижающего большую часть железа в культуральной среде. При очень малых концентрациях этого вещества растут только те клетки, которые синтезируют сидерофоры. Был создан банк клонов ДНК *P. putida* WCSJ58 с плазмидой космогенного вектора pLAI R1 с широкой кругом действия и путем конъюгации осуществлена трансформация всех 28 мутантных форм. Трансформанты были проверены по способности к флуоресценции в УФ-свете и/или к способности к росту в присутствии динитрата. Идентифицированы тринадцать

разных комплексотворящих космогенных клонов со средним размером оклада 26 к. п. н. Действительные исследования показывают, что эти клоны синтезируют по крайней мере пять различных кластеров генов.

Один из этих кластеров был последним более детальным. Его минимальная длина составила примерно 33,4 к. п. н., он содержит пять оперонов по крайней мере с семью инделными генами. Таким образом, как и фальсифицированные клубеньки, биосинтез сидерофоров это сложный процесс. Поскольку каждый сидерофор кодируется несколькими генами, получение рекомбинантных бактерий, способных синтезировать модифицированный сидерофор, — задача не из легких. К счастью, есть другие способы повысить эффективность использования бактерий, стимулирующих раст. системы, в качестве индукторов биоконтроля. Например, можно расширить круг действия клонов бактерийными штаммами клонированного железа-сидерофора, так чтобы один рекомбинантный штамм мог унаследовать и использовать сидерофор, синтезируемый другим независимым микроорганизмом, так чтобы к ним были свои конкурентоспособности. Для этого были алкирированы те же рецепторы выщелачивания железа-сидерофоры из бактерий, стимулирующих раст. системы, и введены в другие штаммы.

Антибиотики

Один из наиболее эффективных механизмов, которые используют стимулирующие раст. системы бактерии для выживания и пролиферации

фермент β-1,3-галактаназу, который разрушал срединной мембраны. В ходе других исследований было показано, что при применении активной грей моллиции *Glutathione oxidoreductase*, стимулируется рост растений, обусловленными изменениями у них комплекса из четырех разных полипептидов, которые, действуя совместно, разрушают мембранную клеточную стенку грибов. Эти бактерии способны ингибировать развитие и размножения *Ascochyta blight*. В то же время Tn5-мутации *E. coli* продуцируют еще активные ингибиторы, не были специфичны мембраны растений от патогенных грибов.

Многие бактериальные ферменты, разрушающие клеточную стенку грибов, в том числе китиназы и β-глюкозидазы, кодируются одним геном, была бы разумно выделить эти гены и ввести их бактериям, стимулирующим рост растений, с тем чтобы получить штаммы, синтезирующие, например, и китиназы, и ферменты, разрушающие клеточную стенку грибов. Были проведены эксперименты, в которых ген китиназы, выделенный из бактерии *Serratia marcescens*, был встроены в клетку *Ercheria coli* и *A. niger*. Оба трансформированных микроорганизма синтезировали китиназу и обладали повышенной пролонгированной активностью. При посеве этих штаммов *S. marcescens* в штамм *P. fluorescens*, стимулирующий рост растений, был получен трансформант, стабильно секретирующий китиназу и эффективно подавляющий размножение фитопатогенного гриба *Ascochyta blight*.

Синтез антикристаллов льда и антифризные белки

Некоторые патогенные нормальные листья бактерии (штамм *Pseudomonas syringae*) синтезируют при низких температурах специфические белки, служащие центрами образования кристаллов льда на поверхности листа при температурах ниже нуля. По мере роста кристаллы приближаются к растительным клеткам и необратимо повреждают растение, а бактерии (вылучают) в свое распространение патогенные вещества. Исследования на разрушенных растительных клетках показали, что белки — центры кристаллизации на поверхности листа отсутствуют, но неспоразительно при низких температурах могут и не приме-

сти в пределах растения, исключая образование кристаллов льда и повреждение растительных клеток. Обычно при низких температурах не исключается образование льда при замерзании (и с образованием ее переохлаждение). Чтобы предотвратить кристаллизацию на листьях злаков культур, как земляника, можно еще до заморозков растительный материал инкубировать бактериями *P. syringae*, не способными синтезировать белки — центры кристаллизации. Такие мутантные формы могут быть созданы с помощью естественных рекомбинантных ДНК или специально мутагенеза с последующим отбором, и они при достаточной концентрации могут предотвратить развитие грибов.

Плыви из многих условий мутационности биологическая патогенных микроорганизмов с помощью бактерий, стимулирующих рост растений, является способность этих бактерий в естественных условиях в Канаде, скандинавских странах и на севере США или Японии сохранять способность в условиях дождя холодных зим, а именно (разно) валься при относительно низких температурах (от 5 до 4 °C). Поскольку микроорганизмы способны выживать в неблагоприятных условиях, можно попытаться селекционировать с помощью скрининга рекомбинантные бактерии, оптимально приспособленные к низким температурам. Недавно было показано, что некоторые патогенные бактерии (в среде них встречаются и виды, которые стимулируют рост растений) могут размножаться при 5 °C и секретировать в окружающую среду антифризные белки при низких температурах. Такие белки регулируют образование кристаллов льда внутри бактериальных клеток. Хотя в их присутствии кристаллы все же формируются, они все достигают больших размеров и не разрушают клетки. Как только будут идентифицированы генные бактериальные антифризные белки, на них будет перенесены в клетки бактерий, стимулирующих рост растений, с тем чтобы получить трансформированные бактерии, устойчивые к низким температурам. Пока нет никаких данных о возможности связи между антифризной активностью бактерий и механизмом, обеспечивающим их выживание при низких температурах. Очень ин-

терьям проверить, является ли синтез этих функций беззащитным аэробной стратеей, не защищенной некоторыми бактериями для обеспечения устойчивости к холоду.

Стимуляция роста растений симбиотическими бактериями

Бактерии, стимулирующие рост растений, оказывают свое действие несколькими способами: 1) фиксируют атмосферный азот, который затем используется растением; 2) синтезируют сидерофоры, которые мобилизуют и связывают железо из почвы и обеспечивают им растительные клетки; 3) синтезируют фитонормоны, ускоряющие разные стадии роста; 4) мобилизуют минеральные вещества (такие, как фосфор), которые затем используются растением; 5) синтезируют ферменты, снижающие уровень растительных гормонов. Каждая бактерия, стимулирующая рост растений, может использовать один или несколько из этих механизмов.

Фиксация азота имеет совсем небольшой вклад в тот положительный эффект, который дает бактерия, стимулирующая рост растений. Не все виды бактерий являются азотфиксаторами, а многие из тех, которые являются, ограничивают количество азота.

Для поглощения железа из почвы некоторые растения используют бактериальные комплексы железа сидерофор; без этого их рост в большинстве случаев был бы сильно ограничен. Однако, несмотря на то что бактериальные сидерофоры несомненно вносят вклад в питание растений и, следовательно, в их рост, этот эффект, как правило, не очень велик.

Как именно бактерии, стимулирующие рост растений, способствуют поглощению растительными клетками минеральных веществ, как фосфор, до конца не установлено. Выяснилось предположение, что у растений, обработанных стимулирующими их рост бактериями, лучше развиты корневые системы, в первую очередь более эффективно поглощают из почвы нужные им вещества, и т. д. влияние бактерий имеет оксидовый характер. Однако эксперименты с *Agrobacterium tumefaciens*, что этот организм увеличивает образование именно минеральных ве-

ществ, в частности, синтезируют и секретируют органические кислоты, которые растворяют и связывают некоторые из этих веществ.

Очень часто различные эффекты бактерий, стимулирующих рост растений, объясняют способностью их к синтезу фитогормонов. Большинство исследований в этой области относится к выделению одной из групп из классов фитогормонов — ауксинов. Наиболее распространенный и лучший всего характеризованный ауксин — это индол-3-уксусная кислота (ИУК). Она стимулирует как быстрое прорастание (например, удлинение растительных клеток), так и длительные (ускорение деления и дифференцировки) растения тоже могут синтезировать ауксин. Часто это не позволяет определить, какой именно ауксин дает необходимый эффект бактериальной или растительной. Тем не менее можно утверждать, что бактерии, стимулирующие рост растений, оказывают свое действие именно через повышение содержания ауксина в растениях.

Нельзя обнаружить, что многие бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют фермент, способный регулировать уровень растительного гормона этилена. Этот фермент, 1-аминоциклопропан (карбонсукцилат(АИК) деградация, гидролизует АИК, который является непосредственным предшественником этилена при биосинтезе в растениях. Одно из основных роли этого фермента состоит в следующем. Бактерия взаимодействует с оболочкой семени или с корнями растения, затем продуцирует и секретирует АИК, повышая концентрацию этилена в почвах растений. Во многих растениях этилен стимулирует прорастание семян и влияет на их состояние покоя; обычно, если после прорастания уровень этилена оказывается слишком высоким, удлинение корней замедляется. Таким образом, бактерии типа АИК деградация увеличивают скорость роста корней, и растение развивается быстрее. Кроме того, многие бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют ИУК, в отличие ИУК, не так распространенный на стимуляцию удлинения растительных клеток или ускорение деления, активирует АИК синтезу, что приводит к повышению концентрации этилена. Присутствие этилена АИК-деградация препятствует выделению

стимулирующие рост растений), оказывают свое действие, по-видимому, посредством создания рекомбинантных микроорганизмов, способные стимулировать рост самых разных растений в различных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие почвенные микроорганизмы обладают способностью стимулировать рост растений. Были исследованы молекулярные механизмы, лежащие в основе этой стимуляции, с тем чтобы применить, можно ли использовать роденные почвенные бактерии вместо химических удобрений. Полезные бактерии могут оказывать свое влияние непосредственно, поставляя растениям фиксированный азот, хелатированное железо, фитогормоны или облегчая поглощение ими фосфора. Но влияние может быть и опосредованным, через повышение роста фитопланктонных микроорганизмов.

Из всех бактерий, стимулирующих рост растений и уже используемых в сельском хозяйстве, наиболее детально изучены члены семейства *Rhizobium* и *Beauverbia*. Эти микроорганизмы вступают в сложные облигатные симбиотические отношения со строго определенными растениями.

Молекулярные основы фиксации азота всесторонне исследовались на *K. pneumoniae*, которая может служить модельной системой для изучения симбиотических бактерий семейства *Rhizobium* и *Beauverbia*. Детально охарактеризована нитрогеназа, азотфиксирующая фермент. Молекулярно-генетические исследования показали, что фиксация азота бактериями — это сложный процесс, в нем участвует семь координированно регулируемых оперонов, кодирующих в общей сложности 20 разных белков. Это белок пока невозможно создание с помощью «глав» г-иМ и в серии растений, которые могли бы сами усваивать азот, и других азотфиксирующих бактерий.

Азотфиксированный фермент нитрогеназы, несомненно, является источником АТР, катализирующей образование газообразного аммиака (N_2). Некоторые штаммы *Rhizobium* синтезируют ферменты, способные к фиксации азота. Он катализирует превращение азота в аммиак, в N^+ , что увеличивает эффект.

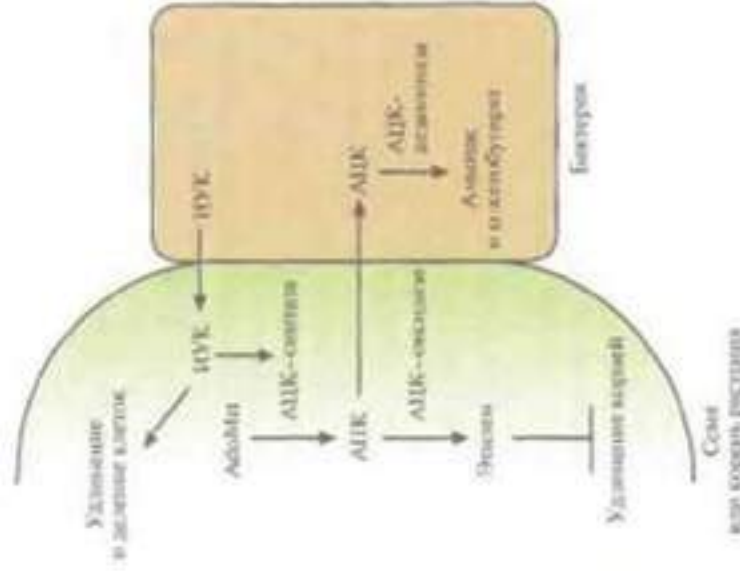


Рис. 14.10. Симбиотическое взаимодействие мезофитов, с помощью которого бактерии, стимулирующие рост растений, связывают концентриацию азота в растительных тканях и тем самым предотвращают избыточное развитие корней. Бактериальная клетка, прикрепившаяся к поверхности стебля или корня растения, производит индол-3-уксусную кислоту (ИУК), стимулирующую рост растений. Попадая в растение, бактерия ИУК (вместе с ИУК, синтезируемой самим растением) стимулирует либо деление растительной клетки и ее увеличение, либо фермент АИК-синтазу, который катализирует преобразование 5-аденилатионина (AdoMet) в АИК. Значительная часть АИК растеет с другим малым молекулярным, обычно встречающимся в свободном или хелатном виде, азотом, образуется парами растения или симбионта, производится бактериями и гидролизует АИК-азой малой дозировкой и в-кетобутират. В результате количество АИК в растении снижается. Чтобы сохранить равновесие между АИК внутри и снаружи, растение сокращает его больше. Соответственно эти концентрации, а следовательно, и концентрация азота в растительных тканях уменьшается. (Из работы Giblin et al., *J. Theor. Biol.*, in press.)

денно АИК даже при высокой концентрации ИУК, так что концентрация азота не повышается до уровня, при котором замедляется рост растения (рис. 14.10). После детального изучения механизма, с помощью которого бактерии,

- plant growth-promoting bacterio. *J. Theor. Biol.*, in press.
- Glick B., J. Zeider, A. M. Banaszak, J. T. Friksen, W. G. Martin. 1981. The identification and partial characterization of a plasmid containing the gene for the membrane-associated hydrogenase from *E. coli*. *Gene* 15: 203-206.
- Groshoff P. M., I. F. Kuth, G. Stacey, W. E. Newton (ed.). 1990. *Nitrogen Fixation. Achievements and Objectives*. Chapman & Hall, New York, N.Y.
- Hancock H. 1990. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *FEBS Lett* 268: 423-426.
- Higashi S. 1993. (Brady)Rhizobium plant commensalism involved in infection and nodulation. *J. Plant Res* 106: 201-211.
- James D. A., M. H. Ryder, B. G. Carey, S. K. Iqbal, A. Kerr. 1988. Construction of a Tn⁺ deletion mutant of a pAgK84 to telegraph the biological control of crown gall. *Mol. Gen. Evol.* 212: 207-211.
- Klopper J. W., R. J. Schiz, M. A. Schroth. 1985. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Ser. Anim. Plant Sci.* 60-64.
- Lava A. J. M., Palgen, I. Blazo, T. Hutz-Argbeson. 1987. Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 169: 4929-4934.
- Leong P., P. Roche, C. Tischer, F. Mallet, G. Trochet, J. C. Pham, J. Douin. 1990. Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.
- Long S. R., W. J. Burkema, F. M. Ausubel. 1987. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod mutants. *Nature* 298: 465-468.
- Lynch J. M. 1990. Beneficial interactions between microorganisms and roots. *Biotechnol. Adv.* 8: 335-346.
- Marrag J. D., M. van Spanje, W. P. M. Hekstra, B. Schippers, P. J. Welbch. 1985. Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth-stimulating *Pseudomonas putida* WC358. *J. Bacteriol.* 164: 563-570.
- Marrag J. D., H. B. Nilsen, A. J. G. Hurrevoets, I. van Negen, I. van Gasteren, P. J. Welbch. 1988. Genetic organization and transcriptional analysis of a major gene cluster involved in siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* WC358. *J. Bacteriol.* 170: 1812-1819.
- North R. H. 1986. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 509-538.
- Nylen P., K. Pankowski, T. Blivelling. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 809-885.
- Nap J.-P., T. Blivelling. 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948-954.
- Nelson J. B., S. A. Leong. 1986. Microphobes in relation to plant growth and disease. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 187-203.
- O'Sullivan H. J., E. O'Gara. 1993. Traits of *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Molecular Res.* 56: 662-676.
- Pain A. S. 1991. Improvement of *Rhizobium* inoculants by mutation, genetic engineering, and formulation. *Biotechnol. Adv.* 9: 173-184.
- Patten C. L., B. H. Glick. 1996. Bacterial biocontrol of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Peters J. W., A. Fischer, H. R. Dean. 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 335-366.
- Rosen J., E. O. Davis, A. W. H. Johnston. 1987. Plant-induced expression of *Rhizobium* genes involved in host specificity and early stages of nodulation. *Trends Biol. Sci.* 12: 430-433.
- Schaefer T., C. Keel, C. Blumer, J. Traxler, G. Hefago, H. Hans. 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* C11A0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* 177: 5387-5392.
- Smith H. P., C. A. Wijetunge, F. Pres, R. J. H. Okler, B. J. J. Lugtenberg. 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* is a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337-340.
- Sprent J. I. 1986. Benefits of *Rhizobium* to agriculture. *Trends Biotechnol.* 4: 124-129.
- Stacey G. 1995. *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. *FEBS Microbiol. Lett.* 127: 3-9.
- Sun X., M. Griffith, J. J. Pasternak, B. R. Glick. 1995. Low temperature growth, freezing survival

- and production of nifH-like protein by the plant growth-promoting rhizobacterium *Beauverriella caryophylli*. *J. Appl. Microbiol.* 41: 776–784
12. Blythe P., J. Vanderleyden. 1995 The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59: 124–142

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Предположим, что у вас есть штамм *Rhizobium lotum*, способный усваивать азот и азотфиксирующий в симбиотических отношениях с растением сои. Какой подход вы использовали бы для идентификации кластера генов, кодирующих образование клубеньков, при условии, что у вас нет заморозки гибридов сои с *nod*-генами?
2. Что такое пирролизин? Как с ее помощью можно повысить урожайность люцерны?
3. Предложите стратегию идентификации всех генов *Azotobacter vinelandii*, участвующих в связывании азота, имея в виду, что у вас нет *nif*-генов других микроорганизмов, которые можно было бы использовать в качестве эталонных клонов.
4. Как, по вашему мнению, повлияет увеличение мутаций в *nifD*- или *nifE*-генах на количество фиксируемого азотом организмом азота?
5. Обсудите возможность создания рекомбинантных растений, способных фиксировать азот.
6. Предложите схему клонирования генов сидерофоров.
7. Если такое сидерофоров? Каким образом, модифицируя гены сидерофоров, можно повысить способность бактерий стимулировать рост растений?
8. Предложите схему идентификации генов биосинтеза сидерофоров.
9. В чем преимущество микробиологических удобрений перед химическими?
10. Как с помощью методов геномной инженерии повысить эффективность *Azobacterium labdiphyllum* как инструмента биоконтроля?
11. Какие ферменты, секретируемые стимулирующими рост растений бактериями, обуславливают их «биоконтролирующее» свойство? Какие молекулярные действия этих ферментов?

Микробные инсектициды

Насеки в своей численности и числ. инсектициды — самая многочисленная группа организмов, числом приближается к 1 млн. Насекомые могут нанести огромный ущерб урожаю сельскохозяйственных культур, а некоторые из них являются переносчиками болезней человека и животных. В 1940-х гг. были синтезированы многие (но не все) новые инсектициды, позволяющие контролировать численность популяций насекомых-вредителей. Самым эффективным из них был пиретроин-этилэтер (ДДТ). Это хлороорганическое соединение синтезировали в 1870-х гг., но в качестве инсектицида стали применять лишь в конце 1930-х гг. ДДТ оказался высокоэффективным средством борьбы со многими насекомыми вредителями. Как и другие хлороорганические соединения, он оказывает парализующее действие на нервную систему и выщипывает (кан) насекомых. К наступлению времени синтеза появились и широко применяются другие хлороорганические соединения, такие как ялдрин, алдрин, элдрин, диндан, гамма-бензен.

Еще один класс химических инсектицидов — фторорганические соединения, включающие малатион, паратион и димлатион. Фторорганические инсектициды первого поколения были разработаны как боевые отравляющие вещества. Теперь их используют для контроля численности насекомых. Их действие основано на ингибировании ацетилхолинстеразы, которая гидролизует нейромедиатор ацетилхолин. Инсектициды этого класса нарушают функционирование мотонейронов и нейронов мозга насекомых.

В США в начале 1960-х гг. химическими инсектицидами обрабатывались около 50 млн. га

сельскохозяйственных угодий. Примерно в это время было показано, что хлороорганические (в большей степени) и фторорганические (в меньшей степени) инсектициды оказывают вредное воздействие на человека, животных и экосистемы. Это воздействие может проявляться немедленно или спустя длительное время. Хлороорганические соединения (в частности, ДДТ) сохраняются в окружающей среде от 15 до 20 лет и накапливаются по мере отравляющих концентраций. Биологическая активность инсектицидов в жирных тканях многих организмов уже привела к глубоким последствиям. Так, в Северной Америке были практически истреблены многие виды птиц: сапсаны, истребитель-перелетчик, белоголовые орланы, бурные пелляны, ушастые бакланцы.

Со временем основные насекомые-вредители становились все более устойчивыми ко многим химическим инсектицидам, и это привело к тому, что в 1950-х гг. для контроля численности пришлось использовать более новые инсектициды — инсектициды. Кроме того, было показано, что химические инсектициды действуют не избирательно, т. е. наряду с насекомыми-вредителями они уничтожают и полезных насекомых, а в некоторых случаях гораздо эффективнее уничтожают естественных врагов насекомых-вредителей, чем самих вредителей. Значит, это привело к весьма неожиданным результатам: обработка вызвала увеличение численности насекомых-вредителей.

С учетом этих же последние 20 лет проводились интенсивные поиски альтернативных способов контроля численности насекомых-вредителей. Прежде всего исследователи обратились к

природным инсектицидом, синтезируемым различными микроорганизмами и растениями. Дело в том, что эти соединения, как правило, высокомолекулярны и подвержены быстрой биодеградации, поэтому устойчивость к ним вырабатывается медленно. В совокупности они не очень эффективны, а их применение обходится дорого, что ограничивает возможность их широкого применения. Есть надежда, что все эти проблемы удастся решить с помощью генетически рекомбинированной ДНК. Теперь для увеличения эффективности микробиологическая инсектицидная нуклеокапсия может привнести манипуляции с геном, которые кодируют на биосинтез. В частности, речь может идти о генно-инсектицидном, вырабатываемых бактерией *Bacillus thuringiensis* или *Baculovirus* насекомых; эти инсектициды безопасны, специфичны и весьма эффективны.

Рядом пестицидов огромной известности мы не имеем преимуществ на всем мире ежегодно расходуется более 20 млрд долларов, и эта цифра быстро растет. При этом на долю биопестицидов, главным образом инсектицидов *B. thuringiensis*, приходится всего 1% этой суммы, но по прогнозам дальнейшим приростом в этой области будет связан именно с биотехнологиями.

Токсины, синтезируемый *Bacillus thuringiensis*

Механизм действия и использование

Все «микробные инсектициды» можно разделить на микроорганизмы, либо синтезирующие либо-либо естественное вещество, либо выделяю-

щееся на определенных насекомых, либо инфицирующим насекомое мышью и при этом и его гибели. Наиболее изучены, наиболее эффективны и наиболее часто используются микробные инсектициды бактерии *B. thuringiensis*. Они представляют множество штаммов и пептидов (ципр.) и различия между синтезируют токсины, специфичным в отношении определенных насекомых (табл. 15.11). Например, *B. thuringiensis* ципр. *Ausubel* токсичен для личинок чешуекрылых (в том числе мотыль и бабочек), для личинок толстоножки, мотыль и личинки листовертки и почкоядя сморок *B. thuringiensis* ципр. *slendy* уничтожает двукрылых: комаров и мушек. *B. thuringiensis* ципр. *paterson* токсичен для личинок жуков (тоже и жесткий как для *Agrotis* эффективен и отравлении жесткокрылых, в том числе короедского жука и злокомого долгоносика. Ципраны и другие штаммы *B. thuringiensis*, каждый из которых токсичен для определенных насекомых.

Инсектицид (белковый токсин) *B. thuringiensis* ципр. *Ausubel* и других штаммов находится в кристалле и имеет так называемую кристаллическую структуру, которая образуется во время споруляции бактерий. Такая особенность биологической функции эта структура не несет. После дождя прикормится от 20 до 30% суходомов споруляющих сульфидов и системы она главным образом из белка (95%) и некоторым количеством углеводородов (5%) кристалл — это по своему делу имеет белковый агрегат, диссоциирующий на сульфидины и свободный пептид. Сульфидины можно более диссоциировать и это обработкой в меркаптиданольном растворе

Таблица 15.11. Некоторые свойства инсектицидных токсинов, синтезируемых штаммами *B. thuringiensis**

Штамм <i>B. thuringiensis</i> и его название	Актин	Молекулярный вес	Пестицид-целевые	Ссылка
<i>ausubel</i>	Cy1B	130-140	Чешуекрылые	1
<i>ausubel</i> 6, 7C5, 81C1	Cy1I	120-130	Чешуекрылые	2
<i>paterson</i> 4-30	Cy1I	130-140	Чешуекрылые	6
<i>paterson</i> 7-20	Cy1I	130-140	Чешуекрылые	1
<i>paterson</i> 1C-1	Cy1I	120	Чешуекрылые, жесткокрылые	7
<i>paterson</i> 11C1-1	Cy1B	71	Чешуекрылые, жесткокрылые	3
<i>paterson</i> 10C1-10C10	Cy1B1	66-71	Чешуекрылые	8
<i>paterson</i> 1C1-1	Cy1B	125-145	Чешуекрылые	8
<i>paterson</i> 10C1-10C10	Cy1B	66	Двукрылые	14

*1982. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 20-31. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0884\(82\)90011-9](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0884(82)90011-9)

видов. *Aspergillus*, прочие всего и избежать, а ни ограничить применение данного микроорганизма (полезными условиями). Парочем, имея в виду масштабы использования *A. fumigatus*, нельзя исключать, что может возникнуть его накопление в среде и количестве, эстетичном для того, чтобы отсутств. в присутии человека отброс. А поскольку *A. fumigatus* используется все более широко в разных регионах, вероятность появления популяции устойчивых насечочка будет увеличиваться.

Идентификация генов токсинов

Для выделения генов *A. fumigatus*, более эффективно сине спрундрх носек гарида и выделенных микробов круп. тожен, нужно было идентифицировать и охарактеризовать (ген) протоксин, и в первую очередь выяснить, где они локализованы: в плазмиде или в хромосомной ДНК. Чтобы проверить наличие плазмидной локализации, штамм *A. fumigatus* продуцирующий токсин, можно комбинировать со штаммом, не обладающим инсектицидной активностью. Передача хромосомной ДНК во время конъюгации происходит крайне редко, а если «дефектный» штамм приобретает способность синтезировать инсектицид, значит, токсичные гены локализованы в плазмиде.

Для идентификации генов, кодирующих протоксин, используют обычную методику. *A. fumigatus* выращивают в культуре и инжируют клетки. Выделенный суммарную клеточную ДНК и центрифугируют ее в градиенте плотности CsCl, чтобы разделить плазмидную и хромосомную ДНК. Если гены протоксина входят в состав генома, содержат банк клонов хромосомной ДНК. Если же они содержатся в плазмиде, то плазмидную ДНК фракционируют по размеру центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Это обеспечивает ту плазмидную фракцию, которая послужит в дальнейшем исходным материалом для идентификации генов протоксина (рис. 15.3).

Ген протоксина *A. fumigatus* имеет длину 2,0, 7,4; 7,8; 8,2; 14,4, 45 и 71 г. н. н. Чтобы определить, в какой именно, проводили центрифугирование плазмидной ДНК в градиенте плотности сахарозы. Были выделены три фракции, в кото-



Рис. 15.3. Выделение и фракционирование плазмид, кодирующих протоксин у *A. fumigatus*.

рых концентрировалась малая (2,0 г. н. н.), средняя (7,4; 7,8; 8,2 и 14,4 г. н. н.) и большая (45 и 71 г. н. н.) плазмиды. Малые плазмиды из рассматриваемой культуры не способны кодировать белок молекулярной массой 130 кДа. Длинная углеводородная последовательность, кодирующая белок такого размера, должна превышать 4,1 г. н. н. Средняя и большая плазмиды кодируют часть гидрофобной рестриктазы *NotI*, кодирующей белок такой же массы, а также часть рестриктазы *NotII*, кодирующей белок такой же массы. Полученными рекомбинантными плазмидными трансформантами клеток *E. coli* в штамм протекли иммунологический скрининг по следующей схеме:

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Клонирование и экспрессия гена, кодирующего токсин *Bacillus thuringiensis*, в *Escherichia coli*

M. C. Schnepf, H. M. Whitley

Proc. Acad. Sci. USA 78: 2093-2097, 1981

Уже давно известно, что паразитирующий в клетках кристалл, образующийся в споры *B. thuringiensis*, состоит из инсектицидной зентенина, который привносит в клетки токсичность, гораздо чем бацилла способна усвоить в естественных условиях и выделяет в виде белковой жидкой кислоты. Кроме того, он то белок обнаружены антигены *B. thuringiensis* не способные образовать паразитирующие кристаллы, являются эффективной иммуногенной трансформации, когда Шенф и Уайтл решили клонировать токсигенные гены *B. thuringiensis* и привнести их

к анти-сериуме трансформантов *E. coli*, используя ДНК *B. thuringiensis* и, с помощью ампуляции и трансформации с использованием антигена в целом кристаллу, или путем использования токсигенной активности «инструментов трансформации». К тому времени были известны некоторые результаты на то, что гены токсина кодируются в том числе, поэтому токсин выделяется и ферментациями, а также антигенами, которые кодирует гены. Было установлено, что токсин является токсичным, что антиген является токсичным, в котором белковые молекулы зентенина являются

то не учитывать существенным подобию инсектициду кристалла, и, следовательно, токсичным, поэтому сами белки, однако, тоу проблеме удалось решить. В работе Шенф и Уайтл описаны трансформанты *E. coli*, которые несли тоу токсин *B. thuringiensis* и были токсичны и иммуногенны, следовательно, белки кодирует. Клонирование генов токсина *B. thuringiensis* велось полагая, что эти гены достаточно легко можно извлечь, и (используя) сформировать белки зентенина и антигены *B. thuringiensis* и в исследовании белковых белков инсектицидов.

информации и в *B. thuringiensis* и в *Escherichia coli*. Затем также генетические конструкции основаны на информации в *B. thuringiensis* и на *lacZ*, *lacY*, *lacA*, *lacZ* и *lacX*. Токсичность полученных трансформантов штаммов (проверили на личинках трех видов насекомых).

Во всех случаях токсичность, обусловленная белком существенным мизерным токсигеном (геном), кодируемым, а в большинстве случаев введенный ген обуславливал специфичность токсического действия, характерную для штамма, откуда он был выделен (табл. 15.2). Кроме того, один из маркеров для штамма уже удивительный результат, при введенном геном токсина *B. thuringiensis* штамм *lacZ* и *lacY* в *B. thuringiensis* штамм *lacZ* и *lacY* получили трансформанты, в какой-то степени токсичные для *Pieris brassicae* (капустница белая), но которые не действовали ни один из продуктов белковых генов.

Плasmидные векторы, несущие клонированные *su*-гены, часто оказываются нестабильными в *B. thuringiensis* даже в отсутствие селективного давления, все они или их часть утрачиваются. Интересно, что при этом в природе большинство

структур локализуемых токсинами в плазмиде. Неустойчивость плазмиды еще раз убеждает в целесообразности информации и информации о генах (геном) с хромосомной ДНК. Рассмотрите один успешный пример такой информации.

Таблица 15.2 Токсичность трансформантов реальных штаммов *B. thuringiensis* для насекомых *Pieris brassicae* (капустница), *Aedes aegypti* (комар) и *Phaenicia sericeipalpis* (жук)¹⁾

Замещающий штамм	Носитель ДНК	Зачисленность яиц ²⁾		
		<i>Pieris</i>	<i>Aedes</i>	<i>Phaenicia</i>
<i>lacZ</i>	Нет	—	+	—
<i>lacY</i>	Нет	—	++	—
<i>lacA</i>	токсичный	++	++	—
<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>	+	—	—
<i>lacZ</i>	Нет	++	+	—
<i>lacZ</i>	токсичный	—	+	++
<i>lacZ</i>	Нет	—	—	++
токсичный	токсичный	++	+	+

¹⁾ *B. thuringiensis* (штамм 01) и *B. thuringiensis* (штамм 15) (15, 1980).

²⁾ *Pieris brassicae* (капустница) и *Aedes aegypti* (комар) — 50 яиц на 50 личинок (для *Pieris* и *Aedes*); *Phaenicia sericeipalpis* (жук) — 50 яиц на 50 личинок (для *Phaenicia*). * — токсичность на 50 яиц на 50 личинок; ++ — токсичность на 50 яиц на 50 личинок; + — токсичность на 50 яиц на 50 личинок; — — нет токсичности на 50 яиц на 50 личинок. Токсичность определяется по количеству погибших личинок (для *Pieris*) и по гибели яиц (для *Aedes*).

Штамм *B. anthracis* штамт *Ames* обычно содержит пять разных генов токсина: *stx1A* (a), *stx1A* (b), *stx1A* (c), *stx1A* и *stx1B*. На продукты токсинов для ряда млекопитающих, но не эффективны против *Xeroderma* spp. В результате ДНК штамма *B. anthracis* штамт *Ames* встраивают ген *stx1C*, обычно присутствующий только у *B. anthracis* штамт *oidalis* и штамт *glaciostabilis*. Трансформированный штамм *B. anthracis* штамт *Ames* был в шесть раз более эффективен в отношении личинок *Xeroderma* *exilis*, чем штамм дикого типа.

Как мы уже говорили, другой способ получения токсина широкого спектра действия состоит в слиянии кодирующего участка гена двух разных токсинов. Эта возможность была проверена в лаборатории, были созданы несколько гибридных токсинов, действующих только на млекопитающих; некоторые из этих токсинов были более эффективны, чем продукты каждого из исходных генов, в данном случае гибридный белок обладал абсолютной новой биологической активностью.

За токсическое действие белка *Stx* отвечает ген домена I, локализованный в N-концевой области белковой молекулы, обеспечивает специфические взаимодействия с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток кишечника млекопитающего. Домен III, расположенный в C-концевой области молекулы, предположительно и отвечает за токсичность. Устойчивость к токсинам *B. anthracis* обычно обуславливается мутационным и изменением (из-

менением) рецепторного белка (белков) на поверхности клеток кишечника млекопитающего, приводящим к тому, что рецептор перестает узнавать *Stx*-белок. Однако, если модифицировать ген токсина так, чтобы токсин мог связываться с другими поверхностными белками, то первоначальная измененная устойчивость уменьшится.

Белки *Stx1C* и *Stx1E* токсичны для млекопитающих, но обладают разной специфичностью: *Stx1C* действует на *S. edwardsi*, *Mastomys natalensis* и *Mastomys natalensis*, в то время как *Stx1E* - только на *M. natalensis*. В одной из лабораторий был создан гибридный белок *Stx1C-Stx1E*, токсичность которого проверялась на разных животных. Была исследована также его способность связываться с различными рецепторами (рис. 15.5). Гибридный токсин G27, содержащий домен III белка *Stx1C*, был токсичен для личинок *X. exilis* хотя связывался только с *Stx1E*-рецептором, но не с рецептором *Stx1C*. И наоборот, гибридный токсин F26 не оказывал действия на личинок *X. edwardsi*, хотя и связывался с *Stx1C*-рецептором. Поскольку токсичные для *S. edwardsi* белки *Stx1C* и G-27 связываются с разными рецепторами на поверхности клеток кишечника млекопитающих, одновременная или попеременная обработка *X. edwardsi* этими токсинами может уменьшить вероятность появления устойчивости к ним у личинок, поскольку для этого необходимо, чтобы мутационные изменения привели одновременно к двум разным белкам.

Рис. 15.5. Взаимодействие белков *Stx1C*, *Stx1E* и гибридных токсинов G27 и F26 со специфичность их связывания с рецепторами. Специфичность связывания определяется взаимодействием (или взаимодействием) токсина с рецептором. К взаимодействию белковой рецептора на поверхности клеток кишечника *X. edwardsi* и соответственно изменениям токсина относятся метки для *Stx1C* или *Stx1E* и определяли связывание метки токсина (Н. Гурбоу *et al.*, *BioTechnology* 12: 915-918, 1994).



Инактивация, продуцируемый *B. thuringiensis* штамм *Beauveria*, превращает свои токсические свойства, когда он попадает в конечную личинку комара. Если же этот токсин, введенный в виде трансформированного кристаллического тела, то кристаллы быстро утонули, и токсин будет неэффективен на личинку (цена личинок комара). Чтобы решить эту проблему, можно ввести ген токсина в организм, который служит пищей для личинок комара. Это может быть, например, фотосинтезирующие цианобактерии *Lyngbyella* и *Synechocystis* spp., которые размножаются в поверхностных слое воды, где доминируют солнечного света и где обычно обитает личинка.

Еще один организм, который можно использовать для экспрессии генов токсина *B. thuringiensis*, бактерия *Saccharomyces cerevisiae*, широко распространена в водной среде, где живут личинки комаров. Инактивация, синтезируемая трансформированными рибонуклеазными или *S. cerevisiae*, в лабораторных условиях была использована для личинок комара. Однако в полевых условиях трансформированные рибонуклеазы не *S. cerevisiae* быстро отмирали, и уровень экспрессии клоноидными линиями был очень низким.

В качестве альтернативной системы для поддержания, кодирования токсичных для комаров белков, можно использовать такие грамотрицательную аэробную бактерию *Agrobacterium tumefaciens*, обитающую у поверхности водоемов. Были проведены эксперименты, в которых *A. tumefaciens* трансформировали плазмидным вектором с шпичками крутом хвоста, который код ген белковых токсинов *Bacillus thuringiensis* (бактерия, аналогичная *B. thuringiensis*). Гены (находясь под контролем промотора *lacI*, успешно) интродуцированы в промотор. Полученный трансформант синтезирует белковые токсины мол. массой 51 и 92 кДа и был практически столь же токсичен для личинок комаров *Anopheles* и *Culex*, как природные микроботоксичные штаммы *B. thuringiensis*. Однако в отличие от *B. thuringiensis* в случае с *A. tumefaciens* не возникало проблем, связанных с размножением под микроскопом. Кроме того, культивирование *A. tumefaciens* обходится гораздо дешевле, поскольку этот микроорганизм растет на более простой среде, чем

B. thuringiensis и *B. thuringiensis*. Для него характерно только присутствие активности, так что токсин не экспрессируется немедленно без индукции. *A. tumefaciens* образует адвансированную и таким образом, как и в случае с *B. thuringiensis*, имеет способность УФ света. Однако, прежде чем применить трансформированные бактерии *A. tumefaciens* для контроля численности комаров и при этом учитывать, необходимо убедиться, что патогенные токсины не содержат инвазивности, детерминирующей способность к патогенности.

Инактивация, продуцируемая *B. thuringiensis*, при их нанесении на листья в виде неактивных на насекомых, покрываемых корнями растений. Чтобы избежать эту трудность, можно ввести ген токсина *B. thuringiensis* в тот же организм, что и для бактерий, которые обитают в слое почвы, не взаимодействуя непосредственно с насекомыми (или сферой). Такие ризобактериальные бактерии, находясь в почве, будут секретировать инактивированный токсин прямо в ризосферу и попадать в корни насекомых уже в почве, и таким образом они смогут проникать. Это ускорит эффективность микроинъекции растений биологическими или химическими инсектицидами.

Ген токсина *B. thuringiensis* штамм *kurstaki* был вставлен в плазмидную ДНК штамма *Pseudomonas fluorescens*, который обитает в почве на корнях кукурузы, следующим образом (рис. 15.6)

1. Трансформант Tn5 встроился в плазмиду и тем самым модифицировал его левую и правую фланкирующие последовательности и удалил ген трансферазы. Такой модифицированный трансформант не может вырваться из плазмиды даже с помощью экзогенной пилосомы.
2. Ген токсина *B. thuringiensis* штамм *kurstaki* встроился в середину модифицированной трансформант Tn5 так, чтобы он находился под контролем конститутивного промотора.
3. Трансформант Tn5 встроился в хромосомную ДНК штамма *P. fluorescens*, обитающего на корнях.
4. Плазмиду, несущую модифицированный трансформант Tn5 со встроенным токсином, ввели в бактерию с хромосомной ДНК которой был встроены трансформант Tn5 прямо в почву.

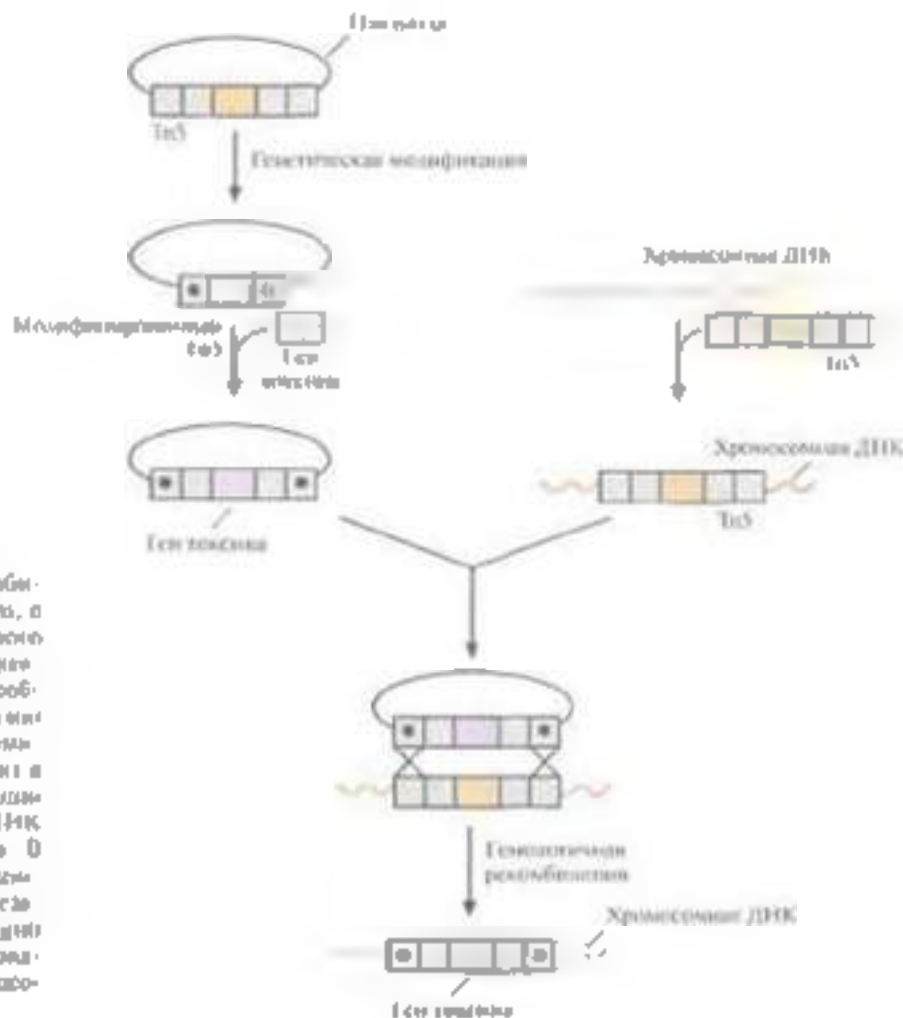


Рис. 15.6. Получение рекомбинантного штамма *P. fluorescens*, в хромосомной ДНК которого встроены ген токсина *Stx2* и ген устойчивости к тетрациклину. В результате генетической модификации в плазмиде Tn5 были встроены ген токсина *Stx2* и ген устойчивости к тетрациклину. В результате генетической модификации в хромосомной ДНК встроены ген токсина *Stx2* и ген устойчивости к тетрациклину. В результате генетической модификации в хромосомной ДНК встроены ген токсина *Stx2* и ген устойчивости к тетрациклину.

5. Осуществивши плановую рекомбинацию с помощью двойки краунтин-перо между не способным к транскрипции Tn5 элементом, несущим ген токсина, и «плавающим» транспоном Tn5 длиной 1000, интегрированным в хромосому. В результате интеграции элементарного транспозона Tn5 с геном токсина оказался встроены в хромосомную ДНК, а транспоны Tn5 длиной 1000 были заминированы.

В таком виде ген токсина при нем утрачивается при естественном мутационном раскомбинировании микроорганизмов в лабораторных

условиях или даже не передается в окружающей среде. Кроме того, переносить (передать) токсин (или другим функциями) в окружающую среду очень трудно. Как показали предыдущие исследования, рекомбинантный штамм *P. fluorescens* токсичен для личинок бляшки. Теперь планируется проверить способность штамма рекомбинантного микроорганизма выживать, выдерживать стрессовые условия (высокая температура, низкая влажность) в окружающей среде.

Гены токсина *P. fluorescens* вводили в хромосомную ДНК с помощью микроинъекции Tn5, гена *su/A (c)* были встроены в ДНК *P. fluorescens*, которые являются растущими со

характерно присутствие от *Edmon kaschabana* Трикс. Формирует этот генем бактерия *Clavibacter* дубинкер «*glaberrimus*», образуя симбиозом в виде миеофермы в ткани, приводит к тому, что рекомбинантные бактерии приобретают способность «защиты» растений кукурузы от мотылькой кукурузника (*Diurina nubilalis*)

Бакловирусы как инструменты биоконтроля

Мелонидеи добывают

Бакловирусы — это очень обширные вирусы с двойной цепочкой ДНК геномом, инфицирующие ретикулярные беспозвоночные. Различные подгруппы этого семейства патогенны для таких животных насекомых, как чешуекрылые, перепончатокрылые, двукрылые, сетчатокрылые, ружейники, жесткокрылые и ротовые. Немногие из этих вирусов способны жить в организме человека и животных насекомых-вредителей в природных условиях. Бакловирусы известны только в Северной Америке, начиная с 1930 г. и, достигая своего химического пика в 1960 г. и., до борьбы с вредителями лесов, в том числе с пильчатыми шелкопрядом (*Panorpa nebulosa*), и в то время этот препарат, хотя и в меньшем масштабе, для контроля пильчатыми шелкопрядом (*Limonium abarum*) (табл. 15.1).

Вирус бакловируса имеет (типично) ретровирусную структуру, в которой характерно его ДНК. После в ядро инфицированной клетки, баклови-

русные частицы объединяются, образуя мультимерную структуру, заключенную в белковую оболочку. Она состоит в основном из белка подкариона. После гибели инфицированной насекомого в среду выходят миллионы подкарионов (частиц). Подкарион в конечном итоге (особенно), если подвергается воздействию внешней среды, активно растворяется и высвобождается инфекционный вирусные частицы. Они проникают в клетки конечных насекомых, через интродукцию попадают в ядро, где после явления репликационной активности реплицируют вирус и образуют новые вирусные частицы. Некоторые из них попадают в организм насекомого, инфицированного от (главным образом) интродукции инфицированных клеток, в ядро и в другие органы. Обычно инкубационный период по времени 10 раз больше реплицируемого вируса, т.е. примерно через 5–6 сут после инфицирования, при этом до 25% клеток насекомого принадлежат из доля пола вируса.

Одно из преимуществ бакловирусов как инструментов биоконтроля заключается в том, что они являются биологически безопасными. С одной стороны, это означает, что данный бакловирус может использоваться для контроля численности только определенных насекомых вредителей. Но с другой, благодаря тому, что бакловирусы эволюционировали в течение многих тысяч лет совместно со своими насекомыми хозяевами, они научились преодолевать не только такие механизмы, в основном устойчивость к этим вирусам (поэтому крайне редко поражаются, чем в *B. thuringiensis*). Более того, устойчивость к бакловирусам насекомые быстро утрачивают из-за способности после того, как прекратились их репликация в вирусах.

Фермеры и садоводы предпочитают использовать один инсектицидный агент, действующий на различных насекомых-вредителей, в том числе и на насекомых-вредителей. Это означает, что для более широкого применения бакловирусов необходимо разработать вирус, который способен пораждать сразу из нескольких.

Было показано, что при одновременном инфицировании клеток насекомого двумя различными бакловирусами после их репликации иногда образуются новые штаммы, имеющие способность на своем действии от нескольких вирусов. Прямой этому фактору является комбинация

Таблица 15.1. Некоторые насекомые-вредители, для контроля численности которых применяются бакловирусы

Название насекомого	Виды насекомых-хозяев	Растения
<i>Chrysomelid beetle</i>	Насекомые-вредители растений	Соя
	Насекомые-вредители	Широколиственный липовый лист
<i>Heliothis</i>	Соя, хлопчатник	Липовый лист
<i>Lygus rufidorsatus</i>	Мелонидеи	Листья и плоды
<i>Trioxys ruficornis</i>	(Пильчатый шелкопряд)	Грибы и фрукты, овощи
<i>Trioxys ruficornis</i>	Соя	Кукуруза
<i>Trioxys ruficornis</i>	Жук-щелкун	Камелия

ния рекомбинация между ДНК разных вирусов. Детальное изучение *любо* инфекции вновь стало, что рекомбинация осуществляется и при этом учитывается ДНК длиной всего 29 нуклеотидов, расположенного в гене гелицина р143. Возможно, этот участок и определяет круг хозяев (различных бакуловирусов). Учитывая все это, можно предположить, что именно в этом неслучайно нуклеотидной последовательности (специфичности) с высшей точкой специфичности.

Усиление биоконтроля с помощью генной инженерии

Бакуловирусы не оказывают своего действия моментально. В зависимости от условий инфицирования выделение может активировать от терминировать дней до нескольких недель. Чтобы ускорить этот процесс, попытались увеличить вирулентность бакуловирусов, основанном в них суперинфекция генов, в результате гиперинфекции происходит ослабление инфицированной насекомыми или его (табл. 15.4). В целом эти экспериментальные предположения исполняемых ген, надпроектирование и вставки искусственно созданных вирусов его нормальным для вирусной ядра.

Известно, что понижение уровня количественного содержания у личинок интенсифицирует охватами и приводит к прекращению их активности питания. Это снижение происходит в результате оповещения суперинфекция специфическими эстеразы, катализирующей превращение (молекулярно активной формы) сложного метильного эфира ювенильного гормона в неактивную форму.

Таблица 15.4. Эффект ингибирования активности бакуловирусы для насекомых на интродуцированной личинки*

Примеры ген	Влияние, направленное на развитие личинки
Дигуанилатный гормон <i>Dejardinia</i> в форме генов в суперинфекции	Увеличение числа личинок
Ген <i>W. blattellae</i> в форме суперинфекции	Понижение
Клеточный геном	Понижение
Токсин <i>gels</i>	Понижение активности личинок, увеличение продолжительности жизни

* Методы Метод. Сит. Сит. *Journal* 8: 315-319, 1992

формы. Ингибирующие возможности эстеразы проявляют в зависимости от того активного количества гормонов, личинок которые остаются на стадии активного питания и в результате достигают физиологического размера. Разумно было предположить, что при искусственном повышении уровня ингибирования ювенильного гормона происходит ингибирование уровня активности личинки и прекращение питания. К тому же было известно, что при уменьшении времени активного питания личинок уродливо шло бы меньше ущерб.

Чтобы проверить это предположение, пришлось сначала провести эксперименты по квантификации и экспрессии гена эстеразы ювенильного гормона. Фермент выделили из насекомых *Heliothis virescens* (соевая) и синтезировали Сиринезин с помощью синтетической последовательности, синтезированной синтетическими методами, синтезировали синтетический, соответствующий участку и сегментов белковой молекулы, и использовали его в качестве матрицы для гибрида. Из библиотеки cДНК *H. virescens* выделили кодирующую последовательность для эстеразы ювенильного гормона и встроили ее в вирус бакуловируса так, чтобы она находилась под контролем вирусной контрольной системы. После обработки таким рекомбинантным бакуловирусом *Trichoplusia ni* (капустная белячка) происходит на первой личиночной стадии развития, характерные ювенильного гормона у насекомых (субитика), в рост личинок резко замедляется по сравнению с личинками контрольных личинок, обработанных бакуловирусом другого типа.

К сожалению, применимость *любо* метода для повышения эффективности инсектицидного действия бакуловирусов ограничивается тем, что улучшение питания личинок при равном уровне ингибирования ювенильного гормона происходит на первой стадии развития личинок. Личинки, находящиеся на первой стадии развития, гораздо менее чувствительны к обработке бакуловирусом. Такие барьеры, бакуловирусы, специально сконструированные для ингибирования гена эстеразы ювенильного гормона, эффективны лишь тогда, когда личинки большей частью инкупируются искусственно-артифициально на первой стадии развития, что и естественно улавливая формы непродуктивности.

Другой подход к повышению эффективности инсектицидных пестицидов заключается в использовании вирусовой генной инженерии и экспрессии специфичных токсинов, которые экспрессировались бы на время цикла вирусной инфекции. В одной из штаммов бакуловируса была введена ген токсина бактериального происхождения, синтезируемого североафриканским скорпионом, *Androctonus leucotis* Nestor. Этот нейротоксин не оказывает никакого действия на членики, блокирует транспорт ионов натрия и калия на насекомых-мишени, что приводит к параличу и смерти. Известные, конечно были инфицированы бакуловирусом, несущим ген нейротоксина скорпиона, повреждая листья лабораторных растений на 50% меньше, чем насекомые, инфицированные бакуловирусом другого типа.

Клонирование и экспрессия генов вируса паразитического дельты скорпиона, *Deltaus digitatus hebraeus*, в бакуловирусе *Autographa californica* привело к уменьшению времени, которое необходимо для уничтожения 50% личинок контрольного насекомого, со 120 до 78 ч. Кроме того, через 120 ч после инфекции личинки насекомого, обработанные рекомбинантным вирусом, выбирали более меньшим числом сравнительно с личинками, обработанными вирусом другого типа. Таким образом, рекомбинантный бакуловирус не только ускорял гибель инфицированных личинок, но и существенно уменьшал способность насекомых повреждать растения.

На сегодняшний день рекомбинантный бакуловирус *A. californica*, продуцирующий насекомых-специфичный нейротоксин *Androctonus leucotis*, был протестирован в полях зерновых. В проведенных ранее лабораторных экспериментах наблюдалось уменьшение времени, необходимого для уничтожения насекомого 7 кл. на 25–50%, но еще больший эффект ожидали рекомбинантный бакуловирус и комбинированная обработка (рис. 15.2), он быстрее прививал к гибели насекомых, снижал ущерб, причиняемый растениям капусте, сократил число вредителей в следующем цикле репродукции.

Каким бы эффективным ни оказалась бы инсектицидная рекомбинантный бакуловирус и



Рис. 15.2. Выживаемость личинок 7 кл. после обработки листьев капусты бакуловирусом дельты или рекомбинантным бакуловирусом, экспрессирующим ген нейротоксина скорпиона. На инфицированных растения инсекция проводилась личинками 7 кл. Чем выше выживаемость, тем больше личинок погибло и тем больше эффективность обработки. Растения обрабатывали бакуловирусом (средняя одна раз) и через несколько дней

лабораторных экспериментах, основным препятствием на пути его широкомасштабного применения является высокая стоимость его производства и трудности распространения бакуловирусы — это обычные гарантии, они могут размножаться только в живом организме или в культуре клеток насекомого. Стоимость производства бакуловирусов, как минимум от 1000, выделяет вирус рекомбинантным методом, гораздо выше, чем химическим инсектицидом. И тем не менее не исключено, что биологические инсектициды найдут более широкое применение, если учесть, какие неблагоприятные воздействия на окружающую среду оказывают химические инсектициды, и если сопоставить их стоимость и выгоду, которую они дают.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние время микробиологические инсектициды включают все более широкое распространение благодаря тому, что они не оказывают вредного воздействия на окружающую среду. Несмотря на обилие бактерий *Bacillus thuringiensis*

ли образуют пептиксыны, которые, появившись в клетках насекомых и угнетив их мембранную среду и под действием (интегральных протеинов) преобразуются в активный токсин и вызывает гибель насекомых. Металлоидное действие токсины обуславливается образованием в мембранах клеток катионных ионных каналов, через которые АТФ выкачивается из клетки. Это приводит к нарушению метаболизма, прекращению питания, деактивации и т.д. Токсины *B. thuringiensis* высокоспецифичны в отношении ограниченного числа видов насекомых и метостабины для всех остальных: они разрушаются в окружающей среде и поэтому редко оказывают вредные влияния на нее, что не способствует отбору устойчивых к ним насекомых. Благодаря всем этим свойствам биологические инсектициды являются перспективными кандидатами на роль пестицидов, с помощью которых можно контролировать численность насекомых, причиняющих ущерб сельскохозяйственным культурам, и насекомых-переносчиков болезней человека.

Контроль численности насекомых генно-различных токсинами *B. thuringiensis*. Одним из первых токсинов был введен в массовую циркуляцию штамм *Beauveria*. При этом ген экспрессировался он в клетках растений микроорганизма, в не только не снижал урожайности спор, когда формируется микроспоральный кристалл.

Чтобы расширить специфичность токсины *B. thuringiensis*, гены различных токсинам встраивали в плазмиды и вводили в конъюктивный контакт либо в составе плазмиды с вирусом другой жигеки, либо путем интеграции в эукариотическую ДНК клетки-хозяина: бактерии, несущие два разных токсинных гена, имеют исключительно токсичными для одного то третьего вида насекомого-органителя, а не только для тех двух видов насекомых, на которые действуют их продукты входящих генов. С помощью генетической манипуляции была создана рекомбинантный белок, состоящий из двух доменов, кодируемых разными генами *B. thuringiensis*. Он оказался более токсичным действие. В ходе другого эксперимента рекомбинантный белок однократно был объединен с обладающим токсичностью доменом другого вида насекомого, что привнесло только отборных

уменьшил вероятность появления устойчивых насекомых.

Гены токсинов *B. thuringiensis* вводили также в различные штаммы в инверсионном случае в виде микропрямых, которые служат основой для дичных культур. Этот подход оказался весьма эффективным для прямой доставки токсинов *B. thuringiensis* в организм насекомого-хозяина. Генноинженерными методами были созданы также бактерии, обитающие в ризосфере и экспрессирующие гены токсинов *B. thuringiensis*. Это позволяет бороться с насекомыми, повреждающими корни растений.

Бактериофаги перспективны для борьбы с вредными насекомыми, но каждый из них специфичен в отношении большинства видов насекомых. Обычно гибель инфицированного насекомого происходит лишь спустя довольно длительное время, поэтому бактериофаги не очень эффективны как средство контроля численности насекомых. Однако в различных штаммах бактериофагов можно ввести специфические гены, и тогда вирус может действовать как система доставки гена, обеспечивающего синтез инсектицида в течение всего жизненного цикла вируса. Проведены предварительные испытания в лабораторных условиях, которые дали положительный результат. Кроме того, в бактериофаг была введен ген нейротоксина, смертельного для насекомых, и были проведены полетные испытания.

ЛИТЕРАТУРА

- Aranda Kumar P., R. P. Sharma, V. S. Shah, 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 1-47.
- Baum J. A., T. Malvar, 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 19: 1-17.
- Chen H., B. H. Han, 1992. Development and potential of genetically engineered insecticides. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 10: 455-489.
- Irwin D., B. Schaffer, H. van der Kog, R. A. de Maagd, W. J. Salekman, 1994. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for transgenic management. *Bio/Technology* 12: 915-918.

- Calogero S., A. M. Albertini, C. Fogher, R. Mattazi, A. Galizzi. 1989. Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 55: 446-453.
- Caramori T., A. M. Albertini, A. Galizzi. 1991. In vivo generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene* 98: 37-44.
- Cherjanovskiy N., N. Zuberberg, H. Riklin, E. Zilberman, M. Goertitz. 1995. Functional expression of an alpha unit-irradiation scorpion neurotoxin in insect cells and lepidopteran larvae. *FEBS Lett* 376: 181-184.
- Chungjatapornkul W. 1990. Expression of the mosquitoicidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the helicidase resistance gene *hcr* in *Synechocystis* PC(650). *Curr Microbiol* 21: 283-288.
- Cory J. S., M. L. Hirst, T. Williams, H. S. Hobb, D. Goulson, M. M. Green, T. M. Carey, K. D. Power, P. J. Cagley, D. H. I. Bishop. 1994. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* 370: 136-140.
- Crichton N., C. Nicholas, H. J. Farg, T. C. Hodgson, D. J. Elter. 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel epsilon toxin δ endotoxin combinations. *Biochem. J* 270: 133-136.
- Crozier G., I. Crozier, D. Argaud, D. Paudsiguer. 1994. Emergence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus from range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 48-52.
- Ferré J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Joensen, M. Deferon. 1991. Response to the *Bacillus thuringiensis* insecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 5114-5117.
- Fox J. R. 1991. Insect control with baculoviruses. *Biocontrol. Adv* 9: 425-442.
- Ge A. Z., N. I. Shivarova, D. H. Deam. 1989. Location of the *Bombix mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 4037-4041.
- Gebratter W., G. E. Schaub. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems, p. 89-104. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Welby, S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Hawstock B. D., B. C. Banning, R. D. Piesse, T. M. Hazell, S. Maeda. 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature* 344: 458-461.
- Held G. A., I. A. Salla, E. Ferrant, J. Hoch, A. I. Aronson, S. A. Munch. 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kerstali*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79: 6065-6069.
- Herrera G., S. J. Sajman, J. A. Herrera. 1994. Construction of a bioinsecticidal strain of *Parachanna fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 682-690.
- Kalman S., K. L. Kelme, N. Cooper, M. S. Rejman, T. Yamamoto. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol* 61: 3063-3068.
- Langel J. S., G. I. Carter, M. B. Unack, J. L. Kelly, J. J. Anderson, B. B. Uralant, J. S. Foulke, Jr., J. T. Turner. 1994. Integrative cloning, expression, and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kerstali* in a recombinant strain of *Clostracter lyli* subsp. *cyndodontis*. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 501-508.
- Letecky D., H. Agabise, M. Gombert, J. Chantoux. 1995. Overproduction of cocapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *Bio/Technology* 13: 67-71.
- Letecky D., A. Delecluse, M. M. Leclercq. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p. 37-69. In P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Welby, S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Liu J. T., M. J. Noh, D. D. Ji, J. H. Wu, C. C. Chen, C. C. Chen. 1995. Protection from ultraviolet radiation by melanin of mosquitoicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *brachinensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 131-136.

- Lim J. W., W. H. Yap, T. Thanaohab, A. G. Porter. 1996. Efficient synthesis of musquitocidal toxin in *Aspergillus terreus* demonstrates potential of gram negative bacteria in mosquito control. *Appl Biochem* 14: 343-347.
- Maeda S. 1995. Further development of recombinant baculovirus insecticides. *Curr Opin Biotechnol* 6: 313-319.
- McCutchen B. F., P. V. Choudary, K. Crenshaw, D. Maddox, S. G. Kamta, N. Padkar, S. Yalraj, E. Fowler, B. D. Hammock, S. Maeda. 1991. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect selective neurotoxin: potential for pest control. *Bio/Technology* 9: 448-452.
- Mettus A. M., A. Macaluso. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* δ endotoxin genes during vegetative growth. *Appl Environ Microbiol* 56: 1128-1134.
- Murphy R. C., E. S. Stevens. 1991. Cloning and expression of the *cryIIID* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PK-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl Environ Microbiol* 58: 1630-1635.
- Okamoto M. G., F. J. Perlak, K. Kusano-Kiritanoe, E. J. Mayer, L. S. Wauson. 1986. Tn5-mediated integration of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing pseudomonads. *J. Bacteriol* 168: 982-989.
- Okamoto M. G., F. J. Perlak, K. Kusano-Kiritanoe, E. J. Mayer, L. S. Wauson. 1986. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of pseudomonads using Tn5. *Gene* 48: 327-331.
- Priest E. G. 1992. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J Appl. Bacteriol* 72: 357-369.
- Schnepf H. E., H. R. Whiteley. 1991. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 78: 2893-2897.
- Stewart I. M. D., M. Hbet, M. L. Ferber, A. T. Merryweather, P. J. Caylor, M. D. Posner. 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect specific toxin gene. *Nature* 352: 85-88.
- Thanaohab T., J. Hindley, S. Breence, C. Oel, C. Berry. 1992. Expression of the musquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. *Appl Environ Microbiol* 58: 905-910.
- Thiry L., L. Nicolas, K. Rippla, N. Landeau de Marsae. 1991. Selection of cyanobacteria isolated from mosquito breeding sites as a potential food source for mosquito larvae. *Appl Environ Microbiol* 57: 1334-1339.
- Tombali M. D., I. K. Miller. 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a milic neurotoxin gene. *Nature* 352: 52-54.
- Van Rie J., W. H. McCaughey, D. E. Johnson, B. D. Barnett, H. Van Melanen. 1990. Mechanism of insect resistance of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72-74.
- Wood H. A., R. K. Granados. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu Rev Microbiol* 45: 69-87.
- Yap W. H., T. Thanaohab, A. G. Porter. 1994. Expression of musquitocidal toxin genes in a genetically stable *Aspergillus niger* strain. *Appl Environ Microbiol* 60: 4199-4203.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы преимущества биологических инсектицидов перед химическими?
2. Почему токсины *Bacillus thuringiensis* не токсичны для человека?
3. Какой вирус вы использовали бы для идентификации гена протеина *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*? Какое практическое применение может найти этот ген?
4. Как вы можете ген локализовать ген определяющего протеина в плазмиде или в хромосоме *E. coli* *B. thuringiensis*?
5. Как с помощью генов инсектицидов можно улучшить полезные свойства того или иного протеина *B. thuringiensis*?
6. Как, используя методы генной инженерии, повысить эффективность биологических инсектицидных штаммов?
7. Каким образом можно расширить эффективность токсинов?

8. Какую информацию вы можете получить, имея в распоряжении отряды той или иной бета-Сгу?
9. Как бы мы модифицировали бета-Сгу, чтобы уменьшить вероятность появления насекомых, устойчивых к тифину?
10. Почему бактерия *Aerobaculum examiners* является несмысленным индикатором для осуществления явной инфекции генов шельмон *A. dylardensis*?
11. Как расширить круг исследований, охватываемых данными фактотирисом?

Промышленный синтез белков при участии рекомбинантных микроорганизмов

Для получения коммерчески продукта с помощью рекомбинантных микроорганизмов необходимо сотрудничество специалистов в двух областях: молекулярных биологов и биотехнологов. Задачи молекулярных биологов заключается в идентификации, клонировании генов, модификации генов и солюбиции эффективных систем для экспрессии в клетках микроорганизмов. Многие можно будет использовать для промышленного синтеза соответствующего продукта, а задачи биотехнологов – обеспечить условия оптимального роста культуры рекомбинантных микроорганизмов с целью получения продукта с наибольшим выходом. На заре развития молекулярной биотехнологии ученые единогласно признали, что переход от лабораторного синтеза в промышленному – но вопрос увеличения масштаба, т. е. увеличения, оптимальные для малых объемов, будут оптимальными и для больших, так что достаточно просто начать с большим реактор и соответственно большим объемом культуры такой среды.

Таким упрощенное представление не соответствует действительности. Например, аэробные микроорганизмы хорошо растут в обычной колбе на 200 мл при аэрации ее содержимого с помощью мешалки мощностью 200 Вт. Если просто увеличить объем «колбы» до 10 000 литров, то потребуется мощность 15 МВт. Ее мотор будет размером с дом, а при перемешивании выделится столько тепла, что микроорганизмы попросту сварятся. Этот простой пример может не во всем убедить биотехнологов, однако они точно знают, что проблема промышленного культивирования микроорганизмов не сводится к пропорциональному увеличению масштаба лабораторного эксперимента. Конечно, увели-

чить размер реактора (биореактора ферментера) совершенно необходимо, поскольку для получения 10 000 л клеточной культуры не имеет смысла использовать 50 000 отдельных колб по 200 мл. Однако помимо этого для получения максимального выхода как в малых (от 1 до 10 л), так и в больших (>100 л) биореакторах необходимо оптимизировать множество параметров: температуру, pH, интенсивность и способ перемешивания культуры и – в случае культуры организмов – концентрацию питательной среды. При этом надо иметь в виду, что как правило оптимальные условия изменяются при каждом десятикратном увеличении объема биореактора.

Есть и другие очень важные соображения. В реакторе должен поддерживаться постоянный уровень стерильности и, кроме того, необходимо создать условия протекания процесса генетически измененных микроорганизмов. Чтобы иметь возможность быстро и легко изменить условия в ходе ферментации, реактор должен быть снабжен компьютерной и периферийной аппаратурой, позволяющей непрерывно отслеживать изменения как можно большего числа параметров. Поскольку при стерилизации может измениться состав среды (например, могут разрушиться витамины), можно убедиться в том, что он остался оптимальным для роста нужных микроорганизмов.

Как правило, промышленный ферментация и очистка продукта – процессы многоэтапные (см. рис. 16.1). Обычно ферментация осуществляется в аэрируемой и стерилизованной культуральной среде и оборудовании. Сначала выращивают исходную культуру (5–10 мл), затем инкубируют ее на питательной колбе (200–1000 мл), после



Рис. 16.1. Обобщенный вариант процесса промышленной ферментации. Выделение продукта осуществляется либо в клетках, либо в культуральной среде. Ни во втором, ни в первом случае, так что дальнейшие манипуляции проводят с одной из этих фракций.

часто используют в ферментер для посева инокулянт (10-100 л) и, наконец, в промышленный ферментер (1000-10000 л). По мере роста ферментации клетки выделяют из культуральной среды центрифугированный или фильтратив. Если продукт локализован внутри клеток, после их разрушения, удаляют клеточные осадки и высевают продукт на осевшую среду. Секретируемый продукт выделяют непосредственно из среды

Рост микроорганизмов

Микроорганизмы можно выращивать в ферментере практически в любых условиях, в ферментере берем какое-либо действие с добавлением субстрата

или в непрерывной культуре (рис. 16.2). В первом случае микроорганизмы выращивают в стерильных условиях без вмешательства в среду ферментации свежей культуральной среды. Во втором случае по ходу ферментации в культуру периодически добавляют увеличивающиеся количества питательных веществ. При этом культуральную среду не удаляют до окончания процесса. При непрерывной ферментации свежая культуральная среда поступает в ферментер непрерывно, и параллельно отводится такой же объем клеточной суспензии. Во всех случаях через среду при необходимости продувают воздух, добавляют питательные и (если это нужно) кислоты или основания

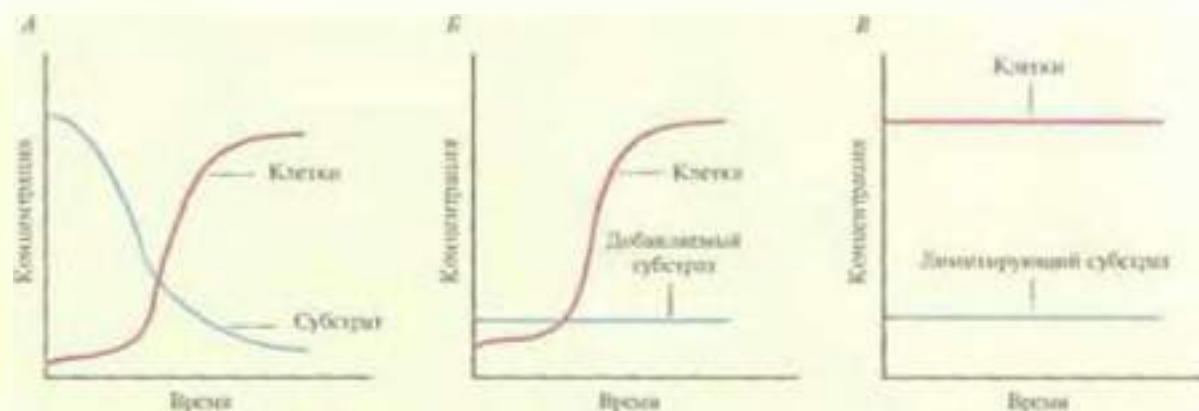


Рис. 16.2. Изменение во времени концентрации клеток и субстрата в периодической культуре (а), непрерывной культуре с добавлением субстрата (б) и в непрерывной культуре (в).

Периодическая культура

В ходе периодической ферментации состав культуральной среды, концентрация микроорганизмов (концентрация биомассы), химический состав клеток и количество безводной продукции или избыточного продукта от фазы роста, клеточного метаболизма и наличия питательных веществ. Различают шесть основных фаз роста: латентную, фазу ускорения, логарифмическую (лог), или экспоненциальную фазу, фазу замедления, стационарную фазу и фазу старения (рис. 16.3).

Обычно после инокуляции стерильной культуральной среды микробной увеличению числа клеток не подвергается. В течение какого-то периода времени, называемого лат. фазой, клетки адаптируются к новым условиям, растут pH или концентрации питательных веществ. В конце лат. фазы адаптации может произойти увеличение количества новых, ранее не проявившихся путей метаболизма. Лат. фаза называется также лат., когда посевной материал (почвенная культура), рост которой прекратился в результате истощения субстрата или ингибирования продуктом (т. е. культуры и стационарной фазы). Продолжительность лат. фазы зависит от времени, в течение которого клетки посевного материала адаптируются к стационарной фазе, и от того, как сильно различались среда, в которой росли

культуры, и новая, свежая культуральная среда. Если же посевным материалом служит культура, выращенная в экспериментальной фазе, то продолжительность лат. фазы может отсутствовать и рост начнется немедленно после инокуляции. Между лат. и экспоненциальной фазами есть короткий период, так называемый фаза ускорения, когда скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины.

Во время экспоненциальной фазы клетки претерпевают несколько делений, в удельная скорость роста остается постоянной. При до-

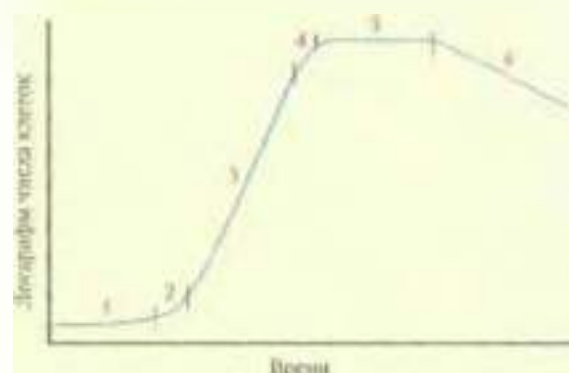


Рис. 16.3. Кривая роста бактерий в культуре при периодической ферментации. 1 - лат. фаза, 2 - фаза ускорения, 3 - экспоненциальная фаза, 4 - фаза замедления, 5 - стационарная фаза, 6 - фаза старения.

бытие субстрата (питательных веществ) и в отсутствие ингибирования роста каким-либо соединением, присутствующим в культуральной среде, удельная скорость роста не зависит от концентрации субстрата. Кривую роста при таких условиях можно описать математически, что позволяет биотехнологам моделировать процесс, а затем провести его масштабирование. Прирост клеточной массы во времени dX/dt равен произведению удельной скорости роста μ на биомассу X :

$$dX/dt = \mu X.$$

Аналогично, прирост числа клеток dN/dt равен произведению удельной скорости μ на число клеток N :

$$dN/dt = \mu N.$$

Удельная скорость μ зависит от концентрации лимитирующего субстрата (источника углерода или азота) S , максимальной удельной скорости роста μ_{max} и субстратспецифичной константы K_S :

$$\mu = \mu_{max} S / (K_S + S).$$

И S , и K_S имеют размерность концентрации (г/л или М).

Иногда вместо удельной скорости роста используют время удвоения, или время генерации $t_d = \ln 2/\mu$. Это время, за которое в определенных условиях число клеток или биомасса удваивается. Для микроорганизмов микроэтаноломเลี้ยงита μ_{max} обычно находится в диапазоне от 2,4 до 0,086 ч⁻¹, что соответствует времени удвоения примерно от 20 мин до 8 ч.

Когда субстрат присутствует в избытке (т. е. при $S \gg K_S$), $\mu = \mu_{max}$ и достигается максимальная скорость роста культуры в экспоненциальной фазе. Как правило, величина K_S настолько мала, что концентрация субстрата редко становится сравнимой с K_S во время экспоненциальной фазы. Например, в случае *Escherichia coli* K_S для глюкозы равна примерно 1 мг/л, а начальная концентрация глюкозы в среде обычно составляет около 10 000 мг/л. Однако в конце экспоненциальной фазы субстрата остается мало, и S может стать ниже K_S . При $S < K_S$ быстро наступит фаза стационарного или практически незамет-

ной, поскольку из-за большого числа клеток в конце экспоненциальной фазы субстрат может быть истощен очень быстро.

В результате истощения лимитирующего субстрата (например, источника углерода) или выделения продуктов метаболизма, замедливших рост, удельная скорость клеток постепенно снижается и культура переходит в стационарную фазу. В это время биомасса остается постоянной, однако метаболизм часто претерпевает кардинальные изменения. Именно в этот период нередко синтезируются соединения (вторичные метаболиты), представляющие коммерческий интерес, например антибиотики. Продолжительность стационарной фазы зависит от конкретного организма и условий роста.

В фазе отмирания энергетические запасы клеток оказываются исчерпанными, и метаболизм прекращается. В большинстве промышленных процессов ферментацию останавливают и клетки собирают еще до наступления фазы отмирания.

Периодическая культура с добавлением субстрата

В этом случае ферментер периодически добавляет субстрат, а конечный продукт собирают только по завершении процесса. Добавление субстрата приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз и к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых во время стационарной фазы (например, антибиотиков). Однако в стационарной фазе микроорганизмы часто синтезируют продукты: ферменты (протеиназы), рибозимы и все промышленные виды белков. Поэтому, если целью ферментации является получение белковых продуктов, лучше остановить процесс до его перехода в эту фазу. Прямое измерение концентрации субстрата в ходе ферментации часто бывает затруднено, а чтобы определить, в какой момент нужно добавить следующую порцию субстрата, приходится использовать другие параметры, коррелирующие с его расходом: например количество синтезированных органических кислот, ионичные pH или количество выделяющегося CO_2 . Вообще говоря, ферментер периодического действия с добавлением субстрата требует постоянного и более тщатель-

ного контроля, чем простые ферментеры периодического действия, и поэтому используются реже. Но они имеют ряд преимуществ, если говорить о разработке систем получения белков с помощью рекомбинантных микроорганизмов, и потому становятся все более популярными.

Периодическое добавление субстрата к растущей культуре рекомбинантных микроорганизмов позволяет избежать стационарной фазы и оптимизировать наступление стационарной фазы, во время которой инициируются клеточные отходы из стрессовых воздействия, происходит синтез протеина и другие изменения метаболизма, уменьшающие выход рекомбинантного белка. Для поддержания метаболизма клеток требуется количество добавляемого субстрата (необходимо постоянно увеличивать). Чтобы обеспечить непрерывный синтез рекомбинантного белка и его стабильность, нужно тщательно контролировать процесс и добавлять субстрат (используя углерод и вода вместе с микроорганизмом) сразу, как только и этом возникнет необходимость. В зависимости от технологии микроорганизма и природы рекомбинантного белка при периодической ферментации добавление субстрата может достигать (на 25–100%) по сравнению с простой периодической ферментацией.

Периодическую ферментацию с добавлением субстрата можно использовать для культурной ролики не только микроорганизмов, но и клеток млекопитающих и насекомых. Это связано прежде всего с тем, что культуры все чаще применяются для получения белковых продуктов, имеющих медицинское значение; 2) без необходимости добавления субстрата животные клетки не могут эффективно синтезировать нужные белки.

Непрерывная культура

При непрерывной ферментации стационарные условия, т. е. условия, при которых $dX/dt = 0$, обеспечиваются тем, что при постоянном объеме биореактора убывает число клеток (увеличение продукта) в точности уравновешивается их увеличением в результате деления. Таким образом ферментативным реактором для непрерывного процесса в стационарном состоянии скорость размножения μ , определяемая как скорость прироста

среды F , деленная на экстенсивный объем среды V и биореактора:

$$\mu = F/V,$$

равна удельной скорости роста μ :

$$D = (dX/dt)(1/X) = \mu$$

Чтобы получить непрерывную культуру с постоянными стационарными условиями, необходимо соблюдать условия, при которых удельная скорость роста была бы такой же максимальной величиной. Для этого нужно отрегулировать расход, который контролирует скорость прироста F , чтобы объем культуры в биореакторе V поддерживался постоянным.

Важнейшей задачей промышленного ферментации является получение максимального количества продукта при минимальных затратах. Это можно решить, если для каждого конкретного процесса разработать свою, наиболее эффективную конструкцию ферментера. Наиболее совершенным ферментативным реактором в промышленности нельзя так как это часто, предельно потому, что ученые постоянно ищут лучшие виды в работе с периодическими культурами. При этом стоимость получения важного количества биомассы в ферментере непрерывного действия всегда ниже, чем в ферментере, работающем в периодическом режиме. Такое увеличение обуславливается следующими факторами:

- Для получения важного количества продукта с помощью непрерывной ферментации нужны меньшие биореакторы, чем с помощью периодической.
- При периодической ферментации для сбора клеток, их разрушения и последующей очистки белкового продукта или стабилизации, стерилизации и микрофрезиования, меньшие затраты хрупкого оборудования. В то же время в ферментере непрерывного действия синтез идет постоянно, так что и оборудование может быть не столь громоздким.
- Ферментер, работающий в непрерывном режиме, не прерывается, как ферментер, при одностороннем действии, который нужно время от времени чистить и подготавливать к повторному использованию. Простой биоре-

матрица в смеси с резиновой, чистой или стерилизованной – решающая причина снижения эффективности процесса. При непрерывной ферментации этот процесс создаются меньше.

- Физическое состояние большинства клеток при непрерывной ферментации одиночных, поэтому синтез происходит более согласованно. При кинетической же ферментации небольшие различия во времени сбора клеток, который приводит к изменению экспоненциальной фазы и капающей ее популяции клеток, могут привести к значительным несогласованности.

Непрерывную ферментацию уже использовали для промышленного получения белков с помощью клеточных экстрактов, антибиотиков и органических растворителей.

Впрочем, этот способ имеет и свои недостатки:

- Время ферментации в непрерывном режиме обычно составляет 500–1000 ч, при этом некоторые клетки могут потерять рекомбинантные плазмиды. Кроме, не possuише плазмид, обычно расщепить мембры эритроцитов и делаться быстрее, чем те, которые содержат эту плазму, поэтому со временем выход продукта может снижаться из-за уменьшения числа клеток, способных его синтезировать. Эту проблему можно было бы решить, используя клонированный ген в самом организме хозяина.
- Очень трудно поддерживать стерильные условия в промышленных установках в течение долгого времени. Кроме того, для непрерывных процессов необходимо стерильное резервное оборудование, что значительно увеличивает их стоимость.
- Качество компонентов культивируемой среды, используемой при крупномасштабной ферментации, не предъявляется столь высокие требования, как в лабораторных средах при ферментации в лабораторных условиях; они могут изменяться от одного процесса к другому, что может привести к изменению pH среды и клеток и снизить производительности.

Результаты периодической ферментации как весьма надежной системы снижается (переход к любому другому типу ферментации, даже при том что непрерывный режим является более эффективным). И все-таки (несмотря на это) создание простых и недорогих установок, лабораторных (до 10 л) и промышленных (до 1000 л), для непрерывной и термодинамической ферментации с добавлением субстрата – с целью изучения белков с помощью рекомбинантных микроорганизмов. Это говорит о том, что более широкое применение экспериментальных ферментеров и термодинамических ферментеров с добавлением субстрата в промышленности это только вопрос времени.

Повышение эффективности ферментации

Независимо от типа биореактора в ходе ферментации необходимо строго контролировать такие параметры, как концентрация растворенного кислорода, pH, температура и интенсивность перемешивания. Сильным влиянием изменения любого из них может существенно снизить скорость роста клеток и стабильность белкового продукта.

Для оптимального роста *E. coli* и многих других микроорганизмов, используемых в качестве инструмента экспрессии рекомбинантных белков, обычно нужна короткая аэрируемая культуральная среда. Максимальная скорость утилизации кислорода при ферментации Q_{O_2} зависит от массы клеток X , максимальной удельной скорости роста μ_{max} и скорости роста, зависящей от количества потребленного кислорода Y_{O_2} . Эти зависимости выражаются следующей формулой:

$$Q_{O_2} = Q_{O_2} \cdot X \cdot Y_{O_2}$$

Поскольку кислород плохо растворим в воде (0,034 г/л при 25 °C), он должен подаваться в среду непрерывно. Обычно для аэрации через ферментер пропускали стерилизованный воздух. Однако при этом в среде образуются пены, и если они сливаются медленнее, то скорость переноса кислорода в клеткам недостаточна для поддержания их роста. Таким образом, в ходе ферментации необходимо с помощью специальных устройств контролировать содержание растворенного кислорода в среде, чтобы за это время

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Экспрессия гена гемоглобина стимулирует синтез белка в *E. coli* в условиях недостатка кислородаС. Кима, J. E. Сипп, J. H. Модера, I. Нидел, J. E. Бейли
BioTechnology 8:419-423, 1990

Поскольку кислород является важным фактором в мире, рост аэробных биотермофильных микроорганизмов в культуральной среде анаэробно. Это проблема особенно остро стоит при биодизелизации культур или при крупномасштабной ферментации. Чтобы решить ее, биотехнологи пытаются увеличить выживаемость клеток, находящихся в анаэробной культуральной среде. Прочисленные механизмы состоят в следующем: 1) введение в культуральную среду чужеродных нуклеотидов; 2) введение в культуру генов или структурных или регуляторных генов; 3) добавление в культуральную среду чужеродных

генов или элементов, таких как индукторы ферментов, повышающих растворимость кислорода. 4) модификация структурных ферментов такими образом, чтобы обеспечить им стабильность в анаэробной среде. Все эти попытки приводят к анаэробному росту, однако, для каждой из них существуют свои минусы, они требуют много времени и затрат усилий, а также зависят от сложности биологических систем.

Исследователи Берли и др. предложили модифицировать микроорганизмы, используя для культивирования

таких образом, чтобы они более эффективно выполняли ту работу, которую выполняют в культуральной среде. Они перенесли ген, кодирующий структуру гемоглобина человека, в термостабильную бактерию *E. coli*, в специально разработанный системный вектор. Кроме того, вектор кодирует регуляторные функции, которые контролируют его в клетках, что стимулирует рост и экспрессию чужеродного белка. Этот подход привлекателен из-за простоты, с которой модифицировать микроорганизмы можно в лабораторных условиях.

Черным пигментом по всему объему и продолжительным временем культуры. Обеспечивая эффективным аэрированием культуры.

Важнейшим микроорганизмом роста является при pH от 5,5 до 8,5. Следует иметь в виду, однако, что клеточные метаболизм, поступающий в культуральную среду, могут изменить ее pH. Таким образом, необходимо тщательно контролировать pH в ходе ферментации и при необходимости добавлять в ферментер кислоты или щелочи. При этом последние должны быть хорошо перемешаны со средой и равномерно распределены по всему объему.

Еще один параметр, от которого зависит успех ферментации, — температура. Если она ниже оптимальной, то рост микроорганизмов замедлится и может полностью остановиться. Если же, наоборот, температура слишком высока, то может произойти преждевременная индукция синтеза белка, если он находится под контролем температурно-чувствительного репрессора, или индукция белков независимо от того, что активируется клеточные процессы и синтез белка белыми структурами

Тщательное перемешивание культуры необходимо, по-первых, для равномерной доставки питательных веществ к клеткам и, во-вторых, для предотвращения накопления токсичных побочных продуктов метаболизма в каком-нибудь небольшом объеме биореактора. Эффективное перемешивание оптимально легко обеспечить при культивировании в небольших объемах, при крупномасштабном же культивировании под давлением возможности культуральной среды становятся одной из главных проблем.

Перемешивание культуральной среды влияет и на другие параметры: скорость переноса кислорода от пузырьковой газовой фазы в жидкую среду, в том числе и в клетки; эффективность теплопередачи; точность измерения концентрации метаболитов в культуральной жидкости; эффективность дистрибуции добавляемых реагентов (кислород, питательных веществ и т. д.). Исходя из всего этого, можно было бы предположить, что чем интенсивнее культура перемешивается, тем лучше она растет. Однако при чрезмерном перемешивании среды и клетки могут погибнуть из-за механических повреждений, губительных для большинства клеток и клеток

механизмов. Они проявляют температурную зависимость, которая также связана с температурной активностью. Таким образом, во всех случаях необходимо учитывать температурные перемены в среде и стремление сократиться. целостность клеток.

Есть еще один эффект, касающийся крупно-массовых ферментов, которые не имеют отношения к основной стороне процесса, а касаются того, что происходит на этой стороне биохимических микропроцессов. И биохимические стороны крупномассовых культурирования рекомбинантных микроорганизмов образуются с необходимостью соблюдения определенных принципов и инструкций. Хотя биохимические реакции питания микроорганизмов не представляют никакой опасности, также не допустить их случайного попадания в среду. Для этого используют специальные системы, предотвращающие утечку живых рекомбинантных микроорганизмов из биореакторов или реакторных систем, а также же предотвратить попадание живых рекомбинантных микроорганизмов в среду. Для этого используют специальные системы, предотвращающие утечку живых рекомбинантных микроорганизмов из биореакторов или реакторных систем, а также же предотвратить попадание живых рекомбинантных микроорганизмов в среду.

Адаптация к высокой плотности

Вообще говоря, при получении культуральных клеток с помощью рекомбинантных *E. coli* руководствуются тем, что при максимальной конечной плотности культуры получается и максимальное количество продукта. В ферментерах периодическое действие с добавлением субстрата концентрирует рекомбинантных клеток *E. coli* достигает 50 (грамм сухого вещества на 1 л среды) в некоторых случаях >100 г/л. (Все сухое вещество клеток *E. coli* составляет примерно 21–25% веса влажного вещества.)

Один из способов повышения плотности культуры состоит в оптимизации культуральной среды. Следует иметь в виду, что некоторые питательные вещества, в том числе ионы аммония, азота, при слишком большой концентрации замедляют рост клеток. (Таким образом, по мере роста при концентрации >50 г/л, замед-

ляется при концентрации >3 г/л, железо — $>1,5$ г/л, магний — $>8,7$ г/л, фосфор — >10 г/л, цинк — $>0,01$ г/л. Таким образом, простое увеличение содержания питательных веществ в культуральной среде при периодической ферментации не дает желаемого результата. Кроме того, поскольку состав сложной среды типа пептона или дрожжевого экстракта может несколько различаться от дня к дню, ферментация в нем всегда бывает вольтервольновой.

Анализ который может проводиться, рост клеток, производится с *E. coli* при росте в условиях недостатка кислорода, но избытка глюкозы. Проблема с *E. coli* обычно можно решить, если использовать в качестве источника углерода глицерин вместо глюкозы, повысить температуру или использовать рекомбинантный штамм *E. coli*, способный превращать нитрат в аммиак — сильные вещества (см. гл. 6).

В культуре с высокой плотностью может также возникнуть недостаток кислорода. Чтобы избежать этого, увеличивают количество культуральной среды (разбавление) либо скорости перемешивания или дежурят и т.д. и другое. Кроме того, можно добавить в культуру чистый кислород, а не воздух, в котором содержится только 20% кислорода, или выводить клетки под давлением, чтобы увеличить эффективность кислорода. В качестве альтернативы представляется рассмотреть и другие клетки *E. coli* с генетически модифицированными клетками.

Высокой плотности чаще всего удается достичь при росте в периодическом режиме с добавлением субстрата. Режим подачи питательных веществ может быть разным, непрерывным, ступенчатым или экстенсивным. При непрерывном режиме в среду в течение всей ферментации добавляются некоторые питательные вещества. Однако в этом случае увеличение скорости роста непрерывно останавливается. При ступенчатом режиме питательные вещества добавляются по мере увеличения концентрации клеток до все большего количества, так что сначала увеличение скорости роста в десятикратной мере компенсируется. При экстенсивном режиме питательные вещества добавляются в количестве, обеспечивающем постоянную скорость роста клеток. Периодическую подачу питательных веществ можно автоматизиро-

роваги, основываясь на результатах измерения концентрации лимитирующего субстрата (например, глюкозы) в среде в ходе ферментации.

Биореакторы

При беглом просмотре литературы по био-технологии создается впечатление, что число типов биореакторов безгранично. Однако на самом деле все биореакторы можно подразделить на три основных группы:

- реакторы с механическим перемешиванием (рис. 16.4, А)
- ферментационные колонны, через которые для перемешивания содержимого пропускается воздух или другая газы (рис. 16.4, Б)

- эрлифтные реакторы с внутренним (рис. 16.4, В) или внешним (рис. 16.4, Г) рециркуляцией; перемешивание и циркуляция культуральной среды в них обеспечивается потоком газа (обычно воздуха), за счет которого между верхним и нижним слоями культуральной среды возникает градиент плотности.

Чаще всего используются биореакторы первого типа. Они обладают следующими преимуществами:

- позволяют легко менять технологические условия
- всегда есть и пробы
- обеспечивают эффективную доставку газа к растущим клеткам (если сравнивать на уровне

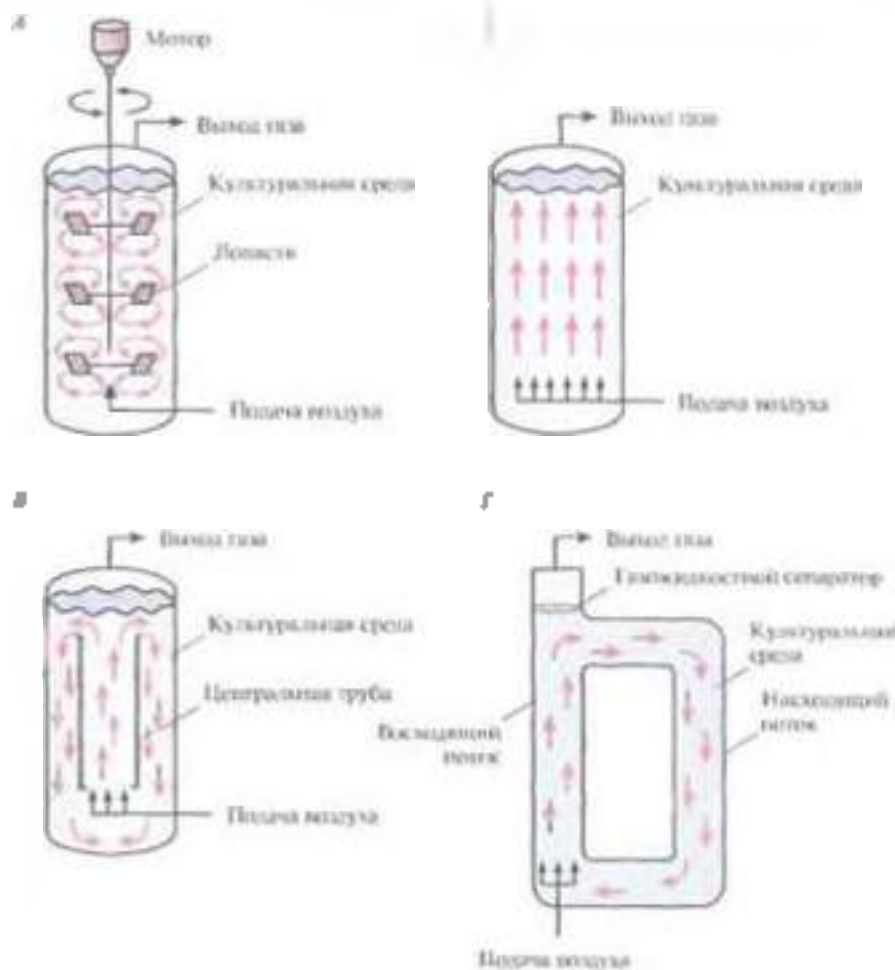


Рис. 16.4 Разные типы биореакторов (упрощенный рисунок) А Реактор с механическим перемешиванием Б Ферментационная колонна В Эрлифтный реактор с внутренним рециркуляцией Г Эрлифтный реактор с внешней системой рециркуляции Среды (газо-жидкостная полочка) культуральной среды

нерном языке, обладают высоким объемным коэффициентом массообмена, $k_L a$)

- уже давно используются для выращивания различных микроорганизмов.

В реакторах с механическим перемешиванием газ (как правило, воздух) подает в культуральную среду под давлением через разбрызгиватель — кольцо с множеством мелких отверстий либо трубку с одним отверстием. В первом случае образуются мелкие пузырьки воздуха и обеспечивается их более равномерное распределение, однако разбрызгиватели в шнек-трубок используются чаще, поскольку они реже закупориваются. Для равномерного распределения газа по всему объему биореактора используются мешалки — одна или несколько. Они разбивают крупные пузырьки воздуха, разносят их по всему реактору и увеличивают время пребывания в культуральной среде. При сильном перемешивании средней размер пузырьков в больших биореакторах практически не зависит от размера отверстий в разбрызгивателе. Эффективность распределения газа зависит прежде всего от типа мешалки, числа оборотов и физико-химических свойств среды. Если размер биореактора слишком велик, а газ, поступающий из разбрызгивателя, распределяется по объему неравномерно, то даже при энергичном перемешивании гомогенизировать среду не удастся.

Многие культуральные среды весьма агрессивны, и во избежание коррозионного или механического повреждения стенок биореактора его обычно изготавливают из нержавеющей стали или стекла. Стекловые части чаще используют только в лабораторных биореакторах емкостью меньше 50 л.

Размер биореактора лимитируется его способностью эффективно отводить тепло, выделяемое микроорганизмами в ходе метаболизма и высвобождаемое в результате перемешивания. Если теплоотвод неэффективен, температура среды может превысить критическую, что уменьшит выход продукта. Для отвода тепла используют охлаждающую рубашку или змеевик, помещаемые внутрь реактора. Внутреннее охлаждение более эффективно, однако змеевик часто покрывается слоем растущих клеток, что за-

трудняет охлаждение, а иногда мешает интенсифицировать перемешивание культуральной среды.

Большую опасность представляет загрязнение ферментера грибами или бактериями. Поэтому биореакторы конструируют таким образом, чтобы их можно было стерилизовать; обычно для этого используют пар под давлением. Внутри реактора не должно быть «мертвых зон», недоступных для пара во время стерилизации. Обработка подается через клапаны, датчики, шланги и выходные отверстия. При конструировании перед инженером зачастую возникает проблема: использовать максимальное число датчиков для полного контроля за процессом ферментации или ограничиться их минимальным набором, чтобы легче было поддерживать стерильность.

При интенсифицированном перемешивании культуральной среды в процессе ферментации часто происходит ее вспенивание. Это может привести к переувлажнению фольеры в отверстие, через которое воздух выходит из биореактора, и уменьшению его потока, а также к попаданию в реактор посторонних микроорганизмов. Для контроля пенообразования используют химические пеногасители или механические сбиватели пены. Слишком присутствие химических реагентов может ухудшаться перенос кислорода, а иногда приводит к ингибированию клеточных ферментов, что уменьшает скорость роста микроорганизмов. Кроме того, если пеногасители не удалять, они могут загрязнить конечный продукт. Проблему вспенивания можно решить, если оставить в верхней части биореактора достаточно большое пустое пространство, в котором лопались бы пузырьки воздуха. Правда, в этом случае рабочий объем реактора уменьшится примерно на 25%.

Все эти соображения относятся и к «индустриальным» реакторам типа барботажных колонн и эрленмейеров биореакторов. Таким образом, обеспечение стерильности, постоянства pH и температуры — ключевые требования при любом способе культивирования независимо от конструкции биореактора.

Конструктивные особенности барботажных колонн и эрленмейеров биореакторов дают им некоторые преимущества перед реакторами с механическим перемешиванием. «Индустриальские» реакторы более экономичны, поскольку

перемешивание в них происходит с помощью выходящего потока воздуха (или крутого газа в случае эластичных мембран), а не механической мешалки, позволяющей много мерять. Кроме того, в отсутствие вязкостной мешалки исключается и один из путей протекновения в биореактор посторонних микроорганизмов. В пневматических биореакторах в культуральной среде не возникает столь сильных гидродинамических возмущений (сдвиги слоев жидкости друг относительно друга), при этом в трифазных биореакторах перемешивание происходит более равномерно по всему объему. Уменьшение силковых дефектов очень важно по следующим причинам:

- клетки рекомбинантных микроорганизмов более хрупки, чем нетрансформированные клетки, поскольку часть их энергетических ресурсов расходуется на синтез чужеродных белков и в результате образуются менее прочная клеточная стенка;
- самый распространённый способ клеток выживания в неблагоприятных условиях — уменьшение количества всех синтезируемых белков, в том числе и рекомбинантных;
- под действием внешних эффектов могут изменяться физические и химические свойства клеток, что нарушит выполняемую работу с ними. Например, может увеличиться количество включения на поверхности клеток, что приведет к ухудшению условий на поверхности и внутри, а также нарушит кинетику рекомбинантного белка.

В барботажных колоннах воздух подается под давлением в определенную часть биореактора; по мере подъема давление пузырьков воздуха уменьшается, что приводит к неравномерному его распределению. Кроме того, под воздействием высокого давления может происходить в сыпучем состоянии перемешивание. Все это отрицательно влияет на длину конструкций и сужает диапазон реализуемых технологических условий, а также уменьшает возможный размер барботажных колонн.

Трифазные биореакторы могут использоваться как в экспериментальных установках, так и в целях промышленной ферментации. Газ в

них подается в нижнюю часть вертикального канала. Поднимаясь, он увлекает за собой жидкость в верхней части канала — такжидкостному сепаратору, и часть частично выходит в воздух. Более глубина дегазированной жидкости осуществляется по другому вертикальному каналу со дна реактора, и процесс повторяется в том же порядке, культуральная среда вместе с клетками непрерывно циркулирует в биореакторе.

Трифазные биореакторы бывают двух основных типов. В первом случае реактор представляет собой одну емкость с центральной трубой, которая обеспечивает циркуляцию жидкости (реакторы с внутренней рециркуляцией) (рис. 16.4, А). Во втором культуральная среда подается через отдельные, независимые каналы (реактор с внешней рециркуляцией) (рис. 16.4, Б). Конструкция трифазных реакторов с внутренней рециркуляцией проще, но если уж реактор построен, его объем и скорость циркуляции остаются неизменными. Напротив, биореактор с внешней рециркуляцией можно модифицировать и создавать разные условия ферментации.

Трифазные биореакторы, вообще говоря, более эффективны, чем барботажные колонны, особенно в случае существенной микрореагентности с большой вязкостью или инертностью. Переоборудовать их более эффективно и проблем с изменением конструкции не столь велика. И особенно бесценны трифазные ферментеры, такие как ферментер на 1 500 л (и в форме 30' (Англия), сконструированный для получения белков овио-клеточных культур животных, для культивирования клеток животного шара в реакторе требуется весьма значительное время. Чтобы обеспечить субстратами все все время по переключению с током воздуха, субстраты вводятся по всей длине реактора сразу во многих точках.

Тысячные крупномасштабные системы ферментации

Ресурсоэффективные микроорганизмы широко используются для получения разнообразных белковых продуктов, применяющихся в медицине (например, инсулин), а также в качестве сырья промышленности по производству высококачественных ферментов, антибиотиков. Белки синтезируются наиболее

интенсивно в период от середины экспоненциальной фазы до ее завершения, а метаболиты – и особенно замедления роста и в стационарной фазе. Все это должно учитываться при выборе параметров крупномасштабных процессов ферментации.

Оптимальная система необходимо должна учитывать все вышеизложенные проблемы. Если речь идет о белках, то для ее решения обычно используют кинетические тесты, наклонившись под контролем системы регулируемых промоторов. Включая гены или, что это получение генов в количестве продукта будет достаточно конкретизированной экспрессии кинетически тесты. Однако опыт показал, что при непрерывной транскрипции и трансляции кинетически тесты не позволяют все энергетические ресурсы клетки и ее рост и деления. Чтобы приблизить экспрессию кинетически тестов к определенной фазе роста, можно использовать медленное индукцию. Для этого вначале инкубируют клетки в оптимальных условиях до относительно высокой численности, а затем индуцируют трансляцию, либо ингибитор (температура, либо добавление среды или или иной химической индуктор в зависимости от принципа промотора (например, кинетически- β -индикатороминионид).

Двухступенчатая ферментация в большом биореакторе (>100 л) встречается с определенными трудностями, поскольку технически очень сложно быстро изменить температуру (обычно с 10 до 42 °C) в большом объеме или обеспечить быстрое и равномерное распределение численности индуктора. Эту проблему можно решить, если использовать два последовательных биореактора (двухступенчатая ферментация): клетки выращивают в одном из них, а индукция осуществляется в другом. Это позволяет оптимизировать процессы роста и индукции по отдельности и увеличивать количество продукта, синтезируемого за единицу времени.

Двухступенчатая ферментация в танк-системе злифитной биореактора

Штамм *S. cerevisiae* NM989, несущий ген ДНК-лигазы T4 под транскрипционным контролем промотора *p_{AD}* и температурно-чувствительного репрессора *p_{AD}*, выращивали и индуцировали в двухступенчатой злифитной биореакторе (рис. 16.5). Ген

ДНК-лигазы был встроены в хромосомную ДНК, что снизило все проблемы, связанные с нестабильностью плазмиды в ходе длительной ферментации. Клетки выращивали при 30 °C в злифитной биореакторе с внешней рециркуляцией и работы объемом 10 л. В этих условиях ген ДНК-лигазы не экспрессировался. Для индукции при 42 °C в танк-системе злифитной биореактор с внешней рециркуляцией и работы объемом около 5 л биореакторы были соединены (грубой) насосом, который обеспечивал непрерывность потока сусла между злифитной биореакторной системой. Клеточную суспензию, достигшую определенной плотности, удаляли из биореактора, где проводилась индукция, и подвергали минимальной обработке.

Максимальная удельная скорость роста культуры (μ_{max}) составляла примерно 0,66 ч⁻¹ в первом биореакторе и 0,54 ч⁻¹ во втором, что свидетельствовало времени удвоения 61 и 77 мин. Спустя сразу непрерывно добавляли в ферментер, где росли клетки, со скоростью 2 л/ч, в биореактор, где проводилась индукция, отбирали такой же объем сусла. Индукция работных объемов биореакторов различались, клетки кололись примерно 5 ч в биореакторе, где производился рост, и 7 ч в биореакторе, где осуществлялась индукция. Развитие во времени преобразования клеток в биореакторах было необходимо для оптимизации числа клеток, выхода продукции и стабильности ДНК-лигазы. Само время преобразования клеток в разных реакторах можно варьировать изменением из относительного рабочего объема и объема индукционной в первом биореакторе индукционной сусла.

Используемая в этой работе злифитная ферментер с внешней рециркуляцией (рис. 16.5) не только упростила регулировку оптимальных рабочих объемов ферментеров, а также позволила гибкость системы (обеспечивать разные условия роста для разных индукционных режимов работы клеток). При синтезе ДНК-лигазы индукционные результаты были получены при ежедневном поступлении примерно 11 мл клеток точной суспензии из первого биореактора во второй. Это эквивалентно всего 0,67% объема биореактора, где осуществлялась индукция, что обеспечивало практически мгновенный подъем температуры всей индукционной сусла с 30

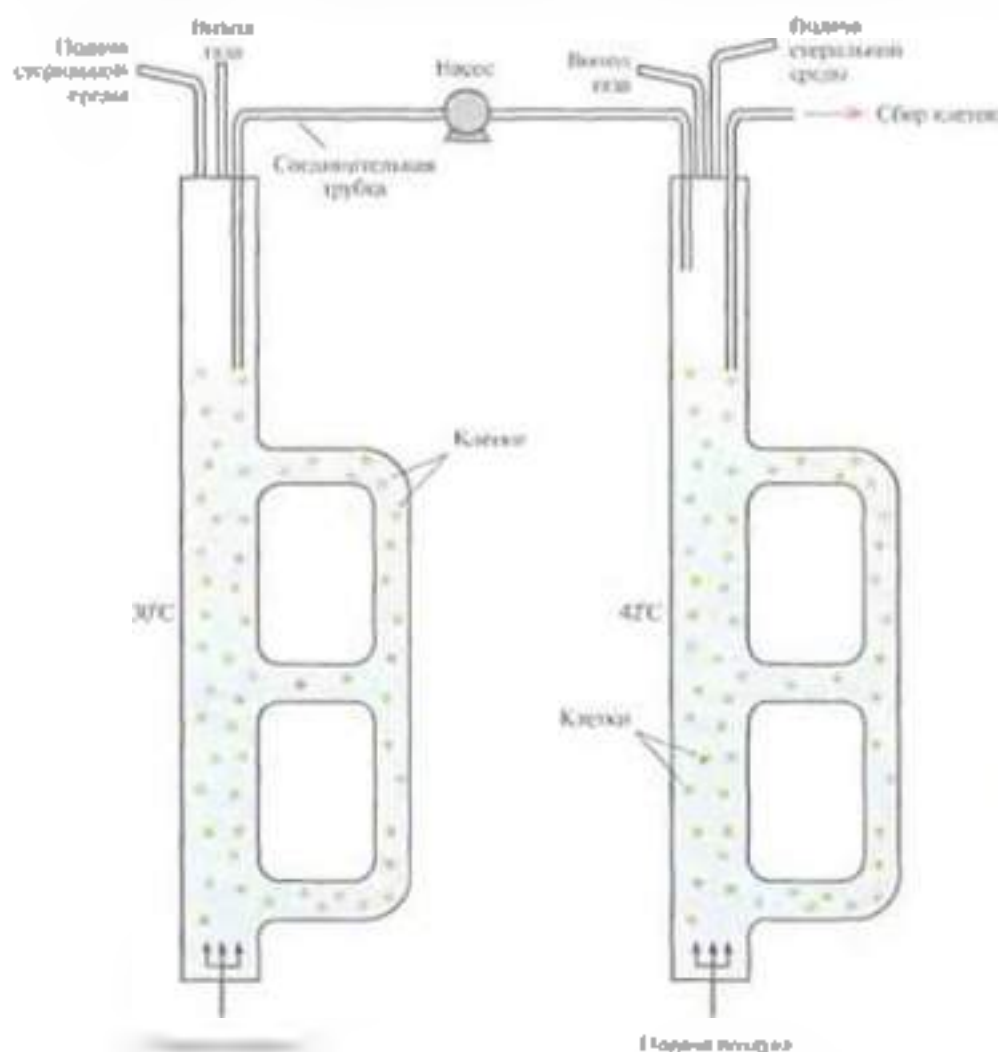


Рис. 18.5. Система из двух аэрируемых биореакторов, используемая для температурной индукции синтеза белкового продукта. В первом реакторе, в котором устанавливается культивируемые при 30 °С (слева), клетки находятся в ферментер-е температурой 42 °С (справа), где происходит индукция. В обоих биореакторах имеются двойные вертикальные рециркуляционные устройства, позволяющие циркулировать. Изменив направление потока, можно изменить режим работы системы для разных условий.

лы 42 °С. Для поддержания роста клеток, накопивших во втором биореакторе, в экспоненциальной фазе в него непрерывно добавляется нужное количество питательных веществ в компьютеризированной форме. Это позволяет реализовать расширение ДНК клеток при использовании ферментов, которые обычно синтезируются клетками в фазе экспоненциальной и в стационарной фазе.

При росте в таком двухступенчатом биореакторе непрерывность действия культуры (таблица 7, штамм NH489) может достигать плотности 4 г (сухой вес/вес) на 1 л, а (на долю ДНК-лиганды T4) может достигать до 4% суммарно белка в клетке, что соответствует примерно 25 U/ml ED ферментативной активности на 1 л (сухого веса). Впрочем же с помощью оптимальной подкормки можно синтезировать примерно 100 U/ml ED

ферментивный активитет на 1 л культуры, т. е. до 4 000 000 ЕД в сутки. С учетом того что каждая единица фермента имеет ширину активности уменьшена до 30% и что стоимость единицы активности равна примерно 0,25 долларов, получаем, что существенно можно снизить количество фермента на сумму 240 000 долларов. Мы не учли всех затрат на сами производящие белок, штаммы и т. д., что прибавит от нескольких десятков миллионов долларов, полученных при непрерывной ферментации в биореакторах среднего размера, значительное преимущество широты.

Двухступенчатая ферментация в одном реакторе с механическим перемешиванием

Иррациональный рекомбинантный белок AG[*gal*], использующийся при определении иммунологических тестов, синтезируются в промышленных масштабах в одном биореакторе с механическим перемешиванием. Ген этого белка был сконструирован методом скрининга и содержит сегмент, кодирующий пептид ситоксинамином иммуноглобулина G (IgG) А белка *Morbidity of a virus*, два сайта связывания IgG G белка штамма G148, *Antigenicity* и β-галактозидазу E *cod*. Он кодируется под контролем промотора *p^{lac}* бактерии *E. coli*, регуляция которого осуществляется так же, как регуляция *p^{lac}* промотора, и был встроена в плазмиду, несущую ген устойчивости к ампициллину; этой конструкцией трансформировали клетки *E. coli*. Штамм с плазмидой, несущей ДНК AG[*gal*], содержит торью для выводу, несущую ген температурычувствительного белка-репрессора *t1* и ген устойчивости к ампициллину.

Культуру в объеме 3 л выращивали при 30 °C в присутствии ампициллина и канмицилина, с тем чтобы обеспечить условия для сохранения абенк плазмиды. В этом использовали в качестве питательного материала для инициальной фазы культуры без антибиотиков при 30 °C в реакторе с рабочим объемом 45 л. Субкультуру клеток из 45-литровой ферментера в свою очередь служила источником индукции для культивирования в биореакторе на 600 л, в котором клетки продолжали выращивать при 31 °C без антибиотиков (рис. 16.6) (воспользуйтесь, для усиления эффективности процесса широты при крупном-



Рис. 16.6. Схематическое представление промышленного синтеза белка AG[*gal*]. В скобках указан объем культивируемой среды на каждом этапе. На ее долю приходится от 10 до 25% объема соответствующим биореакторам (ферментерам).

масштабам в культивировании в среде не возобновляя) Как только плотность культуры в биореакторе на 600 л достигла примерно 4 г/л, температуру увеличивали с 30 до 40 °C, чтобы индуцировать экспрессию гена белка AG[*gal*]. На меньшие температуры в этих условиях уходило около часа. Незадолго до этого при 40, а не при 42 °C, по-

самаму при более низкой температуре синтезируется в том же количестве белка AcVca1, но клетки могут расти в течение более длительного периода. Новые штаммы при более высокой температуре инкуляции (40 °С) дали большое количество биомассы.

Увеличиваем активность белка AcVca1 в течение 2 ч после начала индукции, получившаяся в этом случае масса Biomaxim, но было возможно с этим путем проработать клетками, перенесенными в фазу немедленного роста или в стационарную фазу. Кроме того, примером является рост клеток в течение 2 ч при 40 °С, уровень платины. Но даже при этом после 4-часового культивирования при 40 °С на долю AcVca1-белка приходилось примерно 20% всей массы сухого вещества. Учитывая все это, можно их интегрировать с тем же белком AcVca1 и репрессора c1 в хромосому ДНК микробной клетки E. coli с целью увеличения выходов продукта.

Периодическим ферментацией и периодическим ферментацией с добавлением субстрата

В некоторых случаях для достижения высокого титра белка при инкуляции биомассы (количество продукта) мы проводим ферментацию в обычном периодическом режиме. В этом случае инкуляция проводится, используя те же параметры и условия, используя те же ферменты белка, при этом количество субстрата было меньше, инкуляция в, помещая эту культуру в проточную E. coli и инкуляция в проточной E. coli, трансформированные клетки

культивировали в среде с разным содержанием триптофана. При высокой концентрации последнего желтого фермент белок не синтезировался, последующее понижение триптофана из среды востановило клетками производимый индукцией синтез необходимого белка. Таким образом, триптофан в среде привнесло в увеличенное количество как биомассы, так и синтез нужного белка, а инкуляция в неиндукционной среде с добавлением постоянного количества субстрата еще более усилило этот эффект (табл. 16.1).

Сбор клеток

Чтобы избежать процесса ферментации, нужно прежде всего отделить клетки от культуральной среды. Сбор генетически модифицированных и неиндуцированных трансформированных клеток можно проводить такими же методами. Однако трансформированные клетки часто обладают другими физиологическими свойствами (они имеют другой размер или синтезируют внеклеточные полисахариды), и в результате условия, оптимальные для сбора неиндуцированных клеток, могут не подходить для клеток, синтезирующих нужные белки.

Для выделения клеток из биомассы «объемов» культуральной среды часто используют высокоскоростное центрифугирование. Для этого стандартным способом используются высокоэффективные центрифуги непрерывного действия. Существуют клетки неспособны подходить в лабораторной работе центрифуге, клетки инкуци-

Таблица 16.1 Титры различных белков, синтезируемых в периодическом режиме инкуляции в, при инкуляции в проточной ферментации и при периодическом ферментации с добавлением субстрата^{1, 2}

Индукция субстрата	Выход		
	периодическая ферментация	периодическая ферментация с Trp	периодическая ферментация с добавлением субстрата
Биомасса, г/л	67	12	20
Содержание белка в сухой массе, %	2,6	2,0	61
Содержание белка в сухой массе (белок), г/л	0,17	0,33	1,21
Вход белка, мг/л и выход, %	26	62	91

¹ По: Saito, Inoue, Yoshida, Sugiyama et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 500-506, 1991

² Виталин В. В. Биотехнология. Сургутский филиал СВН-104, 2010 г. URL: www.vitalin.ru

продукты в воду, в осветляемой среде улавливаются. Клетки барабан задерживаются осевшими клетками, центрифугу осевшим клеткам и клеткам соби-
рают. Основное неудобство данной системы заключается в необходимости периодически чистить барабан, и затем снова начинать работу. Кроме того, недостатками являются высокая стоимость оборудования и потребляемая им энергия, вероятность утечки микроорганизмов в окружающую среду, невозможность полной улавливания клеток из среды.

Альтернативным методом выделения клеток из культуральной среды является использование мембранной культуры. При обычной фильтрации клетки со временем забивают поры мембранного фильтра, накапливаются на его поверхности, и в результате скорость процесса быстро снижается (рис. 16.7, А). Фильтрацию можно ускорить, проведя ее для движения, но это имеет временные эффекты: клетки все равно будут накапливаться на поверхности мембраны, и кривые

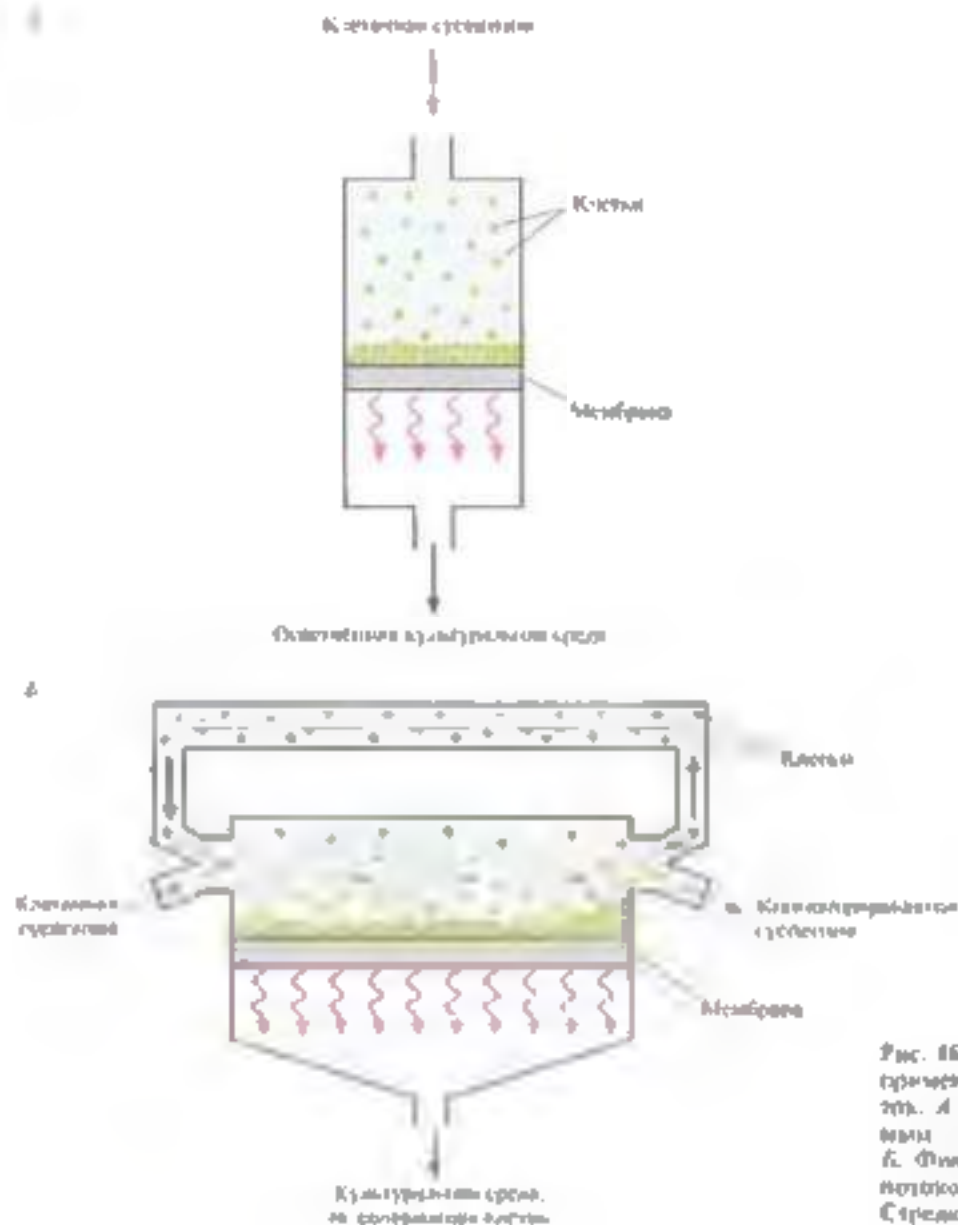


Рис. 16.7. 4 способа фильтрации применяются для сбора клеток. А Фильтрация с необратимым задерживанием фильтрации. Б Фильтрация с параллельным потоком культуральной суспензии. Средним направлением потока

того, под давлением они образуют более плотный и менее проницаемый слой.

Чтобы решить эту проблему, клеточную суспензию пропускают с высокой скоростью параллельно поверхности мембраны (рис. 16.7, б), так что через мембрану в один раз за проход только небольшая часть циркулирующей массы. Остаточная ее часть очищает мембрану от скопившихся клеток (см. рисунки), и в результате скорость фильтрации (и шаг не так быстро, как при необратимом забитии фильтра). После многократных разливов фильтрация через мембрану проходит почти вся культуральная среда. Этот метод используется пока только в лаборатории, в промышленности процессы для сбора клеток применяют центрифугирование.

Дальнейшие действия зависят от природы и локализации продукта. Если продукт представляет собой белок, находящийся в культуральной среде, то среду концентрируют, в белке очищают хроматографическими или другими методами. Если продукт — это низкомолекулярное соединение, находящееся в культуральной среде, то используют соответствующие методы экстракции. Наконец, если продукт имеет внутриклеточную локализацию, то прежде чем очистить его, клетки разрушают.

Разрушение клеток

Для разрушения клеток используют разнообразные механические, биологические и физические методы. Все процедуры должны быть еще жестче, чтобы разрушить клеточную стенку и не только через кислотную среду, чтобы исключить денатурацию белка. А поскольку у живых клеток у разных микроорганизмов (даже в разных штаммах) несколько универсальных методов разрушения не существует.

- У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит из толстого беспорядочного слоя слоев N-ацетилглюкозамина и октаэков N-ацетилмуравьиной кислоты, соединенных беспорядочными цепями.
- У грамотрицательных бактерий клеточная стенка тоньше и снаружи слоем липидов

- Стенка дрожжевых клеток состоит из и из-за того свои частично фосфорилированными маннозой и β-глюканами.
- У грибов (грибы имеют многоклеточные клеточные стенки, состоящие из α- и β-глюканов, гликопротеидов и липидов

Состав и прочность клеточной стенки зависят от условий культивирования, скорости роста клеток, фазы, на которой они собираются, условий кормления склосомированных клеток и от того, неперенесли ли выделенный микроорганизм условия культивирования.

Химические методы разрушения клеточных стенок включают обработку щелочью, органическими растворителями или дегерметами. Если белковый продукт не разрушается при pH от 10,5 до 12,5, то можно без труда и легкости обработать большие количества бактериальных клеток. Например, рекомбинантный гормон роста человека очень просто выделить из клеток *E. coli* обработкой гидроксидом натрия при pH 11. После обработки щелочью не остается практически ни одной жизнеспособной клетки, что значительно решает проблему утечки рекомбинантных микроорганизмов. (Используя органическими растворителями — это простейший и недорогой способ разрушения клеток — голый исключается для выделения ферментов из дрожжей). Однако, чтобы убедиться в том, что в индивидуальных случаях большая проточка не денатурирует, необходим процесс предварительного тестирования. Под действием дегерметов в мембранах бактериальных клеток образуются поры, через которые белки и другие молекулы выходят из клетки. К сожалению, дегерметы дороги, в большинстве случаев в их присутствии белки денатурируют, в крайнем случае они могут образовать конечный продукт.

Основным биологическим методом разрушения клеток члениковидными является лизис с помощью ферментов. Так, лизоцим (лизоцим белка яйца) гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий. Для разрушения клеточных стенок грамотрицательных бактерий используют лизоцим и этилоксиминистроуксильную кислоту (ЭИТА) и клеточные стенки дрожжей гидролизуют с помощью одного или

носкостью ферментов: β -1,3-галактозы, β -1,6-галактозы, манназы и дектиназы. Ферментативная обработка так окислительна, а лицев протекли в чистых условиях. Пока использование ферментов для анализа клеток сдерживается из-за высокой стоимостью, но с применением рекомбинантных микрорганализмов для промышленного синтеза ферментов, разрушающих клеточные стенки, эта проблема будет решена.

Клетки можно разрушить и физическими методами немеханическими (например, с помощью осмотического шока или быстрого многократного замораживания и оттаивания) или механическими (обработкой ультразвуком, с помощью паровой ванны, помощи пистона под давлением, сепарации). Обычно после обработки немеханическими методами многие клетки остаются неповрежденными. Напротив, механическое разрушение высокоэффективно, что делает его более приемлемым. Особенно часто ультразвуковые излучатели, генерирующие высокочастотные звуковые волны, используются для обработки мелких объемов. Клетки разрушаются при этом под действием гидродинамических сил (сдвиг и сжатие) вблизи друг относительно друга, а также от т.д.)

Для разрушения большого количества клеток обычно используют шаровые мельницы. Концентрированную клеточную суспензию добавляют в камеру высокооборотистой шаровой мельницы, заполненную инертным абразивным материалом (например, стальными шариками диаметром 0,5 мм). Содержимое быстро перемешивают с помощью лопастей, вращаемых на ось. Близость клеток разрушается под действием сдвиговых напряжений, возникающих в результате быстрого движения шариков. Условья оптимального разрушения клеток можно подобрать, варьируя число и форму шариков, скорость перемешивания, размер шариков, их число, концентрацию клеток, геометрию камеры и температуру. Приборы такого типа успешно применялись для разрушения клеток самых разных микроорганизмов. С их помощью можно легко разрушать клетки как перкомбинантных, так и рекомбинантных микроорганизмов.

При одновременном низком давлении концентрированную клеточную суспензию продавливают через небольшое отверстие в вытравленном диске, а затем давление резко сбрасывают, что и вызывает лизис. Условья обработки можно оптимизировать применительно к разным микроорганизмам. Для этого изменяют режим давления, размер и форму отверстия, температуру клеточной суспензии, число продавливаний.

Еще один механический метод разрушения клеток — сепарация. Клеточную суспензию большой вязкости направляют под давлением по боковой поверхности вращающегося диска, в месте сепарации выделяется большое количество энергии, разрушающей клетки. Таким способом с помощью устройства под названием *Micellizer* за один прием можно разрушить большую часть клеток *E. coli* в двух встречных потоках суспензии. Данное для разрушения клеток, других микроорганизмов может использоваться большее число шариков. В отличие от шаровой мельницы вытравленным давлением и высокоскоростных шаровых мельниц, в которых, как правило, используются концентрированные клеточные суспензии, данные устройства пригодны для обработки любых суспензий. Как показала предварительные исследования, активность клеточных белков уменьшается при разрушении клеток по этой методике лишь незначительно. А если обработать суспензию клеток небольшим количеством льда, а затем использовать устройство *Micellizer* в режиме вытравливания по сравнению с обычным давлением и при небольшой скорости, то сохраняются активность некоторых важных белков, ингибирующихся при вытравливании.

Дальнейшая обработка

После разрушения клеток на осколки удалено либо низкоскоростным центрифугированием большого объема, либо микроцентрифугацией с использованием ультрацентрифуги осадок из трубки или осевший на дно образцовых роторных стиральных (стирных или дистальных) или сульфатом аммония. Достигаемое при этом обогащение — 2-5 раз к исходному, сорбционная

вещие, использующиеся для получения, может значительно увеличить стоимость процесса. В качестве альтернативы для концентрирования и выделения суммарных белков можно использовать ультрафильтрацию с двумя следыщим потоком через мембрану с мембраной средней пористой пор. — у мембран, применяющихся для концентрирования клеток или удаления их с поверхности (рис. 16.7, б). Этот подход пока накопился в стадии разработки, однако уже ясно, что он пригоден для работы с объемами от одного до нескольких тысяч литров, процесс может идти непрерывно (что позволяет уменьшить размеры установок) и обеспечить 10–100-кратное обогащение (в зависимости от размера и свойств выделяемого белка).

Необыкновенно чистая белковая продукция зависит от того, где его подвергается использовать. В одном случае это может быть довольно грубой препарат, в другом (например, если речь идет о белках, используемых в медицине) — препарат высочайшей степени чистоты.

Некоторые белки, синтезирующиеся в клетках в избыточном количестве, образуют нерастворимые частицы (также включенная) После разрушения клеток из клеток можно выделить их (близкостепенно другим клеточным компонентам). Вплоть до исследования не удавалось детерминировать выделенные только выделенные так, чтобы при этом не применялся неэффективный метод, но позже были разработаны эффективные методы, позволяющие восстанавливать активность белка, что все эти дополнительные процедуры увеличивают стоимость процесса в разы.

Солюбилиция белков

В некоторых случаях при гиперпродукции рекомбинантных белков образуются как растворимые, так и нерастворимые продукты, что увеличивает процессуальную стоимость. Например, при экспрессии в клетках *E. coli* гена инсулинподобного фактора роста 1 (IGF-1) человеком мод массой 7,6 кДа примерно 90% рекомбинантных молекул локализируются в периплазме, а 10% секретируются. Чтобы выделить растворимую и периплазматическую формы IGF-1 от периплазмы, для солубилизации нерастворимой формы in situ добавляли метионин и дисульфидолиз до массовых

концентраций при среднем pH. При этом клетки погибали, но не разрушались, так что интрацеллюлярные белки оставались внутри клеток. В результате образовался очень густой раствор, что затруднило отделение клеток и их окисление перифторированием. Чтобы решить эту проблему, разработали процедуру двухфазной жидкостной экстракции, позволяющую разделять растворимые и нерастворимые продукты. И солубилизация in situ, и двухфазная жидкостная экстракция эффективны; с их помощью можно выделить от 80 до 95% IGF-1 из культуры объемом от 10 до 1000 л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для крупномасштабного культивирования не комбинантных микроорганизмов в промышленных биореакторах (>1000 л) недостаточно просто оптимизировать условия роста в лабораторных ферментерах (0,1–1,0 л). При конструировании промышленного биореактора необходимо учитывать такие параметры, как температура, pH, скорость и характер перемешивания, потребности в робинных организмах в кислороде, количество питательных веществ.

Ферментацию можно проводить по разным. При периплазматической ферментации основным продуктом будет в связи с культуральной средой и применением культивирования, не достигая субстрата до тех пор, пока количество питательных веществ не достигнет максимума. В этих условиях рост культуры прекратится сразу после истощения фазы, фазы ускорения, стационарной фазы (lag) фазы, фазы замедления, стационарную фазу и фазу отмирания. Больше всего белков синтезируется во время логарифмической фазы, а также стационарной фазы продукта — во время стационарной. При таком способе ферментации необходимо тщательно следить за тем, чтобы клетки были собраны в наиболее время. При периплазматической ферментации с активным субстратом в биореактор добавляется сразу культуральная среда через ряд интервалов времени, как правило два раза, чтобы получить логарифмическую фазу. Непрерывная ферментация предполагает добавление свежей среды в течение всего процесса и одновременное удаление клеток и отработанной среды.

Квадрат из этих систем ферментации имеет свои преимущества и недостатки, которые следует учитывать, применяя ее для промышленного синтеза рекомбинантных продуктов. Несмотря на то что непрерывная ферментация применяется в промышленности масштаба не только сейчас, этот способ имеет ряд преимуществ и в будущем, по-видимому, получит большое распространение.

Одним из способов увеличения количества рекомбинантного белкового продукта состоит в максимальном увеличении плотности культуры (трансформированных клеток, синтезирующих данный продукт). Для достижения этой цели лучше всего использовать режим перистальтической ферментации с подвижным субстратом.

Все биореакторы можно отнести в основном к трех основных типам: реакторы с механическим перемешиванием, барботажные колонны, аэрированные реакторы. В настоящее время в промышленности чаще всего используют биореакторы первого типа, но по-прежнему интерес к аэрированным биореакторам. Механическое перемешивание обеспечивается с помощью механической мешалки, а в аэрированных биореакторах для аэрации и перемешивания применяют газ (обычно воздух), который подается под давлением через диффузиратор в реактор. При этом во всем объеме промышленно непрерывно циркулирующей жидкой среды. Барботажные колонны связаны с аэрированными реакторами, но из-за недостатка воздуха отсутствуют циркулирующая культуральная среда. Для обеспечения стерильности, контроля pH, температуры и других параметров используют разные способы и элементы системы биореактора. Для синтеза рекомбинантных белков промышленно доступны печатные процессы ферментации, осуществляемые в емкостях аэрированных биореакторов или в одном реакторе с механическим перемешиванием.

Если синтезируемый продукт накапливается в клетках, то их осаждают и культуральной средой центрифугируют или фильтруют, затем разрушают ферментативными, химическими или механическими методами и выделяют нужный продукт. Если синтезируемый продукт секретируется в культуральную среду, то процедура его выделения поинтереснее, так как она включает

ЛИТЕРАТУРА

- Bayley J.E., D.F. Oth. 1977 *Biotechnical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill, New York, N.Y.
- Charles M. 1985 Fermentation scale up: problems and possibilities. *Trends Biotechnol.* 3:134-139.
- Datar R. 1986 Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process Biochem.* 21: 19-29.
- Fogler L.R. 1985 Distortion of microbial cells, p. 305-324. In C.I. Conway, A.E. Humphrey, M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 2. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- Gilpin R.J., J.J. Wu. 1986. Design of large scale containment facilities for recombinant DNA fermentations. *Trends Biotechnol.* 4:61-65.
- Gosset G., R. de Ando, N. Cruz, A. Mantilnez, R. Quintana, F. Bolivar. 1993 Recombinant protein production in cultures of an *Escherichia coli* top strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 541-546.
- Grand G., C.W. Robinson, B.R. Gibb. 1991 Cross-flow ultrafiltration of proteins, p. 69-83. In M.D. White & Kenney, A. Shallerman (ed.), *Biologicals from Recombinant Microorganisms and Animal Cells: Production and Recovery*. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Hart R.A., P.M. Lester, D.H. Redwood, J.R. Oger, S.F. Boffler. 1994. Large scale, in situ isolation of periplasmic β -gal I from *E. coli*. *Bio/Technology* 12: 113-117.
- Kroger K.H. 1986 Cross-flow filtration in the downstream processing of enzymes: current status. *Biotechnol. Forum* 3:20-31.
- Kroger, K.H., H. Nitsch, H. Ziegler. 1987. Improved dynamic filtration of microbial suspensions. *Bio/Technology* 5:921-926.
- Lee S.A. 1996 High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14:98-105.
- McKillop E.H., A.K. Giles, M.H. Jones, P.P. Tong, R.N. Njorh. 1991. Bioreactors for large-scale rPA production. *Bio/Technology* 9: 815-817.
- Mendoza-Vega O., C. Hebert, S.W. Brown. 1994 Production of recombinant insulin by high cell density fed-batch cultivation of a *Saccharomyces*

- receptor strain physiological considerations during the bioprocess design. *J. Biotechnol.* 32:249-259.
- Merechuk J.C. 1990. Why use airlift bioreactors? *Trends Biotechnol.* 8:66-71.
- Park T.H., J.-H. Seo, H.C. Lim. 1991. Two stage fermentation with bacteriophage λ as an expression vector in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 37:297-307.
- Pandey G.J., R.L. Wittoo, D.D. Spatz. 1984. Cross-flow membrane technology and its applications. *Food Technol.* Dec 1984: 77-87.
- Ramirez D.M., W.J. Bentley. 1995. Fed batch feeding and induction policies that improve foreign protein synthesis and stability by avoiding stress response. *Biotechnol. Bioeng.* 47: 596-608.
- Reuss M. 1995. Stirred tank bioreactors. p 207-233. In J.A. Asenjo, J. Merechuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Robinson H.R., C.P. Chu, C.Y. Ip, P.K. Tsai, J. Yong, T.C. Seamans, A.B. Izon, D.K. Lee, J. Irwin, M. Hilberberg. 1994. Characterization of a recombinant antibody produced in the course of a high yield fed-batch process. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 727-735.
- Samer T., C.W. Robinson, B.R. Glick. 1989. Disruption of native and recombinant *Escherichia coli* in a high-pressure homogenizer. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 1330-1342.
- Savadi S., M. Nouri, F. Berry, J.N. Barbato, T. Linman. 1987. Effect of temperature on the stability of plasmid pTC201 and productivity of *xyf* gene product in recombinant *Escherichia coli*: development of a two-stage chemostat with free and immobilized cells. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1901-1908.
- Schugert K., A. Jabbert. 1995. Pneumatically agitated bioreactors. p 257-303. In J.A. Asenjo, J. Merechuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Schutte H., M.-R. Kohn. 1990. Pilot- and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 599-620.
- Segel R., D.D.V. Ryu. 1985. Kinetic study of stability of recombinant plasmid pP(c23)gM in *E. coli* using two-stage continuous culture system. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 28-33.
- Siegel M.H., H. Hallgulle, J.C. Merechuk. 1988. Air lift reactors: design, operation, and applications. *Adv. Biotechnol. Processes* 7: 79-124.
- Strandberg L., A. Kohler, S.-O. Enfors. 1991. Large-scale fermentation and purification of a recombinant protein from *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 26: 225-234.
- Strandberg L., L. Andersson, S. O. Enfors. 1994. The use of fed batch cultivation for achieving high cell densities in the production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *LEMS Microbiol. Rev.* 14: 53-56.
- Steinman H. 1985. Membranes and membrane processes in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 3: 112-118.
- Tony G.D., H. Mirelman, J. Pizole. 1980. Improved filtration techniques for concentrating and harvesting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 269-273.
- Tulunan H.S. 1985. Scale-up considerations for membrane processes. *BioTechnology* 3: 615-626.
- Van Brunt J. 1985. Scale-up: the next hurdle. *BioTechnology* 3: 419-424.
- Van Brunt J. 1986. Fermentation economics. *BioTechnology* 4: 395-400.
- White M.D., B.R. Glick, C.W. Robinson. 1993. Bacterial, yeast and fungal cultures: the effect of microorganism type and culture characteristics on bioreactor design and operation. p. 47-87. In J.A. Asenjo, J. Merechuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Whitney, G.D., B.R. Glick, C.W. Robinson. 1989. Induction of T417NA lyase in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 991-998.
- Yoshida T. 1995. Bioreactor operation modes. p 479-509. In J.A. Asenjo and J. Merechuk (ed.), *Bioreactor System Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Чем различия между периодическим ферментацией, периодическим ферментацией с добавлением субстрата и непрерывным ферментацией?

2. Какие параметры необходимо строго контролировать при оптимизации процесса ферментации?
3. Как влияет присутствие в клетке рекомбинантной плазмиды на ее рост?
4. Как влияет перемешивание на доставку кислорода из культуральной среды в клетки?
5. Для чего нужно стремиться максимально повысить плотность культуры при промышленной ферментации?
6. Каковы относительные преимущества и недостатки биореакторов с механическим перемешиванием и эрлифтных биореакторов?
7. Сравните процедуры выращивания и высушки культуры рекомбинантных микроорганизмов в двух типовых биореакторах и в одном реакторе.
8. Какой обработке подвергают клеточную суспензию по завершении ферментации?
9. Какие стратегии вы бы выбрали для очистки рекомбинантного белка, секретируемого в культуральную среду?
10. Каковы преимущества и недостатки механического разрушения клеток (по сравнению с химическим)?
11. Как собирают клетки по завершении ферментации? Каковы преимущества и недостатки соответствующих методов?

Эукариотические системы

До недавнего времени высокопродуктивные сорта сельскохозяйственных растений и новые породы животных получали методом селекции. Однако этот подход, требующий для своей реализации много времени, уступил место методам, основанным на геной инженерии высших организмов. Теперь гены, обуславливающие специфические признаки, могут вводиться в клетки растений или животных и передаваться следующим поколениям (наследоваться). В ч. III мы рассмотрим, как получают такие трансгенные растения и животные.

Уже создано несколько видов трансгенных растений, обладающих признаками, которые детерминируются генами, введенными в них геноинженерными методами. К числу таких признаков относятся: способность синтезировать инсектициды; устойчивость к вирусным инфекциям и гербицидам; измененные сроки созревания плодов; измененная окраска цветков; повышенная пищевая ценность семян и симбиотическая совместимость. Исследования трансгенов у животных только начинаются, так что пока трудно предсказать, какие генетические признаки будут наследоваться путем рецессивом. К настоящему времени выведены линии трансгенных мышей, которые используются как модельные системы для изучения механизма возникновения рака, муковисцидоза, болезни Альцгеймера и других заболеваний человека.

Технология рекомбинантных ДНК нашла широкое применение в изучении наследственных болезней человека и раз-

работке методов генной терапии. Так, используя специфический хромосомный сайт в качестве маркера, можно локализовать на хромосоме человека ген, ассоциированный с данным заболеванием, ничего не зная о механизме действия этого гена, а затем, используя клонированную последовательность, которая узнает этот маркерный сайт, попытаться идентифицировать дефектный ген. С помощью такого подхода уже были найдены и охарактеризованы гены некоторых болезней человека. Далее можно исследовать механизм действия нормального и дефектного гена и разработать эффективные методы лечения. В ч. III обсуждается молекулярная генетика человека и генная терапия.

Генная инженерия растений: методология

Одной из основных задач селекционеров были выведение высочайших сортов растений с максимальной пищевой ценностью. Наилучших результатов удалось достичь при том же уровне культуры, как культур из пустынь и рек, однако были осуществлены программы и по созданию новых сортов сельскохозяйственных и декоративных культур. В качестве основного инструмента прямого генетического воздействия на растения применяется recombinant (рекомбинантный) ДНК, выделенная и используемая в микробиологических системах. К высшим преимуществам разработки исключительно эффективных систем переноса ДНК и экспрессии генов в клетках растений относятся: возможность работы с геном растительных клеток. Одним из достоинств высших является их totipotency: из одной клетки может быть регенерировано целое растение, так что из клетки, сконструированной генными методами, можно получить идентичное растение, все клетки которого несут ту же самую ДНК (transgenic (трансгенные растения)). Если такое растение имеет и плодородные семена, то можно при этом высеивать последующим поколениям.

Можно привести три основных применения в области выведения трансгенных растений. Во-первых, введение генов (генов) часто приводит к повышению безвредности и/или устойчивости декоративных культурных растений. Во-вторых, трансгенные растения могут служить новыми биореакторами при массовом производстве пробиотических веществ безвредных или метаболитов. В-третьих, генетическая трансформация растений (трансгенез) позволяет изучать действие генов в ходе развития растения и в ходе биологических процессов.

Некоторые генетически обусловленные признаки – такие как устойчивость к болезням, устойчивость к вирусным заболеваниям и гербицидам, устойчивость к старению, устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды, изменению окраски плодов, повышенная пищевая ценность (семя) и комбинация признаков, могут быть приобретены растением при введении в него одного или нескольких генов. На сегодняшний день уже получены многочисленные трансгенные растения на основе как культурных, так и диких видов. Биотехнология исключительно несет коррективы в традиционные приемы выведения растений, в рамках которых для выведения нового сорта требуется от 10 до 15 лет. А в будущем с ее помощью можно будет создавать растения с совершенно новыми характеристиками.

Трансформация растений *Agrobacterium tumefaciens*

Граммогатическая бактерия *Agrobacterium tumefaciens* физиологически активна в процессе своего жизненного цикла трансформирует клетки растений. Эта трансформация приводит к образованию корончатого галла – опухоли, нарушающей нормальный рост растения (рис. 17.1). Этот процесс, вызванный серьезными агрономическими последствиями, поражает только древесные растения, в частности южные сосны, косточковые фруктовые деревья, розы.

Многочисленные корончатые галлы образуются в результате заражения растительных клеток и экспрессии специфического белка бактериальной плазмидной ДНК – так

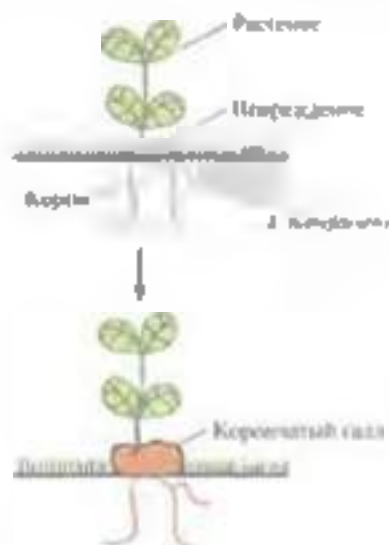


Рис. 17.1. Инфекция растения *A. tumefaciens* и образование корончатой галлы

изометричной Т-ДНК (от слова *transfered DNA*) Т-ДНК – это часть плазмиды, осуществляющей функцию переноса (transfer) плазмиды Т-типа (оплазмиды), ее носитель – штаммы *A. tumefaciens*.

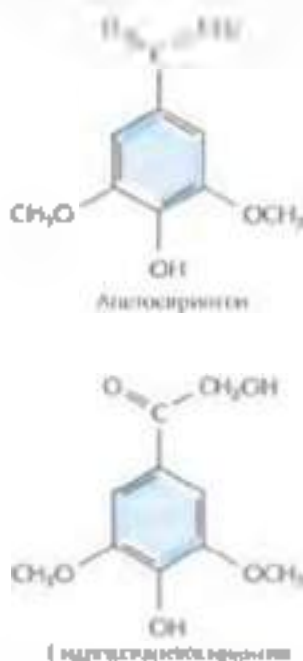


Рис. 17.2. Структурные формулы ацетосирингона и гидроксициннамата. Эти соединения участвуют в развитии и специализации корончатой галлы *A. tumefaciens*

Для Т-ДНК характерны от 12 до 24 т. п. н. в зависимости от штамма. Штаммы *A. tumefaciens*, не содержащие Ti-плазмиды, не способны индуцировать развитие корончатой галлы.

Инфекционный процесс начинается с прикрепления *A. tumefaciens* к клеткам растения в месте повреждения, часто у основания стебля (у корневой шейки). Ранее предполагалось, что *A. tumefaciens* вызывает химико-повреждаемые растения вследствие разрушения клеточной стенки и устранения физического барьера, затрудняющего проникновение бактерий в клетку. Однако сейчас считается, что все дело в специфических фенольных соединениях, ацетосирингоне и гидроксициннамате (рис. 17.2), которые выделяет поврежденное растение. Эти соединения складываются с некоторыми продуктами основного пути синтеза у растений изопреципитина, таких как лигнин и флавонолы. Ацетосирингон и гидроксициннамат активируют ген вирулентности (*vir*), который кодирует оксидиназу и вместе с Ti-плазмидой длиной 35 т. п. н., эти компоненты образуют Т-ДНК. Продукты синтеза неэффективны для транспорта и интеграции Т-ДНК (рис. 17.3) в геном растительной клетки (экзистуют по меньшей мере семь разных вариантов).

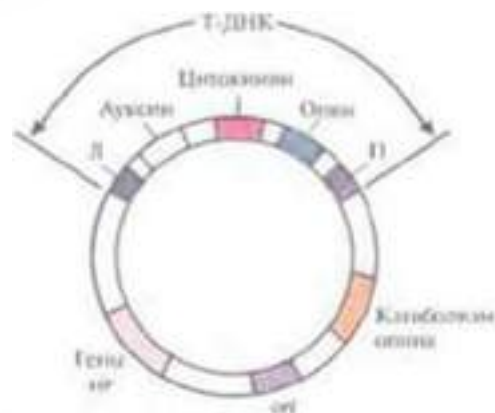
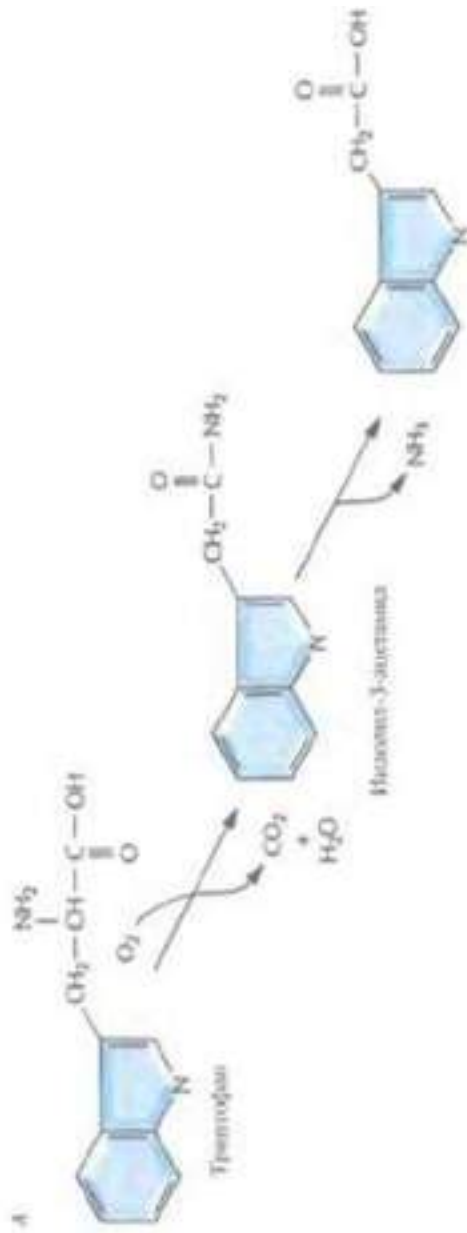


Рис. 17.3. Структурная карта Ti-плазмиды (составляет ее 80% генома) Т-ДНК состоит из двух структурных элементов – цитохрома b₅ и опина, которые кодируются *vir* геном, кодирующим гены *vir* в растительной клетке. За опинем следуют Т-ДНК, состоящая из участка *ori* (*ori*), кодирующего функцию катехолсинтазы и *A. tumefaciens*. Л и П – участки, кодирующие функции (они кодируются плазмидой *A. tumefaciens*)



Индол-3-пировиноградная кислота



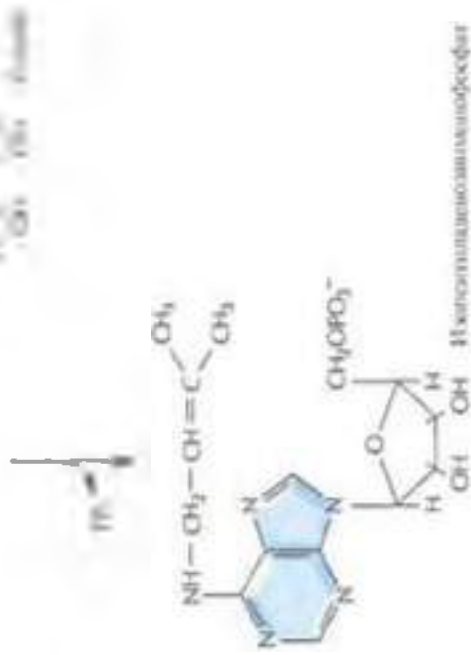


Рис. 17.4. Биосинтез азукана и штекинина при участии ферментов, кодируемых геном T-ДНК T4-вирусами *A. laticapsulae*. А Синтез азукана начинается с превращения триптофана в индол-3-ацетамид, катализируемого триптофанаминоксигеназой. Затем происходит превращение индол-3-ацетамид в индолуксусную кислоту ферментом индол-3-ацетилтрансферазой. Б Синтез штекинина включает превращение инозинатрифосфатной группы изопренглицерилфосфата в 5'-AMP при участии фермента изопренглицерилтрансферазы с образованием изопренглицерилдифосфата.

После прикрепления *A. tumefaciens*, несущей T-плазмиду, к растительной клетке и активации ее теном I ДНК транспортируется в клетку, по механизму, с помощью меланина, а именно меланин переносит плазмидный ДНК в эукариотической клетке прешинет(тук) в ядро(осе) (копидация). При этом I-ДНК находится в определенной форме, и именно в такой форме она встраивается в хромосому и ДНК растения.

Переход I ДНК в одноцепочечную форму сопровождается введением в нее разрывов по обеим фланкирующим ее последовательностям. При этом правая фланкирующая последовательность оказывается на 5'-конце односторонней I ДНК, а левая — на 3'-конце. Предполагается, что нуклеотиды I ДНК в теном растения имеют от специфических последовательностей, локализованных в правой фланкирующей последовательности, которая содержит повтор длиной 25 п. н. Аналогичный повтор присутствует и в левой последовательности, однако, как показывает делеционный мутагенез, она не принимает участия в интеграции.

Большинство тенов I-ДНК активируются только после ее встраивания в геном растения. Их продукты и выделенные образцы корончатого рака *Teish m/M* и *coll*, известны также как *ms1* и *ms2* соответственно, кодируют ферменты, принимающие участие в синтезе растительного гормона ауксина (индолуксусной кислоты). Тен *ms1* кодирует фермент триптофан-2-индолуксусилу, который катализирует превращение триптофана в индолил-3-ацетилен, а тен *coll* — фермент индолил-3-ацетиленгидролазу, катализирующую образование индолуксусной кислоты из индолил-3-ацетилен (рис. 17.4, А). Кроме тенов I-ДНК несет тен *iaa* (известный также как тен *ip*), кодирующий ионенцистронферазу — фермент, который катализирует присоединение к 5'-AMP изопреноидной боковой цепи с образованием индолуксусной ионенцистронферазы (рис. 17.4, Б). При гидроксилировании этих соединений растительными ферментами образуются индолуксусные трикеталлины и трикеталлины соответственно. И арканис, и индолуксусные редуцируют рост и размножение растительной клетки, но, присутствие в небольшом количестве у растений образующие опухоли, таких как карциномы (рис. 17.5).

Кроме тенов ауксина и индолуксусина, I ДНК малой эукариотической T-плазмиды содержит еще индолуксусиную цепочку соединенную из класса опиинов. Стимулы от индолуксусина производят конденсацию индолуксусина и кетокислот или аминокислот и сахаров. Например, при конденсации индолуксусина и индолуксусинной кислоты образуется оксалин, индолуксусин и α -кетоглутаральдегидная кислота, а индолуксусин и индолуксусинная кислота — индолуксусин (рис. 17.5). Индолуксусин образуется в корончатом раке, и затем секретируется. Они могут использоваться как источник углерода (липоиды и как источник азота) любой *A. tumefaciens*, которая несет T-плазмиду (рис. 17.5) или близкая родственная индолуксусина (рис. 17.5), а также индолуксусина I-ДНК. Большинство других исследованных почвенных микроорганизмов

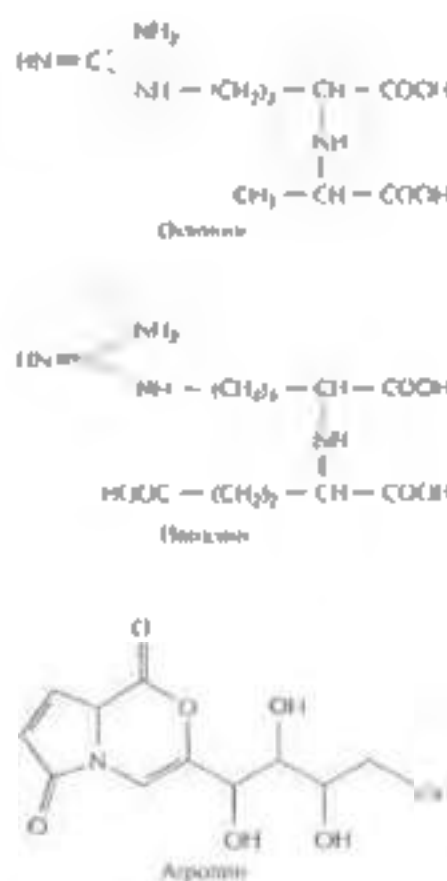


Рис. 17.5. Структурные формулы трех опиинов: оксалина, индолуксусина и аргопатина

мог не способна использовать одини как источник углерода. Таким образом, в процессе эволюции выработался уникальный набор механизмов, посредством которых каждый штамм *A. tumefaciens* генетически трансформирует растительные клетки в «биологические фабрики» по производству соединений углерода, используя которые могут только сами эти бактерии.

Векторные системы на основе Ti-плазмид

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

- Фитогормоны, такие как ауксин и цитокинины, стимулируют деление клеток и тем самым способствуют регенерации из этих клеток нового растения, но только при конструировании векторов на основе Ti-плазмиды гены ауксина и цитокинина должны быть удалены.
- Ген опии не существует для трансгенных растений, но при его наличии может сцидаться конечный выход биомассы, поскольку чужеродные расщелдуются на синтез опиума. Следовательно, при содании векторов ген опиума также должен быть удален.
- Ti-плазмиды имеют очень большой размер (от 200 до 400 к.б.п.), а для эффективности рекомбинантных ДНК нужны векторы меньшего размера, поэтому участки ДНК, несущиесящие для клонирования вектора, должны быть удалены.
- Ti-плазмиды не реплицируются в *Escherichia coli*, что исключает работу с рекомбинантными Ti-плазмидами в этих бактериях. Следовательно, при конструировании векторов на

основе Ti-плазмид необходимо делать в них сайт инициации репликации, обеспечивающий их поддержание в *E. coli*.

Несмотря на все эти сложности было сконструировано несколько векторов для растительных клеток. Все векторы на основе Ti-плазмид имеют юбаты «холодным образом» и имеют следующие элементы.

- Селективный маркерный ген, например ген неомининофосфотрансферазы, который обеспечивает устойчивость трансформированных растительных клеток к канамизину. Поскольку этот ген (как и многие другие маркерные гены, используемые при трансформации растений) по своей природе промоторно неактивен, необходимо поместить его под контроль растительных (эукариотических) сигналов регуляции транскрипции в том числе промотора и системы терминирования-полиадезилации. Это обеспечит эффективную экспрессию гена в трансформированных растительных клетках.
- Сайт инициации репликации, который позволяет плазмиде реплицироваться в *E. coli*. Некоторые векторы содержат также и сайт инициации репликации *A. tumefaciens*.
- Прямая фланкирующая последовательность T-ДНК. Этот элемент абсолютно необходим для интеграции T-ДНК в клеточную ДНК растения. Большинство же векторов содержат как прямую, так и обратную фланкирующую последовательности.
- Полилинкер (множественный сайт клонирования) для встраивания гена в участок между границами T-ДНК.

Поскольку клонирование векторов не содержит генерации, они сами не способны обеспечить интеграцию и интеграцию T-ДНК в клетки растений хозяина. Чтобы решить эту проблему, было разработано два подхода. В первом случае использовался биологический векторный сайт (рис. 17.6, А). Инициация клонирования вектора осуществляется сайтом инициации (используемым для *E. coli*, и для *A. tumefaciens*, но не несет генов *uidA*, *t*, *e* или фактически чужеродный вектор *E. coli* *A. tumefaciens*). Все сайты клонирования при-

лит в *E. coli*, в штем вектор вводит в *A. tumefaciens* Штамм-реципиент *A. tumefaciens* несет модифицированную неонкогенную («рапоружающую») T1-плазмиду; она содержит полный набор генов, но не имеет участка штем (или весь) T-ДНК (так что T-ДНК не может быть транспортирована). В этой системе на неонкогенной T1-плазмиде синтезируются продукты генов, которые мобилизуют участок T-ДНК бинарного клонирующего вектора. Производимые белки, кодируемые геном, неспецифичной T1-плазмиды взаимодействуют с рецепторами слабости встраивания T-ДНК из бинарного клонирующего вектора и прямо сомизую ДНК растения.

Во втором случае используются конститутивную векторную систему. Векторная ДНК рекомбинирует в *A. tumefaciens* с «рапоружающей» T1-плазмидой, T-ДНК которой не несет онкогенных генов. Таким образом, что весь клонирующийся вектор встраивается в неонкогенную T1-плазмиду (рис. 17.6, б). Конститутивный вектор и неонкогенная T1-плазмиды-помощник содержат функциональные последовательности, которые образуют сайт для функциональной рекомбинации и это (как и в первом случае) обеспечивает расщепление и T-ДНК. После рекомбинации клонирующийся вектор становится частью неонкогенной T1-плазмиды, которая содержит гены, необходимые для переноса T-ДНК в растительную хостовскую клетку. Единственный способ поддержания клонирующегося вектора в *A. tumefaciens* — это использование полной конститутивной структуры. В данной конфигурации структурно сбалансированный участок T-ДНК может быть перенесен в растительные клетки.

Физические методы переноса генов в растительные клетки

Системы переноса генов с помощью *A. tumefaciens* эффективно работают только в случае некоричневых растений. В частности, однодольные растения, включая некоторые зерновые культуры (рис, пшеница и кукуруза), практически не трансформируются *A. tumefaciens*. Тем не менее, модифицированные металлами и титаном «концентрирующие» условия, удается трансформировать кукурузу и рис агробактериями *A. tumefaciens*, используя векторы — производные T1-плазмид. Так, например, не через зачищенные кукурузы помещают на несколько минут в суспензии клеток *A. tumefaciens*, в штем инкубируют несколько дней в отсутствие селективного давления. После этого зародки переносится в среду с антибиотиками, в которой выжили только трансформированные растительные клетки. Эти клетки выдерживают в темноте в течение нескольких недель, затем переносится в массу (трансформированным растительных клеток на другой питательную среду и инкубируют на свету, чтобы произошла регенерация целого трансгенного растения.

В то же время (7) переключенный метод трансформации однодольных растений. Некоторые из этих методов требуют удаления клеточной стенки с образованием протопластов. Последние поддерживают в культуре как исключительно растительные клетки или в спонгиозной питательной среде, где они образуют клеточные стенки; но только клетки может быть регенерировано целое растение. Кроме того, разработаны методы трансформации, включающие введение клони-

Рис. 17.6. Две векторные системы на основе T1-плазмиды *A. tumefaciens*. клонирующийся вектор содержит сайт инициирования репликации (ori) и это *E. coli*, и это *A. tumefaciens* (оригинальный реципиент) не имеет в *E. coli* сайта и *A. tumefaciens*, в штем интересующий исследователя ген и растительный селективный маркерный ген, встроенные в T-ДНК. б) конститутивный клонирующий вектор (вверху) содержит сайт инициирования репликации только для *E. coli* и не может автономно существовать в *A. tumefaciens*. Он также имеет селективный маркерный ген, встроенный в участок штем в *E. coli*, сайт и *A. tumefaciens*. (внизу) формирующая неонкогенная T1-ДНК (N), растительный селективный маркерный ген, сайт инициирования репликации в *E. coli*, и фрагмент T1-плазмиды, ее функциональный участок ДНК («рапоружающий») T1-плазмиды. Необходимые T1-плазмиды («рапоружающие») являются «концентрирующими» условиями *A. tumefaciens* (ниже). Функциональная рекомбинация конститутивного клонирующегося вектора с неонкогенной T1-плазмидой дает рекомбинантную плазмиду (внизу), которая несет клонирующийся ген в растительном реципиенте. сайт инициирования репликации и селективный маркерный ген T-ДНК.

17.4.4. Исходы реинтерференции и селективных экспрессионных генов растений (400 н. л. 1994)⁴¹

Фермент	Исход экспрессии в клетках реинтерференции	Исход экспрессии в клетках селективной экспрессии
Нисинин	Да	Да
Гидролизин (фермент) (1) (2) (3)	Да	Да
Делируфин (1) (2) (3) (4)	Да	Да
Хитиназы (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Глюкозидазы (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Нисинин (1) (2) (3)	Нет	Да
Синтеза нисина	Нет	Да
β -D-глюкозидаза	Нет	Да
Синтеза нисина (фермент) (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Фермент, синтез нисина (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Нет
Синтез нисина (1) (2) (3)	Нет	Да
Уреаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Нет	Да
Уреаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Уреаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Нет
Фосфоэстераза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
β -D-глюкозидаза	Нет	Да
Глюкозидаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Амиллаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Нет
Глюкозидаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Нет

Waller, S. and J. D. 1992. *Plant Cell Culture*, p. 101-110. © R. K. & G. L. E. Plenum Press, New York, NY.

Гендер, Р. 1994. *Растения и Культура*. Издательство «Планета», Москва.

шаровидный коммерческого продукта. В связи с этим лучше не надевать зенки устойчивости к антибиотикам в селекционных растениях.

Некоторые продукты репортерных генов (например, β -D-глюкозидаза, а также люцифераза, синтезируемая бактериями и светлячками) можно обнаружить в клетках растительных тканей. И системы трансформации чаще всего используются ген β -D-глюкозидазы *gus*, cod (CUS ген). Он кодирует стабильный фермент, обычно отсутствующий в растениях, который кодирует растительные β -D-глюкозидазы. Его активность в трансформированных растительных тканях можно обнаружить по появлению синей окраски в результате гидролиза искусственно субстрата, 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-глюкозидазы кислоты. Альтернативным более чувствительным методом количественной оценки активности Gus-гена в растительных тканях является анализ на определение концентрации флуоресцентного продукта гидролиза 4-метилюмбеллифераза- β -D-глюкозидазы.

Эксперименты по экспрессии чужеродных генов в растениях

После того как методика трансформации растений была полностью отработана, исследователи стали пытаться вводить различные растительные и бактериальные гены в клетки самих растений. Трансформированные растения проверяли на способность к синтезу чужеродного белка, проводить физиологические исследования, чтобы определить, как присутствие этого белка связывается на уровне растений. Во многих ранних экспериментах использовали промоторы, контролируемые конститутивно экспрессию в ряде растительных клеток. Не так давно были выделены и охарактеризованы растительные промоторы, контролирующие экспрессию чужеродных белков в специфических клетках на определенных стадиях роста и развития растения. Например, вместо конститутивного промотора нурсы выделены специфичной капуста, фунг ингибирующего по пест растительных тканей в течение всей жизни растения, эк-

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Регенерация андрогенетических фертильных растений, синтезирующих аспартинсиназу, из корнчатого галла табака после деления генов, контролирующего образующие опухли

W. De Gooze, J. Leemans, J. P. Herrebouts, L. Tho Thuy, M. De Vaele, J. I. Wilmitzer, I. Oden, M. Van Montagu, I. Schell
Annals 300: 157-165, 1992

Для получения трансгенных растений необходимо эффективная регенерация системы. Первые попытки создания таких систем основывались на использовании *Agrobacterium tumefaciens* для формирования трансгенных табачных растений через Ti-плазмиду (Т-ДНК) и трансформации *in vitro* растительных клеток. Однако при инфицировании растений *Agrobacterium tumefaciens* образуются корнчатые галлы, содержащие пролиферирующую

растительную ткань, которую прежде чем использовать Ti-плазмиду в качестве вектора для трансформации растений, необходимо идентифицировать сформированную опухоль.

Исходя из ДНК, транскрипция синтез с участием и мультиформированная Т-ДНК, Шелл и др. установили, что гены, ассоциированные с формированием галлов, локализованы в Т-ДНК. Это свидетельствует о том, что галлы не Т-ДНК несутся в качестве геномных элементов растительных клеток.

Ти-плазмиды, так же как и хромосомную ДНК обычных растений, реплицируются в форме Т-ДНК, которая является для клеток растительных клеток основным источником энергии. Следовательно, при инфицировании растительных клеток *Agrobacterium tumefaciens* происходит образование Т-ДНК, чтобы не только было трансформировано в хромосомную ДНК растительных клеток. Вспомогательная система ти-плазмиды должна обеспечить репликацию в клетках *Agrobacterium tumefaciens* для поддержания трансгенных растений в течение вегетационного

цикла или промотор генов ядерной субгеномной хромосомной системы ферментов рибозолизом, цитохро-*b*5-гидроксилазы, рибонуклеотидазы и фотосинтезирующих галлов, например в листьях. Аналогично для контроля экспрессии некоторых хлоропластных генов хлоропластами растительные клетки функционируют только в специфических галлах или только при небактериальных условиях.

Подобляющиеся большинство генов растений локализованы в ядерной ДНК, однако хлоропласты и митохондрии тоже содержат гены, выполняющие ряд важных и уникальных функций. При этом не все белки, присутствующие в этих органеллах, закодированы в их ДНК. Некоторые из них кодируются ядерной ДНК, синтезируются в цитоплазме, а затем с помощью специального механизма импортируются в соответствующую органеллу. Есть два способа введения специфического чужеродного белка в митохондрии или хлоропласты. Один способ — это введение гена, кодирующего чужеродный белок, и последовательности сигнального пептида, направляющего белки в органеллу. Такая конструкция может быть

встроена в хромосомную ДНК, а рибосомный белок будет импортирован в соответствующую органеллу. Второй способ предполагает введение гена, кодирующего чужеродный белок, непосредственно в хлоропластную или митохондриальную ДНК.

Выделение различных промоторов и их использование

Для выделения растительных промоторов из некоторых видов растений используются специальные процедуры так называемые «промоторизированные» векторы и система трансформации на основе Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Этот подход состоит в следующем. Репортерный ген без промотора встраивают сразу за цис-элементы фланкирующей последовательностью генов на основе Ti-плазмиды, а после переноса Ti-ДНК в хромосому растения он оказывается в окружении растительной ДНК. Если Ti-ДНК встроится в промоторный участок функционального гена, то произойдет транскрипция репортерного гена. Для идентификации растительных промоторов и клонирования репортерного гена можно использовать ген

необходимых фосфотрансферазы (pH) При этом экспрессия данного гена можно проконтролировать подбором канонически устойчивых трансформантов. Однако таким способом трудно идентифицировать промоторы, функционирующие лишь на определенной стадии развития растения или индуцируемые специфическим фактором окружающей среды Чтобы быть уверенными в отборе именно трансформированных растений с T-ДНК следовало репортёрным геном без промотора встраивать ген устойчивости к антибиотикам в кодирующую область гена конструкции конститутивной промотора. Стимулы отбирают или формируют устойчивые клетки, а затем проверяют функциональную активность трансформантов в условиях, обеспечивающих экспрессию репортёрного гена В результате обнаруживается, что от 5 до 10% трансформированных растительных клеток несут репортёрный ген, находящийся под контролем активного промотора

35S-промотор имеет мощную интронную капучину часто используемую в растительных системах для сильной промотор, хотя уровень экспрессии контролируется им геном, кодирующего чужеродный белок, часто снижается ниже, чем хотелось бы Чтобы решить эту проблему и найти наиболее эффективный промотор, необходимо протестировать в растении различные конструкции «промотор-ген». Кроме промотора, экспрессию чужеродных генов могут усиливать некоторые другие моменты, в частности интронные последовательности, расположенные на расстоянии от одной до нескольких сотен нуклеотидов до промотора, итроны, стабилизирующие m⁷GK, и сигналы терминации транскрипции

Были протестированы ДНК-конструкции, содержащие все или некоторые из следующих элементов: 35S-промотор, сигнал терминирующей транскрипции геномной матрицы (т.е. от одного до семи тысячелетних повторов интронных последовательностей), так называемый 13-повторительности, который предположительно усиливает экспрессию генов на уровне трансляции Наиболее эффективная конструкция содержала семь интронных последовательностей (там указаны), экспрессию чужеродного гена в трансгенных растениях табака и риса был примерно вдвое выше, чем в случае только 35S-промотора (табл. 17.5). Протестированные промоторные конструкции контролировали экспрессию в трансгенных растениях (клеточных культурах) чужеродных генов во всех растениях, независимо от того, чем, что T-ДНК встраивалась в разные сайты в геноме растения. Каким бы ни было, можно создавать сильные тканеспецифические промоторы, регулируемые в процессе развития

Введение чужеродных генов в хлоропластную ДНК

У большинства высших растений в каждой клетке листа присутствует примерно 100 хлоропластов и каждый хлоропласт содержит примерно 100 копий хлоропластной ДНК Для специфической генетической трансформации хлоропластов с целью повышения их функциональных характеристик, необходимо вводить чужеродные гены в хлоропластную, а не в ядерную ДНК, длина которой примерно в 10^4 – 10^5 раз больше Кроме того, необходимо чтобы чужеродные гены присутствовали во всех из примерно 10^4 молекул хлоропластной ДНК, содержащихся в одной клетке

Таблица 17.5 Генетически протестированные конструкции в трансгенных растениях¹

Растение	4-кратный уровень экспрессии гена		Минимум одной копии гена	
	35S-промотор	сильный промотор	35S-промотор	сильный промотор
Табак	0,0	10,0	1,0	10,1
Рис	0,0	14,4	2,2	49,3

¹ Таблица Мейерс и др. Plant Cell, 1990, 2: 46–50 (1990).

² В этом случае от растений отбирались только те, у которых

было от 1 до 100 копий чужеродного гена. В таблицах 17.5 и 17.6 Функциональные конструкции, которые обеспечивают экспрессию генов в трансгенных растениях, содержат от 1 до 100 копий чужеродного гена. Таблица 17.5 показывает, что от 5 до 10% трансформированных растительных клеток несут репортёрный ген, находящийся под контролем активного промотора

Средняя экспрессия чужеродного гена в трансгенных растениях, полученных с помощью различных конструкций, приведена в таблицах 17.5 и 17.6

В таблицах 17.5 и 17.6 приведены данные о том, что от 5 до 10% трансформированных растительных клеток несут репортёрный ген, находящийся под контролем активного промотора

Средняя экспрессия чужеродного гена в трансгенных растениях, полученных с помощью различных конструкций, приведена в таблицах 17.5 и 17.6

В таблицах 17.5 и 17.6 приведены данные о том, что от 5 до 10% трансформированных растительных клеток несут репортёрный ген, находящийся под контролем активного промотора

Рис. 17.2. Примеры типичных векторов, используемых для встраивания генов в хлоропластную ДНК. *Spc^r* – ген устойчивости к спектромицину



Вначале чужеродные гены вводили в ДНК хлоропластов в составе плазмидного вектора, несущего (последовательную чужеродную ДНК и селективный маркер, например ген устойчивости к антибиотку), фланкированные специфическими последовательностями хлоропластной ДНК (рис. 17.2). Такая стратегия была весьма эффективной, однако нередко селективный маркер мешал экспрессии фланкируемых хлоропластных генов. Чтобы решить эту проблему, разработали стратегии, в которой селективный маркер и чужеродный ген не были физически связаны друг с другом. Для этого растения табака трансформировали смесью олигонуклеотидов разных типов, одна половина содержащая селективный маркер (ген устойчивости к спектромицину), фланкированный ДНК из одного участка хлоропластной ДНК, а вторая – чужеродный ген (ген устойчивости к хлоромицину), фланкированный последовательностями из другого участка

хлоропластной ДНК (рис. 17.3). Оба гена имели прокариотические сигналы транскрипции, что обеспечивало их транскрипцию в хлоропластах, но не в ядре. Последовательности хлоропластной ДНК вблизи были ориентированы таким образом, что рекомбинация или встраивание в геном хлоропластов не приводило к нарушению работы какого-либо хлоропластного гена. Помимо влияния метафор-бомбардировки микрочастицами, а затем отбора трансформированных растений также на основе селективного маркера. Хлоропласты из отобранных трансформантов проверяли на наличие продукта, детерминируемого геном устойчивости к хлоромицину (неселективным чужеродным геном). Удивительно, что примерно 50% селективных устойчивых трансформантов экспрессировали также ген устойчивости к хлоромицину, что указывает на применимость коинтрансформации для встраивания чужеродных генов в хлоропластную ДНК.

Рис. 17.3. Примеры векторов, используемых для встраивания в хлоропластную ДНК двух генов – селективного и последовательности *Spc^r* – ген устойчивости к спектромицину.





Рис. 17.9. Схематическое представление T-DНК, кодирующей вставки в геном. После интеграции T-DНК в хромосомную ДНК растений транскопирование вставки селективного маркерного гена и вставка его в другой хромосомный сайт. Обозначения L и R – левая и правая фланговая последовательности, T_s – терм. или D-терминалы. Прямые и обратные терм. последовательности T_s и T_d транскрибируются в T-терминалы. Ген, интересующий исследователя, и селективный маркерный ген не кодируются.

Получение трансгенных растений, не содержащих маркерных генов

Обычно при введении чужеродного гена в растение селективный маркер и селективный маркерный ген. Хотя до сих пор не было никаких указаний на то, что какой-либо из этих генов оказывает неблагоприятное воздействие на человека, животных и на окружающую среду, nonetheless, к которым в принципе может принадлежать селективный маркерный ген), мы хотим избежать опасности. Например, продукты некоторых маркерных генов могут оказаться аллергенами или токсичными веществами, а гены устойчивости к антибиотикам могут помешать идентификации трансгенных микроорганизмов. Кроме того, присутствие селективных маркерных генов усложняет трансформацию трансгенных растений доминирующими генами, поскольку один селективный маркер не может использоваться дважды. Чтобы усилить общность, были разработаны методы получения трансгенных растений без каких-либо маркерных генов.

Один из экспериментальных подходов к получению безмаркерных трансгенных растений включает коинтеграцию растений двумя разными ДНК, одна из которых несет маркерный ген, другая – интересующий исследователя чужеродный ген. В этом случае от 30 до 50% растений содержат оба гена, которые, по-видимому, интегрированы в разные сайты хромосомной ДНК. После набора трансформантов маркерный ген можно удалить из трансгенного растения с помощью обычной скрещивания.

В рамках другого подхода селективный маркерный ген интегрирован между растительными мобилизационными элементами (D_s элементами) и таковой конструкции вводят в T-DНК (вместе с геном трансформации, которая вызывает участок

ДНК между D_s-элементами и интегрирует его в другом хромосомном сайте (рис. 17.9). В процессе интеграции T-DНК в ДНК растения-хозяина в 90% случаев селективный маркер, кодирующийся между двумя D_s-элементами, оказывается в другом сайте хромосомной ДНК, при этом с вероятностью 30% этот сайт находится далеко от исходного. Таким образом, селективный маркерный ген может использоваться для идентификации трансформированных растений, а затем удалиться (при скрещивании).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью генов инженерии можно проводить чужеродные гены в растительные клетки в культуре с последующей регенерацией целых фертильных растений из отобранных трансформированных клеток. Легче всего путем трансформации растений осуществляется с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. При поражении растений в них начинает синтезироваться специфическое вещество. В ответ на этот химический сигнал *A. tumefaciens* прикрепляется к мембране растительной клетки, после чего проникает в цитоплазму (T-DНК) бактериальной плазмиды в ядро растительной клетки. T-DНК интегрируется в растительный геном и экспрессируется T-DНК содержит гены, кодирующие ферменты синтеза фитонормонов, которые вызывают увеличение (в меру растительных клеток и их пролиферацию). Кроме того, растительные клетки начинают синтезировать один, кодируемый T-DНК, который может использоваться только *A. tumefaciens*. Таким образом, в качестве мобильных сформированных металлов трансформация растительных клеток и «фабрику» по производству вещества – источник углеводов и азота (онлайн) исключительно для гена *A. tumefaciens*.

Чтобы использовать природную способность *A. tumefaciens* проникать в растительные клетки для доставки в них клонированных генов, были созданы модифицированные Ti-плазмиды. На T-ДНК удаляли гены фитопатогенности и гены метаболитов опухоли и встраивали эту же измененную T-ДНК в плазмиду, способную стабильно существовать в *E. coli*. Встроенный в T-ДНК ген-маркер помещал вместе с ней в агро растительной клетке ферментативно. В случае биотрансформации системы чужеродный вектор с клонированным в T-ДНК геном вносил в клетки *A. tumefaciens*, несущие модифицированную плазмиду с геном, необходимым для переноса T-ДНК в клетку растения (агробактерии). Кроме того, разработана конъюгативная система, которая предполагает введение чужеродного вектора в *A. tumefaciens*, где он рекомбинирует с несомкнутой Ti-плазмидой, несущей T-ДНК, с образованием одной плазмиды, в которой есть и функционирующие маркеры, и T-ДНК с клонированным геном. Успех T-ДНК *A. tumefaciens* можно считать для переноса генов в различные растения. Как следствие, эта система применима не для всех видов растений. Эффективным методом доставки ДНК в различные растительные клетки являются также биобактериальные микрокапсулы (биоканюлы).

Для обеспечения экспрессии чужеродных генов, введенных в растительные клетки, используются растительные промоторы. Различные промоторы, функционирующие только в определенных растительных тканях или на определенной стадии развития растения, идентифицированы по экспрессии репортерного гена без промотора после его интеграции в хромосомную ДНК растения. Были разработаны методы встраивания чужеродных генов непосредственно в хлоропластную или митохондриальную ДНК так, чтобы координатно безвекторно вводились прямо в эти органеллы. В настоящее время для того чтобы ускорить общедоступность, были разработаны методы введения маркерных генов in vivo в растения.

ЛИТЕРАТУРА

Али Г., Я. Кли. 1993. Techniques for isolating and characterizing plant transcription promoters, enhancers, and terminators, p. 155-166. In B. R.

- Glick, J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Carter H., P. Maliga. 1995. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. *Bio/Technology* 13: 791-794
- Curtis P. 1992. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J* 2: 275-281
- Dale E. C., H. Chu. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10558-10562.
- Goldbrogh A. P., C. N. Lavrello, J. I. Yoder. 1993. Transposon mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/Technology* 11: 1286-1292
- Gilmer M. Y., W. L. C. (eds). 1993. Vectors for plant transformation, p. 89-119. In B. R. Glick, J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Halford L., P. C. Marth, L. Wilmshere. 1992. Gene targeting in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet* 231: 186-193.
- Ishida Y., H. Sakta, S. Ohta, Y. Hiei, T. Kanari, T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* 14: 745-750
- Jefferson R. A., T. A. Kavanagh, M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *FAOBO J.* 4: 3901-3907
- Klein T. M., E. D. Wolf, H. Wu, J. C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Annu. (London)* 327: 70-73.
- Kruger-Lieber S., I. Potrykus. 1987. A simple and efficient method for direct gene transfer to *Petunia hybrida* without electroporation. *Plant Mol Biol Rep* 5: 289-294.
- Mull B. L., P. F. Fulbert, P. J. Charest, V. N. Iyer. 1997. Procedures for introducing foreign DNA into plants, p. 67-88. In B. R. Glick, J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* CRC Press, Boca Raton, Fla.

- Mitsubara T., M. I gaki, H. Hanochika, M. Ohshima, T. Morakami, Y. Gotah, Y. Katsuyose, S. Nakamura, R. Hosokura, S. Nishiyama, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki, Y. Ohashi. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 49-59.
- Ow D. W., K. V. Wood, M. Helms, J. H. de Wet, D. R. Hellens, S. H. Howell. 1996. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859.
- Pachkowski J., M. Baur, A. Darycki, I. Potrykus. 1988. Gene targeting in plants. *FAO J* 7: 4021-4026.
- Park K. P. 1995. Plant biotechnology for crop improvement. *Biotecnol Adv* 13: 673-693.
- Potrykus I. 1990. Gene transfer to cereals: an essential. *Bio/Technology* 8: 335-342.
- Potrykus I. 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu Rev. Plant Physiol.* 42: 205-225.
- Southgate E. M., M. R. Davey, J. B. Power, H. Marchant. 1995. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotecnol Adv* 13: 631-651.
- Yale P., J. de Buyser, V. Bal Tangu, H. Nakamura, Y. Horiy. 1995. Foreign delivery into monocotyledonous species. *Biotecnol Adv* 13: 653-671.
- Walden R., J. Shell. 1990. Techniques in plant molecular biology - progress and problems. *Eur J. Biochem.* 192: 563-576.
- Walden R., R. Wiegand. 1995. Gene transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Biotecnol.* 13: 324-331.
- Yoder J. I., A. P. Goldsbrough. 1990. Transformation system for generating marker free transgenic plants. *Bio/Technology* 12: 263-267.
- Zambryski P. 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium* mediated DNA transfer to plant cells. *Annu Rev Genet* 22: 1-30.
- Zambryski P., J. Tempe, J. Scheil. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* T1 and R1 plasmids in plants. *Cell* 56: 193-201.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Почему T5 (индикатор) *Agrobacterium tumefaciens* подходит для создания вектора - переносчика чужеродного гена в хромосому ДНК растения?
2. Чем различаются биархивы и комплементарные векторные системы?
3. Что такое репортерные гены и как они используются при трансформации растительных клеток?
4. В чем заключается метод бомбардировки клеток микрочастицами, несущими ДНК для трансформации растений?
5. Подробно опишите, как вы будете клонировать растительный промотор, специфичный для данной ткани?
6. Как интегрировать чужеродный ген в ДНК хлоропласта?
7. Как получить трансгенное растение, не содержащее маркерного гена?
8. Как повысить активность растительного промотора?

Генная инженерия растений: применение

Скромной перламутровой наукой генетическая инженерия растений является создание новых сортов культурных растений. Большинство работ исследователей было направлено на получение выносливых сортов растений без применения пестицидов. В растения вводят гены, обеспечивающие их устойчивостью к насекомым-вредителям, вирусам, гербицидам, неблагоприятным условиям окружающей среды, к гелям, замедляющие старение. Число этих работ мы рассмотрим ниже. Кроме того, производятся заимствования полезных генов от диких родственников и качества растительных продуктов, а также по использованию растений в качестве «биореакторов».

Выведение растений, устойчивых к насекомым-вредителям, вирусам и гербицидам

Растения, устойчивые к насекомым-вредителям

Если бы хлебные злаки можно было изменить методами генной инженерии так, чтобы они продуцировали функциональные инсектициды, то мы получили бы культуры, устойчивые к насекомым-вредителям и не требующие отныне опасной дурнопахнущими и ядовитыми химическими пестицидами (вместо такого отравляющего препарата ацетилхолин (серинид)). Но идея эта, в 1995 г. на химические инсектициды во всем мире было затрачено примерно 4 млрд долларов. Однако следует, что себестоимость зерна при возделывании культур, устойчивых к насекомым-вредителям, была бы ниже, чем для

неустойчивых. Кроме того, биологические инсектициды обычно действуют лучше, на строго определенное число видов насекомых и безопасны для человека и других высших животных.

Для создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям, с помощью генноинженерных методов были получены различные штаммы. В одном случае использовали ген инсектицидно-протектина, продуцируемый личинками шелкопряда *Bombyx mori* (гв. 15). В другом – гены растительных белков типа ингибиторов амилазы или протеиназ, эффективных в отношении широкого круга насекомых. Исследования в отношении второго подхода дали отрицательные результаты. Было не способно пережить растительную ткань, потому что ингибиторы присутствовали в недостаточных количествах белков.

Протеины в мышечных это белковые средство защиты растений: обладая в окружающей среде, они теряют активность. К сожалению, множество вредителей хлебных злаков питаются внутренними тканями растений, так что присутствие в мышцах, растительных на поверхность растений, оказывается малоэффективным. Эту проблему можно решить, если обеспечить экспрессию генов токсинов в самих растениях. Растительные инсектициды в этом случае не потребуются и растения не повредят и окружающую среду, а кроме того, не возникнет проблем, связанных с применением пестицидов на животных и результате расщепления. Задача биотехнологов состоит в создании трансгенного растения, которое синтезировало бы активную форму бактерицидного инсектицида в количестве, достаточном для защиты растений от вредителей.

измененная форма гена токсина. Такой ген содержится в колоне, чаще используемые растениями по сравнению с теми, которые «предпочитают» грамположительные бактерии. Были внесены также изменения, предотвращающие образование вторичной структуры у мРНК или исключение появления сайтов полиаденилирования, характерных для растений, что могло бы снизить уровень экспрессии. GC-содержание «полностью» измененного гена было равно 49% (для гена дикого типа эта величина составляла 37%), а мутационная последовательность была только на 78,9% гомологична тойковой гена дикого типа.

Трансгенные растения, трансфермированные сильно измененным геном протоксина, синтезировали в 100 раз больше токсина, чем растения, трансфермированные геном дикого типа, при этом наблюдалась прямая корреляция с увеличением инсектицидной активности. Полученные данные позволяют надеяться, что аналогичным образом удастся повысить уровень экспрессии в растениях множества других полезных генов.

Количество синтезируемого в растениях токсина попытались увеличить, осуществив экспрессию «полностью» измененного гена протоксина под контролем промотора гена малой субъединицы рибулосебисфосфат-карбоксилазы, помещенного после хлоропластной сигнальной последовательности этого фермента, таким образом, чтобы сверхэкспонированный протоксин был локализован в хлоропластах. Эта стратегия привела к радикальному повышению уровня экспрессии гена протоксина, так что на долю протоксина стало приходиться до 1% всех белков листа. Другим эксперименте ген протоксина вводили непосредственно в хлоропластную ДНК растения-хозяина. Это дало следующие преимущества. Во-первых, вводимый ген не нужно мутифицировать, поскольку транскрипционный и трансляционный аппараты хлоропластов относятся к прокариотическому типу. Во-вторых, на одну клетку приходится много хлоропластов, а на один хлоропласт – много копий хлоропластной ДНК, поэтому ген протоксина присутствует в большом числе копий, и эффективность его экспрессии повышается. В-третьих, хлоропласты передаются только через

материальную наследственность, поэтому синтез токсина происходит в потомстве (тогда ДНК по наследству передается и ген, кодирующий белок-инсектицид). Кроме того, в отличие от других растений, в хлоропластах нет ядра, поэтому на другие растения.

Одним из первых генов, введенных в растения, это экспрессируемый в тканях растений как токсин табак, картофеля, гри, кукурузы и других видов жай картофеля (гены *Proteinase*, *Proteinase*, *Proteinase* и *Proteinase*). Кроме того, одним из первых методов «ввода» растений в ткани в настоящее время декламационный. Так, в трансгенных растениях картофеля осуществлена эффективная экспрессия синтетического гена на основе гена инсектицидного токсина *B. thuringiensis* var. *kentuckyensis* с кодовым словом, используемым растениеводами. Полученные растения оказались высокоустойчивыми к колорадскому жуку, основному вредителю картофеля. Уже проведены успешные полевые испытания культуры в течение нескольких лет и получено разрешение на коммерческое ее использование в США. Следует отметить, однако, о необходимости постоянного контроля популяции насекомых-вредителей, с тем чтобы вовремя обнаружить устойчивые варианты. Возможно, в будущем для защиты трансгенного картофеля придется использовать более мощные протоксины *B. thuringiensis* или, что более вероятно, клонировать и экспонировать в растениях другие инсектицидные гены и дополнить их к генам протоксина *B. thuringiensis*. В настоящее время разрабатывается способ снижения селективного давления со стороны трансгенных растений, экспрессирующих ген протоксина *B. thuringiensis*, на устойчивых насекомых-вредителей. В одном случае экспрессию гена *B. thuringiensis* в трансгенном растении ограничили во времени. Для этого его помешали под контроль промотора гена табака PR-1a (от англ. *pathogenesis-related*), экспрессия которого представляет собой часть естественного механизма защиты табака от болезнетворных организмов. Ген PR-1a индуцируется любыми патогенными организмами или химическим агентом типа салициловой или полиакриловой кислоты. Обработка трансгенных растений, несущих ген протоксина *B. thuringiensis* под контролем PR-1a-промотора, химическим индуктором, обнаружил, что они синтезируют инсектицид в

определенном количестве в течение 1 сут после обработки, и этого достаточно для последующей закладки растений от нескольких обработок. Таким образом, можно индуцировать синтез протектина, обработав трансгенное растение пестороним и безвредным химическим веществом в определенном месте вегетационного цикла. Такая селекционность синтеза протектина приводит к снижению селекционной стоимости устойчивых насекомых. Аналогичные системы могут применяться для получения семян семян разных чувствительных белков в трансгенных растениях.

Из одной из рассмотренных ранее протектинов *B. thuringiensis* может быть эффективным в отношении всех видов насекомых. В ходе эволюции растения (включая и многие млекопитающие от насекомых, обеспечивающие их выживание, однако степень этой защиты не всегда достаточна. Некоторые растения синтезируют ингибиторы протектина, которые, попадая в кишечник насекомого, блокируют развитие растительных белков. Разумно было предположить, что если выделить растительный ген ингибитора протектина и связать его сильным привлекателем, то можно будет создать привлекательные сельскохозяйственные культуры, способные синтезировать ингибитор протектина в количестве, достаточном для защиты от насекомых вредителей. В одном из таких экспериментов с использованием химически синтезированного ДНК-кода из банка клонов комплементарной ДНК (кДНК) был выделен клон, кодирующий ингибитор протектина улитки кукурузы. (При синтезе ДНК коды руководствуются принципом взаимодополнительности оснований этого белка.) Вынараженную кДНК субклонировали в бинарный вектор на основе *P. (p)ubi* (рис. 18.2) и ввели в штамм *A. tumefaciens*, содержащий плазмидосистему *(Ti-плазмиду)* с активными центрами. После инфицирования листовых тканей табака *A. tumefaciens* тем культурным клеткам, содержащим комплементарную ДНК, отбиралась их способность к росту в присутствии капамина и ресекретируемости ими трансгенное растение. Ущерб, наносимый насекомыми *Heliothis virescens* (совка) трансгенным растениям, синтезирующим белок *2* был ингибитором протектина *101* м растительного белка, был существенно меньше, чем в случае обычных растений.

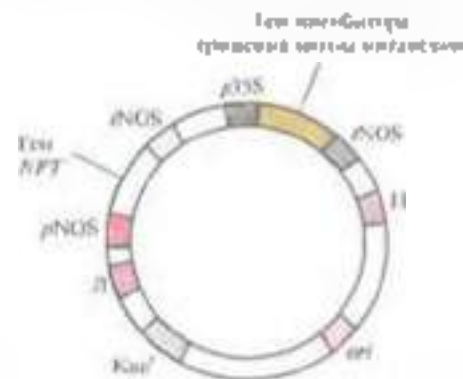


Рис. 18.2. Циркулярный и линейный варианты вектора, несущего ген ингибитора протектина улитки кукурузы. Вектор содержит сайт ориентации репликации ДНК для млекопитающих клеток (*ori*) и ген устойчивости к капамину (*NPT*), который функционализирует как в *S. (S)*, так и в *A. tumefaciens*. Между *ori* и *NPT* и между *II* и *ori* функциональными последовательностями $1-1.6 \times 10^6$ нуклеотидов ген неспецифичной фенилаланина (*NPT*) был связан с помощью метода рекомбинации трансформации *in vitro* плазмидосистемы (*pNOS* и *pNOS*), что позволяет проводить отбор трансформантов устойчивых к трансформации штаммов млекопитающих. *II* ген ингибитора протектина улитки кукурузы, так называемый ген ингибитора *25S* протектина (*p35S*) вирус индийской мушкетерской и синтетический трансформационный/плазмидосистемный ген выключателя (*35S*)

Система улитки кукурузы, содержащая увеличенное количество ингибитора протектина для улитки и человека. Впрочем, если бы такая способность существовала, можно было бы ограничить экспрессию гена ингибитора гена (камина) растения, которым предшествовал питательный источник насекомых вредителей, но которые не использовал и (или) человек и другие виды. Так, эволюционный ген ингибитора протектина *101* бы обработан в листьях и корнях растения, но не в его плодах.

Выделение гена ингибитора *II* протектина картофеля в растении риса индуцирует на его корневого стеблевого ингибитора (*Sclerotinia sclerotiorum*) основного насекомого-вредителя для этой культуры; ингибитор приводит к «бурной гибели» (гибели стеблей) и черным черепкам без семян. Было сконструировано растение, содержащее ген ингибитора *II* протектина картофеля под контролем его собственного промотора и системы естественной трансформации. Между промотором и кодирующей областью гена ингибитора был

Рис. 18.4. Зависимость эффективности трансформации *Agrobacterium tumefaciens* от концентрации трансформационного фактора, при культивировании *Agrobacterium tumefaciens* в среде с добавлением трансформационного фактора.

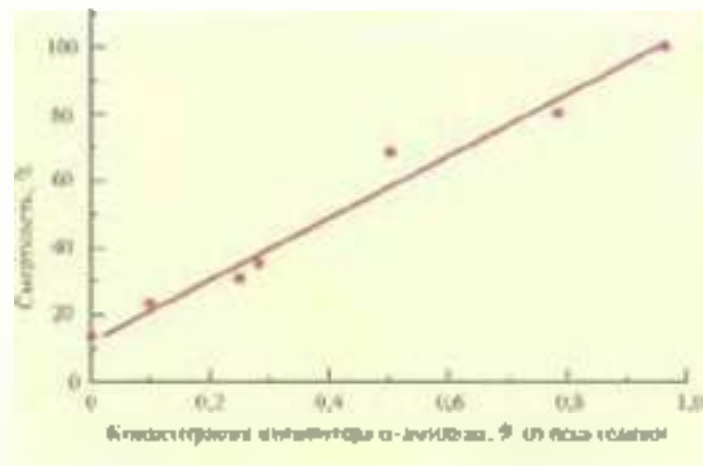
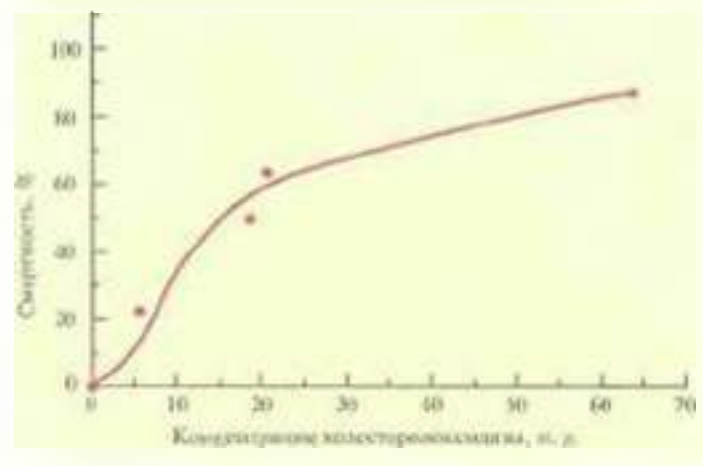


Рис. 18.5. Зависимость эффективности трансформации *Agrobacterium tumefaciens* от концентрации трансформационного фактора, при культивировании *Agrobacterium tumefaciens* в среде с добавлением трансформационного фактора.



эпоксилипиды, кодируемые белок мол. массой 75 кД (75 аминокислотных остатков) и липопротеин белок мол. массой 300 кД (43 аминокислотных остатка), был выделен из штамма *Agrobacterium tumefaciens* и встроен в вектор вместе с промотором вируса мозаики инжирного шиповника и сплайсом терминатора из 3'-области гена полиомиксина *A. tumefaciens*. Когда такую конструкцию ввели в протопласты клеток табака, трансформированные клетки стали активно экспрессировать эпоксилипиды. В будущем, вероятно, этот ген будет введен в растения хлопчатника, сои или кукурузы, либо совместно, либо в комбинации с геном других биологически активных веществ — он станет эффективным инсектицидом защиты растений от насекомых-вредителей.

Растения, устойчивые к вирусам

Вирусы растений часто причиняют значительный ущерб растениям и существенно снижают урожай. Чтобы не прибегать к обработке культур химическими препаратами, селекционеры пытаются перенести природные гены устойчивости к вирусам от одной линии растений к другой. Однако устойчивые растения часто вновь становятся чувствительными, а устойчивость к одному вирусу не гарантирует устойчивости к другим. Природный иммунитет к вирусам формируется комплексно разными причинами: блокированием проникновения вируса в растение, предотвращением его распространения, появлением симптомов вирусной инфекции.

Чтобы получить растения, устойчивые к вирусу сам, проводилим их «иммунизацию» вирусными телами, кодирующими белок оболочки, другими вирусными телами или синтетическими иммуноспецифическими вирусного генетика.

Если в трансгенном растении экспрессируется ген, кодирующий белок оболочки вируса, который обычно инфицирует это растение (а данным белком зачастую является основным белковым компонентом вируса), то способность вируса проникать в растение и распространяться в нем часто значительно уменьшается. Механизм антивирусной пролиферации вируса в присутствии генов белка оболочки точно не установлен, однако ясно, что противовирусное действие направлено преимущественно на ранних стадиях репликации вируса, так что вирусные частицы не образуются. Это снижает вероятность возникновения спонтанных вирусных мутантов, способных к репликации в присутствии вирусного белка оболочки. С помощью этого подхода были получены устойчивые к различным вирусам трансгенные растения множества различных зерновых культур (табл. IX.3). И хотя абсолютной устойчивости при этом достичь не удалось, ее уровень был весьма высок. Более того, обнаружилось, что ген белка оболочки одного вируса иногда обеспечивает устойчивость к широкому кругу неродственных вирусов. Ценность подхода заключается в том, что трансгенные растения различаются значительно как в полевых условиях, так и в лаборатории.

Молекула РНК, комплементарная транскрипту нормального гена (мРНК) называется антисмысловой, а сама мРНК, участвующая в трансляции, — смысловой. Антисмысловая РНК образует дуплет с мРНК, блокируя тем самым трансляцию так что в ее присутствии синтез белкового продукта соответствующего гена уменьшается. Кроме того, дуплет антисмысловой РНК-мРНК быстро деградирует, что уменьшает концентрацию конкретной мРНК в клетке. Учитывая все сказанное выше, можно попытаться предотвратить репликацию растительных вирусов и защитить от них растение, введя в него ген, обеспечивающий синтез антисмысловой РНК комплементарной РНК вирусного белка оболочки.

Таблица IX.3. Неслучайное устойчивое к вирусам трансгенное растение, синтезирующее белок оболочки вируса¹

Растение	Вирус — патогенное тело
<i>Antennaria dioica</i> , A	Вирус скрутки махров цветка
A <i>Antennaria</i> , цвето	Вирус 3 антенна махров
A <i>Antennaria</i> , цвето	Вирус желтой махровой крапиво
Пшеница, табл.	Триплекс-0 (антисмысловый белок)
Картофель	Вирус картофеля махров
Картофель	Вирус 3 картофеля
Картофель, <i>Solanum tuberosum</i>	Вирус 5 картофеля
Картофель, табл.	Вирус 4 картофеля
Рис	Вирус рисовой махров
Табл.	Вирус махровый рисовый
Табл.	Вирус махровый рисовый
Табл.	Вирус рисовый махров табл.
Табл.	Вирус рисовый махров табл.
Табл.	Вирус рисовый махров табл.
Табл. <i>A. Antennaria</i>	Вирус махровый рисовый табл.
Табл. цвето	Вирус махровый рисовый
Табл.	Вирус махровый рисовый

¹Из аннотации к статье *Antennaria dioica* в журнале *Plant Cell* 1991, 3: 1161.

Для сравнения эффективности подхода, основанного на использовании вирусного гена белка оболочки, с одной стороны, и антисмысловой РНК — с другой, клонировали cДНК белка оболочки вируса махрового риса (CuMV) в векторную таблицу и двух ориентациях, «смысловой» и «антисмысловой» (в каждом конкретном растении одна из них ориентации), а затем определяли чувствительность трансгенных растений к вирусной инфекции (рис. IX.6) геном CuMV представляется тремя отдельными линейными молекулами РНК, каждая из которых кодирует определенный вирусный белок. Из совокупности этих молекул — РНК — выделяется процессинг; часть ее неспецифичности удаляется и образуется РНК4, кодирующий вирусный белок оболочки. Создание трансгенных растений, которые синтезируют либо антисмысловую мРНК, либо вирусный белок оболочки, либо соответствующий антисмысловый РНК, вкратце следующие

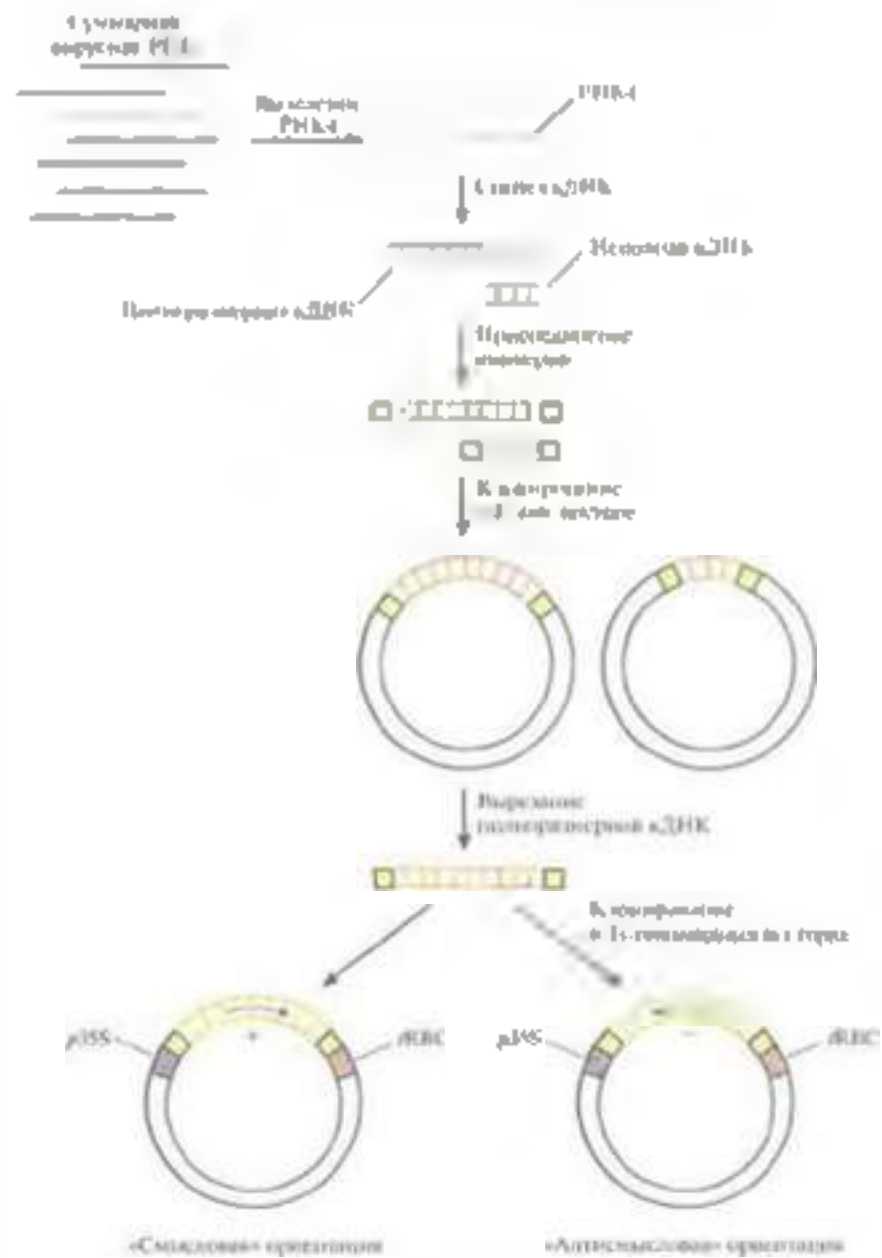


Рис. 11.6. Процедура введения cДНК белая оболочка вируса табачной мозаики (сфера) в растительные клетки. РНК4 кодирует эту белую оболочку, введенная в суммарную библиотеку вирусной РНК и используемая в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной cДНК. К cДНК присоединены анкерные последовательности и интронная ее и встроена в вектор p35S-промоторный вектор между 35S-промотором вируса мозаики (известной области (p)35S) и сигналом терминации транскрипции гена малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы (rbcL). При этом cДНК РНК4 встраивается в двух ориентациях. В первом случае транскрипция осуществляется с помощью РНК и синтезируется белок оболочки, в другом образуется РНК, антикомплементарная РНК белка оболочки. – антисмысловая РНК

1. Введение РНК4
2. Ферментативный синтез in vitro cДНК на РНК4.
3. Присоединение к cДНК анкерных последовательностей
4. Встраивание полинуклеотидной cДНК в вектор для клонирования в обеих ориентациях, в каждой из которых она находится под контролем 35S-промотора вируса мозаики известной

5. Реинтерация отдельных рекомбинантных растительных, в геном которых встроены cДНК в одной из двух возможных ориентаций

Для введения cДНК, кодирующей смысловую (белок-кодирующую) и антисмысловую

А

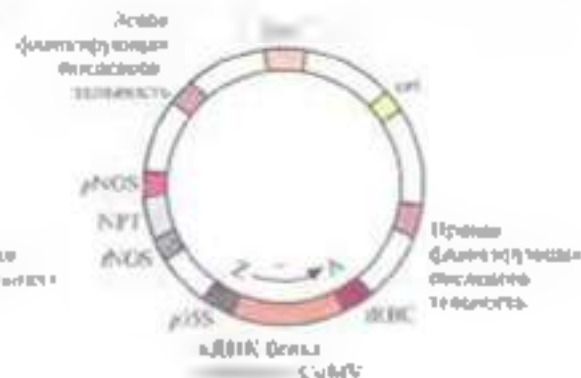
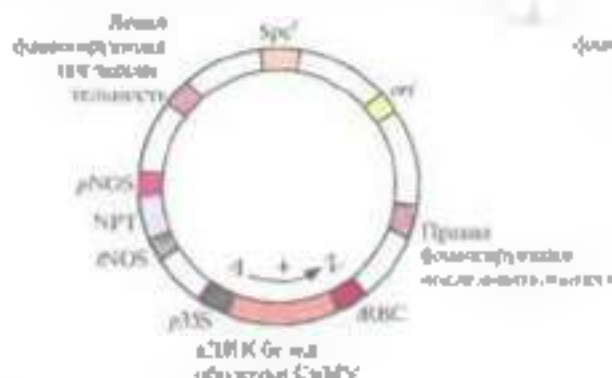


Рис. 18.7. Биархивные векторы для трансформации *Agrobacterium tumefaciens* с помощью Ti-плазмиды, кодирующие кДНК белая оболочка вируса мозаики картофеля (СМВ) в *Agrobacterium tumefaciens* (А) или *Agrobacterium tumefaciens* (Б) с помощью кДНК или пептида для конструирования 35S-промотора ($p35S$) вируса мозаики картофеля и сайтов терминации транскрипции/полимеризации РНК и сайтах субединицы РНК, кодирующей белок оболочки (АВС). Векторы содержат также генетическую информацию о фенотипе (ген NPT), плазмидный фид-контроль экспрессии ($p35S$), промотор и терминатор транскрипции/полимеризации РНК ($p35S$ и $3'UTR$), сайт репликации ColE1, промотор и терминатор транскрипции/полимеризации РНК и сайт терминации репликации ДНК для инференс-группы *ori*. А → 2 – «белая оболочка» трансформации кДНК. Z → A – «белая оболочка» трансформации кДНК.

РНК, в отдельные клетки табака переносили (в биархивную векторную систему) на основе Ti-плазмиды (рис. 18.7). В трансгенных растениях синтезировали белок оболочки вируса СМВ, вирусные частицы не накапливались и симптомы инфекции не проявлялись независимо от титра инокулянта. В отличие от этих трансгенных растений, синтезирующих антимозаичную РНК белок оболочки СМВ, трансгенные устойчивые только при малых концентрациях вирусной частицы в инокулянте.

Схожие результаты были получены в других лабораториях, где были созданы трансгенные растения, синтезирующие антимозаичные РНК копии генов вирусных белков оболочки, и проверено, смогут ли эти растения противостоять вирусной инфекции. Во всех случаях растения проявляли устойчивость к инфекции, только если интр используемого индуктора была мал. Общий метод, который можно свести к подобным экспериментам, состоит в следующем: антимозаичные РНК-копии генов вирусных белков оболочки обеспечивают гораздо худшую защиту трансгенных растений от вирусных инфекций, чем смысловые копии генов белков оболочки вируса. Во всяком, не стоит надеяться откладывать от стратегий защиты от антимозаичной РНК, однако

прежде чем инвестировать значительные ресурсы, необходимо экспериментально усовершенствовать.

Часто селекционируют теплые культуры бываю подтверждены несколькими вирусными инфекциями; дикая и *in vitro* может нанести ущерб растениям и снизить урожай. В идеале трансгенные растения должны быть устойчивы более чем к одному вирусу. Чтобы достичь этой цели, для трансформации растений желтой мозаичной тканью (*Symplexis* *prunifolia*) использовали биархивные векторы на основе Ti-плазмиды, несущие один или несколько генов белков оболочки СМВ, вируса желтой мозаики картофеля и вируса 2 мозаики арбуза (рис. 18.8) трансгенные растения, в которых экспрессировались все три гена, в лабораторных условиях были устойчивы ко всем упомянутым вирусам. Растения, экспрессирующие гены белков оболочки вируса желтой мозаики картофеля и вируса 2 мозаики арбуза, были проверены в полевых условиях на устойчивость к глыбе – мозаичной, накапливающей природным переносчиком этих вирусов в растущие растения. Если в растении экспрессировались оба гена белков оболочки, то они проявляли полную устойчивость к одновременной инфекции двумя вирусами (рис. 18.9), а если накапливались экспрессия только одного из вирусных белков оболочки, то заражение происходило не сразу,

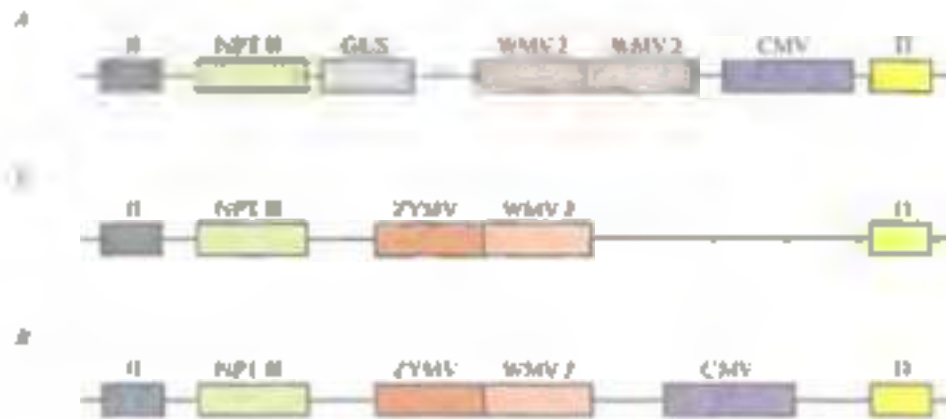
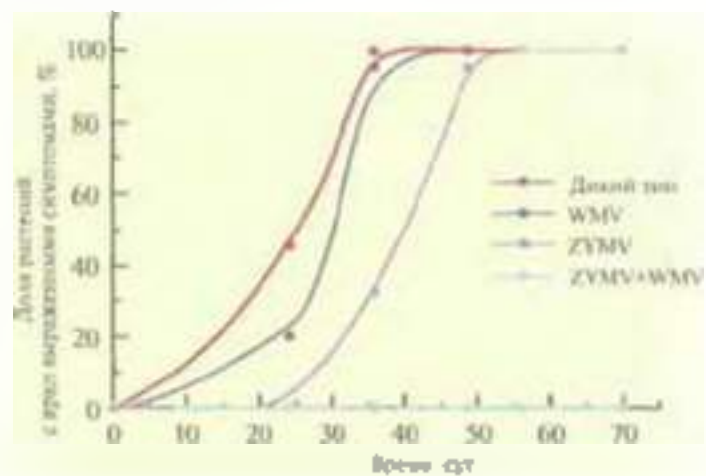


Рис. 18.8. Т-ДНК, несущая ген нонинфосфорилтрансферазы (NPT II) в качестве селективного маркера, ген β-окси-α-уринилазы (GLS) в качестве репортерного гена, две копии гена оболочки вируса 2 оболочки арбуза (WMV2) и ген белка оболочки вируса мозаики огурца (ZYMV). Печки в пещике функционируют последовательно: пещки I и II обозначены A и B соответственно. B. Конструкция, отличная от конструкции A, но без CMV и NPT II, содержала одну копию WMV2 и ген белка оболочки вируса желтой мозаики кабачков (ZYMV). B. Конструкция, отличная от конструкции B, но содержащая CMV. Во всех трех конструкциях присутствуют соответствующие промоторы и сигналы терминиции транскрипции.

Рис. 18.9. Частота заболеваний транзientно растущими в почвах вирусной тлями и растущими в почвах тлями в почвах условиях. Для транзientно растущих тлей связь вируса желтой мозаики кабачков (ZYMV) и вируса 2 оболочки арбуза (WMV) использовалась тля (По данным работы Lucy, Compton, *Annals of Applied Biology* 13: 146-147, 1995.)



но в конце концов все симптомы вирусной инфекции проявляются, и растение утрачивает конкурентную способность. Итак, ясно, что наиболее эффективной стратегией при выведении транзientно растущих, устойчивых ко всем основным вирусам, является использование, в качестве маркера и т.д., нескольких генов, детерминирующих синтез белков оболочки вируса.

Имеется предварительных данных о том, что транзientно растущие, и поэтому неэффективные

иногда вирусные гены, отличные от генов белой оболочки (например, ген вирусных капсидных РНК или ген оболочки вируса), также оказываются в какой-то мере защищенными от вирусных инфекций, но насколько эффективными и применимыми будут соответствующие полимеры, пока неясно.

Защита растений от вирусных инфекций может осуществляться не только на уровне синтеза белков, но и при участии противовирусных белков, синтезируемых

ми растений. Например, в клеточном соке фитопланктера *Mythobolga obovata* присутствуют три разных противовирусных белка: РАР, симметричный в листьях весной, РАР31, обнаруживаемый в листьях летом, и РАР 5, содержащийся в семенах. Эти белки весьма полезны не только в экстрактах и выделенных чужеродных растениях. Если небольшое количество РАР нанести на листья других растений, то полезнее также оказывать устойчивость к некоторым вирусам. Таким образом, эти белки РАР вполне можно применять для получения трансгенных растений, устойчивых к широкому спектру вирусных растений.

Выделение кДНК РАР вводят в геном табака и картофеля с помощью биологических векторов на основе *Ti* или *Agrobacterium tumefaciens*, симметричного РАР в большом количестве (>10¹⁰ нп (1 мг суммарного белка), бычьих членики, патогены и бесполоиды, растения же с более низким содержанием РАР (1–5 нп на 1 мг белка) имели нормальный внешний вид и были фертильны. Эти данные говорят о том, что если сконцентрировано РАР превышает некоторый пороговый уровень, то нормальное функционирование клетки нарушается. Противовирусный эффект белка РАР в трансгенных растениях проявляется в основном в уменьшении числа повреждений; однако, если уже повреждение возникло, то растение систематически инфицируется. Следует сказать, что РАР защищает от вирусов и инфекции на ранней стадии. Тем не менее, когда трансгенные растения табака и картофеля экспрессируют РАР в небольших количествах, инфицируются вирусами картофеля X или Y, на листьях обнаруживалось значительно меньше повреждений, чем в случае не трансформированных контрольных растений. Поскольку противовирусное действие РАР проявляется при относительно небольших его количествах, можно попытаться создать трансгенные растения, синтезирующие этот белок в малых количествах, и параллельно использовать другие способы защиты растений от вирусов.

Растения, устойчивые к гербицидам

Несмотря на то что на производстве более 100 различных химических гербицидов во всем мире ежегодно расходуется 10 млрд. долларов, при-

мерно 10% урожая теряется из-за большого количества сорняков. Кроме того, многие гербициды оказывают неблагоприятное действие на сорняки и сельскохозяйственные культуры: нередко обработку полей необходимо проводить еще до появления сорняков, в некоторые гербициды включаются в окружающей среде ¹⁴С-обильные хотя бы некоторые из этих веществ, можно попытаться создать сельскохозяйственных культур, устойчивых к гербицидам.

Для этого можно

- уменьшить поглощение гербицида растением
- обеспечить синтез белка, чувствительного к гербициду, в таком количестве, чтобы его избыток или выпадение присутствия тау физически присутствия гербицида
- увеличить способность белка, чувствительного к гербициду, в синхронизацию с ним
- обеспечить взаимодействие гербицида и растении в виде устойчивости

Из этих способов были реализованы три последние. Выделенные с их помощью гербициды устойчивые трансгенные растения перечислены в табл. 18.4.

Устойчивые растения, устойчивые к глифосату (гербициду, быстро разлагающемуся и потому безопасному для окружающей среды). Глифосат является ингибитором 5-эмолипуриновой линзы 3 (глюкоцилатов (EPSPS) фермента, осуществляющего роль в синтезе ароматических аминокислот у бактерий, и у растений. Из гликофитовых растений *E. coli* был выделен ген коинвазии (EPSPS, фермент, который контролирует растительного промотора и синтезируют терминирующую транскрипцию/полимеризацию и введен в растительные клетки. Трансгенные растения табака, кукурузы, пшеницы, картофеля и хлопчатника, синтезирующие EPSPS в количествах, достаточных для замены ингибированной гербицидом растительности фермента, были устойчивы к глифосату и при обработке, в отличие от сорняков, не погибали.

Другой способ приобретения устойчивости с помощью ингибиторной гербицида был реализован для бромаксиприлов (3,5-диформил 4-пид

рессиби-эпоитриона) – гербицида, который ингибирует фитоаксинетел. Устойчивые растения созданы путем скрещивания их с геном бациллярриазо-то телиа, кодирующего нитрилату, который ингибирует бромоксенил на сте до того, как он начинает действовать (рис. 18, 10). На почвенной бактерии *Klebsiella aerogenes* был выделен ген нитрилатиза, помещен под контроль спироуст-интегрируемого промотора гена малой субъединицы

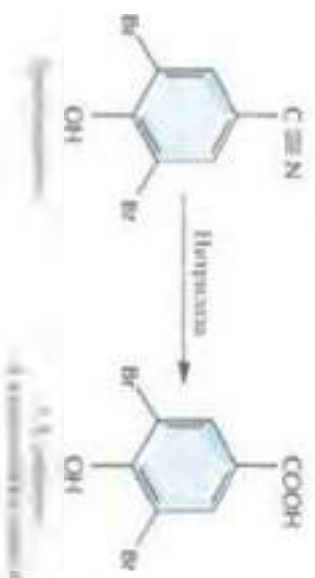


Рис. 18.10. Интегрируемый спироустинтегрируемый промотор в бактерии

рибулозобифосфат-карбоксилазы и экспонированной табака. Трансгенные растения синтезируют активную нитрилату и биели устойчивы к бромоксенилу.

Растения, устойчивые к грибам и бактериям
 Фитопатогенные грибы наносят весьма опутный вред сельскохозяйственным культурам. Поверхности, убитые, которые терпят фермеры Юго-Восточной Азии, Японии и Филиппин в результате поражения грибом, вызывающим пивискулярный, одного из основных зерновых тощевитона, риса, составляют примерно 5 млрд. долл. в год. Сейчас основной способ борьбы с фитопатогенными грибами состоит в обработке растений фунгицидными веществами, которые накапливаются в окружающей среде и представляют опасность для животных, в том числе и для человека. Поэтому очень важно разработать другие, простые, недорогие, эффективные и безопасные для окружающей среды химические методы защиты сельскохозяйственных культур от грибов.



Рис. 18.11. Плазмидный вектор, содержащий кластер генов устойчивости к грибным болезням риса, трансформирован и использован для обработки промильстаем малярийными комарами в присутствии плазмидного вектора. Затем клонировали гены устойчивости к грибным болезням, и проводили тестирование клонированных генов устойчивости с помощью трансформации по Саузерну и на наличие одной или нескольких меток в кластере Флоттинга. Далее эти клоны реинтродуцировали в целевые растения

Часто в ответ на патогенные патогенов растения начинают синтезировать группу специфических РР-белков (от англ. pathogenesis-related proteins). В эту группу входят β -1,3-глюканазы, хитиназы, гуаматинподобные белки (таумалины – нефбеллаин, очень сильный белок) и ингибиторы протеиназ; все они так или иначе воздействуют на патогены. Ныче это важно, ученые попытались сделать растения, устойчивые к болезнетворным грибам, способные конститутивно экспрессировать гены одного или нескольких РР-белков. Так, были получены трансгенные растения, синтезирующие в большом количестве хитиназу, фермент, гидролизующий β -1,4-связи в молекуле N-ацетил-D-глюкозамина, основного компонента клеточной стенки грибов (рис. 18.11).

Среди таких растений были рис, табак и киноа. Соответствующие гены, кодирующие растительный ген, были вставлены под контроль 35S-промотора вируса табачной мозаики (веточной капусты). Кроме того, были созданы трансгенные растения табака, которые конститутивно синтезировали не только хитиназу, но и β -глюканазу. Такие растения были получены скрещиванием одного трансгенного растения, экспрессирующего ген хитиназы, с другим, экспрессирующим ген β -глюканазы. Трансгенные растения, синтезирующие хитиназу, были более устойчивы к болезнетворным грибам, чем контрольные, даже при том, что последние синтезировали собственные РР-белки в ответ на инфицирование грибами. Кроме того, при этом способность патогенного гриба *Gibberia zeaeicola* прикрепляться к корням растений никак не нарушалась. Выяснилось, что если вино с различными в составе клеточных стенках дикими грибов. Следовательно, что трансген-

ные растения, конститутивно синтезирующие хитиназу, не были повреждены грибковым заболеванием в полевых условиях. По-видимому, анисцидный подход окажется весьма эффективным способом защиты растений от патогенных грибов.

По оценкам, ущерб, наносимый урожаю картофеля в результате поражения этой культуры патогенной почвенной бактерией *Fusarium solani*, составляет примерно 10% или более в год. Положение усугубляется тем, что у растений не выявлено никаких способов защиты от данной инфекции, которые можно было бы использовать для создания устойчивых коммерчески сортов. Чтобы решить эту проблему, ученые исследователи начали трансгенные растения картофеля, активно экспрессирующие ген антиметаболита бактериофага T4. При этом дикими селекционировались в апоцитаз (межклеточное пространство), компартмент, в который проникает и где распространяется *E. carotovora*. Чтобы обеспечить специфичность секрета, к гену антиметаболита T4 был инсертирован последовательность, кодирующая специфичный сайт от дикого индикатора, и ген помещен под транскрипционный контроль 35S-промотора вируса табачной мозаики (веточной капусты), сигнала терминации транскрипции и сайта полиаденилирования. Хотя ген не включался на стадии от контроля столь сильного промотора, синтезировалось лишь небольшое количество днк копии. Подобно трансгенным растениям, гены которых содержали *Phyto* конструкцию, оказались устойчивыми к болезням во львиных количествах *E. carotovora* в лабораторных условиях, и в открытом. В естественных условиях эти болезнетворные бактерии присутствуют в гораздо меньших количествах, чем те, которые ис-

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Светоиндуцируемая экспрессия химерного гена, введенного в *Nicotiana tabacum* с помощью Ti-плазмидного вектора

L. Herrera-Estrella, G. Van den Broeck, R. Maenhaut, M. Van Montagu, J. Scheel, M. Timko, A. Cashmore
Nature 316: 115-120, 1984

С разработкой Ti-плазмидной системы трансформации растений у высших растений возникла возможность введения в них чужеродных генов с целью синтеза различных белковых продуктов. Чаще всего синтезируют гены, кодирующие в растительных клетках, участвующих в транскрипционном контроле сильного конститутивного 35S-промотора вируса мозаики листовой капусты или иного менее сильного конститутивного промотора гена новалтиситазы, соответствующего Т-ДНК. Однако для получения растений с новыми полезными признаками часто бывает необходимо, чтобы специфические белки синтезировались только в определенных тка-

ни, например в листьях или корнях, или только на определенной стадии развития растения, например во время развития прокуста, образования пахучих или уловных высокомолекулярного стрессовых соединений. Первый шаг к введению такого растения был сделан Херрера-Эстреллой с сотрудниками, которые сконструировали химерный ген, состоящий из участка алемелиты, 5'-флакокулитов участка гена малой субъединицы рибулозобифосфат-карбоксилазы гербеда, кодирующей участок бактериального гена хормонфенилал-ацетиленового гена 3'-флакокулитовый трансфермаз 3'-флакокулитовый участок гена новалтиситазы, соответствующий участку германия транскрипции и полимембрано-

вины мРНК. Обычно ген малой субъединицы рибулозобифосфат-карбоксилазы экспрессируется только в листьях или фотосинтезирующих тканях, как и ожидалось, тем же экспрессированым геном рибонуклео-эпитетитрансфермазы. Это было одно из первых работ, показавших, что, несмотря на всю свою сложность, растительные промоторы способны обеспечивать синтез генноинженерных белков в строго определенных тканях. Впоследствии различные растительные промоторы широко исследовались для получения экспрессии генноинженерных генов в различных растениях и в разных тканях и на определенных стадиях развития.

пользовались в лабораторных испытаниях, так что есть надежда, что упомянутая генетическая конструкция сможет обеспечить надежную защиту растений. Кроме того, поскольку люциферин люминесцирует различные грамположительные и грамотрицательные бактерии, этот подход можно будет использовать для защиты растений от самых разных болезнетворных бактерий.

Получение растений, устойчивых к воздействию вирусов

В отличие от большинства животных, растения физически не могут защитить себя от неблагоприятных воздействий со стороны окружающей среды: высокой освещенности, ультрафиолетового облучения, высоких температур и концентрации солей в Т. А., поэтому в процессе эволюции у них выработались физиологические механизмы противозащиты в экстремальных условиях. Однако не все растения способны синтезировать фитогормоны, которые вступают в реакцию с другими веществами, способными вызывать стресс, и тем самым образуют защитные соединения.

кислорода. Радушно было предположить, что если удастся создать растения, толерантные к большому содержанию разнородной кислоты, то такие растения смогут противостоять различным неблагоприятным воздействиям.

Окислительный стресс

Наиболее распространенным разновидом окислительного повреждения является окислительный стресс. Фермент супероксиддисмутаза нейтрализует это соединение, превращая его в пероксид водорода, который в свою очередь превращается в воду любой из множества клеточных пероксидаз или каталазы (рис. 18.12). В одном из экспериментов были получены трансформированные растения табака, несущие ген супероксида-дисмутазы под контролем 35S-промотора вируса мозаики цистной капусты. Они синтезировали супероксиддисмутазу и были устойчивы к повреждающему действию разнородной кислоты.

У растений имеется несколько изоформ супероксид-дисмутазы. Суть супероксида-дис-



Рис. 18.12. Последовательное супероксид-дисмутаза и перокси водорода в растении и воды и кислорода

мутина содержится равным образом в хлоропластах и в нехлоропластной ткани в значительном количестве в цитозоле. Mn-супероксид-дисмутаза локализуется в митохондриях в некоторых растении синтезируют Fe-супероксид-дисмутазау. Трансгенные растения табака, несущие гДНК хлоропластной *Cu/Zn-супероксид-дисмутаза* под контролем 35S-промотора вируса мозаики пастьбы азарты, были гораздо более устойчивы к яркому свету, чем нетрансформированные растения. Обнаружено, что фотосинтетическая активность у трансгенных растений сохранялась на 94% в условиях, при которых нетрансформированные растения полностью ее утрачивали. Трансгенные растения, синтезирующие Mn супероксид-дисмутаза, аккумулируют меньше хлорофиллов, были в три-четыре раза менее чувствительны к повреждению листьев под действием ультрафиолета, чем контрольные нетрансформированные.

Полынение ураном супероксид-дисмутаза дает еще одно преимущество растению одновременно более устойчивым к гербициду метизалфосулу и к световому воздействию. Супероксид-дисмутаза способствует также образованию ершиных (шаров) при трансформации. На основании выше описанных в результате образования радикалов дисоксида. Если бы у нас была бы уран трансгенные растения, содержащие ген супероксида-дисмутаза, который кодируется под контролем промотора, специфичного для клеточной, то можно бы стерилизовать ураном.

Сложные сахара

Многие растения произрастают в регионах, где часто бывают засухи или где сильно засолены почвы. Чтобы приспособиться к этим условиям, они синтезируют низкомолекулярные оксигенированные вещества — осмолиты. Эти вещества способствуют понижению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение мем-

бран мембран, присутствующих в клетках растений, под действием осмолитов в осмолитивной соли. Осмолиты включают также хитин, хитозан, крахмал, гликоген, сахара, спирты, полиолы и четвертичные аммониевые соли. Многие из высокомолекулярных осмолитивной являются белками, который накапливаются в некоторых растительных во время засухи или при высокой засоленности.

Некоторые растения осмолитивной являются культуры, в том числе кукуруза, рис, пшеница, и некоторые из осмолитивной являются. Увеличить такие растения можно было бы введением в них генов, кодирующих ферменты синтеза и белки. Как у растений, так и у бактерий белки синтезируются в основном в цитоплазме (рис. 18.13). У этих растений, как у бактерий, образование полимера в белках, который кодируется геном, и последующее превращение в белки. Белки являются белками цитоплазмы. У бактерий генов *E. coli* в стадии культуры в культуре или в ферментном растворе. Немного при создании синтезируемых генов — белка была использована *A. luteum* для трансформации растительных клеток осмолитивной (рис. 18.14). Исходя из генов *E. coli*, который кодирует полидегидрогеназу, ген экспонирован под контролем 35S-промотора вируса мозаики

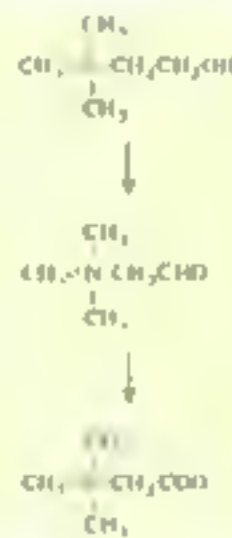


Рис. 18.13. Превращение генов в белки.

добавить дополнительные способности растения синтезировать тиамин. Для этого можно использовать разные подходы (рис. 18.14). Так, были созданы трансгенные растения, синтезирующие дитиоаминокислоты терпин и РНК либо АСС-синтазы, либо АСС-хитиназы, ферментов, необходимых для синтеза растением тиамина. У таких растений уровень тиамина был гораздо ниже нормы, а потому плоды имели длительный срок хранения.

Кроме того, при помощи скрининга было идентифицировано большое количество штаммов почвенных бактерий, продуцирующих АСС. Если фермент АСС-декарбоксилаза, выделяемый из одного штамма штамма, был использован для контроля 35S-принципио вируса мозаики шестилепестковой и встраиван в геном томата. Полученные растения синтезировали метионин тиамина, чем и определялись, а эти плоды тоже имели гораздо более длительный срок хранения. Большинство работ по выделению трансгенных растений с повышенным содержанием тиамина касаются томатов, но имеется одна особенность в создании трансгенной мозаичной дыни с высоким содержанием. Все эти данные говорят о том, что данный подход может быть весьма перспективным применительно к различным плодным культурам.

Изменение окраски шестков

Шестковидные все время стараются содать растениям участки которых имеют более прилегающую к ней выемку над и лучше сохраняются после того, как их срежут (с помощью гравитационных методов скрещивания в течение годы были выведены тысячи новых сортов, отличающихся друг от друга цветом и формой шестков. Однако скрещивание растений — это длительный процесс, требующий много времени и значительных затрат энергии, связанных с темным путем скрещивания. Поэтому, например, никому не удалось вывести шестковидную дыню. В качестве альтернативы для выведения шестковидных шестков можно использовать методы, основанные на использовании генов ферментов биосинтеза дитиоаминокислот. Амидоамины, соединенные классом флавоноидов, являются наиболее распространенными пигментами шестков (они

синтезируются из аминокислоты фенилаланина и могут накапливать ферментативных ретины. Структура шестков определяется количеством соединений (в основном белки, при этом протеиновые соединения ответственны за красный цвет, а флавоноиды за желтый цвет — в шестковидных (рис. 18.15).

Дигидрофлавонол-4-редуктаза петунии катализирует превращение бесцветного антоцианидиновидного в антоцианин-3-гликозида, соединенного красным цветом, а белкового дигидрофлавоногена — в шестковидный дигидрофлавоноген-3-гликозида, но не может использоваться в качестве субстрата бесцветного антоцианидиновидного (рис. 18.15). Однако после трансформации петунии (своем дигидрофлавонол-4-редуктазы кукурузы ее шестки приобрели ярнично-красную окраску. Этого необычного цвета, инжира растет у петунии экзотический цвет, обусловлен синтезом и трансгенном растении оксидофлавонол-3-гликозида из дигидрофлавоногена.

Примерно 70% объема инжира (пастозность) производится из листьев растений (рис. 18.15). Так, выделение и хранение, поэтому все ученые по изучению селекционно трансформированных растений с шестковидной окраской были направлены на работы не только с этими растениями. Например, были выделены трансгенные инжиры, несущие синтетические и естественные конструкции генов дигидрофлавонол-4-редуктазы. Этой ферменты кодирует гены стабильно функционирующей системы (рис. 18.15). Ученые надеются и того, что в следующем, и генетически модифицированные гены будут использоваться для создания новых трансгенных растений «мозаично-шестковидных», имеющих более высокую окраску, особенно в том, что в присутствии антоцианидинов и других флавоноидов может использоваться естественные окислительные РНК. Митохондриальные гены могут включать до 10% генов растения (в зависимости от установленности. Амины состоят из РНК дитиоаминола выделены ферменты шестковидности дитиоаминола выделены РНК.

Самые новые и интересные методы выведения, основанные на использовании 35S-принципио вируса мозаики шестковидной дыни, были направлены на выделение вектора на основе T1-гена вируса и введены в клетки растений. У вируса из 133 «мозаично-шестковидных» трансформированных и при (1) 83 «мозаично-шестковидных» шестковидных без-белки, что указывает на возможность «мозаично-шестковидных» растений (рис. 18.15).

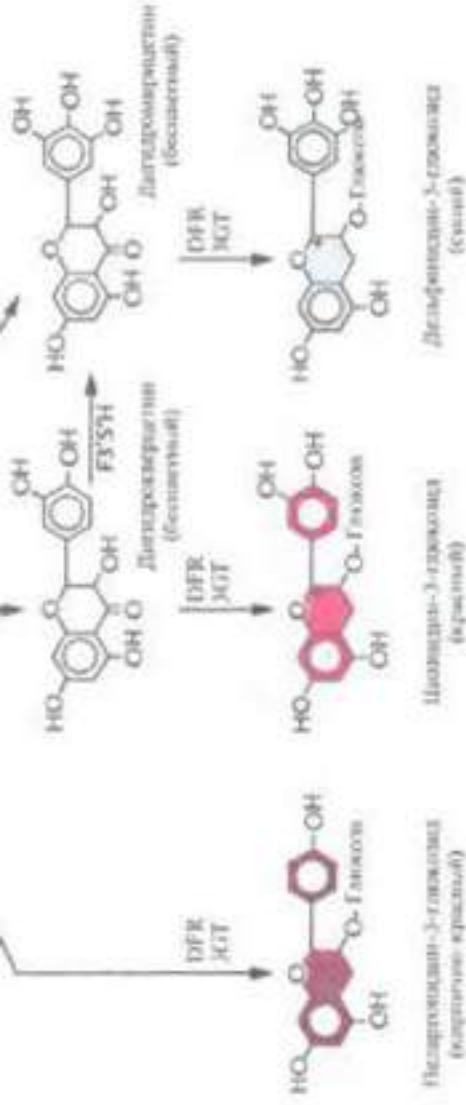


Рис. 18.15. Биосинтез антоцианинов. Сокращения: CHS – халконилсинтаза, СНН – халконилтрансфераза, F3H – флавонон-3-гидроксилаза, F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза, F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза, DFR – дигидрофлавоноид-4-редуктаза, 3GT – UDP-глюкоза: флавоноид-3-О-глюкозилтрансфераза. DFR действует самостоятельно катализируя превращение дигидрофлавоноидов в катехины-3-глюкозиды, а дигидрофлавоноиды – в дельфинидин-3-глюкозиды, соответственно синтез из дигидрофлавоноидов пеларгонидин-3-глюкозидов, соответственно кверцетин-3-глюкозидов и кверцетин-3-глюкозидов.

Изменение пищевой ценности растений

Т. е. подолжение синтеза антоцианинов. Выступают с белыми цветками вегетативно размножаемых черенками и полувзрослых и примерно у 50–95% из них происходит образование белых, а не розовых цветков. Эта работа является важной основой в изучении новых сортов с необычной окраской, представляющих интерес,

За многие годы агрономы и селекционеры добились больших успехов в улучшении качества и повышении урожайности самых разных сельскохозяйственных культур. Однако традиционные методы выведения новых сортов растений,

основанным на их скрепленном, осьмью гудеками и требуют много времени, а их возможность ограничена вследствие ограниченности набора генно-экренированных линий. Генноинженерные методы не только позволяют ускорить процесс получения растений с улучшенными свойствами, но и создавать сорта с новыми признаками, которых previously было бы передать растениям с помощью традиционных методов скрещивания. Например, в лабораториях успешно уже получены также культуры с улучшенными вкусовыми качествами как кукуруза и горох. При этом был изменен аминокислотный состав некоторых пищевых белков их семян. Кроме того, созданы сорта масличных культур (как пищевых, так и технических) с измененным жирнокислотным составом плодов, а также предпринята попытка улучшить вкус фруктов путем введения в растение гена молекулна бета-каротина, имеющего сладкий вкус.

Аминокислоты

Запасные белки, которые служат источником углеводов и азота прорастающей семени, состоят из ограниченного повторяющегося набора аминокислот. Пищевая ценность этих белков велика, поскольку в них отсутствуют одна или несколько незаменимых аминокислот (обычно лизин или метионин). Аминокислотный состав пищевых белков семян можно изменить путем обычных скрещиваний, а именно для этих целей были использованы генноинженерные методы.

В первом из предварительных экспериментов в растении кукурузы был введен ген флавонина из фасоли, кодирующий запасной белок, который состоит из самых разных аминокислот. Ген эффективно экспрессировался, а белковый продукт доставлялся в нужной концентрации. Кроме того, специфически изменили in vitro нуклеотидную последовательность генов запасных белков семян, можно было связать вносить белки с нужным аминокислотным составом. Если аминокислотные замены происходят вблизи кодирующей зоны области 5'-концевого участка мессенжера, то его структура не нарушается. Прямой метод введения генов остается и при трансформации семян.

Чтобы увеличить содержание лизина в семенах, была предпринята попытка изменить регуляторно-белковую часть, Амикоацетилтрансферазы лизина, тропонин, метионин и гистидин синтезируются из аспарагата (рис. 18.16) в нескольких этапах. Первым этапом синтеза в фосфорилированной аспарагата аспарагатаминазой (АК) с образованием β -аспарагилафосфата. Далее, при фосфорилировании, происходит выделение аспарагинафосфата β по механизму с протонированием аспарагата, катализируемым сильной динитрофенолсульфоновой кислотой (DNDFP). Регуляция объема ферментативной активности (АК и DNDFP) осуществляется с помощью гена по принципу обычной сенсибилизации, которую нужно изменить, чтобы сделать лизин ничем не ограничиваемым. Для этого использовался ген DNDFP и АК, не чувствительные к ингибированию лизином, из *Saccharomyces* и *E. coli* соответственно. Каждый из этих генов «привнесен» нуклеотидную последовательность, кодирующую пиверный пептид, транспортирующий белки и хлоропласты, снабжали каждый из генов селекционным промотором и вносили их в растение кукурузы и семя в составе бинарного вектора на основе Ti плазмиды (рис. 18.17). В семенах трансгенных растений содержалось в 100 раз больше свободного лизина, чем в семенах обычных растений; при этом содержание лизина во всех белках семян кукурузы было в два раза больше, а в белках сои – в пять раз.

Когда кукуруза используется в качестве корма для свиней, а не для приготовления муки и очищенной лизин. Однако вместо того чтобы использовать порошковый лизин, можно добавить к кукурузе дешевую соевую муку, выделенную из трансгенных растений сои, которые синтезируют в больших количествах лизин. Возможно, используя этот подход успешно примененный на сое, удастся изменить сорт кукурузы, в семенах которой повышено содержание лизина. Такая кукуруза имела бы большую пищевую ценность.

Липиды

По оценкам, в 1995 г. во всем мире было выращено 100 миллионов гектаров пшеницы. В среднем 45 млрд тонн пшеницы в год, а в 2000 г. — в среднем 100 млрд

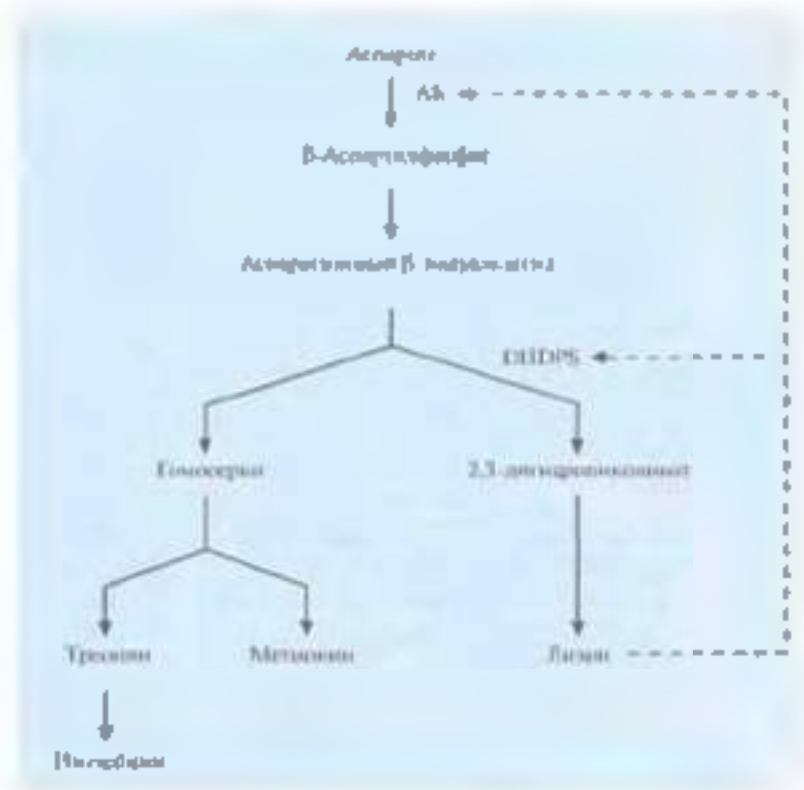


Рис. 18.16. Схема функционирования цикла триглицеридов: триглицериды являются (здесь представлено не все реакции в форме структурных продуктов) O-триглицериды строительными блоками триглицеридов по структуре обратный цикл. OHDPS – специфический дегидрогеназный фермент. AK – аспартаткиназа



Рис. 18.17. Pl-плазмидный вектор, используемый для трансформации *Salmonella enteritidis* с целью получения триглицеридов в этих растениях. P_S – промотор гена β-фазина бобов, P_T – специфический терминирующий триглицеридный ген β-фазаина бобов, SD – последовательность Shine-Dalgarno, кодирующая специфическую инициацию трансляции рибозом, ATG – код стартового кодона, TGA – код терминального кодона, MCS – сайт множественного клонирования, содержащий сайты для гидролизующих ферментов: EcoRI, BamHI, XbaI, KpnI, SmaI, PstI, SalI, XhoI, NotI, SpeI, KpnI, SmaI, PstI, SalI, XhoI, NotI, SpeI. Ori – место и время репликации плазмиды. T-DNA – сайт интеграции

70 млрд тонн более 90% масла производится на промышленном уровне, а также для свечей и для жарки. Примерно 75% всех масляных культур производится на полях США, включая пшеницу (ячмень) и рапсовое масло, а также из семян подсолнечника, соевых бобов, кукурузы и пшеницы. Основные источники животного жира – это говядина, свинина, курица, яйца, молоко и сливки, сыр, масло и маргарин. Примерно 75% всех масляных культур производится на полях США, включая пшеницу (ячмень) и рапсовое масло, а также из семян подсолнечника, соевых бобов, кукурузы и пшеницы. Основные источники животного жира – это говядина, свинина, курица, яйца, молоко и сливки, сыр, масло и маргарин.

С помощью генов триглицеридов можно изменить состав триглицеридов (т.е. состав жирных кислот) и длину цепи этих кислот. Была создана и проверена в лаборатории полезная модель триглицеридов (табл. 18.5), которая содержит триглицериды с ненасыщенными жирными кислотами (табл. 18.5). Каждый триглицеридный сайт содержит один или несколько сайтов для гидролизующих ферментов. Например, растительные триглицериды

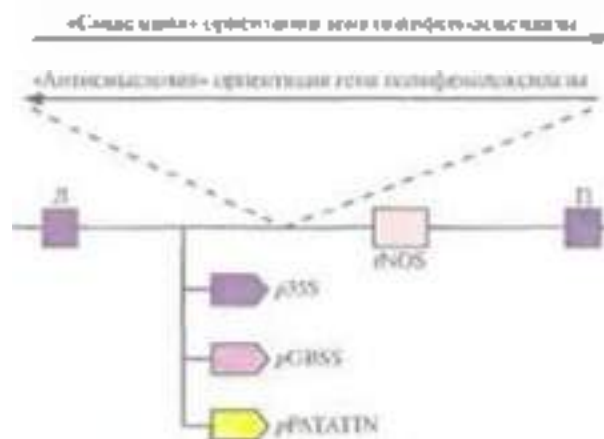


Рис. 18.18. Конструкция от «самосильного» и «антисмыслового» сорт картофеля и его трансформанты. Транскрипция в обоих случаях осуществлялась под контролем одного из промоторов 35S-промотор вируса мшиной кукурузы (#SSS), промотора (транскрипция гранулозовидного крахмала (#GSS) или промотора гена пататина I (#PATATIN), а также сигналом промотора транскрипции гена ингибитора (#NOS). A и B – концы и прямая ориентация последовательности ДНК соответственно. (По данным работы Виллетт *et al.*, *Bio/Technology* 12: 1101–1105, 1994)

трансформированные линии конструктивными, были высокоустойчивы к черной пятнистости (ферритал) и к изменению цвета), причем урожью устойчивости был (породы вырост, чем тип, который удалось достичь при обычном скрещивании. Трансгенные растения, окисляя КДНК полифенолоксидазы, предшественники повреждали, в таком отношении их устойчивости к черной пятнистости). Большинство трансгенных растений, в том числе которые присутствуют антигенными вариации гена полифенолоксидазы, ингибируются как контролем дуба 35S-промотора вируса мозаики картофеля сапуны, либо промотора гена сигнала гранулозовидного крахмала были значительно более устойчивы, чем нетрансформированные. Активные промоторы гена пататина и клубных картофеля, соответственно, привлеклись лишь частично, и накопление полифенолоксидазы не блокировалось. Все растения, содержащие смысловые конструкции, синтезировали полифенолоксидазу в большем количестве и были подвержены повреждению в большей степени, чем контрольные. Хотя все эти результаты имеют существенное значение

характер, интоксикация индустриальной может оказаться полезным для борьбы с ферментативными паттернами иными видами различных коммерчески ценных растений.

Изменение вкуса

Некрасивые фрукты и овощи вряд ли будут пользоваться исключительным спросом, даже если они имеют высокую пищевую ценность. Конечно, вкус «искусственных» фруктов можно улучшить в процессе «приспособления» добавлением соли, сахара, аромата жевачки или других добавок, однако с экономическими точки зрения было бы лучше, если бы натуральные продукты имели бы естественный вкус и аромат, а не искусственные вещества.

В случае картофеля (сорт *Golden Wonder*) содержится белок минестин, примерно в 100 раз больше сахара. Этот белок может служить ингибитором вкуса, связываясь с ним и тем препятствуя, что, не являясь углеводом, он не должен оказывать вредного воздействия на организм.

Минестин это двухцепочечный димер: А-цепь состоит из 45 аминокислотных остатков, В-цепь – из 50. Цепи связаны между собой слабыми нековалентными связями, и это означает, что при нагревании в процессе приготовления пищи или под действием кислоты (например, лимонной или уксусной) он легко диссоциирует и теряет свои вкусовые качества. Чтобы создать трансгенный картофель или микроорганизм, способный синтезировать минестин, усложняется тем, что необходимо клонировать и координированно экспрессировать два отдельных гена. Чтобы решить эту проблему, был клонирован синтезированный ген минестина, кодирующий А- и В-цепи как один интронный. Были созданы трансгенные растения тыльной и белой, синтезирующие химерный белок. Для этого использовался два разных промотора. В случае картофеля это был ЕК-промотор, специфичный для клубня и активирующийся в самом начале их созревания. В растениях с двумя генами использовались сайты терминации

транскрипции/экспоненцирования гена поцелушатаги в системе T1-плазмиды. Синтетический ген кодирует белок в растительных клетках экспонированном как *A. tumefaciens*, используя конъюгативную векторную систему на основе T1 плазмиды. Моноклон был обнаружен в дробях и частично дробях шведов и в листьях салата, но не в тканях помидоров, при этом его содержание и локализация изменилась при резком увеличении концентрации растительного гормона этилена. Сообщения о всесторонних испытаниях вкусовых качеств генетически модифицированных пищевых продуктов пока отсутствуют, но если результаты окажутся благоприятными, то искусственный способ увеличения такой возможности будет использоваться для многих культур.

Растения как биореакторы

Растения дают большое количество биомассы, а выращивание их не составляет труда, поэтому разумно было попытаться создать трансгенные растения, способные синтезировать коммерчески ценные белки и аминокислоты. В отличие от рекомбинантных бактерий, которых культивируют в больших биореакторах (при этом необходимая высокая инфицированность стерильно и дорогостоящее оборудование), для выращивания сельскохозяйственных культур не нужно больших земель и квалифицированных рабочих. Однако проблема, которая может возникнуть при использовании растений в качестве биореакторов, будет связана с выделением продукта целевого гена из массы растительной ткани и сравнительно высокой стоимостью производства нужного белка с помощью трансгенных растений и микроорганизмов. Уже известны экспериментальные установки по изучению с помощью растений моноклональных антител, функциональных фрагментов антител и полимера этилен-β-гидроксипропириата, из которого можно изготавливать материал, подверженный биодegradации.

Антитела

При известном опыте в их фрагментах с помощью трансгенных растений может быть произведена через их синтезом в клетках рекомбинантных микроорганизмов. Трансформации

растений носят стабильный характер, чужеродная ДНК практически необратимо интегрируется в растительный геном, в то время как домашнее микроскопическое трансформирование плазмидными, которые могут утрачиваться в виде д-н-телатой или крупномасштабной ферментации. Кроме того, процессы и укладки углеводов белков в растениях значительно точнее в живых клетках, в то время как в бактериальных процессах, укладки и посттрансляционные модификации углеводных белков отсутствуют. Кроме того, крупномасштабное выращивание растений не требует больших затрат и не ограничивается возможностями процесса ферментации. Наконец, можно создать условия, при которых чужеродные белки будут синтезироваться в семенах, где их целостность не нарушится длительное время.

Полимеры

Крупномасштабный бактериальный синтез поли-β-гидроксипропириата полимеры из культуры получают пластик, полупрозрачный биопластикация, образуется довольно дорого. Поэтому интересно было выяснить, можно ли получить этот полимер с помощью трансгенных растений. В бактериях типа *Alcaligenes eutrophus* поли-β-гидроксипропириат синтезируется из этилен-β-СА в три стадии, каталитические три ферменты (см. рис. 12.22), гены которых входят в один оперон. Растением невозможно процессировать транскрипт оперона с более чем одним геном, поэтому каждый из генов был клонирован по отдельности и встраивен в хлоропластную ДНК растения *Arabidopsis thaliana*. Успешными были выбраны потому, что, как показали выполненные ранее эксперименты, в хлоропласте полимер синтезировался в большом количестве, при этом большинство растений были чистыми. Кроме того, в хлоропластах может накапливаться другой биополимер – крахмал.

К каждому из трех генов этилен-β-гидроксипропириата были присоединены фрагменты ДНК, кодирующие хлоропластную сигнальную последовательность малой субъединицы рибулосом-бисфосфат-карбоксилазы (ср. рис. 12.23) и каждый ген был помещен под промотор (интермит) контрольный 35S-пробатора вируса мозаики шестилепестной капуст-

ны. Если были введены в растение *A. thaliana* в составе линейного вектора на основе T1 плазмид. Два трансгенных растения, каждое со своим чужеродным геном, скрещивали, чтобы получить растение с двумя чужеродными генами, включенными в хлоропластную ДНК. Затем трансгенное растение с двумя чужеродными генами скрещивали с растением, несущим третий чужеродный ген, и отбирали растения, несущие все три бактериальных гена (или β -гидроксибутирата В зрелых листьях некоторых трансгенных растений, экспрессирующих все три бактериальных гена, синтезировалось более 1 мкг поли- β -гидроксибутирата (PHB) в старом тычинковом листе. Это растение можно считать первым важным шагом в создании сельскохозяйственных культур, которые можно использовать для получения в больших количествах поли- β -гидроксибутирата.

Чужеродные белки, аккумулирующиеся в семенах

Овещины или белки являются важным элементом в семенах различных растений. Они весьма гидрофильны и стабилизируют масляные тельца как дискретные структуры. При этом на N- и C-концевые участки белков гидрофильны, чем увеличивается область молекулы, э экспонируемая в водное окружение. Поскольку генетическая инженерия, можно попытаться создать реком-

бинантные белки из овещинов и полиэфирформных белков (рис. 18.19) рекомбинантные белки будут аккумулироваться в масляных тельцах, что является относительно легко их очистить. При этом полиэфирформный белок будет неочищаемым в водное окружение, и при необходимости его можно будет отделить. Это является многократной удешевляет процедуру очистки белков, синтезируемых растениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие генов растений чужеродные гены и обеспечивая их экспрессию, можно относительно быстро создавать новые сорта растений. Уже получены трансгенные растения, устойчивые к неблагоприятным условиям окружающей среды, к насекомым-вредителям, вирусам, гербицидам, кислотному и соленому стрессам. Выведены культуры с необычной окраской цветков, растений, имеющие более высокую устойчивость к болезням, растения с измененным вкусом плодов и т. д. Некоторые растения удалось модифицировать так, что они стали эффективными фабриками по производству стабилизаторов эмульсии пищевых жиров, например эмульгатор Мюллеровские трансгенные растения с измененными свойствами и повышенной пищевой ценностью прошли успешную проверку в лабораторных, а некоторые из них и полевых условиях. К настоящему времени на рынке появились лишь небольшое число генетически модифицированных растений, однако можно с уверенностью сказать, что в будущем они займут на нем активное место.

ЛИТЕРАТУРА

- Ananda Kumar P., R. P. Sharma, V. S. Athik. 1996. The insecticidal proteins of *Borilla thuringiensis*. *Adv Appl Microbiol.* 42: 1-43
- Anderson E. J., D. M. Stark, R. S. Nelson, N. E. Jumer, R. N. Beachy. (1989). Transgenic plants that express the coat protein gene of JMV or AIMV interfere with disease development of non-related viruses. *Phytopathology* 12: 1284-1290.

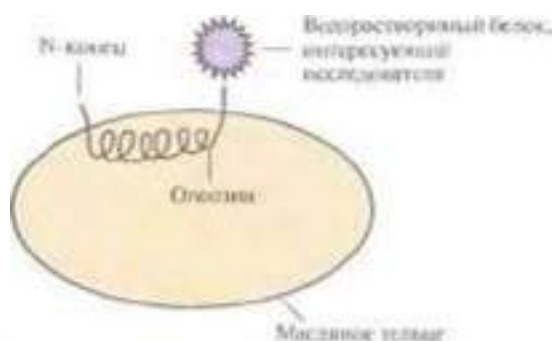


Рис. 18.19. Рекомбинантный белок, стабилизатор эмульсии растительного масла и гидролизостойкий белок. Овещина обладает высоким содержанием в водном растворе семян растений, а его N- и C-концы, а также второй белок гидрофильны и стабилизируются в водное окружение.

- Ayub R., M. Guls, M. Ben Amos, L. Gillot, J.-P. Ruvstan, A. Luche, M. Bourayou, J.-C. Pech. 1996. Expression of ACC oxidase structure gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Mol. Biotechnol.* 14: 862-866.
- Bachetti C. W. B., G.-J. Speckmann, P. C. G. van der Linde, F. T. M. Verheggen, M. D. Hunt, J. C. Steffens, M. Zabeau. 1994. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Bio/Technology* 12: 1101-1105.
- Beachy R. N., S. Laesch-Fries, N. E. Turner. 1990. Coat protein mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 451-474.
- Bird C. R., D. Grierson, J. A. Ray, W. W. Schuck. October 1991. Tomato plants and cells containing pTOM36 antisense constructs. U.S. patent 5,254,809.
- Bowler D., A. M. R. Gatehouse, V. Hilder. 1989. Use of crinipin trypsin inhibitor (CpTI) to protect plants against insect predation. *Biotechnol. Adv.* 7: 489-498.
- Bowler C., L. Spitzer, S. Vanderbruggen, R. De Rycke, J. Bottemas, C. Nybom, M. Van Montagu, D. Inze. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EUBO J.* 10: 1723-1737.
- Branke K. J., R. L. Meeves. 1991. Insect control with genetically engineered crops. *Trends Biotechnol.* 9: 197-200.
- Cheng J., M. G. Bohard, R. C. Saxena, M. B. Sackin. 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Plant Sci.* 81: 83-91.
- Comal L., D. Facciola, W. R. Hiett, G. Thompson, R. E. Rose, D. M. Stalker. 1985. Expression in plants of a mutant *amiA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.
- Corbin D. R., J. T. Greenplate, E. V. Wong, J. Parcell. 1994. Cloning of an insecticidal chitinase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4239-4244.
- Courtney-Gutherson N., C. Napoli, C. Lemley, A. Morgan, E. Frawalady, K. F. P. Robinson. 1994. Modification of flower color in *Datura chrysanthemum*: production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Bio/Technology* 12: 268-271.
- Cowan M., K. M. O'Connell, W. Kulewski, R. X. Fang, N.-H. Chao, N. E. Turner. 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6: 549-557.
- Day A. G., E. R. Bejarano, K. W. Buch, M. Burrell, C. P. Lichterman. 1991. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6721-6725.
- Dekker J., S. O. Duke. 1995. Herbicide-resistant field crops. *Adv. Agron.* 54: 69-116.
- Helmery X., R. J. LaVallie, R. K. Prokosh, R. L. Vuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, P. G. Morrison, R. R. Hodson, J. J. Augustine, J. G. Layton, D. A. Fleckhoff. 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology* 7: 1265-1269.
- Huan X., X. L. Q. Xue, M. Abu-El-Saud, D. Xu, H. Wu. 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Act. Biotechnol.* 14: 494-498.
- Junig K., P. Porsch, M. Fladung, H. Liers. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.* 3: 587-598.
- Jay S. 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, p. 105-124. In P. I. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs (ed). *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Insecticide: Theory and Practice. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Eden S. C., T. Guida, M. Locke, J. Maurus, C. Sanders, R. T. Ward, P. Webber. 1995. Transgenic corn and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* 13: 577-582.
- Hilder E. C. Conrad. 1995. High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/Technology* 13: 1090-1093.
- Flekkhoff D. A., K. S. Bondish, F. J. Perdik, P. G. Morrison, S. M. McMahon, J. G. Niedmeyer, H. A. Dean, K. Komano-Kristof, E. J. Mayer.

- B. E. Rochester, S. G. Rogers, H. T. Frisley. 1987. Insect tolerant tomato plants. *Bio/Technology* 5: 803-811.
- Fischer J. H., R. N. Beachy. 1993. Genetically engineering protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 739-763.
- Fuchs M., D. Gonsalves. 1995. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Bio/Technology* 13: 1466-1473.
- Graj J. E., S. Pletan, J. J. Gibsonsonk, D. Grierson. 1994. The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant Cell Environ.* 17: 557-571.
- Guban R., B. Grezes-Basset, M. Schneider, N. Lucante, L. Olsen, J.-J. Lepan, A. Toppan. 1996. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nat. Biotechnol.* 14: 643-646.
- Hilder V. A., A. M. R. Lathouse, S. E. Sherman, R. F. Barker, D. Roalson. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163.
- Hill K. K., N. Jarvis-Yegan, E. L. Hall, K. J. Kirahn, L. W. Gao, R. S. Mathewson, D. J. Merlo, S. E. Nelson, K. E. Ruskka, L. S. Loesch-Fries. 1991. The development of virus-resistant alfalfa. *Medicago sativa* I. *Bio/Technology* 9: 373-377.
- Holton T. A., F. Brugliera, H. H. Lester, Y. Tanaka, C. D. Hyland, J. G. T. Menting, C.-Y. Lin, E. Farey, T. W. Stevenson, E. C. Coruh. 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Natun* 366: 276-279.
- Johanson H., J. Karioz, G. An, C. Ryan. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 9871-9875.
- Jongedijk E., A. A. J. M. de Schutter, T. Stolte, P. J. M. van den Elzen, H. J. C. Cornelissen. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/Technology* 10: 472-479.
- Klee H. J., M. H. Hatford, K. A. Kertamer, G. F. Barry, G. M. Klueber. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3: 1187-1193.
- Kouton D. S., G. A. Thompson, S. E. Radke, W. K. Johnson, V. C. Knoff, J. C. Knoff. 1992. Modification of *Brassica seed oil* by esterase action of a stearyl acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 2624-2628.
- Lee W. S., J. T. C. Yarn, J. C. Knoff, S. E. Radke, A. H. C. Huang. 1991. Muzze olefin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the muze olefin gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 6181-6185.
- Ellis G., N. Holmberg, L. Bolm. 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio/Technology* 14: 177-180.
- Fu W., C. S. Anuratha, K. Dutta, I. Potrykow, S. Muthurakham, S. A. Datta. 1995. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology* 13: 684-691.
- Hug K., S. Numbi, C. Gonsalves, J. L. Slightom, D. Gonsalves. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. *Bio/Technology* 9: 752-758.
- Lodge J. K., W. A. Kamrath, N. E. Turner. 1993. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pinea wood antiviral protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 7089-7093.
- Mu J. K.-C., M. B. Heia. 1995. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *Trends Biotechnol.* 13: 522-527.
- MacIntosh S. C., G. M. Klueber, F. J. Pezdek, P. G. Murrene, T. B. Stone, N. H. Sims, R. L. Fuchs. 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by using protease inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1145-1152.
- Meyer P., I. Hrdlikova, G. Forckmann, H. Sordler. 1987. A new petunia flower colour generated by translocation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330: 677-678.
- Mol J. N. M., T. A. Holton, H. E. Koes. 1995. Flower colour genetic engineering of commercial traits. *Trends Biotechnol.* 13: 350-353.
- Mol J. N. M., A. R. van der Krol, A. J. van Tunen, H. van Hekland, P. de Lange, A. H. Stuitje. 1991. Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *Trends Genet.* 7: 427-430.

- Murphy D. J. 1996 Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends Biotechnol* 14: 206-211
- Nussalk C., V. Poljarec, C. Somerville. 1994 Targeting of polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12760-12764
- Panzerdix L., R. Kim, J. Giannouli, S.-H. Kim, R. L. Fischer. 1992 Production of the sweet potato nematode in transgenic plants. *Bio/Technology* 10: 561-564
- Perkins F. J., R. W. Heston, T. A. Armstrong, H. E. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, H. A. Fischhoff. 1990 Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 949-943
- Perkins F. J., H. L. Furber, D. A. Dean, S. I. McPherson, D. A. Fischhoff. 1993 Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3324-3328
- Prasad P. A., D. M. Stark, P. R. Sanders, R. N. Beachy. 1989 Protection against tobacco etch virus in transgenic plants that express tobacco etch virus antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6949-6952
- Quinn J. P. 1990. Evolving strategies for the genetic engineering of herbicide resistance in plants. *Biotecnol. Adv* 8: 321-333
- Ramijn G. J. H., M. M. Moloney. 1995 Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Bio/Technology* 13: 72-77
- Ryan C. A. 1990 Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. *Annu Rev Physiol* 52: 425-449
- San Guptis A., R. P. Webb, A. S. Holaday, R. D. Allen. 1993 Overproduction of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol* 103: 1067-1073
- Shade R. F., H. E. Schroeder, J. J. Paejo, L. M. Tubb, L. L. Marchick, T. J. V. Higgins, M. J. Chrispeck. 1994. Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technology* 12: 793-796
- Shah D. M., C. M. T. Romanos, R. A. Beachy. 1995 Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications in agriculture. *Trends Biotechnol* 13: 362-368
- Töpfer H., N. Martini, J. Scheil. 1993 Modification of plant lipid synthesis. *Science* 260: 681-686
- Tricoli D., M., K. J. Carnes, P. F. Russell, J. R. McMaster, D. W. Groff, K. C. Hodson, P. T. Himmelf, J. P. Hubbard, M. L. Sweshore, H. D. Quennada. 1995 Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to cucumber mosaic virus, watermelon mosaic virus 2, and zucchini yellow mosaic virus. *Bio/Technology* 13: 1458-1465
- Vaerck M., A. Rezaei, H. Hofte, S. Janssens, M. de Beuckeleer, E. Deza, M. Zubeau, M. Van Montagu, J. Leemans. 1987 Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37
- Van Camp W., H. Williams, C. Fowler, M. Van Montagu, D. Inze, P. Reupold-Popp, H. Sandermann, Jr., C. Langbartels. 1994 Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Technology* 12: 165-168
- Van Belle J. 1991 Insect control with transgenic plants: resistance or not? *Trends Biotechnol* 9: 127-129
- Verduijn H., M. Ali, J.-M. Neuhaus, T. Böller, A. Wemken. 1991 Colonization of transgenic *Nicotiana glauca* plants, expressing different forms of *Bacillus thuringiensis* chitinase, by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseri*. *Mol Plant-Microbe Interact* 6: 261-264
- Williams S., I. Friedrich, S. Dinscher, N. Curran, H. Kessmann, E. Ward, J. Ryals. 1992 Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology* 10: 540-543
- Zhu Q., F. A. Miller, S. Maswal, R. A. Dixon, C. J. Lamb. 1994 Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/Technology* 12: 807-812

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Предположите, что растения трансформированы вирусом без оболочки с одноцепочечным РНК геномом (RIBV пухляковидный). Почему и это РНК можно легко выделить. Кроме того,

- у них есть антитела на все четыре вирусных белка. Какую стратегию вы выбрали бы для защиты растений от вирусной инфекции?
- Предложите несколько стратегий создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям.
 - Как с помощью антиметаболической ДНК можно обеспечить устойчивость растений к сизифическим вирусам?
 - Каковы эффекты ингибиторов протеаз, ингибитор амилазы и желатиназы в отношении растений и насекомых-вредителей?
 - Предложите стратегии защиты растений от поедания несколькими видами насекомых.
 - Опишите основные способы создания растений, устойчивых к сибирскому
 - Как следует изменить растение, чтобы обеспечить его защиту от цитоплазматичеческих грибов?
 - Как с помощью генов инженерии получить растения, устойчивые к патогенным бактериям?
 - Какой подход вы применили бы для создания растений, толерантного к высоким концентрациям солей?
 - Предложите, что вам нужно изменить содержание плазмиды в хлоропластах при их трансформации. Какой способ вы выберете?
 - Как с помощью метода геновой инженерии получить растения с необычной окраской цветков?
 - Как с помощью генов инженерии повысить содержание лигнина в сое?
 - Что такое коопрессия? Антигисмолония супрессии? Сравните их.
 - Как упростить процедуру очистки растительных белков, например ферментов антител, синтезируемых растением?

Трансгенные животные

Для выведения улучшенных пород домашних животных и птиц (корм с более высокой удойностью, овцы с качественной шерстью, кур с более высокой яйценоскостью и т. д.) приняты множество методов скрещивания и отбора, но каждый раз используют в качестве проиндукторов животных с наилучшими характеристиками. В результате со временем можно получить более или менее чистые линии высокопродуктивных пород животных. Стратегия скрещивания и отбора, требующая больших затрат и материальных затрат, оказалась тем не менее исключительно эффективной, и сегодня почти все аспекты биологических основ выведения новых пород домашнего скота могут быть к ней сведены. Однако после того как эффективная генетическая линия получена, введение новых признаков методом скрещивания и отбора становится все труднее. Так, линия с новым «ценным» геном может быть «замаскирована» геном, наследование чего потомки могут оказаться менее привлекательными. Чтобы быть уверенными в том, что новая, улучшенная линия сохранит полезные помеченые признаки и приобретет новые, необходимо разработать эффективную стратегию.

Успешные эксперименты по введению чужеродных генов в клетки млекопитающих и возможность создания генетически идентичных животных путем переноса ядра из эмбриональной клетки в яйцеклетку с удаленным ядром (через ядро, клятирование) позволили вносить в хромосомную ДНК выделенные из отдельных функциональных генов или целые их кластеры. Наиболее разумная стратегия состоит в следующем.

- Клонированная ген входит в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
- Инкубированным оплодотворенным яйцеклеткам имплантируют в реципиентную женскую особь (высокотехнологичное завершение развития «выбранных» млекопитающих и птиц в условиях неоплодотворенности).
- Отбирают потомство, развившееся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
- Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышковой линии, и получают новую генетически чистую линию.

Такой подход имеет много практических приложений. Например, если продукт гена стимулирует рост, то трансформированные животные будут расти быстрее при одинаковом количестве пищи. Повышение эффективности использования пищи может на несколько процентов повысить стоимость конечного продукта (товарным, шерстью и т. д.)

Несколько лет назад введением животных путем введения генов в клетку оплодотворенных яйцеклетки были реализованы на практике и 1980-х гг. Как и во многих других новых областях науки, для ускорения обмена информацией между учеными были созданы группы термиков. Так, например, чей геном был изменен путем введения чужеродной (чужеземной) ДНК, было названо трансгенным, введенный ДНК — трансген, а весь процесс введением генов — трансгенезом.

Эксперименты по генетической модификации млекопитающих организмов путем введения и интратрансгенно требуют много времени. Тем не менее трансгенно стал мощным инстру-

Таблица 19.1. Белковые составы (г/л) молока мышей и овец

Белок	Мышь	Овца
Казеин		
α_1 -Казеин	10,0	12,0
α_2 -Казеин	1,4	3,1
β -Казеин	3,9	1,6
β -Лактоглобулин	10,0	16,0
Сывороточные белки		
α -Лактоальбумин	1,4	0,1
β -Лактоальбумин	3,0	2,8
Другие белки		
Сывороточный альбумин	11,4	Не обнаружен
Иммуны	1 г. овца клеточный	Не обнаружен
Трансферрин	0,1	—
Плацентарный лактоген	0,7	Не обнаружен

методами для исследования молекулярных особенностей генов и экспрессии генов в клеточных линиях и их развитии. Эти созданные искусственно системы, позволяющие изучать белки человека, в том числе для генетической модификации клеток животных также являются целью получения с помощью животных для медицины белков. Там даже предлагается новый термин «фармаг», относящийся к процессу получения из молока трансгенных животных («protein») животных путем инъекции белков человека или фармацевтических препаратов. Несмотря на то, что целью является получение, что они обрывается в организме животного и белками в количестве и это можно использовать в качестве источника для введения в организм человека и секреторный (молоко) (новый белок не должен при этом оказывать никаких побочных эффектов на организм животного, протекание в организме трансгенного животного, и подвергаться истратификационным изменениям, которые по крайней мере близки к таковым в клетках человека. Кроме того, его наличие в молоке, которое содержит и другие белки (табл. 19.1), не должно составлять проблему труда».

Трансгенные мыши: методология

Трансгенные технологии в репродукции и селекции использовались на лабораторных мышах. Сначала (1980-х гг.) в различные линии мышей бы-

ли введены копии генов. Это послужило в значительной мере способствовать установлению механизмов генной регуляции и развития организма, природы иммунологической специфичности, молекулярной генетики роста и развития, других физиологических биологических процессов. Трансгенные мыши сыграли свою роль и в предоставлении возможности крупномасштабной работе в экспериментальных условиях, в том числе в создании трансгенных линий, позволяющих моделировать различные генетические болезни человека. Впервые чужеродный ДНК мышь можно осуществлять разными методами. 1) с помощью ретровирусных векторов, интегрирующихся в клетки эмбриона на ранних стадиях развития перед имплантацией эмбриона в самку-реципиент; 2) микроинъекцией в увеличение ядра сперматозоида (мужской пронуклеус) оплодотворенной яйцеклетки; 3) введением генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток и предэмбриональных эмбрионов на ранних стадиях развития.

Использование ретровирусных векторов

Преимущество метода, основанного на использовании ретровирусных векторов (рис. 19.1), состоит в других методах трансгенности состоит в его эффективности. Однако размер вставки в этом случае ограничивается 8 kb, вследствие чего трансген может оказаться лишним прилегающим регуляторных последовательностей, необходимых для его экспрессии.

Использование ретровирусных векторов имеет и еще один важный недостаток. Хотя эти векторы способны вти, часто они были неэффективны по репликации, генной интеграции ретровирусом (интеграция-почкование), которая необходима для получения большого количества вирусных ДНК. Несмотря на все принятые меры ретровирус-помощники могут реплицироваться и интегрироваться в трансгенное животное, что совершенно невозможно, если эти животные предназначены использовать в пищу или для получения для получения коммерчески продукта. Поскольку существуют альтернативные методы трансгенной, ретровирусные векторы редко используются для создания трансгенных животных, поскольку коммерчески ценны.

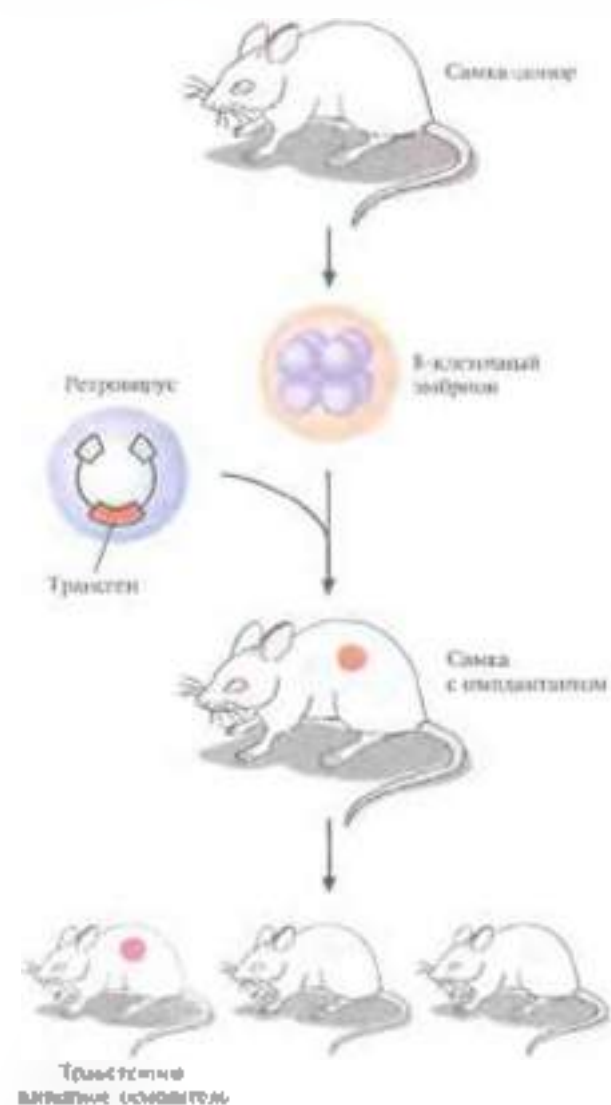


Рис. 19.1. Получение линий трансгенных мышей с использованием репродуцируемых эмбрионов. Эмбрион, состоящий из восьми клеток, инфицирован репродуктивным ретровирусом, который несет трансген. Самка, в которой был имплантирован эмбрион («суррогатная мать»), приносит на свет трансгенные потомки. Для идентификации мышей, несущих трансген в аллель определенной м.н.ч.м., проводят ряд стандартных

Метод микроинъекции ДНК

В настоящее время для создания трансгенных мышей чаще всего используют метод микроинъекции ДНК. Он заключается в следующем (рис. 19.2)



Рис. 19.2. Получение линий трансгенных мышей с помощью микроинъекции. Яйцеклетки выделяются из самки-донора, у которой была гиперактивная генерализация, и помещаются в контакт с сперматозоидом. Трансгенную конструкцию вводят в мужской протопласт оплодотворенной яйцеклетки. Яйцеклетки или имплантируют в суррогатную мать, которая приносит на свет трансгенные мыши, или вводят в оплодотворенную яйцеклетку.

ное число оплотищенных вицеклеток. Например, при изучении трансгенных мышей после инъекции ДНК получали только 66% оплотищенных вицеклеток; оплотнения достигались примерно в 25% имплантационных вицеклетках, причем трансгенными из них оказывались лишь 25%. Таким образом, из 1000 имплантированных оплотищенных вицеклеток реализуется от 30 до 50 трансгенных мышей. Кроме того, введенная ДНК может интегрироваться в любое место в геноме, и зачастую митозотический вектор оказывается в одном сайте. И, наконец, не все трансгенные мышата будут обладать нужными характеристиками. В отличие от некоторых видов трансген может не экспрессироваться из-за неадекватности регуляции сайта интеграции, а в противном случае часть клеток подвергнется генной мутации вследствие действия факторов, что может привести к гиперпродукции белка и нарушению нормальных физиологических процессов. И все же, несмотря на все это, метод микроинъекции используется для получения линии мышей, несущих функциональные трансгены, повсеместно.

Неиспользование модифицированных дробящихся ядрах соматических клеток

Клетки, выделенные из соматических тканей на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя специфичность дифференцировки в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другую зародышью стадию бластоцисты. Такие клетки называются соматическими ядерными переносными стволовыми клетками (ES), ES-клетки в культуре могут дифференцировать в различные типы тканей без нарушения их плюрипотентности. Например, в определенный сайт неспецифического гена в их геноме можно встроить функциональный трансген. Затем можно отобрать отдельные клетки, культивировать их и использовать для получения трансгенных животных (рис. 19.4). Это является преимуществом случайного встраивания, характерного для метода микроинъекции и ретровирусных векторных систем.

При трансфекции ES-клеток в культуре векторы, предельно эффективны для интеграции в специфический хромосомный сайт в некоторых

клетках ДНК встраивается случайным образом, в другом направлении происходит в нужном сайте, в большинстве же ES-клеток интеграция вообще не происходит. Для увеличения числа клеток первого поколения используют так называемую селективно-негативную селекцию. Эта стратегия состоит в позиционной селекции клеток, несущих векторную ДНК, встраившуюся в нужный сайт, и негативной селекции клеток с векторной ДНК, интегрировавшейся в случайный сайт.

В анти-мишенную должен находиться в таком объекте трансгенной ДНК, которая не кодирует никаких белков, чтобы интеграция в нужном сайте не повлияла на процессы развития или клеточные функции. Кроме того, существует, чтобы встраивание трансгена не блокировало трансляцию соответствующего участка генома. Поскольку в любых сайтах ведется непрерывно.

Векторы для позиционной интеграции селекцией обычно содержат следующие элементы: 1) два блока положительной (P1) и (P2), расположенных отдельным участком сайта мишенного трансгена (T), инициирующая новую функциональную репликацию; 2) последовательности, кодирующие устойчивость к антибиотикам G-418 (Neo^r), 4) два гена тета тимидинкиназы ($\theta 1$ и $\theta 2$) вируса простого герпеса типов 1 и 2 (HSV- $\theta 1$ и HSV- $\theta 2$) (рис. 19.5, А). Ключевым для позиционной селекцией является наличие рекомбинации этих элементов. Трансген и ген устойчивости к G-418 (Neo^r) должны находиться между двумя участками ДНК, кодирующими сайт-мишень, а гены HSV- $\theta 1$ и HSV- $\theta 2$ – по бокам этой конструкции. Если встраивание происходит в случайный сайт (не в P1) и (P2), то с высокой вероятностью вместе с другим последовательностями интегрируются один или оба гена HSV- θ (рис. 19.5, А). Напротив, если интеграция происходит в результате соматической рекомбинации путем дупликации (дублирования) нужного сайта, то в геноме встраиваются только трансген и ген Neo^r, а гены HSV- θ – нет (рис. 19.5, Б). При выщипывании трансфицированных клеток в присутствии G-418 клетки, не несущие ген Neo^r, расти не будут. Выживут только клетки, в которых произошла интеграция одним способом, осуществляются имплантация селекции. Если одновременно с G-418 в среду

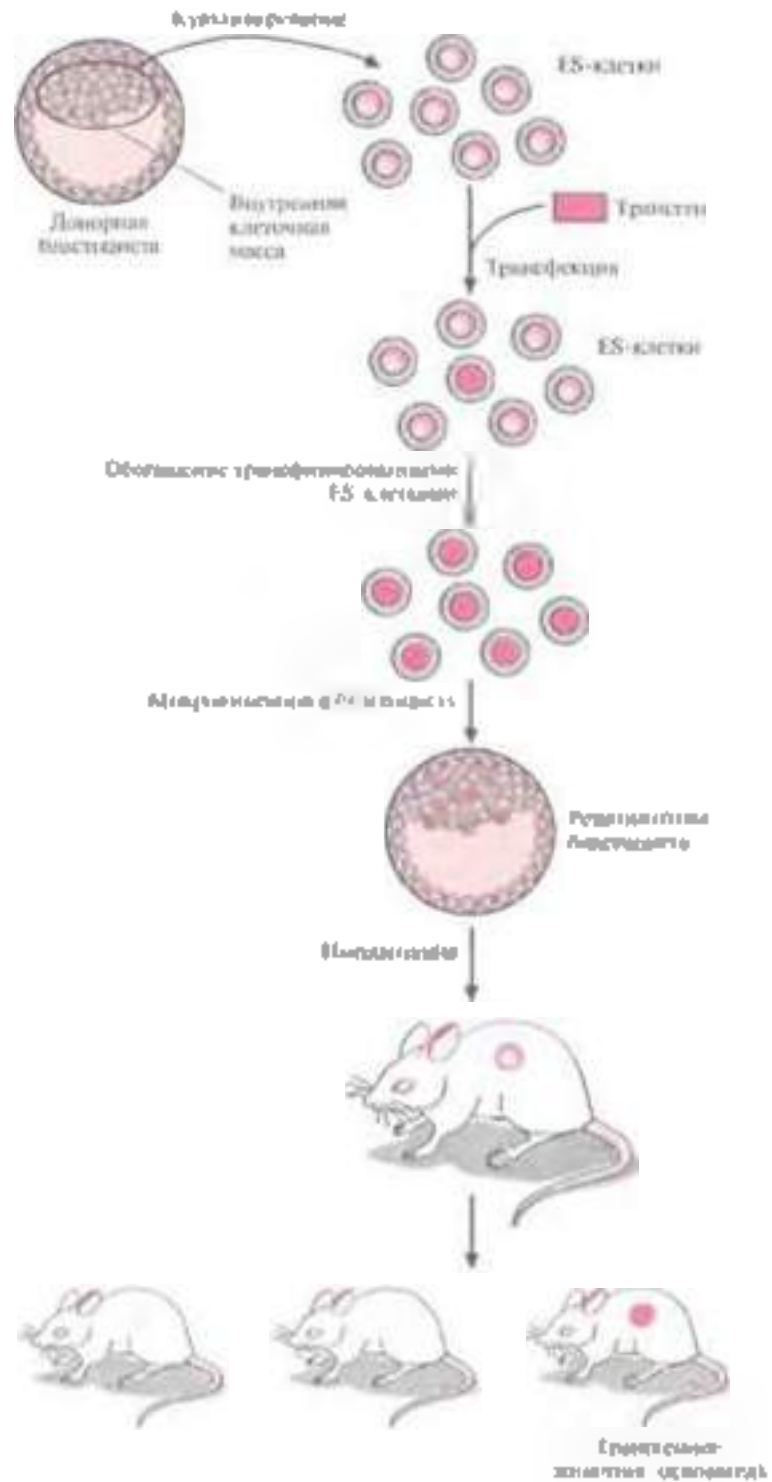


Рис. 14.4. Получение трансгенных мышей с помощью эмбриональной популяции индуцированных стволовых (ES) клеток. ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши. Их трансфицируют вектором, несущим трансген, вульгаризуют и идентифицируют трансфицированной клеткой методом полимеразно-цепочечной реакции или ПЦР. Потомство трансфицированных клеток очень трудно получить и только в бластоцисты, которые затем инъецируют в эмбрионы беременных самок. Существенная особенность — отсутствие чужеродной антител, однако можно получить трансгенных мышей.

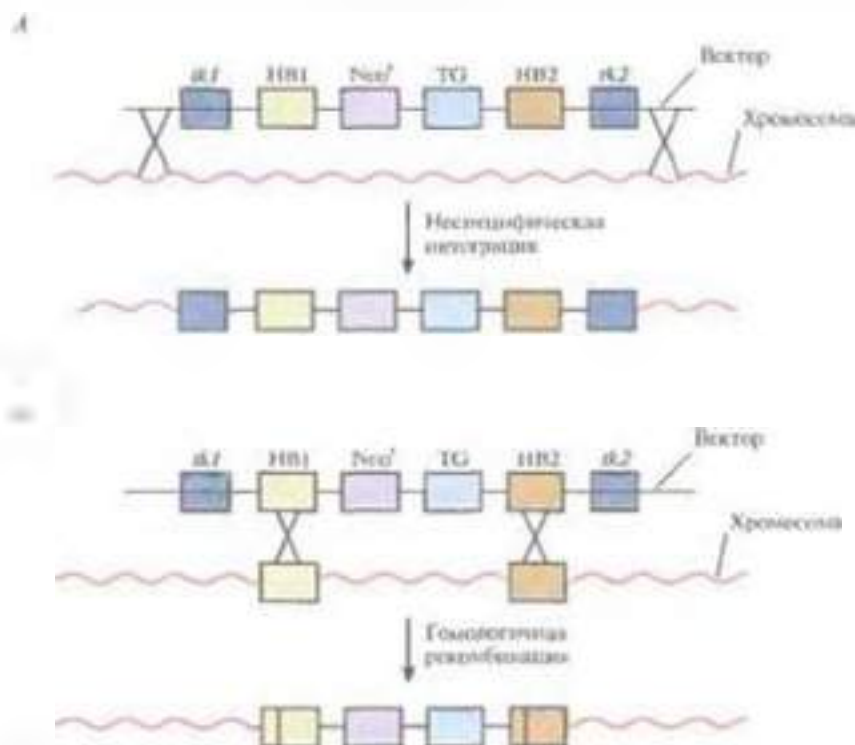


Рис. 19.5. Позитивно селективная делорция. А. Неспецифическая интеграция. В присутствии векторных фоб тем (гомологичными (H1 и H2), для участка ДНК, специфичные последовательности (или хромосомной ДНК реципиентных клеток (H1 и H2), ген (*Neo^r*) обеспечивают избирательность в интеграции в случае метода G-418, и трансгена (TG). После трансфекции образуются трансфицированные клетки, устойчивые к G-418 и тем (или фобу, который селекционирует и выживает только те клетки, которые выживают в присутствии G-418 и тем (или фобу), но не векторных и хромосомных генов (или трансгена). В присутствии G-418 и тем (или фобу) все трансфицированные клетки погибают. Б. Специфическая интеграция в хромосоме. В результате комбинации гомологичных участков (H1 и H2) векторной и хромосомной ДНК в присутствии векторного фобу тем, не селекционируются выживающие (H1 и H2). В присутствии G-418 и тем (или фобу) выживают только клетки, в которых произошла гомологичная рекомбинация.

добавить гидроксиаминоф, то рост клеток, синтезирующих гидроксиаминоф, будет подавлен, поскольку этот фермент катализирует превращение газинкловира в токсичное соединение. Летальные для клеток, в е происходит негативная селекция. Клетки, приспосабливаясь через такое двойное эмто, скорее всего будут содержать последовательности, интегрированные в нужный сайт. Хотя этот метод не защищен от ошибок, он позволяет обогатить клеточную популяцию клетками, несущими трансген в специфичном хромосомном сайте.

Более простой способ идентификации ES-клеток, несущих трансген в нужном сайте, основан на использовании ПЦР. В том случае ДНК-

вектор содержит два участка, специфичных сайту-интеграции, по одному со стороны трансгена и со стороны клонированной бактериальной или синтетической (уникальной) последовательности, отсутствующей в геноме мыши (рис. 19.6). После трансфекции ES-клетки этим вектором проводят скрининг трансфицированных клеток методом ПЦР. Одним из ПЦР-примеров (P1) комплементарен участку клонированной бактериальной или синтетической (уникальной) нуклеотидной последовательности непосредственно вектора, а другим (P2) — участку трансгенной ДНК, прилегающему к одному из гомологичных участков ДНК. При интеграции последовательности-интеграции в случайный сайт

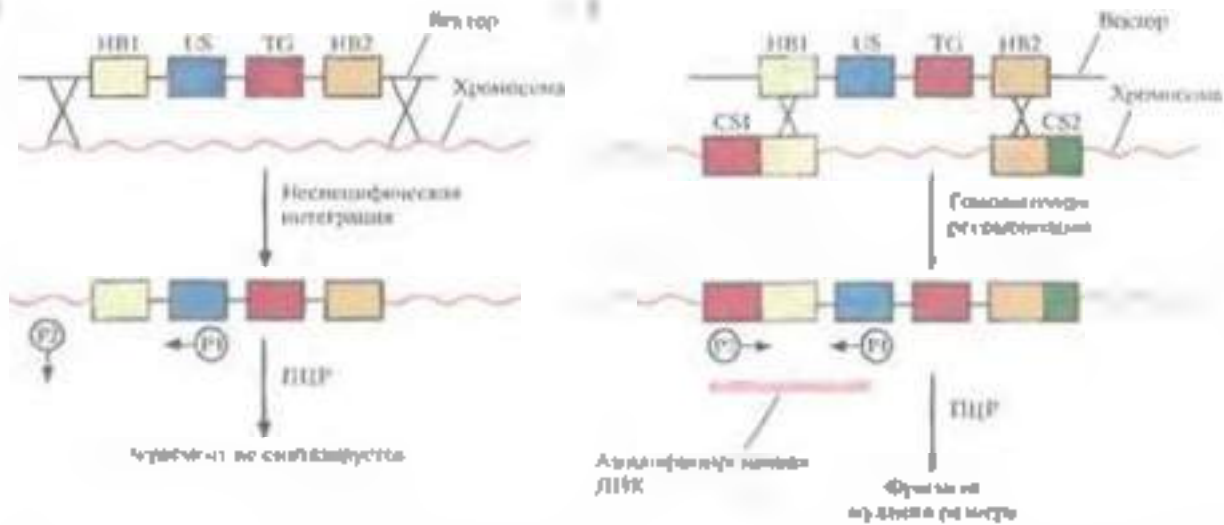


Рис. 19.6. Идентификация мест, несущих транзит в специфическом сайте, при помощи ПЦР. А В результате неспецифической интеграции векторной ДНК (или ее фрагмента) в участок хромосомы, находящийся на определенном расстоянии от места сайта праймера P1, и фрагмента другой цепи размером при амплификации не образуется P1 амплифицируется с уникальным участком (US) встраивенной ДНК, присутствующим в хромосомной ДНК в месте реинтеграции. Б В результате гомологичной рекомбинации между участками HBI1 и HBI2 встраивенной ДНК, с одной стороны, и соответствующими участками хромосомы CS1 и CS2, с другой, образуются участки, с которыми могут гибридизоваться оба праймера, P1 и P2, и которые дадутся на определенном расстоянии друг от друга. В ходе ПЦР амплификацией синтезируются фрагменты одинакового размера, которые можно идентифицировать при помощи геля электрофореза. Если ПЦР продукт другой цепи образовать, линии транзит (TG), находящийся между гомологичными участками (HBI1 и HBI2), встраивается в определенный сайт хромосомы.

скаждым продуктом амплификации образуются не будет (рис. 19.6, А), а при сайт-специфической интеграции в результате ПЦР амплификации образуется фрагмент ДНК известной длины (рис. 19.6, Б). Таким образом можно идентифицировать пуга ES-клеток, содержащих трансген в нужном сайте, а переселяя их из этой пуга получить клеточные линии с сайт-специфической вставкой.

ES-клетки, в темя которых в нужном сайте нетушен транзит, можно культивировать в явности в зигриии на стадии бластоцисты, а затем трансплантировать такую зигриию в матку псевдобеременной «суррогатной» матери. Мышцы, у которых генетически модифицированные ES-клетки участвовали в образовании клеток зародковидной линии, могут дать начало трансгенным линиям. Для этого из пугаи скрестить с особями той же линии, а затем скрестить из трансгенных особей. В результате будут получены трансгенные мыши, homozygous по трансгену.

В специфический хромосомный сайт ES-клетки можно не только встроить, но и разрушить какую-то конкретную функцию, но и наоборот разрушить эту сайт интеграцией с его контролирующей областью специфической последовательности (обычно селективно маркерного гена) (рис. 19.7). Одна из задач направленного встраивения («in-target») гена состоит в последовательном встраивании этого гена в различные органы и протекающие в нем физиологические процессы. Кроме того, есть идея, что трансгенный животных с нарушением в определенном гене можно использовать как модель для изучения болезни человека на молекулярном уровне.

Например, определенный «инсулин» ген родственно мыши приносят в неактивный плазменек сетчатки, что имитирует такую болезнь человека, как пигментный ретинит. На мышах с «индуцированным» геном ретины можно изучать процесс дегенерации сетчатки, а также

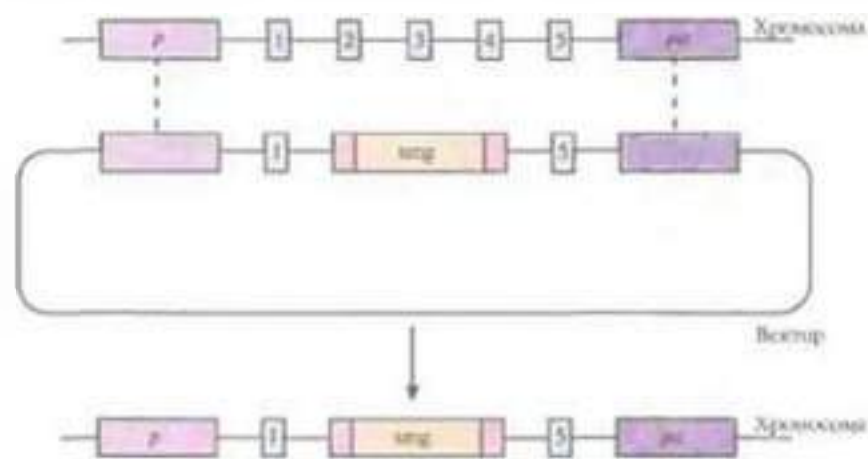


Рис. 19.3. «Имплантация» с помощью интрацитоплазматической инъекции (ICM) и флуоресцентное цитохимическое исследование, только в течение нескольких минут после введения генетического материала (1-5). В результате стандартной рекомбинации интрацитоплазматическая инъекция прекращается (инвазивность)

тергенетический эффект лекарственного средства, шведских или скандинавских ученых, занимающихся генетическим обслуживанием биологических систем. Уже в 1970-е годы 250 тысяч человек с заболеваниями генетически использовались в качестве моделей для изучения различных заболеваний человека.

В принципе идея о создании временных животных с функциональными функциями не «интересна» сложна. К сожалению, генетическая ES-клетка, генетически модифицированная, пока не обнаружена в результате рандомного скрининга, ищущего в шведских, но из этого вытекает.

Анализирование (инъекция) переноса ядра

Планирование взаимности, если перенести ядро тестированной клетки в яйцеклетку с удаленным ядром и затем последовать стабильность последней в равновесии и обратимости антектосомных путях. В нескольких лабораториях с переносом успешно показывали интрацитоплазматическую инъекцию эмбриональных клеток, клеток ядра и зародков особи. Были показаны, что ядра эмбриональных клеток стабильны и с высокой эффективностью — обеспечивают развитие. Например, с помощью переноса ядер эмбриональных клеток крышки рингата сауса, эмбриональных непроизводительных время, были получены жизнеспособные особи. В том же направлении и в том же направлении была использована с помощью переноса ядер клеток во

время ядра (инъекция) использовались животные (рис. 19.3). Так впервые было достигнуто интрацитоплазматическая инъекция эмбриональных клеток. Впрочем, нельзя исключить, что по своему делу донорское ядро было введено в репродуктивную клетку, интрацитоплазматическая инъекция эмбриональных клеток.

Контрольные данные на ядра дифференциальной клетки и при других опытах на ядерных эмбриональных клетках удалось обнаружить биологическую передачу ядер из клеток, модифицированных в стадии эмбриона (E₂), и, по мнению, особенностей эмбриональных эмбриональных клеток. Тем не менее, что в течение первых трех недель жизни особи, инвазивность нескольких слоев, интрацитоплазматическая инъекция ДНК, но они и другие не распространяются. Предполагается, что в это время эмбриональный ДНК усиливается от (инвазивности) в клетках репродуктивных белков, а соответствующие гены эмбриональных репродуктивных клеток с инвазивными эмбриональными белками функционируют на стадии эмбриональных.

Основная проблема, которую нужно решить для себя, чтобы создать трансгенных животных с помощью метода переноса ядер стабильным, это определение эмбриональных клеток в непрерывной культуре. Если это удастся, то генетические изменения таких клеток и создание временных животных стабильно будут рутинной процедурой. Однако вследствие инвазивности рандомного времени процесс развития

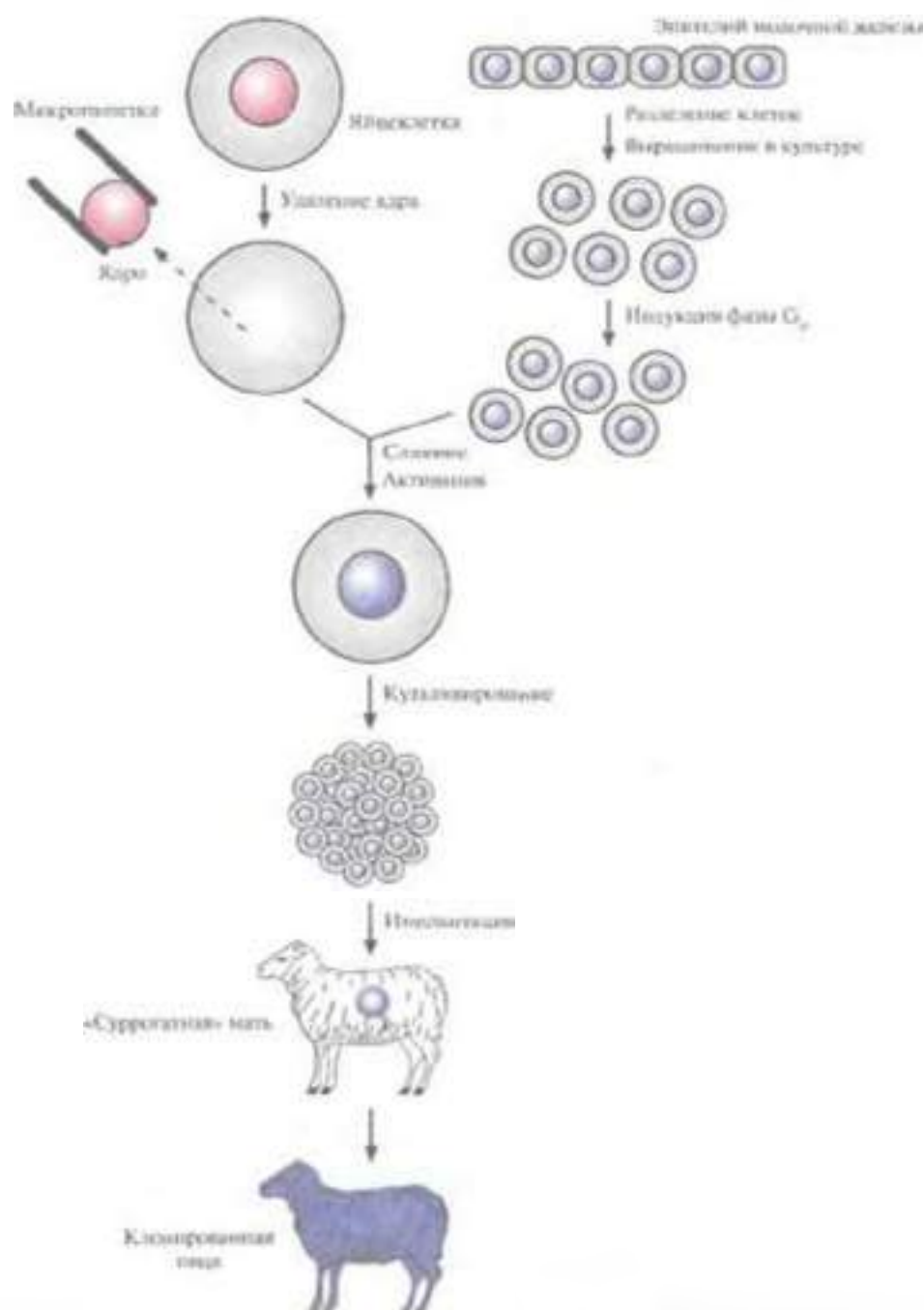


Рис. 19.8. Клонирование овец методом переноса ядра. Ядро яйцеклетки удаляют и помещают микроинъекцией Культивируют эмбриональные клетки молочной железы взрослой осы и индуцируют их переход в фазу G_2 . Осуществляют слияние клеток в G_2 -фазе и вращивание, введение в ядро, и инкубацию в экстракционном растворе с ядром в культуре или в ядре с питательной средой до ранней стадии эмбрионации, в шестидневный период между суррогатной матерью и ее протестацией эмбрионального развития. В эксперименте, описанном Уинчелтом и др. (Winchell et al., 1997), были произведены следующие 277 инъекций с удочеренными ядрами с клетками молочной железы в фазе G_2 ; из 39 эмбрионов только один достиг до рождения состояния плаценты

ние обеспечивалось функциями их иммуноглобулиновыми, которые содержат проантитор и другие важные регуляторные элементы.

Создание мышей, которые синтезируют бычий антитело, — это чрезвычайно интересный пример трансгена с чуждым YAC. Как отмечалось в гл. 10, мыноклональные антитела можно использовать для лечения некоторых заболеваний человека. Однако получить человеческие мыноклональные антитела практически невозможно. К счастью, и мыноклональные антитела гризунов ценны для человека. Чтобы человеческие существующие мыноклональные антитела гризунов были разработаны сложные стратегии с использованием рекомбинантных ДНК. В результате эти трудоемкие процедуры удалось сократить F₁- и F₂-формами, зачастую обладающим каким-то средством к специфическому антигену. Возможно, генетическое программирование удастся, если использовать для получения поливалентных человеческих антител более доступный метод с использованием гибридом.

Синтез природных антител — это настоящее чудо. Антитело — очень сложная тетрамерная конструкция, состоящая из двух пар разных цепей. Одна из них называется тяжелой (H), а другая — легкой (L или K). Эти термины отражают различия в молекулярных весах субъединиц антитела. Генетические особенности каждой тяжелой цепи определяются комбинацией вариабельного (V_H), дивергентного (D_H), интермедио (J_H) и константного (C_H) участков (доменов) соматической ДНК в H-клетке. Известны два типа легких цепей, λ и κ, которые образуются в результате перестройки из соответствующих парабазальных (V_L, V_K), интермедио (D_L, D_K) и константных (C_L, C_K) доменов. Данные H-клетки синтезируют один или два антитела, с уникальной комбинацией участков, кодирующих H-цепь, и либо гиперстроеной λ-, либо κ-цепью.

Набор генетических элементов, обеспечивающих образование множества разных H-цепей антител человека, включает около 95 V_H-доменов, 30 D_H-доменов, 6 J_H-доменов и 5 основных константных (C_H, C_μ, C_δ, C_ε, C_γ) доменов. Локус κ-цепей содержит примерно 76 V_K-доменов, 5 J_K-доменов и один константный (C_K) участок (рис. 19.9). Паттерн H-локусов и κ-цепей — от 1 до

1,5 × 10⁶. Для создания трансгенных мышей, способных синтезировать множество различных человеческих антител, необходимо активировать мышные гены H и L-цепей, а затем встроить в митохондриальную ДНК ялин YAC, содержащую гены H- и L-цепей и химерного человеческого гена иммуноглобулина.

Чтобы решить эту задачу, мышные гены H- и κ-цепей были заменены («показывались») небольшим участком кластера генов H-цепи человека (который включает 4 V_H-домены, 16 D_H-доменов, 6 J_H-доменов, C_μ и C_δ) и кластера генов κ-цепи человека (содержащего 4 V_K-домены, 5 J_K-доменов и C_K). Трансгенные мыши с таким набором генов антител человека синтетически продуцируют человеческие антитела в некоторых антителах; кроме того, были созданы гибридомы, продуцирующие человеческие мыноклональные антитела. Однако разнообразие человеческих антител, продуцируемых такими трансгенными мышами, было несильно ограничено из-за выбора парабазальных сегментов H- и κ-цепей. Чтобы решить эту проблему, создали YAC с большим числом генов парабазальных участков H- и κ-цепей иммуноглобулина человека.

Вместо четырех разных YAC с генами H-цепей иммуноглобулина человека, создали YAC длиной 1000 т. н., несущую 66 V_H-доменов, около 30 D_H-сегментов, 6 J_H-доменов, C_μ, C_δ и C_γ. Аналогично, из трех YAC, несущих различные домены V_K, создали YAC длиной 600 т. н. с 32 V_K-доменами, 5 J_K-доменами и C_K. F₁-клетки трансфицировали по способности YAC с генами H- и κ-цепей методом слияния клеток, отбора клеток, в которых произошла интеграция YAC, с помощью селективной культуры и проверки целостности каждой клетки методом ПЦР. Интегрировали клетки, несущие встраиваемые гены H- либо κ-цепей, в близость и активировали с помощью агента с помощью ПЦР. Трансгенные мыши со вставками генов H- и κ-цепей сформировали отдаленно с мышами с инaktivированными локусами этих цепей. Затем животные скрещивали между собой, чтобы получить мышей лишены функций кодируют мышиными генами H- и κ-цепей, но несущих обе вставки генов H- и κ-цепей иммуноглобулина человека.

Трансгенные мыши с увеличенным числом человеческих V_H- и V_K-доменов синтезировали

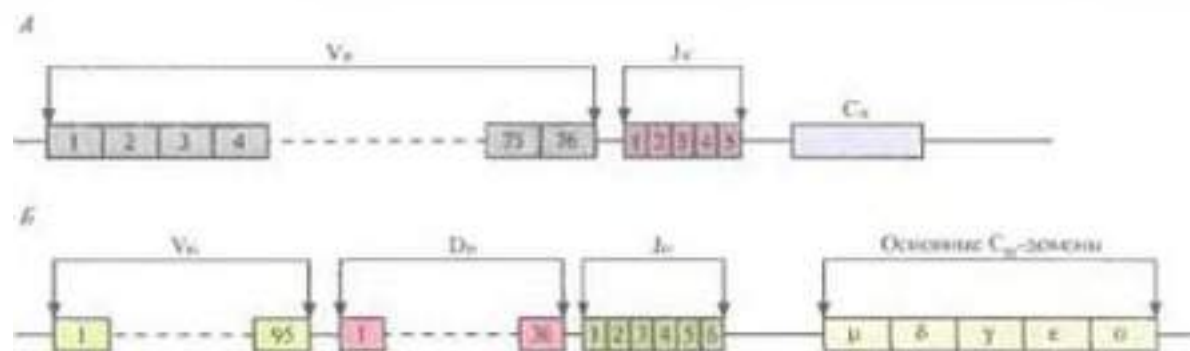


Рис. 19.9. Схематическое изображение генов k - и H -цепей иммуноглобулинов человека. А. Струкция гена k -цепи иммуноглобулина в клетках зародышковой линии Штразовца линии — промежуточные домены, здесь не показаны. Ген функциональный k -цепи, компьютер $V_{\kappa}J_{\kappa}C_{\kappa}$, образуется в В-клетках в результате перекрестных перестроек соответствующим ДНК доменов. Представленные здесь аллели имеют — а здесь один из 500 вариантов. Б. Струкция гена H -цепи иммуноглобулина в клетках зародышковой линии Штразовца линии — промежуточные домены, здесь не показаны. Ген функциональный H -цепи, компьютер $V_{H}D_{H}J_{H}C_{\mu}$, образуется в В-клетках в результате ряда перестроек соответствующих доменов. Представлены здесь комбинации аллелей на 14c 800 расстояния. На рисунке показаны только фрагменты, хотя на самом деле их четыре ($C_{\mu}1$, $C_{\mu}2$ и $C_{\mu}3$).

человеческие антитела. Их иммунохроматограммы различны антителами, и в каждом случае индуцированы секретировать человеческие моноклональные антитела, обладающие высоким специфичностью к антигену, которым животные были иммунизированы. Вероятно, что с помощью такой трансгенной системы удастся получить человеческие моноклональные антитела для использования их в медицине.

Трансгенные мыши: применение

Трансгенные мыши могут служить модельными системами для изучения болезней человека и тест-системами для исследования возможности синтеза и продукции, представляющих интерес для медицины. Используя целые животные, можно моделировать и возникновение заболеваний, и ее лечение. Однако мышь — не человек, хотя она тоже относится к классу млекопитающих, поэтому данные, полученные на трансгенных моделях, не всегда можно экстраполировать на человека в том, что касается медицинских аспектов. Тем не менее в некоторых случаях они (по крайней мере) для предварительной проверки гипотезы (или сложной болезни). Принимая во внимание все это, ученые разрабатывают «мышиную» модель также генетически более чем человека, как болезни Альцгеймера.

миса, артрит, мышечная дистрофия, образованные опухоли, инсульты, непроизвольные нарушения, дисфункция эндокринной системы, сердечно-сосудистые заболевания и многие другие.

Болезнь Альцгеймера — это дегенеративный процесс, приводящий к утрате клеток различных отделов головного мозга. Наиболее ранним проявлением служат ухудшение памяти. Этот процесс прогрессирует, к нему присоединяется утрата способности к абстрактному мышлению, изменение личности, нарушения речи, снижение функционального статуса. Патология наблюдается у 1% людей в возрасте от 60 до 65 лет и у 30% людей старше 80 лет. При патоморфологическом исследовании в теле нейрона обнаруживаются нейрофибрилярные клубочки, а у синаптических окончаний — плотные депозиты, называемые сенильными бляшками (рис. 19.10). Кроме того, в кровеносных сосудах мозга обнаруживаются конгомераты — амилонидные бляшки.

Основным компонентом сенильных и амилоидных бляшек является белок $A\beta$ (выполнен β - β -белок, β -амилоидный белок, $\beta/A\beta$) молярной массой 4 кДа. Существуют $A\beta$ -белки с разным числом аминокислотных остатков, например $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$. Все они образуются в результате гидро-

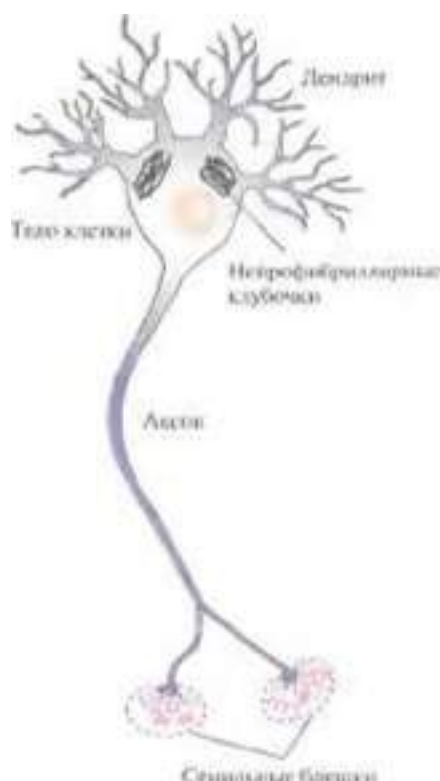


Рис. 19.18. Схематическое изображение нейрона во рту голубиного мозга человека с указанием некоторых гистологических особенностей, характерных для болезни Альцгеймера. У синапсов образуются синаптические бляшки, содержащие амилويدные синильины и амилоидные клубочки. В теле нейрона накапливаются нейрофибриллы, образующие агрегаты из бета-амилоида и других белков. Проксималь и другие типы нейронов, если не показанные

амилويدного расщепления белка-предшественника (APP). Причины накопления APP-белка не установлены. Члены некоторых семей, в которых с высокой частотой встречается болезнь Альцгеймера, несут мутации в гене APP, что заставляет их думать об участии «точечных» и «вонючих» данной патологии. К сожалению, трудно следить и доказать их возникновение и развитие болезни Альцгеймера на человеческом уровне. Пешеходному помощи в этом могла бы «помочь» замена «нужных» мышечных

Было получено множество трансгенных мышей, несущих человеческий ген APP или его часть под контролем нейротрофического промотора. При этом у большинства животных

развивались амилоидные бляшки, нейрофибриллярных клубочков, губель нейронов или нарушенные проводники из плазматических (Олиго) клеток, несущих трансген, кодирующий участок из 100 последних аминокислот APP, который включает в себя белок, обнаруживаемый в терминалах нервных тканей. Аналогичное заболевание при болезни Альцгеймера

Белок-предшественник «животных» модели, позволяющие изучать болезнь Альцгеймера, были созданы с использованием трансгенов, содержащих мутации в гене APP, характерные для некоторых семей с высокой частотой встречаемости болезни Альцгеймера в раннем возрасте (<50 лет). У одной группы таких семей в аннотации 717 APP (APP-717) вместо наличия трансгенной функции, в другой группе в аннотации 670 и 671 APP (APP-670/671) и т.д. и метионин был заменен на аспарагин в позиции 671-го остатка.

Трансген с мутацией APP-717 был создан на основе cDNA APP использованием метода «книжки» в 7, 7 и 9 модифицированных интронов. Интроны включались потому, что синаптический белок APP-717 был обнаружен в синапсах, содержащих APP-717 трансген. Конструкция «книжки» APP-717 была использована под контролем промотора гена β фактора роста из тромбоцитов, экспрессирующегося в теле мозга (рис. 19.17). Все они были названы мини-генами P1APP. У стареющих трансгенных мышей (старше 6 месяцев) носили около 40 копий P1APP, образующих амилоидные бляшки, отмечались изменения нейронов и эффект памяти. Конструкция APP-670/671 под контролем нейротрофического промотора давала у трансгенных мышей симптомы, подобные симптомам болезни Альцгеймера, в том числе образование амилоидных клубочков APP. Интересно, что при старении мышей, несущих P1APP-мини-ген, ни у трансгенных мышей APP-670/671 нейрофибриллярных клубочков не обнаруживались. Возможно, эти структуры возникают у человека как следствие сверхэкспрессии APP.

В развитии болезни Альцгеймера у человека участвуют еще три гена - ApoE4, гены преамилина 1 (PS1) и преамилина 2 (PS2). Наличие аллеля ApoE4 во рту ApoE. мутаций ответственны за

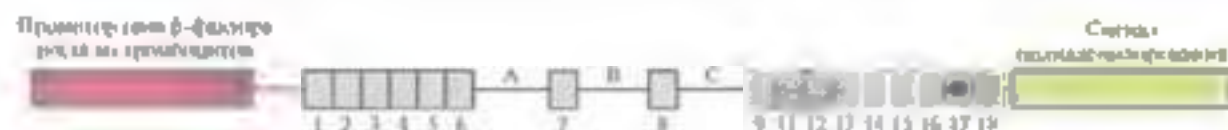


Рис. 19.11. Генетическая конструкция, называемая мини-геном P13APP, с помощью которой можно индуцировать развитие болезни Альцгеймера у трансгенных мышей 1–10 недельного возраста. В ДНК белая-предметельная линия (интрон C) включает интронный Регулируемый элементный элемент промотор гена β -казеина роста и тринадцатилетний сайт потенциальной интеграции вируса SV40

фрагменту интрона, коррелирует с увеличением вероятности поликлональной болезни Альцгеймера у людей старше 60 лет. В семье, где отмечается развитие этой болезни в молодом возрасте, обнаруживаются мутации в генах трансиллинов, однако роды каждого из них о развитии данной патологии не высказались. Но данным разным авторам, мутации в генах пресенилина приводят к увеличению активности А β 42. Например, у родичей трансгенных мышей, полученных скрещиванием трансгенных мышей, которые несли миниоразмерный человеческий ген APP, с мышиным, несущим мутантный ген пресенилина 1, отмечалась сверхпродукция А β 42. Чтобы описать развитие болезни Альцгеймера мало что известно, но есть надежда, что животные модели смогут ответить на некоторые важные вопросы о ее механизмах основы. В США эта болезнь поражает ежегодно около 4 млн. человек, и наносимый ей ущерб составляет порядка 100 млрд долларов.

Трансгенные мышей использовались также и качестве модельных систем для изучения экспрессии генов, кодирующих трансгенные продукты, которые секретируются в молоко. Так, для изучения функций белка, нарушения в котором приводит к муковисцидозу (CFTR), и для разработки способов лечения муковисцидоза (CF) необходимы большие количества дуплицированного CFTR-белка.

Муковисцидоз – распространяемая генетическая болезнь, поражающая в странах Европы одного из 2500 новорожденных. Вероятный эффект дефектного CF-гена – это изменение функции CFTR, который в норме служит каналом для ионов хлора. В результате блокирования потока этих ионов в клетку и из клетки в протокол излучаются органы, особенно в легких и поджелудочной железе, скапливается слизь. Она становится источником бактериальной инфек-

ции, которая с трудом поддается лечению антибиотиками. ДНК, выходящая из лимфоцитов бактерий, делает слизь очень густой. Густая слизь забивает протоки, нарушается нормальная работа органа и симптомы муковисцидоза еще более усугубляются. Продолжительность жизни больных муковисцидозом составляет в настоящее время 25–30 лет.

Для того чтобы лучше изучить механизмы действия CFTR, необходимо иметь этот белок в достаточном количестве. Все известные клеточные системы экспрессии in vitro не обеспечивали его эффект типичного cистема. Возможно, это связано с аккумуляцией CFTR в мембранных трансформированных клетках. Решить эту проблему можно было бы постоянным удалением трансформированных мембран из трансгенных клеток. В такой системе гетерологичный трансмембранный белок синтезируется бы с отдельными фрагментами (плазматической мембраны, что значительно облегчало бы его концентрирование и очистку. Аналогичный механизм используется кластеры молочной железы для обогащения глوبيна жира в период вскармливания. Жирные капли накапливаются в плазматической мембране и в таком виде секретируются в молоко.

Чтобы проверить действительность этой системы, полноформатную cДНК CFTR встроили в среднюю дефектную гена β -казеина мыши, из которой был удален участок от конца экзона 2 до начала экзона 7 (рис. 19.12). Получившиеся конструкции содержали промотор и сайт терминации транскрипции гена β -казеина мыши. При этом cДНК CFTR была встроена в структурный ген с интронами, благодаря которым повышалась эффективность транскрипции гена. Ген β -казеина активно экспрессируется в клетках молочной железы в период вскармливания, и этот белок является основным белком молока.



Рис. 19.12. Генетическая структура «кДНК СФТГ – ген β-казеина коровы». Подчеркнутый «кДНК СФТГ» встроены между экзоном 2 (EX2) и 7 (EX7) ген β-казеина коровы. Справа показаны интроны I, II и III (EX1, EX8 и EX9) ген β-казеина

Были получены линии трансгенных мышей, несущих «кДНК СФТГ» под контролем регуляторных последовательностей ген β-казеина. Как и ожидалось, в молоке трансгенных самок содержится СФТГ-белок, связанный с мембранными глобулами жира. Никаких отрицательных побочных эффектов у мышей СФТГ трансгенных самок или у мышей, вскармливаемых их молоком, не наблюдалось. СФТГ был глобулинизован и легко экстрагировался из жировой фракции молока. Остается только вывить, является ли он эссенциальным белком. Исследовалась также возможность получения других мембранных белков с молоком. В клетках молочных желез трансгенных мышей в черниле выявлены синтезируемые множества белков, представляющих интерес для медицины. Но чтобы иметь возможность получать СФТГ, другие трансмембранные белки и различные белки человека в больших количествах, соответствующие трансгенные конструкции независимо встраивать в геном более крупным млекопитающим коровам, овцам или козам.

Трансгенный крупный рогатый скот

Если предполагается использовать минимальную железу в качестве «биореактора», то наиболее предпочтительным животным для трансгенного «является» крупный рогатый скот, который ежегодно дает до 10 000 л молока, содержащего примерно 35 г белка на 1 л. Если в молоке будет содержаться такое количество recombinantly-го белка и эффективность его очистки составит 50%, то от 20 трансгенных коров можно будет получать примерно 100 кг чистого белка в год. По случайному совпадению, именно столько

белка C, неспособного для предотвращения тромбообразования, требуется ежегодно. С другой стороны, одной трансгенной коровой будет более чем достаточно для получения требуемого свободно количества фактора IX (фактора Кристмаса) каскада свертывания крови, который вводит большим гемофилией для повышения свертываемости крови.

Для создания трансгенных коров использовалась модифицированная сама трансгенная мышь методом микроинъекции ДНК (рис. 19.13). Процедура включает следующие основные этапы

1. Сбор ооцитов коров, забитых на электробойне.
2. Созревание ооцитов *in vitro*
3. Оплодотворение бычьей спермой *in vitro*
4. Цитруфугирование оплодотворенных ооцитов для концентрирования желтка, который в нормальных яйцеклетках мешает оплодотворению мужского протопласма с помощью секционного микроскопа.
5. Микроинъекция ДНК в мужской протоплазм.
6. Разделение зиготы *in vitro*
7. Периуриническая имплантация ооцита зиготы реципиентной самки во время течки.
8. Скрининг ДНК потомков на наличие трансгена

В тестах эффективности из нуля в 240 ооцитов были получены для трансгенных теленок. Этот результат указывает на результативность описанного подхода, но также и на его низкую эффективность. Исследования в этой области продолжаются, и есть надежды на усовершенствование методики трансгенности. Например, скрининг на возможность отбирать небольшое число клеток у развивающегося зиготы *in vitro* и встраивать их на наличие трансгена; такая процедура кластер зиготы не помешает его нормальному развитию. Этот тест позволит идентифицировать только зиготы, несущие трансген.

Один из целей трансгенного крупного рогатого скота – истинные содержания в молоке различных компонентов. Так, количество сыра, получаемого из молока, прямо пропорционально содержанию в нем казеина, потому весьма



Рис. 19.13. Производство трансгенных коров

перспективным представляется увеличение количества синтезируемого х-казеина с помощью гиперэкспрессии транскена этого белка. Далее, если обеспечить экспрессию гена пастыри в клетках молочной железы, то можно будет получать молоко, не содержащее лактозы. Такое молоко весьма ценно для многих людей, не переносящих

лактозу; также гены молока или молочных продуктов у них вызывают серьезные желудочно-кишечные расстройства. Трансгенной крупного рогатого скота — это весьма перспективный подход, но создание большого числа трансгенных животных потребует времени, ведь для того чтобы вырастить, размножить животное из оплодотворенной яйцеклетки, нужно примерно 2 года.

Весьма актуально создание животных с наследственной устойчивостью к бактериальным и вирусным инфекциям и паразитарным болезням. Известно о существовании животных с наследственной устойчивостью к бактериальным инфекционным заболеваниям — австрайту (коровы), антитетерии (пчеловодческие пчелы), холере (домашняя птица). Если в основе устойчивости к каждой из этих болезней лежит один ген, можно попытаться создать животных с трансгенными животными. В настоящее время для борьбы с инфекционными заболеваниями домашних животных используют вакцины и лекарственные препараты. Инфекционными животными страдают, в основном, безудачные животные. Стоимость всех этих мероприятий может достигать 30% общей стоимости конечной продукции.

Для выведения явной животных, устойчивых к инфекциям, можно использовать генетический подход, заключающийся в создании путем трансгенности наследуемые иммунологические механизмы. С этой точки зрения рассматривают также разные гены, ответственные за работу иммунной системы гены основного комплекса гистосовместимости, Т-клеточных рецепторов, лимфокинов. Наиболее обнадеживающими на настоящее время являются предварительные результаты, полученные при введении мышиам, кроликам и самцам генов, кодирующих H и L-цепи свчопо-либи моноклонального антитела. Идея этого подхода заключается в том, чтобы снабдить трансгенные животные наследуемым механизмом защиты, позволяющим обходиться без иммунизации с помощью прививок.

Введение в организм реципиента генов антител, которые связываются со специфическим антигеном, было названо иммунной инициацией in vitro. Для этого гены H- и L-цепей иммуноглобулинов моноклонального мульти-

него антитела к антигену, связывающиеся с 4-гидроксн-3-нитрофенилакратом, вводили с помощью микроинъекции в овариофоренные яйцеклетки мыши, кролика и свиньи. Во всех случаях в сыворотке трансгенных животных обнаруживалась соответствующая активность моноклонального антитела. Однако количество моноклональных антител, содержащихся в нем II и L, было невелико. Чтобы установить, можно ли решить эту проблему, необходимо протестировать различные трансгенные конструкции.

Трансгенные мыши, козы и свиньи

Опыты по трансгенезу в случае овцы и козы особенно были направлены на преобразование молочных желез этих животных в специализированные биореакторы для получения белковых продуктов, используемых в медицине. Несмотря на то что овцы и козы не такие, чем у коров, за год они дают сотни литров молока. С помощью метода, аналогичного используемому для создания трансгенных мышей и трансгенных конструкций, содержащих гены человека под контролем промоторов, специфичных для молочных желез (табл. 19.2), были созданы трансгенные овцы и козы, в которых концы секретировались белки человека. Они были типичны и обрели активность, близкую к таковой соответствующим белкам, изучаемым от человека. Однако, для того чтобы убедиться в полной функциональности этих белков, нужны дополнительные исследования. Экспрессия трансгенных в клетках молочных желез овец и коз не обрела никаких побочных действий ни на эмбрион и

период лактации, ни на вскармливаемое потомство. В отличие от этого при введении свиньям трансгена бычьего гормона роста под контролем промотора металлопротеина наблюдаемые эффекты наблюдались. Количество гормонов у разных особей в группах трансгенных свинок различалось, однако в целом вся группа быстрее прибавляла в весе. Кроме того, это положительный результат частично объясняется различиями паттернов: у животных отмечались вздутия желудка, почечная недостаточность, хромота, воспаление перикарда, уменьшение подвижности суставов, эритроцитоз, лейкоцитоз и пневмония. Причины этих симптомов неизвестны. Возможно, они связаны с длительным присутствием в организме избытка гормона роста. В этих экспериментах трансгенные свиньи рождались более или менее непрерывно (были созданы также трансгенные овцы с повышенной скоростью роста шкряки). Для того чтобы исключить инсулиноподобного фактора роста I была помещена под контроль мышечного промотора гена кератина с высоким содержанием сахара, что обеспечивало гиперэкспрессию гДНК. При этом у трансгенных овец отмечались симптомы нежелательных побочных эффектов не наблюдались.

Положительные результаты были получены в ходе экспериментов с трансгенными свиньями. Например, были созданы здоровые трансгенные свиньи, в теле которых присутствовали следующие «искусственные конструкции»: ретикулярная область тела B-глобулина человека, для гена α_2 -глобулина человека и овин α_2 глобулина человека. В результате ее экспрессии в клетках крови свиней синтезировался человечес-

Таблица 19.2 Трансгенные конструкции, содержащие гены человека под контролем промоторов, специфичных для молочных желез, и ретикулярных областей

Ген/гет	Промотор	Стимулятор
Ген α_2 глобулина человека/молочные железы	Ген β_2 микроглобулина	Коза
Ген α_2 глобулина	Ген β_2 микроглобулина	Свинья
Ген α_2 глобулина (X-краска) шкряки/молочные железы	Ген β_2 микроглобулина	Свинья
Ген ретикулярности овца C1M	Ген β_2 микроглобулина	Коза
Ген α_2 глобулина	Ген β_2 микроглобулина	Коза
Ген α_2 глобулина	Ген β_2 микроглобулина	Свинья
Ген CF1K	Ген β_2 микроглобулина	Свинья
Ген гиперэкспрессии 2	Ген β_2 микроглобулина	Коза

сими гены крови, при этом в результате замены человеческого промотора гена β глوبيна свиным человеческая гемоглобин сконцентрируется в значительно большем количестве. Человеческий гемоглобин, продуцируемый трансгенным свиным, обладает теми же лимитирующими свойствами, что и природный человеческий. Его можно было очистить от гемоглобина свиной обычной хроматографией.

Эти результаты указывают на принципиальную возможность замены цельной крови, испорченной при трансфузии, человеческим гемоглобином, полученным методом трансгенной. Однако и извлеченный гемоглобин переносит кислород не так эффективно, как гемоглобин в составе эритроцитов. В силу того, он быстро разрушается в организме животного, которому был введен. В прошлом его рассматривали только для переливания. Таким образом, исключение возможности человеческой крови с помощью трансгенной — это дело далекого будущего.

В последнее время большое внимание уделяется поиску обходных путей получения эмбриона для трансгенизации человека. Основная проблема медицинской трансгенизации — это гиперострофогенез. Гиперострофогенез влечет за собой связывание эритроцитов с угнетенной эпигенетической детерминантой на поверхности клеток пересаженного органа. Связывание эритроцитов вызывает остроую воспалительную реакцию (активацию каскада химических агентов), приводящую к массовой гибели клеток и быстрой потере пересаженного органа.

В естественных условиях воспалительная реакция блокируется особыми белками на поверхности клеток, выстилающих стенки кровеносных сосудов. Эти белки — ингибиторы комплексного взаимодействия. Было высказано предположение, что если бы животные-доноры несли один или несколько генов человеческого белка, ингибирующего комплексное взаимодействие, пересаженный орган был бы защищен от чрезмерной воспалительной реакции. С этой целью были получены трансгенные свиньи, несущие различные человеческие гены ингибитора комплексного взаимодействия. Каким образом и у этих животных оказались совершенно нечувствительными к комплексному взаимодействию каскада комплексного взаимодействия. Предваритель-

ные эксперименты по пересадке органов трансгенным свиньям показали, что такая пересаженная орган не повреждается, а сам орган не отторгается новым хозяином. Возможно, трансгенные свиньи, несущие человеческий ген ингибитора комплексного взаимодействия, являются основным источником органов для трансплантации человеку.

Трансгенные яйца

Митохондрии и ДНК формируются из яйцеклетки птиц с целью включения в потомство — наследия структура. Это связано с тем, что яйцеклетка и сперматозоиды функционируют и живут по-разному. Так, при оплодотворении у птиц в яйцеклетку мигрирует цитоплазма сперматозоида, а не ядро, как это обычно бывает у млекопитающих, и кастрифицировать тот мужской промотор, который соединится с женским, становится невозможно. Метод микроинъекции ДНК в цитоплазму тоже не подходит, поскольку в этом случае ДНК не инъецируется в ядро оплодотворенной яйцеклетки. Наконец, даже если удастся осуществить микроинъекцию ДНК в ядро, дальнейшие операции будут трудно осуществимы. Поскольку у птиц яйцеклетка после оплодотворения достаточно быстро обволакивается прочной мембраной, покрывается слоем альбумина и внутренней и наружной известковыми оболочками.

Однако трансген можно проводить в область желтка (зародышковый диск), который со временем желтый, и мужской промоторы и образуются раньше, чем скорлупа. После введения ДНК в желток яйцеклетку культивируют *in vitro*, и когда образуется зародок, его помещают в суррогатное яйцо, чтобы инкубировать яйцеклетку. При помощи такой стратегии была получена свинья-яйца трансгенных цыплят. Однако в настоящее время этот метод неэффективен и технически трудны выполняемы в обычных условиях.

К тому времени, когда наружная известковая оболочка яйцеклетки птиц затвердевает, зародок, развивающийся на стадии бластомеры, состоит из двух слоев из 40 000 и 30 000 клеток. Проведены эксперименты по микроинъекции тако-

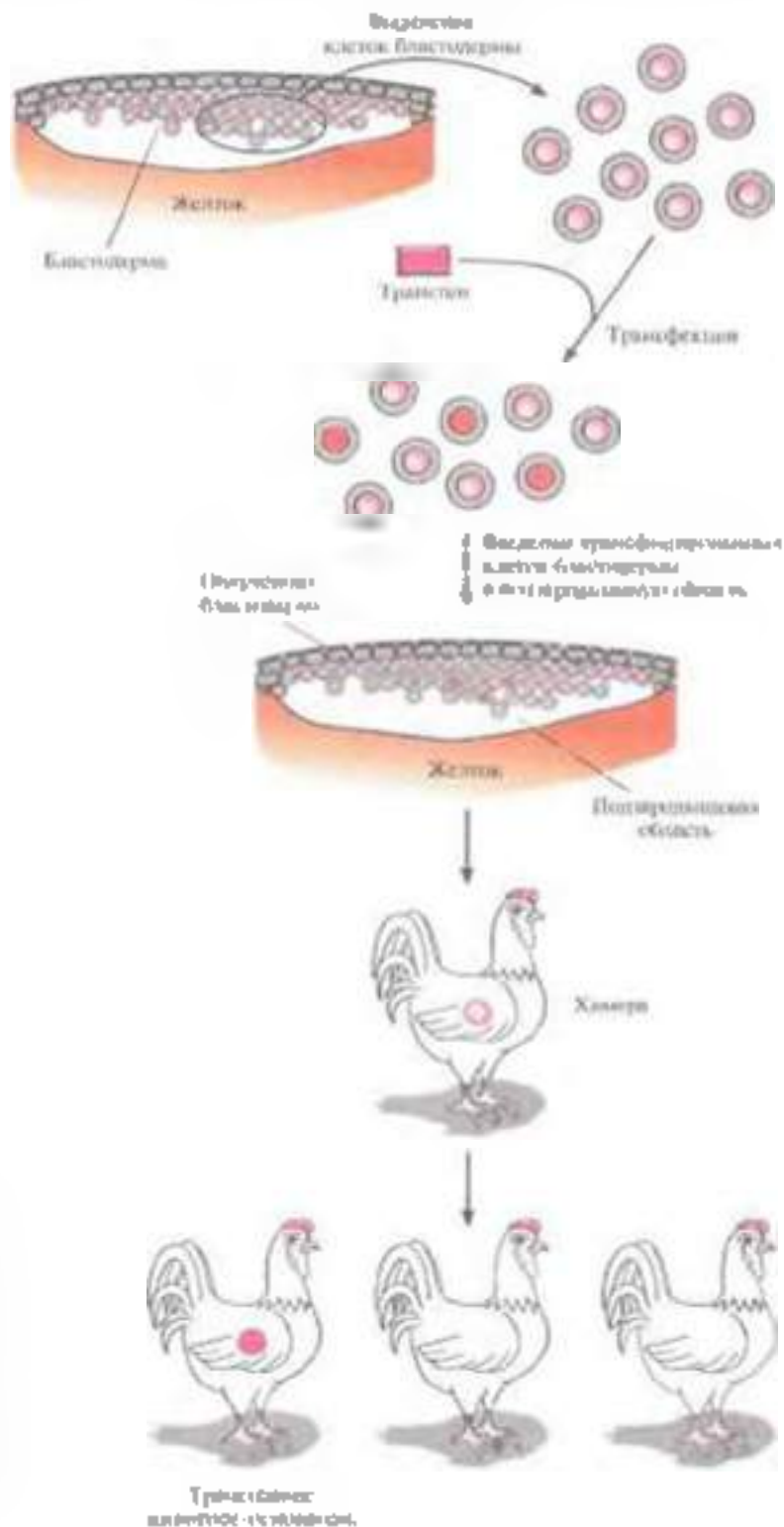


Рис. 19.14. Получение трансгенных животных трансфекцией в культуре клеток бластомеры. Выделенные клетки трансфицируют трансгеном с помощью электропорации и вводят в полупереводную особь облученной бластомерой реципиента. Часть полученных потомков выживает и размножается, в результате и эти животные трансгенны. В клетках переводной особи при скрещивании могут быть только трансгенными потомки.

Трансгенные животные - это потомки.

го доработав ретровирусными векторами с широкой репликацией, присутiating бактериальные вирусные гены. В результате были получены трансгенные цыплята и обыкновенные перепела, несущие чужеродные гены в клетках зародышковой линии. Обычно такие птицы не продуцируют стабильных вирусных частиц, и если не менее важно, несущие ретровирусных векторов и качество - по сравнению с чужеродными генов животных, которые затем могут использоваться в пищу, эти птицы способны возбудить оппортунистическую инфекцию только подпада. Кроме того, ретровирусные векторы могут быть введены в организм реципиента и составе ретровирусного вектора, не превышают 3 т. н. в исключительную часть инфекции и организм сам не стабильно. Но это действие исследователи пока не экспериментальные способы трансгенной.

Никаких специфических для птиц ES-клеток не обнаружено, по этому подход, основанный на их использовании, для птиц неприменим. Внес перспективным представляется метод с использованием рекомбинантных эмбриональных клеток (ли состоит в следующем. Взвешенные клетки бластомеры из куриного эмбриона, трансформируют их с помощью катионных липидов (линосеол), связанных с трансгенной ДНК (линосеоли трансфекции), и помещают в полупроводниковую область соседствующих ячеек (рис. 19.14). Часть потомков будет нести в каждой из небольших количестве клеток донора: таких животных называют химерами. У некоторых химер клеток, производящих от трансформированных клеток, могут образовываться линии зародышковых клеток, и после нескольких циклов скрещивания такая химер можно получить линии трансгенных животных. Чтобы увеличить вероятность создания химер, несущих чужеродные гены в клетках зародышковой линии, число донорских клеток у химеров можно увеличить облучением эмбриона радиацией перед введением и них трансформированных клеток (540-660 рад в течение 1 ч). Под действием облучения некоторые (но не все) клетки бластомеры погибнут, и соотношение между трансформированными клетками и клетками репигмента увеличится в пользу первых. Но-инициом, таким образом можно получить трансгенных цыплят, хотя и с малой эффективностью.

Трансгенных цыплят можно использовать для улучшения качества уже существующих пород - для повышения их (т.е. устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызванным канцерогенами, повышение эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в мясе, повышения качества мяса. Было предложено также использовать птиц с его высоким содержанием белка и качеством источника белковых продуктов, использоваться в фармацевтической промышленности. Эксперимент трансген в клетках реципиента цыплят курицы, для обычно секреторится большее количество овальбумина, может способствовать незначительно специфическому белкового продукта в мясе, однако сам можно этим выделить.

Трансгенные рыбы

По мере совершенствования природных рыбных ресурсов все большую роль будет приобретать разведение рыбы в искусственных условиях. Основная цель исследования в этой области - создание рекомбинантных рыб путем трансгенной. До настоящего времени трансгенны выданы микроматрицей ДНК или дезоксирибозой оплодотворенных инъекцией различных видов рыб - карпа, гуппи, форели, лососа и т. д. Поскольку у рыб процесс оплодотворения яйцеклетки происходит в обычной яйцеклетке, а не в яйцеклетке оплодотворенных яйцеклеток или клеток эмбрионов, достигающих стадии четырех бластомеров. Эмбрионет у рыб протекает в водной среде вне организма, поэтому в инкубации нет необходимости. Все дальнейшие процессы могут протекать в резервуарах с регулируемой температурой. Выживаемость эмбрионов рыб после микроинъекции довольно высока, от 35 до 80%, а доля трансгенных потомков колеблется от 10 до 70%. Трансген можно обнаружить с помощью ПЦР с использованием либо праймеров эмиттерной природы, либо суммарной ДНК. Скрещивая трансгенный рыб, можно вывести трансгенные линии.

Большинство первых исследований в этой области было направлено на исследование влияния трансгена форма роста на скорость роста. В одном из экспериментов в яйцеклетки в

лимфического лососа был введен трансген, состоящий из следующих элементов: промотора гена андрогенной белки американской сельди (шгл), 5'-ДНК гормона роста лососа, сигнала терминатора/полиаденилирования 3'-конца гена шглфермента белка американской сельди. Как правило, трансгенные лососы были крупнее и быстрее прибавляли в весе, чем контрольные нетрансформированные особи. В этом случае была избрана система экспрессии с заложенной транскрипцией гена (гормона роста в холодной воде и приемная для «всех рыб», что позволяло избежать биологической несовместимости, которая могла бы возникнуть, если бы ген гормона роста принадлежал не этой рыбе). Головные трансгенные особи, получившие в результате введения в мышечную нерви ткань генетической конструкции (гена гормона роста, позволяющей для «всех животных», а не только для рыб) больше, чем контрольные. Физиологическая совместимость линии галки (трансгенных лососей) и естественных условий является важным интересом. Предполагается, что в будущем ген устойчивости к болезням и стрессовым воздействиям, в том числе гены, стабилизирующие другие биологические особенности, будут введены как рыбам промысловых пород, так и трансгенным рыбам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическая модификация животных при помощи технологий рекомбинантных ДНК (трансгенных) основана на введении контролируемого гена(ов) в геном клетки, которая могла бы дать начало клеткам зародышевой линии (зрелыми трансгенными животными, полученными в результате такой операции, можно получить гемозиготные линии трансгенных животных). Большинство исследований в этой области проводилось на мышах. Обычно для этого вводили контролируемый ген в оплодотворенную яйцеклетку мыши с помощью микроинъекции, имплантации эмбриона в репродуктивную самку и прокормки потомства на материнском молочном вскармливании. Чужеродный ген можно вводить и оплодотворенную яйцеклетку мыши и с помощью ретроинфекционного вектора. Альтернативный подход заключается в выделении мышечных эмбриональных

стволовых клеток и трансфекции их клонированным геном. При этом мышечная экспрессия белка интегрируется в геном стволовых клеток. Клетки, несущие ген-интерес в определенном хромосомном сайте, подбирают и культивируют, в затем высаживают в различные комбинации на разных стадиях развития. Мышечные эмбриональные стволовые клетки фибробласты (фибробласты), т. е. могут дать начало клеткам любой ткани, в том числе и клеткам производимой линии. Для трансгенных используют также искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), несущие множество генов. Такие образцы были получены мыши, синтезирующие только человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических болезней человека (например, болезни Альцгеймера).

С помощью аналогичных экспериментальных подходов были получены трансгенные коровы, овцы, свиньи, птицы и рыбы. Есть надежда, что трансгенные позволят улучшить генетически существующий пород домашнего скота и вывести породы животных с новыми признаками. Кроме того, во многих случаях домашних животных, как коровы, овец и козы, удается получать в качестве специализированных «биологических фабрик» для получения продуктов и инновационных тканей, секретируемых в молоке.

ЛИТЕРАТУРА

- Blumberg P. L., K. M. Allen, R. H. Behringer, H. E. Gelfand, R. D. Palmiter, 1989. Integrase transactivational efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 836-840.
- Chow M., D. Westaway, W. Xie, G. Carlson, T. McEl, G. Levanque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Sambert, A. Davis, H. Kholodenko, H. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strong, I. Juckerburg, J. Rommen, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St. George-Hyslop, D. J. Selkoe, 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3: 67-72.
- Clark A. J., 1996. Genetic modification of milk protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 633S-638S.

- Damak S., H. Su, M. P. Jay, U. W. Bullock. 1996. Improved wool production in transgenic sheep expressing ovine-like growth factor 1. *Bio/Technology* 14: 185-188.
- Devlin R. H., T. Y. Yesaki, C. A. Blag, E. M. Donaldson, P. Swanson, W.-K. Chan. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371: 209-210.
- Higman I. E., K. R. McCurry, M. J. Maritz, S. R. McClellan, E. R. Oldham, J. L. Platt, J. S. Logan. 1996. Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation* 61: 1241-1249.
- ITallo P., S. H. Cheng, J. Marshall, R. J. Gregory, K. Flert, H. M. Meade, A. E. Smith. 1992. Production of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the milk of transgenic mice. *Bio/Technology* 10: 34-37.
- Höwald D. M., S. L. Gilmartin, T. Bengtsson, T. V. Hudson, F. Harding, S. L. Berthel, D. Jones, R. M. Kay, K. M. Higgins, S. R. Schumm, N. Luning. 1996. High-acidity human IgG1 monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 14: 845-851.
- Fodor W. L., B. L. Williams, L. A. Math, J. A. Madri, S. A. Rollins, J. W. Knight, W. Velander, S. P. Sgalloto. 1994. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11153-11157.
- Games D., D. Adams, H. R. Alexandropoulos, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, F. Gillispie, T. Guido, S. Hagopian, K. Johnson-Wood, K. Khan, M. Lee, P. Leiswitz, I. Lieberburg, S. Little, E. Masliah, I. McGeer, M. Montoya-Zavala, L. Mucke, I. Pagani, E. Pechnyan, M. Power, D. Scheek, P. Seubert, B. Snyder, E. Soriano, H. Tan, J. Vitale, S. Wadsworth, B. Wolozin, J. Zhao. 1995. Alzheimer type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527.
- Gang Z., C. L. Hew. 1995. Transgenic fish in aquaculture and developmental biology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30: 177-214.
- Hidao K., P. Chapman, S. Nilsson, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Yoshida, F. Yang, G. Cole. 1996. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 90-92.
- Humphries M. M., D. Rabacourt, G. J. Farrar, P. Kerns, M. Huel, R. A. Bush, P. A. Sieving, D. M. Sheels, N. McNally, P. Creighton, A. Fryer, A. Boros, K. Galya, M. R. Cupressi, P. Humphries. 1997. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat. Genet.* 15: 216-219.
- Jinne J., J.-H. Hyttinen, T. Peura, M. Toivanen, L. Alhonen, R. Saarelma, M. Hahnkylo. 1994. Transgenic bioreactors. *Int. J. Biochem.* 26: 859-870.
- Johnson-Wood K., M. Lee, H. Matter, K. Hu, G. Gordon, R. Barbour, K. Khan, M. Gordon, H. Tan, D. Games, I. Lieberburg, D. Scheek, I. Seubert, L. McGeer. 1997. Amyloid precursor protein processing and A β 2 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1550-1555.
- Arthropoietin P., A. Rademakers, W. Eijssens, A. van der Schaak, S. van der Brock, P. Koolman, E. Kootwijk, G. Platenburg, F. Pieper, H. Strijker, H. de Boer. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using "in vitro" embryo production. *Bio/Technology* 9: 844-847.
- Mudish E., A. Shk, M. Malter, L. Mucke, H. Scheek, D. Games. 1996. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16: 5793-5811.
- McCurry K. R., U. I. Konyan, C. G. Alvarado, A. H. Cotterill, M. J. Maritz, J. S. Logan, J. L. Platt. 1995. Human complement regulatory proteins protect swine-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat. Med.* 1: 423-427.
- Mendez M. J., L. L. Green, J. R. F. Cortalan, X.-C. Jia, C. E. Maynard-Currie, X. Yang, M. L. Gallo, D. M. Lusk, D. V. Lee, K. I. Erickson, J. Luna, C. M.-N. Roy, H. Abderrahim, I. Kirichenko, M. Noguchi, D. M. Smith, A. Fukushima, J. F. Haley, M. H. Finer, C. G. Davis, K. M. Zsebo, A. Jakobsz. 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat. Genet.* 15: 146-156.

- Cotter-Grande M. L., D. L. McPike, J. Greenan, R. L. Neve. 1996. Age-dependent neuronal and synaptic degeneration of mice transgenic for the C-terminus of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 16: 6732-6741.
- Petitje J. N., M. E. Clark, G. Liu, A. M. Vestler-Gibbins, H. J. Tuboi. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 100: 185-189.
- Purcell V. G., C. A. Pinkert, X. F. Miller, D. J. Bolt, R. G. Campbell, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, R. E. Hammer. 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* 244: 1281-1288.
- Saug H. 1994. Transgenic chickens—methods and potential applications. *Trends Biotechnol* 12: 415-420.
- Sharma A., M. J. Marlow, J. F. Okabe, R. A. Truglio, N. K. Dhargal, J. S. Lagan, R. Kumar. 1994. An orthologous porcine promoter permits high level expression of human hemoglobin in transgenic mice. *Bio/Technology* 12: 55-59.
- Stark M., N. L. First. 1993. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6143-6147.
- Strawker M. E., M. J. Marlow, K. O'Donnell, K. Hoover, W. Lago, V. Hultcrantz, C. T. Parsons, C. A. Pinkert, S. Prider, J. S. Lagan. 1992. Production of functional human hemoglobin in transgenic mice. *Bio/Technology* 10: 552-559.
- Wetzel U. H., H. Izumi, G. Kern. 1991. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits, and pigs. *Gene* 98: 185-191.
- Winnut L., A. E. Schmale, J. McWalter, A. J. Kind, K. H. S. Campbell. 1992. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 355: 810-813.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как получают трансгенных мышей?
2. В чем состоит принцип положительной селекции?
3. Что из себя представляют мыши с «нокаутированными» генами? Как и для чего получают таких мышей?
4. Каковы преимущества и недостатки трансгенных мышей как модельных систем для исследования болезней человека?
5. Что такое клонирование?
6. Расскажите, как с помощью трансгенноза можно изучать многоклеточные организмы человека.
7. Как молочная железа может быть использована в качестве «биореактора» для синтеза лекарственных продуктов?
8. Каким образом трансгенноз может облегчить транс-гентацию органов?
9. Какие подходы используются для выведения трансгенных шипов?
10. Опишите способы улучшения породы рыб с помощью трансгенноза.

Молекулярная генетика человека

Составные элементы человеческого генома не только фиксируют его образ и форму, биохимиче, эволюционные процессы среды, целостность системы сравнительности и т. д. Это последние десятилетия достигнуты значительные успехи в понимании, лечении и профилактике онкологических болезней, патологий более специфичны слабо связанные генетическая факторы, особенно в развитии стресса. Например, в Канаде, генетическая статистическая динамика, у 5% населения в возрасте до 25 лет обнаруживаются наследственные дефекты, приводящие к инвалидности, а у более чем 50% в течение жизни развивается злокачественная опухоль. В настоящее время более половины случаев заболевания в детском возрасте уже удается справиться с генетическими заболеваниями.

Наследственными являются свыше 1000 болезней человека. Белоглистные из них очень редки ($1 \cdot 10^{-6}$), но некоторые встречаются относительно часто ($1 \cdot 10^{-4}$). Многие наследственные заболевания человека обуславливаются мутациями в единичных генах, однако ряд сложных заболеваний, например рак, определяется мутациями в нескольких генах. В том случае, когда имеется полнота, точность и наследственность наследственные симптомы заболевания (фенотипа), определяемого единичным геном, генетическую природу заболевания можно установить исходя из типа его наследования в семье, представленных экзотическими проявлениями. Существует четыре основных типа наследования: аутосомно-доминантный (рис. 20.1), аутосомно-рецессивный (рис. 20.2), X-сцепленный доминантный (рис. 20.3) и X-сцепленный рецессивный (рис. 20.4). Термин «аутосомно-доминантный» относится к 22 парам хромосом человека, в термине «X-сцепленный» указ-

ывает на локализацию гена на X-хромосоме. Доминантным называется галерея состояние, если для проявления заболевания достаточно присутствия одного мутантного аллеля данного гена, а в случае рецессивного заболевания дефектным должно быть оба аллеля. У мужчин в ядре присутствует одна X-хромосома, поэтому бы большинство X-сцепленных генов не проявляются, является самодоминантно или рецессивно, зависят в зависимости от заболевания.

Алгоритм распознавания чрезвычайно важен для установления типа наследования специфического симптома, однако не дает однозначной информации об идентификации с данным заболеванием гена, о биохимический анализе мутации или в случае аутосомного заболевания в хромосомной локализации гена. Более того, не всегда можно определить, является ли заболевание наследственным. Во-первых, не у всех людей имеются дефектные гены, проявляющиеся симптомами заболевания (мутация не-идентичность). Во-вторых, симптомы (фенотип) могут определять, не связаны ли с геном (выраженными (выраженными экспрессивностью). В-третьих, один и тот же фенотип может обуславливаться дефектами в нескольких генах (генетическая гетерогенность). В-четвертых, в некоторых случаях заболевание может проявляться (важно) одного гена может проявиться в ряде фенотипов. В-пятых, не все заболевания можно считать со с точностью все наследственные заболевания определяются конкретными данными в конкретной семье расследования, чтобы сделать вывод о природе того заболевания.

Ученые в установлении корреляции между нормальным или патологическим фенотипом, с одной стороны, и соответствующим ему генотипом, с другой, в значительной степени зависят

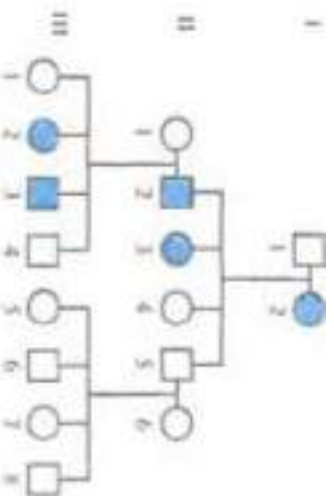


Рис. 20.1. Аутосомно-рецессивный тип наследования. Ключевыми характеристиками являются: кривые линии – женщины; закрашенные символы – больные члены семьи; незатраченные – здоровые. Типичными признаками, свидетельствующими о рецессивном характере и аутозоме, являются: что данные заболевания встречаются у мужчин и женщин примерно с одинаковой частотой; Вероятность появления детей с их родителями, родителей и тех родителей, как они наследуются по принципу, строго равно. Присутствие симптомов (I, II и III) обозначения поколения, поколения (1, 2 и 3) – члена семьи в каждой поколении. Для точного обозначения конкретного члена семьи используются буквы латинского алфавита (например, II-3). Характерными признаками аутосомно-рецессивного типа наследования являются: 1) скрещивание здоровых родителей и носителей генов заболевания в семье; 2) скрещивание носителей генов заболевания (т.е. если каждый родитель передает детскому потомку); 3) линия заболевания и здоровых людей прерываются с одинаковой частотой.

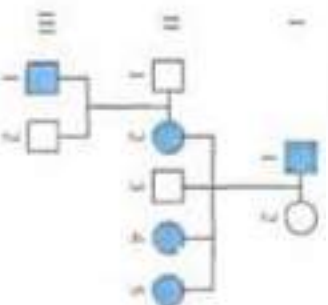
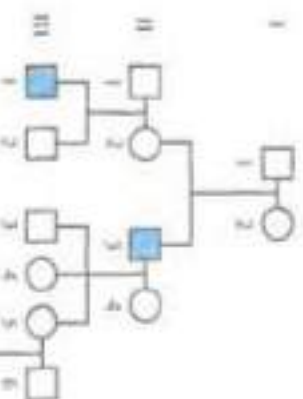


Рис. 20.3. X-сцепленный рецессивный тип наследования. Характерные признаки: 1) в семье носитель заболевания; 2) больные все дочери носительного мужчины, а все его сыновья здоровы; 3) в поколении больных носителей часто появляются типичные носители «от отца – к дочери» – к ее сыновьям; 4) часто больные являются только носителями болезни, если мужчина.



наши знания о функциях генов, ответствен-
но за или иные заболевания, тем более эффек-
тно самому человеку или семье предотвратить

Р. Менделю геном человека не была известна
и этого определенных исследовательских проце-
дуры существует набор различных инстру-
ментов и способов, используемых в зависимости от
конкретных условий. Например, тивальный этап
идентификации информации о его продук-
тах генов, ответственного за данное заболевание,
уже является идентифицированными, не явля-
ются безгеномическими и фенотипическими карт, а по-
лучение данных карт в конечном счете поможет оп-
ределить конкретную последовательность всего
генома человека. Генетическая карта (карта сцеп-
ления) показывает расположение определенных
генов (локусов) на хромосомах. Для построения
карт сцепления необходимо, чтобы локусы
на хромосомах были представлены часто
иногда аллели и чтобы можно было
идентифицировать каждый из них. Физиче-
ские карты – это набор упорядоченных клонированных
фрагментов ДНК, охватывающих всю хромосому или какую-то
ее область. На практике эти клоны перерезаются,
преобразуются в библиотеки фразисмов, наклеива-
ются на мембраны. Длинная область, охватываемая ком-
плексом, выделяется в перх нуклеотидов. Физиче-
ские карты, состоящие из клонов, служат основой
для построения окончательной физической карты,
которая представляет собой полную нуклеотидную
последовательность хромосома.¹¹

Генетическое сцепление и картирование генов

В 1865 г. Грегор Мендель, основываясь на ре-
зультатах своих опытов с садовым горохом,
сформулировал основные принципы наследова-
ния признаков. Во-первых, он пришел к выводу,
что единицы наследственности дискретны,
встречаются парами и могут существовать в аль-
тернативных формах. Позже (1905 г.) эти едини-
цы назвали генами, а варианты одного гена –
аллелями. Во-вторых, Мендель обнаружил, что

¹¹ Полная геномная последовательность каждой из хромосом че-
ловека уже определена. Более того, идентифицированы аллели
для большинства признаков из структуры. (J. C. Venter et al., *Science*,
1996, 273, 243–249; J. C. Venter, *Nature*, 2001, 409,
846–852; в. Мейер, – *Генетика*).

в половую клетку (гамету) попадает только один
ген из каждой пары. В-третьих, он заключил,
что пары генов образуются независимо друг от
друга, поэтому результатом скрещивания будут все воз-
можные генетические комбинации – в том слу-
чае, если число потомков достаточно велико
(рис. 20.5). Последнее заключение, хотя Мен-
дель и не знал этого, справедливо только для пар
генов, находящихся на разных хромосомах или
по крайней мере на разных концах одной хромо-
сомы. В экспериментах Менделя ни при одном

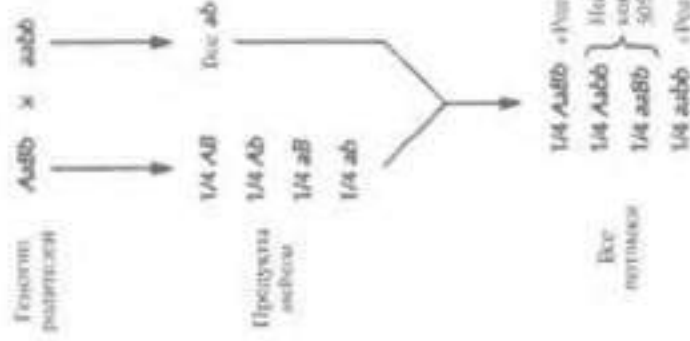


Рис. 20.5. Независимое распределение генов. При скрещивании дигетерозиготного индивида ($AaBb$) с индивидом, гомозиготным по двум рецессивным признакам ($aabb$), 50% потомков будут иметь родительские генотипы ($AaBb$, $aabb$), а 50% – новые комбинации генотипов ($Aabb$, $aaBb$) – в том случае, если число потомков достаточно велико для получения репрезентативной выборки. Этот результат означает, что гены A и B распределяются независимо, у потомков встречаются все возможные комбинации гамет каждого из родителей. Необходимо заметить, что предельное соотношение «родительских» и «комбинированных» типов зависит от генотипов родителей; например, в результате скрещивания особей с генотипами $AaBb$ и $aabb$ потомки в 100% случаев будут иметь генотип, отличный от родительских ($AaBb$).

от сцепленного не затрачивались такие формы генов, которые находились на одной хромосоме ближе друг от друга. В противном случае он пытался бы, что эти гены наследуются не независимо, как сейчас изобрет, они сцеплены.

В геномные при каллуса генетическая сцепленности все гены той же хромосомы должны переключаться в яловые слезки в виде (различные) блокля, не образуя в процессе мейоза новые генетические комбинации на хромосоме (рис. 20.6) Однако в большинстве случаев сцепленность является неполной. При мейозе происходит обмен (рекомбинация, кроссовер) между геновыми сайтами (локусами), и создаются новые комбинации генов (рис. 20.7) Простыми

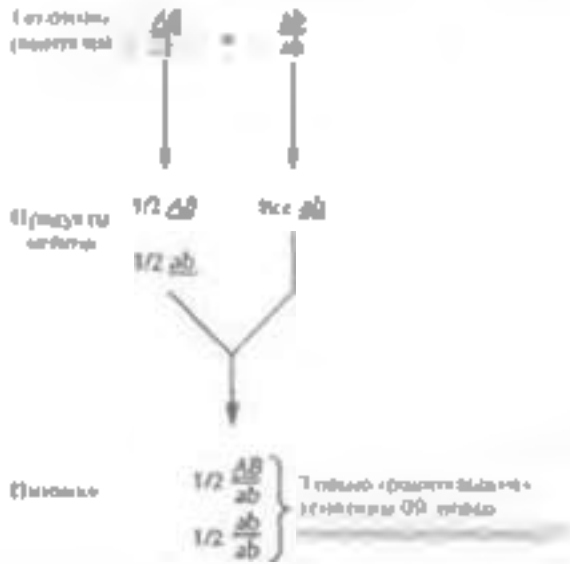


Рис. 20.6. Полное сцепление. Рассмотревшие для ин дигибридного скрещивания, $AaBb/aabb$, пытаясь в фазе сцепления (час), второй индивид пошел по двум рецессивным аллелям, что (тотчас) $aabb/aabb$. В отсутствие рекомбинации между локусами А и В все потомки будут иметь родительские генотипы, parental (генотипы $AaBb/aabb$ и $aabb/aabb$). Мейоз соединяет не всегда отбирает отсутствующие новые комбинации (кроссовер, все потомки от скрещивания $AaBb/aabb$ в $AaBb/aabb$ будут иметь новые генетические комбинации, а именно $AaBb/aabb$, $AaBb/aabb$, $aabb/aabb$ и $aabb/aabb$). Однако в отсутствие рекомбинации гены одной и той же хромосомы будут идти сцепленными вместе. Для удобства генетическим исследователям используют одну интервенционную или мутацию через шесть двух для обозначения сцепленных локусов пары хромосомы (помимо других) хромосом.

образно рекомбинация происходит тем чаще, чем больше расстояние между двумя специфическими геновыми локусами, частоту рекомбинации можно использовать как меру расстояния (генетическое расстояние) между двумя сайтами. Таким образом, анализируя частоты рекомбинации у потомков родителей, генетическими по ряду сцепленных генов, можно построить генетическую карту, на которой гены будут расположены в линейном порядке. Расстояние между локусами отражает длину, частоту рекомбинации и не коррелирует точно физическому расстоянию. Однако, сравнивая физическое и генетическое карты хромосом, удалось установить соответствие между частотой рекомбинации и



Рис. 20.7. Неполное сцепление. В данном скрещивании 20% (т.е. $0,1 + 0,1 = 0,2$) потомков имеют генотипы, сформировавшиеся в результате рекомбинации (R) между локусами А и В в процессе мейоза. Частота рекомбинации не зависит от генотипов родителей. Родители, homozygous по двум рецессивным аллелям (родители $aabb/aabb$ или $aabb/aabb$) или (так же) как в случае рекомбинации. В мультигибридных скрещиваниях рекомбинационные продукты мейоза проявляются у потомков фенотипически.

числом нуклеотидов в пар ДНК. В качестве единицы при картировании используются 1 сантиморганеда (сМ), измеряемая, равным частоте рекомбинации [9]. Что для человека соответствует примерно 10^8 пар нуклеотидов (и т.д.).

Одним из способов выявления мутаций, происходящих генетическом сцеплении и картировании генов. Во-первых, чтобы можно было оценить частоту новых генетических комбинаций (рекомбинаций), один из родителей должен быть гетерозиготен как минимум по двум лokusам (*AaBb* или *Aa/bb*). Во-вторых, дисперсионные гены должны существовать в двух конфигурациях (фазах). Если два сцепленных гена на каждой из хромосом представлены одним типом аллелей (т.е. оба доминантные, *AB*, или оба рецессивные, *ab*), то такую конфигурацию называют фазой сцепления (*couple phase*). Если же для сцепленных генов на каждой хромосоме представлены разными типами аллелей (т.е. один доминантный, а другой рецессивный, *Ab* или *aB*), то конфигурацию называют фазой отщипывания (*rep phase*). В третьих, рекомбинация между двумя сцепленными лokusами происходит не из фазы (тогда частота генетической рекомбинации между генами, называемая в аутосомном состоянии (т.е. *AaBb* или *Aa/bb*), не зависит в принципе от фазы сцепления), а тем не менее, если рекомбинация происходит, ее невозможно обнаружить. В-четвертых, частота рекомбинации 0% означает нулевое сцепление, в 50% что гены расщеплены либо на разных хромосомах, либо на одной хромосоме, но удалены друг от друга настолько далеко для выявления сцепления. Для решения проблемы картирования делят сцепленные гены, расположенные на одной хромосоме, по крайней мере картировать гены, находящиеся между ними, что позволяет определить, образуют ли все они одну группу сцепления.

Для измерения парных генетических карт несколько альтернативных организмов, таких как мышь, кукуруза, и подобная мушкетера, нематода и дрожжи, необходимо идентифицировать целый ряд генов, каждый из которых представлен на крайней мере двумя аллелями. Затем эту пару организмов скрещивают и подсчитывают частоту рекомбинаций у большого числа потомков. Результаты отражают степень сцепления между

генами в конце концов, используя мушкетера принцип (более двух пар сцепленных генов) скрещивания, можно получить детальные генетические карты.

Обнаружение и оценка генетического сцепления у человека

До появления в начале 1980-х гг. темплатон рекомбинантных ДНК обнаружение и оценка генетического сцепления у человека представляли собой сложную и очень трудоемкую процедуру, которая к тому же обычно выполнялась безупречно. При этом исследователи сталкивались с весьма реальным problem. Во-первых, генетический статус родителей обычно бывает неизвестен, что затрудняет различение рекомбинантных и нерекомбинантных отцов. Во-вторых, изменчивость близнецовых семей снижает статистическую достоверность полученных результатов.

Наконец у мужчин одним X-хромосомы значительно облучается оценка генетического сцепления между генами лokusов. В данном случае все аллели генов, расположенных на X-хромосоме, проявляются фенотипически. Сыновья лokusов, дисперсионных по X-сцепленным лokusам, получают рекомбинантную или нерекомбинантную X-хромосому. Если фаза, а именно аллели двух генов лokusов известны у матери, известно, то среди сыновей легко установить рекомбинантные и нерекомбинантные типы. Геномный отцов в данном случае не имеет значения, поскольку сыновья наследуют только материнскую X-хромосому. Иногда фазу аллелей у дисперсионной матери можно установить исходя из фенотипа ее отца. Например, если у отца матери (деда) два X-сцепленных признака рецессивны, а у нее самой — доминантный, то мать дисперсионна, а расщепляющаяся лokusов наследуются как фаза. $t \neq Ab/ab$ (где t — 20%). Этот метод обнаружения сцепления основан на подсчете дочерних фенотипов у сыновей большого числа дисперсионных женщин с известной фазой аллелей. В этом случае для каждого рекомбинантного по двум сцепленным генам лokusам (рекомбинантный лokus), будет равен сумме рекомбинантных хромосом (R), деленной на общее чис-

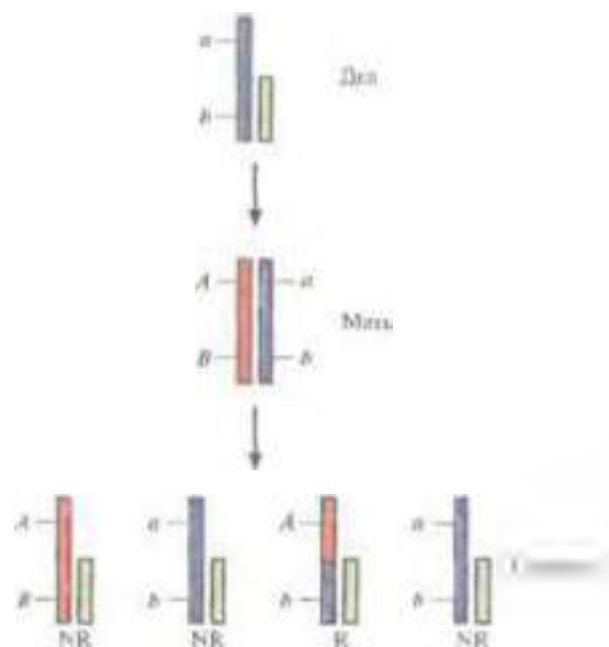


Рис. 20. В. Картирование X-хромосомы. В этом случае генетическая карта двух или большего числа X-хромосомных локусов у вичери (Mata) устанавливается на основании данных о X-структурных аномалиях ее отца (Dad). Эту информацию в свою очередь используют для определения, в каком из ее сыновей (Сыновья) получили рекомбинантную (R) и нерекомбинантную (NR) хромосому. В данном примере все несет два рецессивных гена в локусах A и B X-хромосомы, это locus дигетерозиготна, а рекомбинантные аллели находятся у нее в cis-фазе. Из X-хромосомы родителей в семье локусов A и B, Y-хромосомы и Z-хромосомы в отце более короткой по величине

лю хромосом — рекомбинантная и нерекомбинантная (NR).

$$\Sigma(A) / \Sigma(B) + \Sigma(NR)$$

Одним из главных недостатков имеет ряд недостатков. Во-первых, не всегда можно определить генетический пол, а следовательно, фаза, в которой находятся аллели у предположительно дигетерозиготной матери, остается неизвестной. Во-вторых, не все сыновья в большой выборке семей будут гетерозиготны по одному и тому же паре локусов. Несмотря на все усилия, в 1980-х гг. не удалось построить достаточно притягательную единичную карту сцепления X-хромосомы человека, основанную на подсчете рекомбинантных и нерекомбинантных хромосом. В то время было известно всего

несколько локусов и считалось маловероятным быстрое их картирование.

Анализ сцепления методом максимальной правдоподобия. Алгоритм споманисени мангол (1980 год.)

Кроме методов, основанных на подсчете рекомбинантных между двумя локусами на основании прямого подсчета рекомбинантных и нерекомбинантных хромосом, необходимо было разработать более сложные, точные методы, которые: 1) могут строиться на основе данных о частоте расщепления и сцепления; 2) не обязательно опирались бы на данные о фазе аллелей дигетерозиготных родителей; 3) могут суммировать информацию, полученную от большого количества различных семей; 4) позволяли оценить рекомбинационные частоты в том случае, когда сцепление обнаружено. Такой метод, впервые использованный в настоящее время, был создан в 1955 г. Мортеном.

При изучении сцепления рекомбинантных и не-рекомбинантных хромосом обозначается трехбуквенный термин (θ). В методе Мортена сравнивается вероятность $I(\theta)$ того, что у братьев и сестер (сестры) два локуса сцеплены (т.е. аллели находятся на одной хромосоме и находятся близко друг от друга), с вероятностью $I(0,5)$ того, что два локуса не сцеплены (т.е. аллели находятся на разных хромосомах или далеко друг от друга и находятся в пределах одной хромосомы), для любого рекомбинационного частоты θ. В случае сцепления, поскольку рекомбинационная частота не известна, он может принимать любое значение в интервале от 0 до 0,5 ($0 < \theta < 0,50$). Если же два локуса распределены независимо по θ = 0,50 по определению. Другими словами, в том случае, когда половина потомства, полученного от дигетерозиготного родителя, содержит новые генетические комбинации, два локуса находятся либо на независимых хромосомах, либо частично на нем друг от друга на одной хромосоме, что это вычисляют так, будто они распределены на разных хромосомах. Следовательно, если $I(\theta) = I(0,50)$, то два локуса не сцеплены. Десятичный логарифм отношения этих двух вероятностей, т.е. $\lg\{I(\theta) / I(0,50)\}$, представляет собой логарифм соотношения шансов ($\log\text{-odds ratio}$), называемый лодж-оdds (LOD). Лодж-оdds обозначается буквой Z, $Z(\theta)$ — но лодж-оdds для дигетерозиготных θ ($0 < \theta < 0,50$).

$f(\theta)$ можно определить, если известны вероятности получения конкретной сочетания рекомбинантных и нерекомбинантных хромосом для sibсов каждой изучаемой семьи. Вероятность того, что потомки получат от дигетерозиготного родителя нерекомбинантную хромосому, равна $\frac{1}{2}(1-\theta) + \frac{1}{2}(1+\theta)$, или $1-\theta$, а вероятность того, что они получат рекомбинантную хромосому, $\frac{1}{2}\theta + \frac{1}{2}\theta$, или θ . Например, в семье с пятью детьми вероятность для каждого из них получить нерекомбинантную хромосому от дигетерозиготного родителя составляет $\lambda(1-\theta)^5$, где $(1-\theta)$ – вероятность получения нерекомбинантной хромосомы, показатель степени 5 – число sibсов с нерекомбинантной хромосомой, точное число нерекомбинантных хромосом у sibсов, λ – коэффициент. Если все хромосомы одинаковы, т. е. все нерекомбинантные или все рекомбинантные, то $\lambda = 1$ (т. е. $5!/5!R$, или $n!/n!R$, где n – число sibсов в данной семье). В семье с четырьмя детьми вероятность того, что все они получат рекомбинантную хромосому от дигетерозиготного родителя, составляет θ^4 . Далее, вероятность того, что в семье с девятью детьми пять получат нерекомбинантные хромосомы и четыре – рекомбинантные, равна $\lambda(1-\theta)^5(\theta)^4$, где $\lambda = 126$, т. е. $9!/5!4!$. Под-базы выражаются как отношения величин, имеющих одинаковые коэффициенты. Эти коэффициенты, стоящие в числителе и знаменателе, сокращаются, а потому при анализе сцепления не учитываются.

Приведем пример подсчета под-баз по примеру sibсов одной семьи (рис. 20.9). Оба родителя B и O на рис. 20.9 считаются аллелями ABO^*B и ABO^*O (группы крови системы ABO). Закрытыми символами обозначено зутосомно-доминантное шиблсвание с (плотной) пенетрантностью (окрашенный пигмент) (NFS, *hair-raised in youth*). Основные признаки NFS – зарожение волосистой на пальцах рук и ног и редукция или отсутствие выщипывания. Ген NFS обозначается $NPSI$, а его рецессивный («нормальный») и доминантный («патологический») аллели – $NPSI^*N$ и $NPSI^*D$ соответственно. NFS представляет собой инвазивный для изучения сцепления признак, так как он равно диагностируется, не влияет на жизнеспособность и репродуктивную функцию и присутствует при рождении.

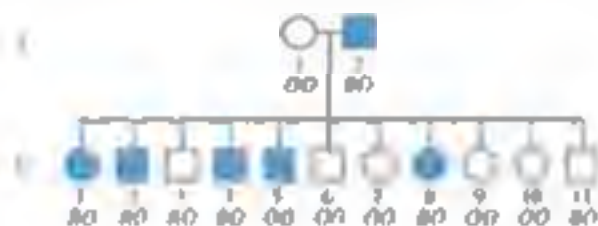


Рис. 20.9. Наследование (семья Фенкелвертца) в семье группы крови системы ABO (закрытыми символами обозначены дети с наследственным выщипыванием, незакрытыми – лица, у которых признака данного шиблсвания отсутствует). Буквы под аллелями символов обозначают аллели группы крови системы ABO (используемые сокращения обозначены O соответствует ABO^*O , B – ABO^*B).

Отец 1-7 (рис. 20.9) гетерозиготен по локусу NFS, поскольку среди его детей есть как больные, так и здоровые. Он гетерозиготен и по локусу ABO (ABO^*B/ABO^*O), так как у его детей встречаются фенотипы O и B , в генотипе его супруга (1-1) – ABO^*O/ABO^*O . Следовательно, если дигетерозиготен по этим двум зутосомным локусам ($NPSI^*N/NPSI^*D$; ABO^*B/ABO^*O). Если локусы ABO и NFS сцеплены, то фаза, в которой находится их аллель у отца, неизвестна (сочетание с неизвестным фактом). Он может быть как $ABO^*B NPSI^*D/ABO^*O NPSI^*N$ (фаза 1), так и $ABO^*B NPSI^*N/ABO^*O NPSI^*D$ (фаза 2). Или, в сокращенном виде, $B D/O N$ (фаза 1) или $B N/O D$ (фаза 2).

Если предположить, что локусы ABO и NFS сцеплены и на аллели у отца находится в фазе 1 ($ABO^*B NPSI^*D/ABO^*O NPSI^*N$), то дети 1-1, 11-2, 11-4, 11-6, 11-7, 11-8, 11-9 и 11-10 получили от него нерекомбинантную хромосому $ABO^*B NPSI^*D$ или $ABO^*O NPSI^*N$ (рис. 20.10). Все дети получили от матери (1-1) хромосому $ABO^*O NPSI^*N$, поскольку они гомозиготны по двум локусам ($ABO^*O NPSI^*N/ABO^*O NPSI^*N$). В данном случае генетический вклад матери и отца не влияет на анализ сцепления. Несмотря на то, что рассматриваемые аллели у отца находятся в фазе 1, каждый из его детей 11-3, 11-5 и 11-11 получил рекомбинантную хромосому. Следовательно, вероятность такого сцепления нерекомбинантных и рекомбинантных хромосом для данной семьи равна $(1-\theta)^5(\theta)^5$.

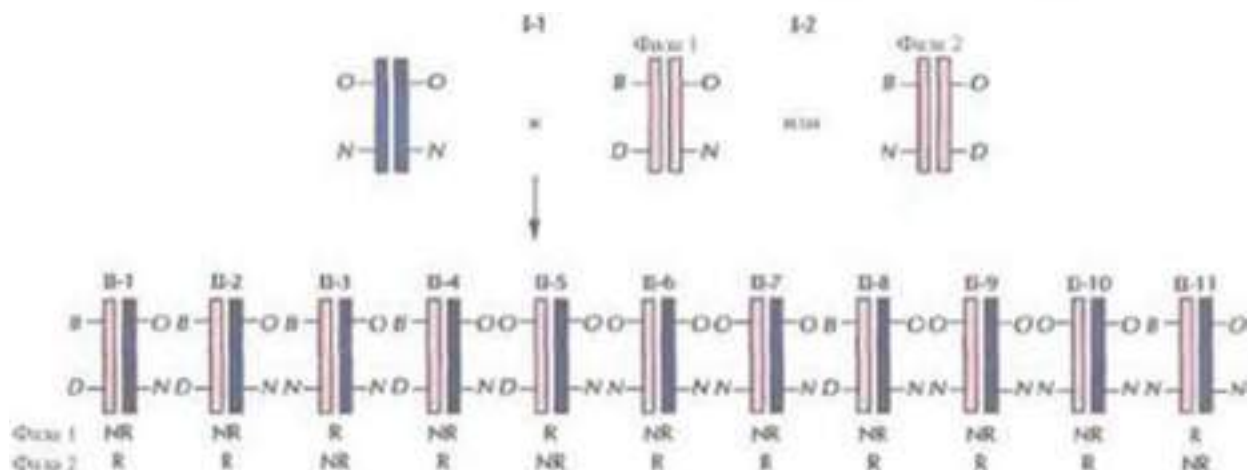


Рис. 26, 26. Генетическая организация хромосом оцеллофероза и группы крови ABO у человека родословным, приведенным на рис. 26, 9, при условии сведения к нулю возмущения. Испытуемыми сконструированы комбинации хромосом групп крови системы ABO O соответствует ABO⁰O, а B — ABO^BB (гетерозиготы («интермедиаль») и гомозиготы («чистопородность») для пары генов (на расстоянии) антикоферента объема группы A и B соответственно. Генотип отцов (1-2) может измениться в любой из двух фаз (фаза 1, фаза 2). Хромосомы (отца и матери), исследованные от него детьми, исследованы (отцом и матерью, хромосомы матери) (1) и хромосомы, исследованные от нее, — хромосомами (отца и матерью, хромосомы матери) (2) для фазы 1 и фазы 2.

Рассмотримые аллели у отцов с такой же вероятностью могут находиться в фазе 2, т. е. ABO^BB NPSI^NN/A BO⁰O NPSI^OO. Тогда дети II-3, II-5 и II-11 (как и дети от него) не являются носителями хромосомы, а каждый из оставшихся детей исследован рекомбинантную хромосому (рис. 26, III). Вероятность такой комбинации для данной семьи равна $(1-\theta)^2 \theta^2$.

Поскольку для генотипа отца обе фазы равновероятны, общая вероятность $f(\theta)$ подобной в родословной комбинации хромосом у его детей равна $\frac{1}{2}(1-\theta)^2 + \frac{1}{2}(1-\theta)^2 \theta^2$. Далее находим значение данного выражения для разных θ (обычно используют следующий набор значений θ : 0; 0,001; 0,05; 0,10; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,50, а если нет информации по времени, можно иметь весь спектр значений θ от 0 до 0,50). Затем вычисляют логарифм отношения вероятности для каждого θ , кроме 0,50, к вероятности для $\theta = 0,50$. Например, для $\theta = 0,10$ отношение $f(0,10)/f(0,50)$ равно

$$\frac{1}{2}(1-0,10)^2(0,10)^2 + \frac{1}{2}(1-0,10)^2(0,10)^2}{\frac{1}{2}(1-0,50)^2(0,50)^2 + \frac{1}{2}(1-0,50)^2(0,50)^2} = \frac{2,152 \cdot 10^{-4}}{4,883 \cdot 10^{-4}} = 0,441$$

Логарифм логарифма 0,441 равен $-0,356$, т. е. и есть логарифм для данного генотипа. Другими словами, $Z(0,10) = -0,356$.

Если фазы, в которых находится рассматриваемые аллели у отцов, не известны, то и значение вероятности $f(\theta)$ для данной семьи также будет неизвестно. Например, если оба генотипа 1-2 имеют место фазы 1 (ABO^BB NPSI^OO/ABO⁰O NPSI^NN), то, как отмечалось выше, вероятность $f(\theta)$ для данной семьи будет равна $(1-\theta)^2 \theta^2$ и $Z(0,10)$ составит

$$\ln \frac{(1-0,10)^2(0,10)^2}{(1-0,50)^2(0,50)^2} = \ln \frac{4,883 \cdot 10^{-4}}{4,883 \cdot 10^{-4}} = 0,055$$

Если же для генотипа 1-2 имеют место фазы 2 (ABO^BB NPSI^NN/ABO⁰O NPSI^OO), то $Z(0,10)$ будет равен

$$\ln \frac{(1-0,10)^2(0,10)^2}{(1-0,50)^2(0,50)^2} = -4,826$$

Для соотношения с неизвестной фазой максим Z для родословной, приведенной на рис. 26, 9, варьирует от $-5,993$ при $\theta = 0,001$ до $+0,029$ при

Таблица 20.1. Значения Z при разных θ для сцепления, преобразованного на рис. 20.9, в случае состояния с максимальной фазой

θ	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,45
Z	3,973	3,825	3,671	3,516	3,358	3,078	2,695	2,229

$\theta = 0,45$ (табл. 20.1). Если бы мы получили хотя бы одну рекомбинацию на хромосоме и $\theta = 0$, то $Z \rightarrow \infty$. Как видно из табл. 20.1, минимальное значение (Z_{\min}) при θ , близком к 0,30. Прямые дополнительные расчеты для θ от 0,20 до 0,40, показывают, что $Z_{\min} = +0,214$ при $\theta = 0,274$.

Значение $Z = 10,214$ не позволяет с уверенностью говорить о сцеплении локусов ABO и $NP5I$. Условимся, что два локусовых локуса могут считаться сцепленными только в том случае, если значение максимального локуса больше или равно 13,000, вероятность сцепления в этом случае составляет 100 к 1 или выше. В случае λ -сцепления темп, медленно изменяющийся на одной хромосоме, значение Z_{\min} при котором можно говорить о сцеплении, больше или равно 12,000; это соответствует шансам в пользу сцепления 100 к 1 или выше. Если $Z = -2,000$, то сцепление двух локусов исключается, поскольку в этом случае в опыту сцепления существуют лишь 1 шанс из 100.

Чтобы проверить сцепление, необходимо подсчитать Z -балл при разных θ для разных семей и найти максимальное его значение. Преобразование отношения фрегатолобии для каждой из секций в десятичный логарифм позволяет суммировать логарифмы L -ов. Для определения сцепления локусов ABO и $NP5I$ было проведено примерно 25 расщеплений, в том числе несколько с близкими родственными парами, и получены значения $Z(0,10) = +31,235$ (табл. 20.2); это больше, чем +2,000, следовательно, два указанных локуса сцеплены.

Значение θ , при котором Z достигает максимума, даст грубую оценку рекомбинационной

Таблица 20.2. Усредненные значения Z при разных θ для локусов ABO и $NP5I$ ¹⁾

θ	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40
Z	28,199	31,235	30,405	27,746	22,963	14,439	9,046

¹⁾ Haldane, J. H. (1951), *Journal of the Royal Society B* 37: 942, 1952, с. 100-101.

частоты в двух сцепленных локусах. В первом разделе по определению сцепления локусов ABO и $NP5I$ значение Z_{\min} не представляло, но Z -балл при $\theta = 0,10$ был наибольшим из всех Z посчитанных для разных θ , из чего был сделан вывод, что, по-видимому, расстояние между этими двумя локусами составляет примерно 10 сМ. Необходимо подчеркнуть, что при анализе разных родословных с $NP5I$ обнаружилось, что с локусом $NP5I$ сцеплены разные аллели системы ABO . Другими словами, не существует специфического сцепления между конкретным аллелем системы ABO и локусом $NP5I$. Хотя не доказано обратное, можно говорить только о вероятности сцепления между локусами, а не между определенными аллелями. Следует также отметить, что метод расчета Z был бы не полезен для определения локализации двух сцепленных локусов. Как мы увидим, для того чтобы установить, что локусы ABO и $NP5I$ расположены на длинном плече (q) хромосомы 9 между районами M и M2, 1 с. 9q34-9q34.2, потребовались дополнительные исследования.

Построение генетических карт хромосом человека

Генетический полиморфизм

Сцепление между локусом ABO и геном первого хромосома удалось обнаружить по двум причинам. Во-первых, каждый из основных аллелей системы ABO (I^A , I^B , I^O) можно точно идентифицировать при помощи простого лабораторного теста, так что родители всех исследуемых родителей и детей легко идентифицируемы. Во-вторых, каждый аллель системы ABO встречается в популяции с высокой частотой, и вероятность того, что родители будут гетерозиготны, достаточно высока. В Селлабриганте, где были проведены первые работы по изучению сцепления ABO - $NP5I$, частоты аллели I^A , I^B и I^O составляли примерно 0,66; 0,26 и 0,08 соответственно.

Термин «частота аллеля» обозначает долю конкретного аллеля среди всех копий данного локуса в популяции. Например, для доминантного локуса (A_1 , A_2) в популяции из 13 000 человек, где 3800 человек имеют генотип A_1A_1 , 6400 A_1A_2 и 2800 A_2A_2 , частота аллеля A_1 составляет

$$\frac{2 \cdot 3000 + 6400}{2 \cdot 13 \cdot 000} = 0,61$$

в частоте аллеля А2

$$\frac{2 \cdot 2000 + 6400}{2 \cdot 13 \cdot 000} = 0,46$$

Для белизности locus частота одного аллеля ($>0,999$) значительно превышает частоту другого (другой) ($<0,001$). Последствие этого в белых популяциях подавляющее большинство (99,5%) особей оказывается гомозиготным по более частому аллелю, около 0,198% - гетерозиготными и 0,001% - гомозиготными по редкому аллелю. В подобных условиях практически невозможно установить соотношение аллелей данного locus или его соотношение с другим locus, поскольку большинство родословных будут гомозиготны по частому аллелю (или аллелям). Если же частоты двух аллелей данного locus составят 0,99 и 0,01, то гетерозиготными будут примерно 2% особей, и можно обнаружить его соотношение или сцепление по родствам, поскольку в популяции много особей, гетерозиготных по данному locus (табл. 20.3). Таким образом, изучение сцепления у человека возможно только для locus с часто встречающимися аллелями. Если два или больше аллелей данного locus встречаются в популяции с частотой 0,01 и выше, то можно, что

Таблица 20.3 Частоты аллелей и гетерозигот в большой популяции со случайными скрещиваниями¹⁾

Частоты аллелей		Частоты гетерозигот		
A1	A2	A1A1	A1A2	A2A2
1,0	0	1,0	0	0
0,999	0,001	0,998001	0,001998	0,000001
0,99	0,01	0,9801	0,0198	0,0001
0,90	0,10	0,81	0,18	0,01
0,75	0,25	0,5625	0,3750	0,0625
0,50	0,50	0,25	0,50	0,25
0,25	0,75	0,0625	0,3750	0,5625
0,10	0,90	0,01	0,18	0,81
0,01	0,99	0,0001	0,0198	0,9801
0,001	0,999	0,000001	0,001998	0,998001
0	1,0	0	0	1,0

¹⁾ Частоты гетерозигот вычислены по формуле Харди-Вайнберга: $2 \cdot p \cdot q$, где p и q - частоты аллелей.

наклеточные гетерозиготы (гетерозиготы), и locus становится полиморфным. Поскольку гетерозиготы полиморфны, подобный полиморфизм аллелей системы АПК, встречается редко, для большинства проектов (и критериев) критерием исследования родословных методы кинеза позволяют с легкостью обнаружить большее количество полиморфных сайтов.

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

Для полиморфизма аллелей достаточно, чтобы два гомологичных гена различались всего одним нуклеотидом. Во многих случаях замена одного нуклеотида приводит к значительным различиям между продуктом измененного гена и нормальным белком. Однако множество изменений в гомологах генов не приводит к синтезу измененных генов продуктом, в конце того, замены могут происходить в некодирующей области ДНК и не приводить ни к какому изменению. Такие безвредные замены, распространенные по всей длине генов, не приводят к полиморфным сайтам (маркерным locus, генетическим маркерам), которые можно использовать для генетического картирования. Но иногда эти полиморфные сайты можно обнаружить.

В 1980 г. Д. Готштейн, Р. Уайт, М. Сволтс и В. Дэвис (E. White, R. J. White, M. H. Skolnick, R. W. Davis) разработали теоретические основы идентификации полиморфных сайтов полиморфных сайтов и использовали их в качестве маркера для картирования хромосом человека. Смысл методологии состоит в следующем. Рестрикционные нуклеотиды (рестриктивный) расщепляют ДНК в специфических сайтах. Когда однонуклеотидная замена происходит внутри такого сайта, рестриктаза перестает его расщеплять, но по предельному участку расщепляет интактный сайт в другой хромосоме (рис. 20.4). Поскольку один из аллелей «открывает» сайт, участвующий для другой рестриктазы, а другой - нет, то при обработке ДНК этой рестриктазой образуются фрагменты разной длины. Наличие или отсутствие полиморфных сайтов рестрикции можно установить, используя гибридизацию ДНК с зондами, строго специфичными к определенным участкам хромосомы.

Предпожим, например, что какой-то участок хромосомы содержит три сайта, расположенных рестриктазой *HindIII* (рис. 20 11, б), при этом у всех индивидуумов сайты А и В интактны. Это означает, что в популяции нет альтернативных аллелей по этим сайтам, т. е. отсутствует полиморфизм. В отличие от этого в сайте С высокая частотой встречается однонуклеотидная замена, в результате чего он становится уязвимым к расщеплению *HindIII*. Таким образом, две хромосомы в популяции различаются по данному сайту: одна из них расщепляется (+), а другая нет (-).

Если расстояние от сайта А до сайта 1 и от сайта 1 до сайта В не слишком велики, то из них не прорежут 20+ и т. д. существует панмиксия, т. е. гибридизация с участками ДНК между сайтами А и 1 (рис. 20 11, б), то после боот-гибридизации по Саузерну и расщепления в отарном поле фрагментов ДНК, полученных в результате обработки *HindIII*, мы сможем различить две ситуации. Первая - сайт 1 расщепляется, в результате чего образуются два фрагмента, и когда гибридизуется с тем из них, который ограничивается сайтами А и 1. Вторая - сайт 1 не расщепляется и зона гибридизуется с фрагментом ДНК, ограниченным сайтами А и В (рис. 20 13, б).

Анализ результатов гибридной ДНК несомненно более сложен, поскольку хромосомы встречаются парами (рис. 20 11, в). Однако и в этом случае каждому генотипу (+/+, +/-, -/-) соответствует определенный набор фрагментов, образующийся в результате гибридизации с зондом. Кроме того, для выявления сайта рестрикции на участке 1 можно использовать зонды, гибридизующиеся с другими участками ДНК между сайтами А и В (рис. 20 13, г). Феномен, состоящий в том, что наиболее часто встречающиеся в популяции аллели данного рестриктазного сайта приводит к образованию специфического набора фрагментов ДНК, называемого полиморфными аллельными рестрикционными фрагментами (ПАРФ). Полиморфные сайты рестрикции образуют маркерные локусы на той хромосоме, где они присутствуют.

Генетический статус каждого ПАРФ-аллеля на одной хромосоме называется гомозиготой. В случае одной копии существует два гомозиготных

аллели (+/+ или -/-), в случае двух разных сайтов четыре (+/+, +/-, -/+ или -/-); для n локусов число гомозиготных форм 2ⁿ. (Среднее значение ПАРФ locus (или любых других полиморфных локусов), присутствующих на хромосомах данного индивидуума, называется гетерозиготностью (генотипированием, ДНК-типированием). Последствия ПАРФ locus описаны подробно в соответствии с законами Менделя, и можно проследить их передачу в пределах родословия. Если изучается последствие двух и более ПАРФ-locus в данном семье, то можно выявить рекомбинанты. На рис. 20 12 представлены следующие ситуации. Отец (+/-) гетерозиготен по трем разным ПАРФ-locus, различающимся на одной хромосоме, а у матери (1/2) сайты рестрикции в трех хромосомах отсутствуют. Генетический статус хромосомы, происходящей от отца, является из детей, можно установить путем генотипирования. Сын 11-2 получил от отца хромосому, в которой произошла кроссинговер: остальные дети унаследовали от него нерекombinantные хромосомы.

На практике ДНК каждого индивидуума в отдельной пробе обрабатывают различными

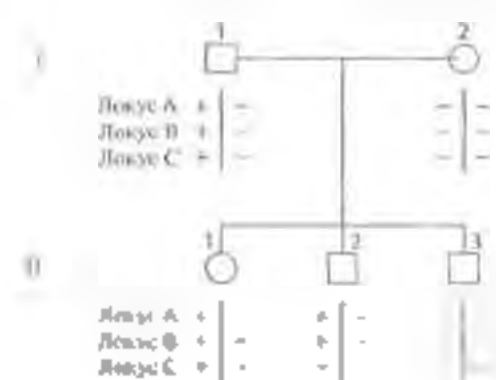


Рис. 20.12. Появление кроссингов и рекомбинантов ПАРФ-locus в родословии. Значения (+) и (-) обозначают аллели, соответствующие интактным и инактным сайтам рестрикции, при ПАРФ-locus (А, В, С), расположенных на одной хромосоме. Генетический статус 1-3 определен исходя из генотипов его родителей, +/-/+/+ (не показано). Среднее значение гетерозигот у детей (примечание: 11-2 получил от 1 рекомбинантную хромосому), а 11-3 и 11-3 нерекombinantные. Вероятности черной (или белой) палочки ПАРФ аллели под символом, обозначают их для детей (мать homozygous recessive homozygous).

рестриктазыми, а затем гибридизуют с клонированными однокопийными фрагментами ДНК, которые используются в качестве зондов или зондов для ПЦР. Гибридизация ДНК юнда с пренатальным метафазным хромосом человека, распечатанным на предметном стекле (гибридизация *in situ*), позволяет определить, соответствует ли данный зонд уникальному участку хромосомы (однокопийной ДНК). Для обозначения тысяч ПЦР-локусов (в основном стандартная номенклатура Например, индекс 121518 соответствует локусу, идентифицированному с помощью ДНК-зонда (12), который гибридизуется с эрмистинами 21 (21), представки одной копии (S) и эрестрированы комплектом по систематическим кодо выполнения человека (DNA Committee of the International Union for Human Linkage Maps - ISLA) по восьмизначным номером (28). Полиморфные маркерные сайты, расположенные между известными зонам, обозначают по шифру гомы Например, *AluI* это полиморфный locus в гене алкогольдегидрогеназы (*AluI*). Никакого стандартного обозначения для ПЦР-аллелей не существует. В одних лабораториях аллели нумеруют по порядку (D1S34*1, D1S34*2 и т. д.), а другие по длине фрагмента (в гал.), образующегося при наличии или в отсутствие сайта (сайтов) рестрикции (D4S38*х, D4S38*12, D4S38*4 и т. д.).

Уже идентифицированы тысячи ПЦР-локусов, благодаря чему значительно увеличилось число аллелей, которые можно использовать для генетических исследований. Связление между ПЦР-локусом (локусами) и болезнью того или иного заболевания можно установить, посчитав «парный» («двуухлоустный») лод-балл для гаплотипированных семей, в которых выявлены случаи и изучаемого генетического заболевания. Аналогично, сравнение между ПЦР-локусами можно обнаружить, принадлежащие ли они по родословным, представленным несколькими индивидными. Использование

ПЦР для амплирования имеет несколько ограничений. Эти локусы распределены по хромосомам неравномерно, земли в виде клонов поддерживать неудобно, а типотипирование большинства числ индивидов из нескольких семей методом блан-гибридизации по Сазерну весьма трудосыко. В частности, в геноме человека в большом количестве (>100 000) встречаются другие полиморфные локусы, содержащие простые повторяющиеся элементы на длине трех или четырех пар нуклеотидов короткие (ландчные повторы (STR, *st*) или члонт (аллели *repets*)), которые легко рестрируются с помощью полимеразаой цепной реакции (ПЦР).

Полиморфизм коротких повторов

По геному человека равномерно распределены примерно 100 000 блоков двухцепочных повторов (CA/GT) (CA) (GT) (рис. 20 13), содержащих от 1 до 40 повторяющихся CA/GT элементов. Любой такой блок, локализованный в определенном участке хромосомы, наследуется из поколения в поколение с сохранением числа повторяющихся элементов. Для CA/GT-повторы принято обозначение (CA)_n, где *n* число CA-повторов. В геноме человека встречаются и другие двухцепочные повторы [например, (AT)_n и т. д.], а также три-(ATG)_n и т. д.] и тетра-нуклеотидные (ATCT)_n и т. д.).

Чтобы идентифицировать полиморфные STR-локусы, нужно прежде всего провести скрининг геномной библиотеки человека, содержащей участки небольшого размера (примерно 100 п. н.), включающа наибольший одито нуклеотидный зона. Для идентификации клонированных (CA)-повторов обычно используют зонд, состоящий из 15 CA-элементов. Каждый индивидуум пятую секвенируют, чтобы установить длину CA-повтора и последующие последовательности флангирующая от участков. Чтобы определить, являются ли флангирующие последовательности однокопийными



Рис. 20 13 Длинноцепочная нуклеиновая кислота (CA)_n, содержащая 24 повторяющихся элемента.

Myra (Hies), и это указывает скорее на то, что обозначение «мечина» для STRP примеров ассоциируется с аббревиатурой AFM, после которой идет идентификационный номер (AFM49x5). Обозначение пары примеров часто сопровождается обозначением соответствующего локуса [AFM49x5 (1)S20(7)].

В настоящее время для картирования генома человека используются в основном не ПЦРФ локусы, а STRP. В отличие от ПЦРФ зондов, которые необходимо клонировать в вектор, синтезировать и вводить, в случае STRP локусов нужна информация лишь о нуклеотидной последовательности пары праймеров, которая может быть введена в компьютерной базе данных. Кроме того, STRP локусы равномерно распределены в геноме человека; частота STRP аллелей очень высока, что обеспечивает высокую гетерозиготность, а сами аллели без труда идентифицируются после ПЦР амплификации.

Картирование локуса генетического заболевания в определенном районе хромосомы

Анализ родословных не позволяет установить хромосомную локализацию гена того или иного заболевания, если только этот ген не находится на X-хромосоме. Однако можно исследовать связь между геном данного заболевания и полиморфными ПЦРФ или STRP-локусами, идентифицируя их (связанные с помощью сплайс-структур) как-то. Этот подход дает наилучшие результаты в том случае, когда заболевание имеет четкие симптомы, его наследование имеет однозначный характер и известны степень его пенетрантности.

Для этого необходимо прежде всего брать пробы крови у членов нескольких семей, представляющих разные времена поколений, либо у членов одной большой семьи, представляющей несколько поколений, с данными генетическими заболеваниями (при этом необходимо проинформировать всех испытуемых о целях анализа и получить их согласие). Клетки крови культивируют, что позволяет постоянно использовать ДНК для дальнейших процедур без повторного забора крови. Проводят типирование ДНК каждого индивида по нескольким поли-

морфным маркерам. В некоторых исследованиях используют более 250 маркеров, представляющих разные участки всех аутосом. Для всех информативных семей для каждого полиморфного локуса и локуса генетического заболевания вычисляли двуаллельный (биаллельный) лод-балл. Если $Z > +3.00$, то имеет место сцепление, при $Z < -2.00$ сцепление исключается.

Для определения хромосомной локализации гена, ответственного за доброкачественные семейные синдромы пролактинемия (BPCNC, benign familial neonatal convulsions), была изучена большая семья, представленная несколькими поколениями, члены которой страдают данным заболеванием (рис. 20, 16). Это состояние проявляется приступами неконтролируемых возбудимых мышечных спазмов, тремора, рук и ног в первые часы месяца жизни. Примерно в 90% случаев симптомы исчезают после 1 года. По-видимому, припадки не влияют на развитие интеллектуальное и интеллектуальный статус BPCNC – редкое заболевание, которое имеет четкие клинические признаки, наследуется по аутозному доминантному типу и имеет высокую пенетрантность.

В исследовании родословной, отличающейся несколькими поколениями, для всех протестированных полиморфных маркеров, D20S19 и D20S20, были сделаны с локусом BPCNC (табл. 20 4; рис. 20, 16). Аллели локусов D20S19 и D20S20 каждого генотипированного члена родословной, представленной на рис. 20 16, обозначены числами, расположенными над или под ними. Вертикальные числа соответствуют аллелям локуса D20S19, над ними – D20S20. Вертикальная черта разделяет аллели локусов одной хромосомы.

С помощью кода D20S19 было получено 10 аллелей ПЦРФ локуса, с помощью кода D20S20 – 2 аллеля. В некоторых ПЦРФ-локусах несколько сайтов связывания для одной рестриктазы группируются на небольшом сегменте ДНК (например 20 7, и. и.) и все вместе рассматриваются как один локус. Четыре близкородственных сайта для одной рестриктазы могут принадлежать к образованным III фрагментам разных аллелей, которые являются одними зондами STRP локусы также могут иметь более двух аллелей.

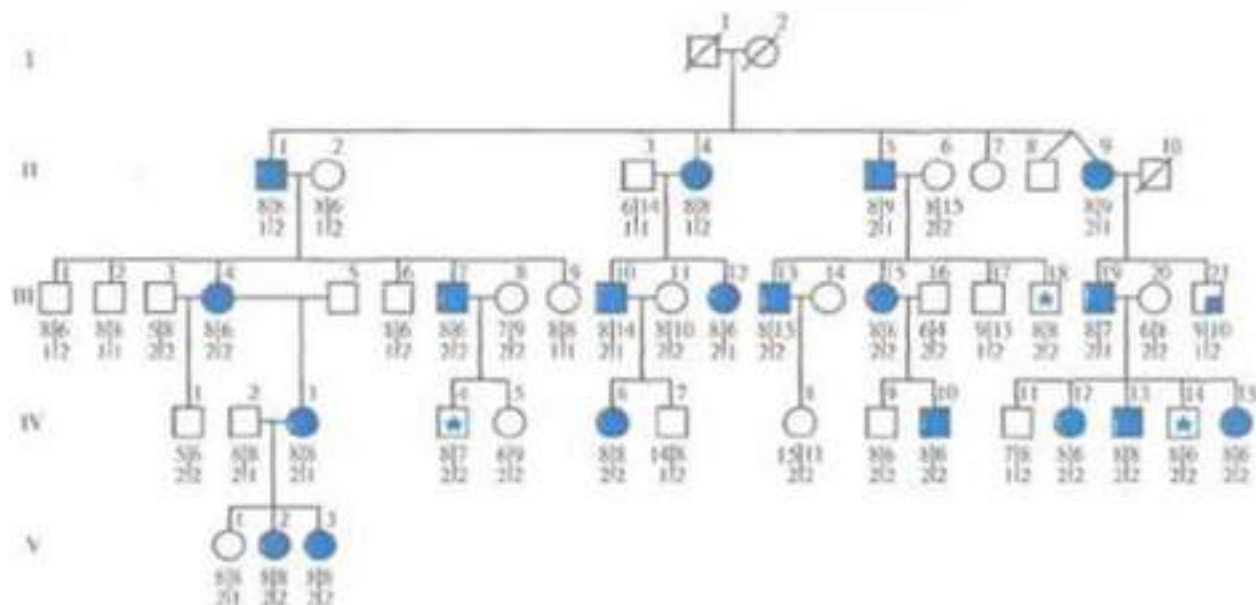


Рис. 20.16. Анализ непатитных двух хромосом по 20 полиморфным аллелям в родословии, члены которой больны ВФНС. Числа над символами – аллели двух полиморфных локусов, *PLX1/PLX2* (верхние) и *PLX3/PLX4* (нижние) (числа в скобках) (аллели двух хромосом индивидуума различают верхний и нижний сегмент). Перекрытые символы соответствуют указанным индивидуумам, неким женом, страдающим типичной заболеванием. Символ с заштрихованной четвертью квадрата отвечает сыну, у которого «материнский» фрагмент инделя отримал от фенотипично другого больного члена семьи II-4 и III-9 (идентифицированы по анализу) братства. Символы со заштрихованной четвертью квадрата (заштрихованной четвертью) представляют здоровый пенетрантности (III-18, IV-4, IV-14). У больных членом семьи обнаруживается когестация (патит) (8,2) с заболеванием, все они несут эту хромосому, унаследованную от общего предка (по данным работы Скриптс и др., *Am J Hum Genet* 33: 647–648, 1989.)

Среди членом представленной на рис. 20.16 родословной в большинстве случаев наблюдается когестация (патит) (8,2) с заболеванием; это позволяет предположить, что в данной семье локус ВФНС находится именно на хромосоме 8,2. Можно было ожидать, что и инделя III-18, IV-4 и IV-14, полученные от больного родственника хромосому (8,2), также будут болеть, однако это предположение не подтвердилось. Возможно, для некоторых случаев с пенетран-

тностью заболевания. Другими словами, у инделя III-18, IV-4 и IV-14 есть ген ВФНС, но он не экспрессируется. Аналогичные случаи при анализе сцепления других заболеваний могут обусловливаться ошибками в определении или тем, что у некоторых инделя, несущих ген заболевания, симптомов еще не проявились.

В нескольких случаях дети родители, больного ВФНС, несут хромосому (8,2) (например, IV-7 и IV-11), но никаких симптомов заболевания у них не обнаруживается. В обоих упомянутых выше случаях можно определить происхождение данной хромосомы. Например, инделя IV-7 унаследовал хромосому (14,1) от больного отца, а хромосому (8,2) с нормальным геном ВФНС от здоровой матери. Сложнее объяснить генотип инделя IV-9 и V-1. С одной стороны, они могли получить хромосому (8,2) с нормальным геном ВФНС от здорового предка

Таблица 20.4 Двуххромосомный тест для анализа ВФНС и двух полиморфных локусов хромосомы 20*

Дети	Числа полиморфных аллелей, n					
	0,00	0,95	4,18	8,36	φ =	0,48
PLX1/PLX2	1,12	1,05	2,08	2,10	1,50	0,40
PLX3/PLX4	2,03	2,03	2,03	2,36	1,61	0,76

* По данным работы Скриптс и др., *Am J Hum Genet* 33: 647–648, 1989.

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Посредством генетической карты сцепленной цепи человека с анонимным металлом, идентифицированного на полиморфизме длины рестрикционных фрагментов

D. Bonnen, K. L. White, M. Zdzienicka, H. W. Davis

Am J Hum Genet 37: 514-531 (1985)

Часто встречающиеся типы полиморфизма у человека, которые можно интерпретировать с помощью полимеразной цепной реакции

J. I. Weber, P. F. May

Am J Hum Genet 34: 268-286 (1984)

Впервые разработана методика генетической цепи человека, анонимного в 1980-х гг., стало возможным благодаря повторным работам Д. Боннен, К. Л. Уайта, М. Зденецки и С. Дэвиса. Они обратили внимание, что полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) человека поровался полиморфизму аллели (маркерные локусы), подвопились катрицианна. Кн также интерпретировать свои статьи, «мы хотим предложить новый способ идентификации генетической карты сцепленной цепи человека. В его основе лежит сравнение при помощи гетерозиготных рестрикционных ДНК сцепленных аномальных ДНК типов, способных выявить полиморфизм в виде периодических колебаний частоты при гомологизации с индивидуальными ДНК, образующими рестрикционные» было то, «они показали, что, не пользуясь специальным темпом или иного заболевания с маркерным локусом, можно определить хро-

мосому дождимание того гена. Эта идея не была высказана в том ключе, в том некрестрестрелю и гетерозиготы на анонимном боштом и др. привели в эксплуатацию цепочку шлоу» «Применение метода зондов, специфичных в отношении полиморфизма участка ДНК, давали ДНК цепочку родство с боштом частоты (короблено отарост истинс формации в течение человека»

В 1987 г. на разных хромосомах человека были идентифицированы локусы и картированы сотни ПДРФ маркеров. С их помощью были идентифицированы гены, выявлены наследственные заболевания, при помощи гетерозигот и мутационной К особенно, высокополиморфные локусы рестрикции на разных хромосомах человека исследовались и не всегда их функциями различали друг от друга. Кроме того, ПДРФ эти тип, генотипный на гетерозиготных локусах

рестрикции ДНК, несли трудностей и часто несли аномальные результаты. Все эти проблемы удалось решить, когда Вебер и Май обнаружили, что во всему геному человека рекуррентно встречаются высокополиморфные локусы и цепочка, гетерозиготных гетерозигот (каротика сцепленных интронов, STS, от них ДНК также перестраиваются при помощи ПДРФ. Как показали авторы, «длинный тип полиморфизма высокополиморфности, вероятно, является маркером при изучении митохондриальной наследственности до беременности и позволяет значительно увеличить разрешающую способность цепочку человека STS, особенно для гетерозиготных типов, особенно для гетерозиготных типов» «фактически как маркеры, в этом качестве они уже вытеснили ПДРФ локусы и в настоящее время они являются для идентификации индивидуальных генетических карт всех хромосом человека»

Например, выявил IV-9 мог установить хромосому (8,2) через свои мать (II-15) от бабушки (II-6). С другой стороны, гетерозиготы IV-9 и V-1 (присылок «близнецов» будет объяснены не полной гомозиготностью в том случае, если они установили хромосому (8,2) в гетерозиготном состоянии от обоих родителей. Необходимо подчеркнуть, что с другой стороны с III-15 может не наблюдаться сцепления аллели D2S19*4 и D2S20*2 с аллелем длинного шлоу. Тн показывает, что в рассмотренном нами случае именно эти полиморфные аллели находятся на

той же хромосоме, которая несет аллель D1S*4 и которая установилась от одного предка. В общем случае сцепления локусы, и не аллели.

Из данных табл. 20.4 можно предположить, что расстояние от локусов D2S19 и D2S20 до локуса D1S*4 не превышает 5 cM ($5 \cdot 10^6$ н. м.) В общем случае наличие сцепления не позволяет различить два локуса, если расстояние между ними меньше 1-2 cM. Поскольку локусы D2S19 и D2S20 расположены внутри района 13.2-13.3 длинного плеча (q) хромосомы 20

(№13.2 13.3), то и locus *DFAC* должен находиться именно там же (линия хромосомы или внутри него). К нам сегодня пришел при помощи метода, основанного на вычислении лямбда и использовании полиморфных маркеров, в специфических временных участках была картирована более ста тысяч полиморфных локусов.

Построение мультилокусных хромосомных карт человека

Используемые многие тысяч разбросанных по всему геному полиморфных маркеров позволило определить как порядок расположения маркеров в расстоянии между ними на хромосоме. Карта сцепления полиморфных участков генома выводится несложными при помощи шпигеля — различные табелирования. Для каждой функции таких геномов можно использовать методы, специфичные в отношении наследственности, вторичные фенотипические варианты генов.

Используя для картирования полиморфных локусов являются семьями, представляющие трех поколений, в которых живы обе бабушки и оба прадеда, и родители имеют большое число детей (>8). Исходя из четкой фазы, в котором находится исследуемый locus у каждого из родителей, а также вычислив число детей повышает вероятность того, что рекомбинация произошла. В Центре по изучению полиморфизма человека (CEPH, Centre d'Etude de Polymorphisme Humain) в Париже собраны данные и образцы ДНК членом 65 семей, представленных в большинстве случаев тремя поколениями и имеющая в среднем по 8,5 детей (см. например, рис. 20.17). Этот банк семей (CEPH-семей) предоставляет информацию о генотипах

каждого члена лабораториями всего мира, функционирующим картированием. В действительности он состоит из культур лимфобластных клеток (или линий большинства клеток CEPH-семей) и связанных готовым инструментом ДНК для картирования новых полиморфных локусов по мере их обнаружения.

Построение мультилокусной генетической карты (карты сцепления) хромосомы человека является задачей, для ее решения необходимыми средствами компьютерной программы, позволяющей установить порядок расположения локусов, наилучшим образом согласующимся с данными по рекомбинациям. Приблизительно равными локусы упорядочиваются по мере возрастания числа локусов, которые наследуются картируются. Для N локусов существует $N!/2$ возможных вариантов их расположения. Так, для 10 локусов их число равно $1/2 \cdot 10!$ или 1,8 миллиона комбинаций. Однако, далеко не все сочетания являются реальными, так как если рассуждать на интуитивной основе (или, все же число возможных вариантов остается очень большим). Обычно сначала задает наиболее вероятное расположение нескольких сцепленных локусов, а затем комбинирует их «наилучшим» образом и строит статистически достоверную карту сцепления всех локусов. Критерием того, расположил ли один locus рядом с другим, является значение десятичного логарифма правдоподобия (log-likelihood); если он равен или превышает 3,00, то ответ будет положительным.

В общем случае построение карты проводится поэтапно. Сначала отбирают несколько полиморфных маркеров, расположенных на одной хромосоме. Потом генотипируют образцы ДНК, полученные от нескольких CEPH-семей, по каждому полиморфному маркеру. Структуры CEPH-семей таковы, что нет необходимости в



Рис. 20.17. CEPH семья K1331

определении генотипов всех образцов ДНК. Привлечение других семей не дает помешания качества карты, которое традиционно бы потребовало работу. Обычно используются 15, иногда 40 семей. Для генотипирования 40 CEP1 семей до 70 полиморфных маркеров необходимо провести примерно 10 000 анализов. Генотип каждого индивида по каждому локусу платят в баунданы. На этом этапе происходит проверка базы данных на предмет ошибок. Компьютерная программа проводит поиск случаев несоответствия генотипов родителей и детей; эти ошибки возникают во время введения данных или генотипирования. Иногда для уточнения полученных результатов проводят повторное типирование. Ошибки могут принадлежать к неправильным вычислениям расстояния между локусами и расстояния между ними. Ошибочные данные по возможности исключаются из анализа. Для генотипирования CEP1-семей определяют все «автоматические» локусы и рекомбинационные участки (RI), а исходя из этих данных конкретная компьютерная программа строит генетическую карту (карту сцепления).

Карты сцепления хромосомы человека постоянно обновляются по мере идентификации дополнительных полиморфных локусов. С увеличением числа локусов повышается разрешение карты и уменьшается расстояние между локусами. К 1994 г были определены генотипы члена CEP1-семей примерно по 6000 полиморфным маркерам (с помощью мультилокусного картирования установлено положение примерно 1000 локусов по всему геному человека со средним расстоянием между локусами около 4 сМ. Задача первоочередных проектов картирования состоит в том, чтобы использовать дополнительные полиморфные маркеры, построить карту хромосомы с расстоянием между локусами 1–2 сМ.

Локализация гена заболевания на карте сцепления

Для решения этой задачи проводят генотипирование члена семей с определенным (известным) заболеванием по полиморфным маркерам, которые, по данным картирования, находятся на том же участке хромосомы, что и ген заболевания. Используя те же принципы, что и при вычислении двукратного лог-балла при анализе

сцепления. В данном случае фокус (ген) заболевания приходится размещать среди четырех упорядоченных локусов и вычисляют лог-балл для каждой позиции. В случае мультилокусного картирования лог-балл равен логарифму отношения 1) вероятности того, что ген заболевания занимает определенное положение на карте по четырем упорядоченным локусам, к 2) вероятности того, что ген заболевания не сцеплен ни с одним из рассмотренных полиморфных локусов. Используя вместо четырех полиморфных локусов обычно четыре полиморфных локуса обусловлено тем, что при больших числах сцепления сильно усложняются расчеты. Ген заболевания может располагаться во первом локусе, в разных областях между локусами или в последнем локусе. Рассчитав лог-балл для каждого положения гена, которое он может занимать в различных областях из четырех локусов, выбирают максимальное его значение, превышающее +3,00; оно дает наиболее вероятную локализацию данного гена.

Картирование с использованием радиационно-индуцированных гибридов

Для картирования с использованием радиационно-индуцированных гибридов (РГ-картирование) не нужно собирать рецессивные и генотипировать членов семьи CEP1 семей. В основе метода лежит работа с соматическими клетками с хромосомами (с использованием ПЦР-анализа) человека, содержащими чужие (фрагменты) хромосомы человека. РГ-картирование клеток хромосомы (или хром) то же обычно выполняется с помощью гибридной (человек/крыса) клеточной линии, содержащей одну хромосому человека. Клетки такой микромощности гибридной клеточной линии подвергают радиационно-индуцированному повреждению (реплетированию или гамма-лучем), в результате чего разрушаются клеточные мембраны, интродуцируются фрагменты, происходят фрагментация хромосом. Для анализа и измерения дозы интродуцируется излучение, использованной биологическим объектом, является рад (рад, от латинского radiatio — доза). Одна рад равна 0,01 Дж на 1 кг массы или 100 эрг на 1 г массы. Обычно клетки в культуре ре-экспондируют при 3000 рад. Чем больше доза, тем более крупные порции хромосомы интродуцируются. Чем больше размер интродуцируемых фрагментов

ДНК. При доле 10 000 раз фрагменты слишком малы для PF-картирования.

Одной из главных проблем при PF-картировании является выщелачивание и старение фрагментов ДНК человека, полученных после облучения. Чтобы решить эту задачу, применяют следующие облученные (донорские) клетки с необлученными (реципиентными) клетками трупами. Облученные клетки, сливаясь друг с другом или оставшиеся неподвижными, не способны расти в культуре вследствие радиационных повреждений. В свою очередь, реципиентные клетки, как сливаясь друг с другом, так и не сливаясь, имеют селективный маркер, который присутствует в донорских клетках и обеспечивает их рост в культуральной среде, используемой для анализа. Следовательно, в данной среде будут пролиферировать лишь слившиеся клетки донор-реципиент, образуя селективный маркер. При этом большинство фрагментов ДНК облученных клеток оказываются встроенными или транскрипированными на функциональные хромосомы реципиентных клеток. Выделенные слившиеся клетки культивируют вместе до тех пор, пока не установится отдельная клеточная линия — так называемые радиационные гибриды (РГ). Группу радиационных гибридов, полученных в результате одного эксперимента, называют панелью радиационных гибридов (РГ-панелью). В ней в виде фрагментов хромосомы содержится часть хромосомной ДНК человека, полученной из монохромосомной клеточной гибридной линии.

ДНК каждого члена РГ-панели амплифицируют с помощью нескольких хромосомспецифичных ПЦР-зондов, многие из которых «узко» полиморфны участки. Однако полиморфизм как таковой не требуется для PF-картирования. Цель такого картирования — выяснить, присутствует ли данный участок хромосомы в клеточной линии РГ-панели. Следовательно, для скрининга можно использовать и ПЦР-пробы, специфичные в отношении уникальных (однокопийных) последовательностей ДНК. Мономорфные ПЦР-идентифицируемые хромосомспецифичные участки называют ДНК-маркерующими сайтами (STS, от англ. short tandem repeats). Все клеточные линии РГ-панели проперяют на наличие (+) или отсутствие (–) такого сайта (табл. 22.5), используя весь набор зондов, и гибриды,

Таблица 22.5 Данные по селективно выщелоченной РГ-картированию¹⁾

РГ-линия	Наличие или отсутствие маркера						
	A	B	C	D	E	F	
1	+	+	+	+	+	+	
2	+	+	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	+	+	
5	+	+	+	+	+	+	
6	+	+	+	+	+	+	
7	+	+	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	+	+	

¹⁾ Фрагменты ДНК выщелачивают из гибридов РГ-картирования с помощью фермента EcoRI, который расщепляет ДНК в определенных сайтах. В результате образуются фрагменты ДНК, содержащие сайты EcoRI. Эти фрагменты ДНК выщелачивают из гибридов РГ-картирования с помощью фермента EcoRI.

ДНК которых не амплифицируется, образуются ввиду неэффективного PF-картирования необлученными панелями примерно из 100 РГ, полученных из смеси монохромосомной гибридной клеточной линии.

Теоретически одним РГ-и можно сделать картирование весьма сложной. Чем ближе друг к другу на хромосоме находятся два участка, тем выше вероятность того, что они окажутся в одном фрагменте ДНК после облучения. Точно так же, чем ближе друг к другу находятся сайты, тем с большей вероятностью они не разойдутся при мейотическом картировании в результате рекомбинации. Основные положения, на которых базируется PF-картирование, состоят в следующем: 1) индуцированный облучением разрыв между двумя сайтами не зависит от сближения маркера; 2) сохранение фрагмента с одним маркером не зависит от сохранения другого фрагмента в этой же клетке.

Полученные для всех клеточных линий РГ-панели паттерны (паттерны сохранения, конфигуры) наличия (+) или отсутствия (–) каждого маркера используют для построения РГ-карты. Под-видом исключения как линейные отклонения вероятности получения конкретной паттерны сохранения двух сайтов к вероятности того, что при облучении эти сайты вообще не разделены разрывом. В отличие от мейотической рекомбинации, в для частоты радиационных разрывов характерна асимметрия от 0 до 1; в Р

означает, что два маркерных сайта находятся на расстоянии при определенном поле облучения. Т.е. они тесно сцеплены. При $R = 1$ маркеры всегда разделяются при определенной дозе облучения, т.е. вообще не сцеплены. Если коэффициент сцепления или больше 1,00, можно с уверенностью говорить о сцеплении двух маркеров. Разработаны компьютерные программы, позволяющие упорядочивать сайты и определять расстояния между ними на R-карте.

Расстояние между сайтами на R-карте определяется так на величье как сайт-маркер (СР). Последний имеет форму непериодичности, противоположно-люди дозе облучения. Необходимо указать дозу, при которой была получена данная R-карта. Например, расстояние в 1 cP_{1000} означает, что при дозе 1000 рад между двумя маркерами произошло разрыв в 1% случаев.

Принимая связь между сайтами и числом пар нуклеотидов не существует. Можно лишь сказать, что чем выше поле в ратах, тем меньше физическое расстояние для конкретной величины в сайтах. Например, расстояние в 1 cP_{1000} , 1 cP_{10000} , 1 cP_{100000} и $1 \text{ cP}_{1000000}$ эквивалентны примерно 50, 5, 0,5 и 0,05 п. и соответственно. Методическое же (генетическое) картирование способно дифференцировать сайты, находящиеся на расстоянии друг от друга в лучшем случае 1 cM , т.е. 1000 п. и. R-карты не только имеют более высокое разрешение, но и являются более полными, чем генетические. Кроме того, R-картирование проще методическое и техническим плане, и новые сайты можно быстро включить в ранее построенную R-карту. К сожалению, R-картирование не позволяет локализовать зоны тех или иных заболеваний в специфических районах хромосомы. Несмотря на это при построении мультилокусных карт хромосом человека R-картирование, вероятно, является картирование по сцеплению, основанное на типировании членов С.Р.Н-семей.

Физическое картирование генома человека

Генетические и R-карты указывают на определенные расположения маркерных сайтов. Расстояния между сайтами измеряются в условиях сцепле-

ния, которые отражают частоту рекомбинации (СМ) или вероятность сохраниния двух сайтов в одном гаметическом наборе (СР). Эти единицы можно перевести в некотором приближении в единицы реальных физических расстояний в пары нуклеотидов, которые используются в физических картах. Физическая карта хромосомы или ее области дает непосредственное представление о расположении генов в ДНК, что облегчает их идентификацию и характеристику и систематическое картирование хромосомной ДНК.

Для построения физической карты необходимо прежде всего выделить из библиотеки секционированной ДНК клоны, содержащие интересующие сегменты. Несмотря на трудности о перекрывающихся участках и другой информации о положении клонов, можно реконструировать непрерывный ряд клонированных сегментов какого-то района хромосомы, если хромосомы или всего генома были получены упорядоченные наборы смешанных (специфично) клонов (копий) на основе YAC- (yeast artificial chromosome, искусственно хромосомы дрожжей), BAC- (bacterial artificial chromosome, искусственно хромосомы бактерий), PAC- (pacifirophage P1 artificial chromosome, искусственно хромосомы бактериофага P1) и космидных библиотек ДНК человека. Отметим, что стратегия построения копий из крупных фрагментов ДНК человека, содержащихся в YAC-, BAC или PAC-библиотеках, отличается от таковой для R- или сцепленных копий.

Построение копий из YAC-, BAC и PAC-библиотек

При построении физических карт тех или иных районов хромосом или целых хромосом из генетических библиотек, содержащих крупные вставки (YAC-, BAC-, или PAC-библиотеки), наиболее приемлем метод картирования, основанный на скрининговании STS. STS — это короткий однокопийный участок ДНК (примеры IN1, MDT и т.), который можно выявить при помощи ПЦР с использованием заданных шаблонов (примеров). Для получения приблизительного копий, чтобы избежать изчуже чужих участков хромосомы, требуется большое число STS, находящихся на расстоянии 50–100 п. и. друг от друга. Напри-

мер, для физического картирования хромосомы длиной примерно 200 миллионов пар нуклеотидов (м. п. н.) необходимы от 1500 до 2000 STS. Для построения же достаточно точной физической карты всего генома человека их нужно по меньшей мере 10 000.

Для создания STS были разработаны различные подходы. В основном эти ДНК изолированы из генов с помощью хромосомы человека, поликлональной или помпы протоплакты антимифометри, образующей рестриктазой и кюлируют в векторе, способном амплифицировать небольшие (< 1000 п. н.) фрагменты ДНК. Затем секвенируют вставки из клонов, выбранных случайным образом, и идентифицируют те клон, в которых вставка короче (100 п. н.), в те, которые содержат последовательности из повторяющихся элементов ДНК человека. Наличие векторов определены при помощи компьютерных программ, сравнивая нуклеотидную последовательность вставки с последовательностями всех известных повторов ДНК человека. Затем для каждого отобранных клонов находят нуклеотидные последовательности примыкания. Каждая STS тестируют на предмет уникальности амплифицируемого фрагмента хромосомной ДНК.

С помощью ПЦР-скрининга выявляют STS в индивидуальных клонных библиотеки с крупными вставками, а затем, обнаруживая их распределение STS в клоны, используют методами находят характерный набор перекрывающихся клонов и оптимальное размещение их относительно STS (рис. 20.18). С разработкой метода РГ картирование позволило вычислять без особого труда упорядочить STS, что облегчает идентификацию составляющих контигов (рис. 20.19). Выявив перекрывающиеся клоны, определяют степень их перекрытия, размер контига и обычно длину соответствующей им ДНК, с помощью стандартных картирования с использованием электрофоретической системы, разделяющей фрагменты ДНК длиной 105 п. н. (например, выделенный электрофорез). Уже получены контиги хромосомных районов, соответствующие от 1 до более чем 20 м. п. н., а в ряде случаев – и целые хромосомы. В конце концов будут получены контиги из крупных фрагментов ДНК, перекрывающиеся между собой.

Построение контигов из космидных, P1- и λ-библиотек

Более удобным для генетических исследований и высокомасштабного секвенирования часто оказываются контиги из небактериальных фрагментов ДНК, чем из крупных. Для построения контигов определенных районов хромосомы или целых хромосом нередко используют космидные библиотеки. Обычно перекрывающиеся килобитные клоны идентифицируют методом гелематричной дактилоскопии. Для того из каждого клоня экстрагируют ДНК и обрабатывают ее рестриктазой. Полученные фрагменты метят, разделяют при помощи электрофореза и анализируют радиографически металами. Каждый клон порождает специфический набор фрагментов (уникальный отпечаток от ДНК); перекрывающиеся клоны или несколько фрагментов совпадают.

Для конченого меченый ДНК-фрагментом (обычно от 100 пар нуклеотидов) после электрофорезной обработки контигов (3'-³²P-5'-супернатив и т. д.) можно использовать реакции замещения, как и при работе с ДНК-полимеразой T4. В том случае к препарату клонированной ДНК, обработанной рестриктазой, добавляют ДНК-полимеразу и один меченый дезоксирибонуклеотид (рис. 20.20). Под действием 3' клонированной вблизи ДНК-полимеразы происходит последовательное озонирование 3' концевых нуклеотидов. Процесс продолжается до тех пор, пока в противоположной цепи не экспонироваться нуклеотид, доми симметрично меченному дезоксирибонуклеотиду, добавленному в реакцию смесь. Далее в реакцию добавляют ДНК-полимеразу, и к 3' концу присоединяется свободный меченый нуклеотид. Поскольку другие нуклеотиды в противоположной цепи отсутствуют, дальнейшее реакция не происходит.

Для меченых идентифицируемых фрагментов существуют и другие способы. Усеченный 3' концевой фрагмент можно удлинить (растормозить) при помощи фрагмента Кленова используемого индугуирующей 5' концевой в качестве матрицы, дисстрибуирующей нуклеотидов за счет дублирования в реакционной смеси дезоксирибонуклеотидов, один из которых несет метку. Кроме того, в ти-

А

Клон	STS															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		+	+	+		+				+	+		+	+		
2	+	+			+					+			+	+	+	
3			+	+		+					+	+				
4	+				+		+		+							
5							+	+		+						

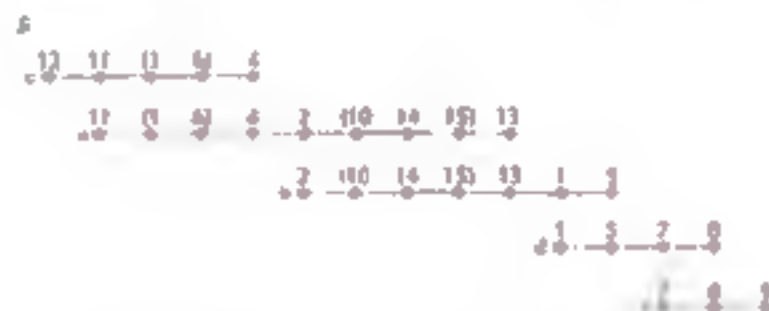


Рис. 20.18. STS-картирование. А STS с 1 по 15), обнаруженные с помощью HHP-селекцией в клонных В-с, обозначены знаком плюс (+). Буквами К и В указаны STS, размещенные на 1'- и 2'-концах вставки (та же левая и правая концы соответственно). Б. Идентифицированные перекрывающиеся участки, можно построить адитив из пяти клонов и карту расположения STS. Полученные данные не позволяют установить точные расстояния между маркерами (по мере в скобках). Интервалы между STS представлены символами, в соответствии с которыми неизвестны.

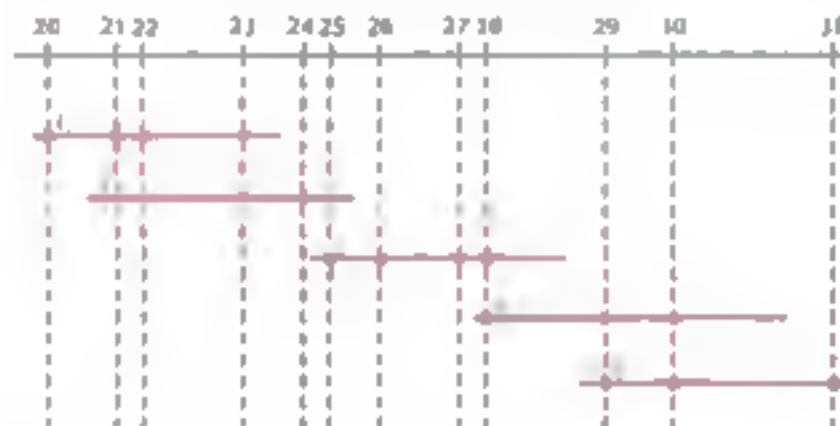


Рис. 20.19. Картирование с помощью упорядоченных STS (маркеры с 20 по 31 над горизонтальной линией). Точками указаны STS-состав клонов (1-5). STS упорядочены в том порядке, в котором была идентифицирована перекрывающаяся область.

структурным клоном рестрикционных фрагментов можно идентифицировать меченые олигонуклеотиды.

Для выявления перекрывающихся участков необходимо ориентировать, очень большое число космических клонов, поэтому для поиска меченых рестрикционных фрагментов, общих для пары клонов, используют специальные компьютерные программы ДНК-отпечаток сравни-

то к тому сканируя, информацию вводит в компьютер в продолжении парирования. По результатам этих сравнений ориентируют 141 клонный континг. Наличие перекрывающихся участков в области созданного континга подтверждается построением подробных рестрикционных карт вставок. Проблемы между контингами возникают, выбирая зоны из близлежащих клонов соседних



Рис. 20.20. Концевое метение шестивалентным ДНК с помощью ДНК-полимеразы E4.3. 3'-используемая активность ДНК-полимеразы связывает отщепляемые 3'-концевые фосфорильные фрагменты ДНК с 3' концами (а), с выступающими 3'-концами (б) или с выступающими 5'-концами (в). Стимуляция происходит от тех пер. фос. на противоположной стороне фосфорильного основания, конъюгированного с метильным ацетирибонитрилом, шестивалентной и релаксационной смесью (dCTP). Затем -фосфорильная полимеризационная активность ДНК-полимеразы E4.3 к 3'-концу присоединяется свободной метильной группой дитрибутилметила. Метильная группа в оба конца фрагментов ДНК (на рисунке это не показано). Для метения можно использовать любой из дитрибутилметила

контингов и провила сдвинуты вблизи генов, содержащих крупные вставки, для поиска неидентичных участков ДНК.

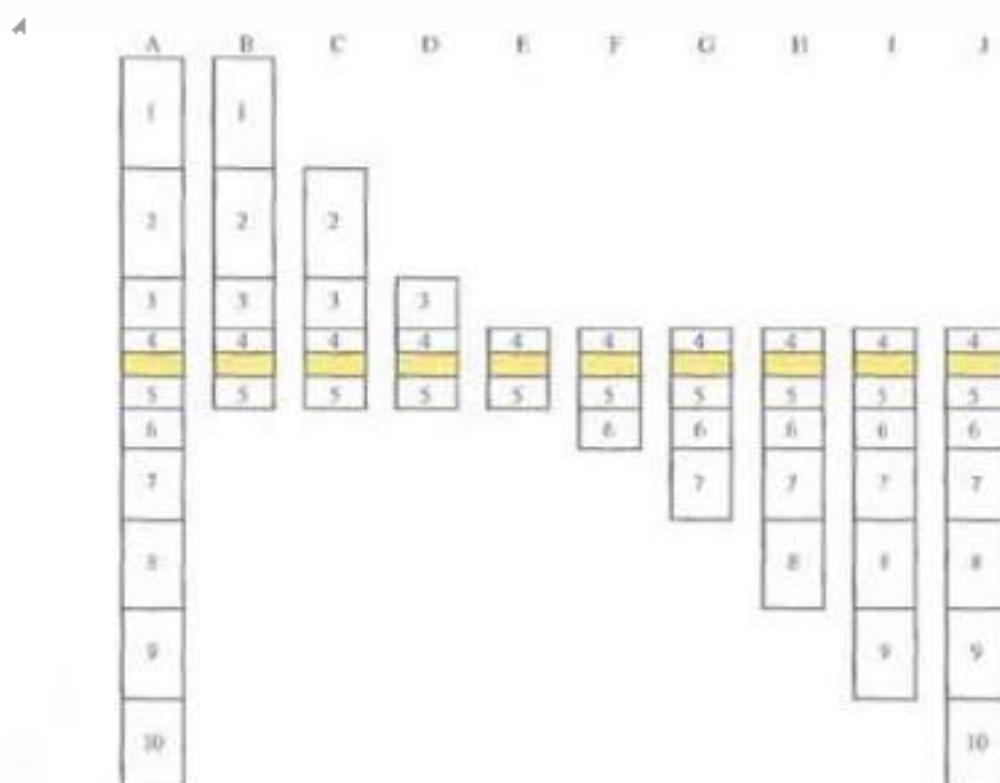
Транскрипционные альтернативы

Кланы cДНК-библиотеки представляют собой ДНК-копии тех транскриптов экспрессирующихся генов, которые присутствуют в конкретной ткани в момент экспрессии их мРНК. «Приемы» идентификации клонированных cДНК в хромосомном районе совпадает предположительно с выделением возможных альтернативных генов тех или иных организмов. Если выявлен генетический сдвиг, то можно проверить, не принадлежат ли типичные клонированные cДНК из генов этого заболевания.

Приемку cДНК-клеток и других типов нуклеотидных экспрессируемых последовательностей в специфическом хромосомном районе можно транскрипционным картированием. Для построения транскрипционных карт используются различные методы. Одним из этих ча-

стично определяют отдельные cДНК-клетки и в качестве транскрипционной части генов cДНК-клетки получают STS. Другим тип STS является экспрессируемый STS (eSTS). Для определения хромосомной локализации eSTS используют линии соматических гибридных клеток, которые содержат единственную хромосому человека (монотромосомные гибриды) или фрагменты конкретной хромосомы человека (делеционные панели). Для этого ДНК каждого из монотромосомных гибридов амплифицируют методом ПЦР с использованием eSTS-примеров и идентифицируют ту хромосому, которая содержит данный eSTS. Затем методом ПЦР-амплификации ДНК клеточных линий делеционных панелей идентифицируют район хромосомы, в котором находится данный eSTS (рис. 20.21). Кроме того, внутригеновые STS можно нанести на существующие Р-карты. К 1996 г. во всех аутосомных X хромосоме было картировано около 20 000 внутригеновых STS человека.

Помимо экспериментов по картированию cДНК-клеток в хромосомных районах, в институте исследования генов в Роквилле, Мэриленд (The Institute for Genome Research) и других



Маркер	Локусный анализ										Район	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
STS a	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3
STS b	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	8
STS c	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
STS d	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	7
STS e	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	10

Рис. 20.21. Примеры а) маркера и специфического хромосомного района с неперекрещиваемой делецией (или инверсией) в гибридных клетках. А) Связанность представителем фрагментов хромосомы, присутствующим в кариотипом гибрида (A) и в хромосоме донора (B) делеционной или инверсионной гибридной клетке. Районы (с 1 по 10) обозначены в гибридном кариотипе в соответствии с рисунком. Б) Результаты ПЦР-анализа ДНК гибридных клеток для зон (A) с использованием STS маркеров (с STS a по STS e). На месте или отсутствии ПЦР-продукта указаны маркеры или нет. Соответствие данных о наличии или отсутствии ПЦР-продукта хромосоме донора в гибридной клетке (с STS маркером) указывает на принадлежность хромосомного района, в котором находится STS. Например, STS d (на риске в районе 7), поскольку соответствующий ПЦР-продукт образуется при амплификации каждой хромосомной копии донорского фрагмента, в котором присутствует фрагмент.

лабораторных животных к реализации проекта по частичному секвенированию клонов λ -ДНК-библиотеки всех органов и тканей человека. Успехи в этом направлении являются сочетанием большого количества коротких последовательностей (150–300 нуклеотидов) для каждого экспрессируемого гена человека. Такие короткие кодирующие последовательности называют маркерными экспрессируемыми последовательностями (EST, от англ. expressed sequence tags). С их помощью можно изучить размеры, рибониреже и транскрипционную активность экспрессируемых генов человека. Более того, на основе EST можно создавать STS и использовать их для картирования и отбора ценных клонов, содержащих данный ген.

Частичное секвенирование λ -ДНК-клонов и обработка полученных данных позволяют анализировать. Каждую новую EST сравнивают с теми, которые уже были секвенированы, и если последовательность действительно является новой, ее вносят в базу данных по EST. Для анализа информации EST с известными геномичными характеристиками и для определения категории, в которой отключена функция представляемого ей гена, применяли компьютерные сравнения. К 1995 г. было идентифицировано примерно 300 000 EST из 300 λ -ДНК-библиотек 37 органов и тканей. Примерно 90 000 EST представляют собой рибонизирующиеся экспрессирующиеся последовательности человека, из них примерно 10 000 соответствуют генам, для которых в клетке известны, а остальные 80 000 — еще неоткрытым генам.

Клонирующие гены заблуждений человека

Как правило, ген однозначно ассоциирован с конкретным геном, руководствуясь как клинико-патологическими данными, так и экспериментальными протоколами. Выбор генов и их расположение исследователи делают в зависимости от конкретных условий. Начало поиска гена заблуждений определяется наличием информации о структуре генома. В других случаях геномный продукт бывает хорошо известен, а других можно лишь догадываться, что он собой представляет. Наконец, для многих из-

следственных заболеваний ирригию геномного продукта можно не знать. Для каждого из этих случаев разработаны свои стратегии. В целом для поиска генов заболеваний существует четыре подхода: функциональный, кандидатный, ассоциативный и позиционный-кандидатный. Картирование. Независимо от примененного подхода утверждать, что данный ген ассоциирован с интересующим исследователя заболеванием, можно лишь после того, как у больных обнаружены нуклеотидные изменения в гене, не встречающиеся в том же гене у здоровых или интактных.

Выявление мутаций в генах человека

Для выявления мутаций разработаны целый ряд простых и эффективных методов, таких как анализ конформационности полиморфных нуклеотидов ДНК (SSCP, single strand conformational polymorphism), анализ генов в электрофорезе и денатурирующих условиях (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis), гетеродуплексный анализ (HA, heteroduplex analysis), химическое расщепление некомплементарных сайтов (СЗК, chemical mismatch cleavage), тест на укороченный белок (PTT, protein truncation test).

Наиболее широко среди перечисленных методов применяется SSCP. Суть метода состоит в следующем. Как можно большее (по возможности все) число клонов исследуемого гена по определенности амплифицируют методом ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК болонки и клонные инициаторы. Каждая пара праймеров выбирается из последовательностей, фланкирующих экзон, или из его концевых участков. Кроме того, используя данные секвенирования, выбирают праймеры для амплификации 5'-области, предшествующей первому экзону гена, 3'-области, следующей за последним экзonom, и участок, содержащий тап-сплайсинг.

ПЦР продукты каждой реакцией денатурируют, быстро охлаждают и разделяют с помощью электрофореза. Гетеродуплексные молекулы сдвигаются к концу гелевой ленточки и образуют дуплекс с другой нуклеотидной последовательностью молекулы ДНК (образуют сдвигленную трехмерную конформацию, зависящую от ее нуклеотидной последовательности). Следовательно комплементарность для цепи одной молекулы ДНК имеет разную нуклеотидную после-

ген-экспрессию можно также провести с помощью панели микроматрицы. Альтернативой гибридам, в которых не выявлено гомологичной ДНК (или при наличии дДНК-клина или отобранных рекомбинантных клонов).

Затем для определения клонов, гибридоуподобившихся с данными дДНК-клинком, проводят скрининг амплификационного продукта, содержащего хромосомный район, в котором локализован ген-кандидат. Отобранные генотипные клоны секвенируют в соответствии с данными о нуклеотидной последовательности (или с дДНК, идентифицируют гомологичные нити и 5' → 3' флуоресцирующие последовательности гена. В отсутствие последовательности, соответствующей району нуклеотидной хромосомы, который содержит ген-кандидат, выделяют клон с критичной секвенцией, соответствующей данному району, при помощи дДНК- или геномного зонда. Из клонов с критичной секвенцией получают субклоны с различными вставками, и анализируют скрининг при помощи дДНК-клина. Полученные клоны секвенируют и характеризуют ген-кандидат (рис. 20.23).

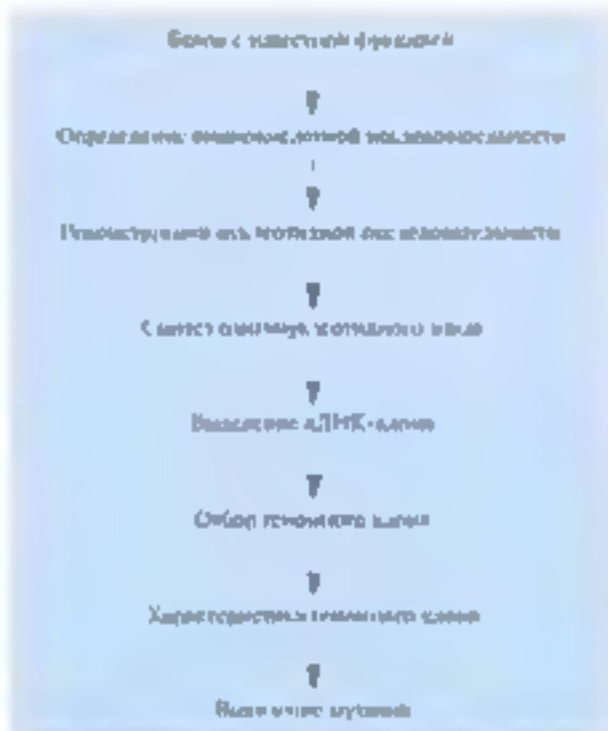


Рис. 20.23. Функциональный картирование. Идентификация гена для случая, когда известна эмбриональная экспрессивность гена и функция.

Анализ генов кандидата

Хотя эти гены не имеют эффекта при картировании генов человека, в ряде случаев они могут оказаться весьма полезными. Суть метода состоит в следующем. Анализируют симптомы соответствующего заболевания в нескольких семьях, а также проводят анализ генов кандидата. Затем просматривают нуклеотидные последовательности всех кандидатных генов на предметный момент генов и выбирают ген(ы)-кандидат(ы). Скрининг на нуклеотидном уровне температуры ген-кандидата, выявляют наличие мутаций и с его помощью пытаются установить, является ли ген-кандидат истинным геном (рис. 20.24). Принцип во внимание, что геном человека содержит очень большое число генов, и охарактеризованы лишь некоторые из них. Не стоит упускать из виду тот факт, что (практически любой) ген встречается не так уж часто. Но все же и отрицательный результат, поскольку он позволяет исключить данный ген из числа ответственных за конкретное генетическое заболевание.

Позиционное картирование

Стратегия позиционного картирования применяется в тех случаях, когда ничего не известно о продукте гена, ответственном за наследственное



Рис. 20.24. Картирование кандидата. Процедура выявления гена, ответственного за наследственное заболевание при условии отсутствия информации об экспрессивности и функции гена кандидата. Анализ симптомов и сбор генов, если из уже сгенерированных генов может предположительно быть выявлен ген.

нос приближения, и нет никаких генно-кодирующих (рис. 20.25). В некоторых случаях определяют хромосомную локализацию (позицию) гена приближения в пределах его локуса, применяя различные инструменты и средства («охота за геном»). Главной задачей для позиционного картирования является ситуация, когда у исследуемых больных встречается хромосомная перестройка типа (рекомбинация или крупной делеция) (>10⁷ п. н.) Предположив, что гена затрагивает ген, ответственный за патологический фенотип, при анализе сцепления используют только один специфический район хромосомы вместо того, чтобы проанализировать все гены при помощи большого числа полиморфных маркеров. После локализации гена в конкретном районе хромосомы переключают его положение более точно и идентифицируют близлежащие фланкирующие маркеры, используя мультилокусное картирование с дополнительными полиморфными маркера-

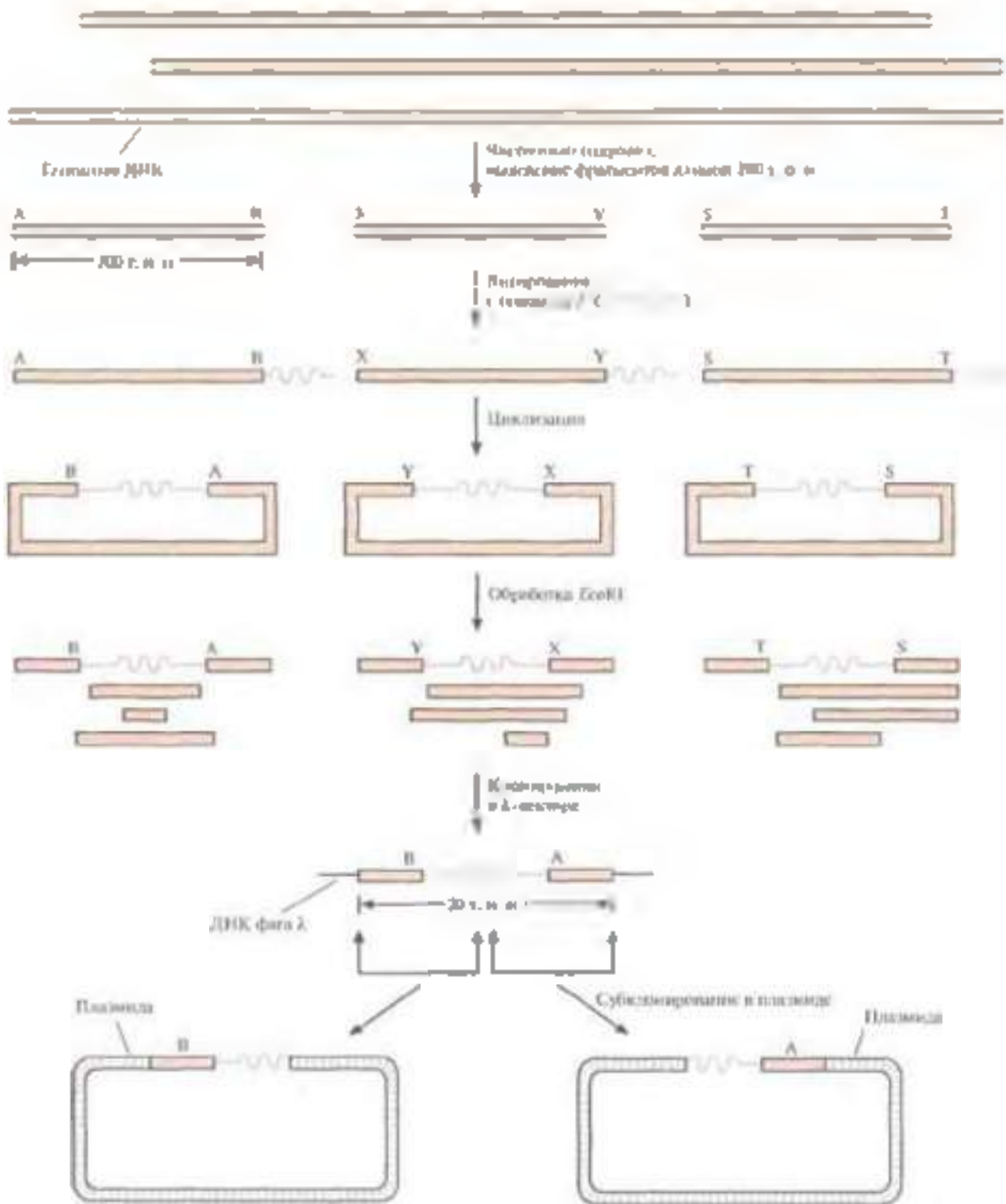


Рис. 20.25. Позиционное картирование. Идентификация гена, продукт которого неизвестен, с помощью хромосомного картирования и зондов, специфичных к полиморфным генам близлежащих маркеров.

ми. Минимальное расстояние между картированными маркерными сайтами, при котором можно определить, в каком случае составляет 1 cM (что соответствует примерно 10⁶ п. н.). На такой участок может уместиться в среднем от 20 до 50 генов. Задача позиционного картирования состоит в том, чтобы определить, какой именно из них ответственен за данное заболевание.

Из анализа, охватывающего район хромосомы, содержащий ген приближения, выбирают генетические клоны, которые включают фланкирующие маркеры и заключенный между ними участок ДНК. Если такой клон отсутствует, то с помощью зондов, специфичных в отношении к определенным маркерам сайтов, проводят скрининг библиотек генетичных ДНК для выявления клонов, происходящих из того района, который содержит искомого гена. Между 1986 и 1991 гг., когда метод «хиты в генами» применялся только рандомизация, для идентификации генов «спонсоры клонов» использовали метод «призлов из хромосомы» (рис. 20.26) или метод «прогулки по хромосоме» (рис. 20.27). После создания генетичных библиотек, содержащих крупные фрагменты ДНК человека, и копирование этой стратегии утратили свою доступность.

Независимо от того, как именно получить нужные генетичные клоны, важно иметь, как минимум (рис. 20.26). Создают библиотеку «хитов» «призлов из хромосомы». Проводят частичный гравитационный ДНК рестриктазой, делится небольшим числом разрывов, в результате формируются клоны примерно 200 п. н. Сопоставляют клоны длиной 7 п. н. и меньше с олигонуклеотидами длиной 4 и 6, X и Y, S и T (четыре пары сайтов, исходя изсорниются друг от друга на расстоянии 200 п. н., но после интродукции фрагментов разлетаются 7 п. н. Клонированные молекулы, содержащие множество сайтов для EcoRI обрабатывают этой рестриктазой, в результате чего-сформируются фрагменты, содержащие 100 пар п. н. фланкирующие эти последовательности (A и B, X и Y, S и T). Из всех фрагментов отбирают только те, длина которых составляет примерно 200 п. н. и рестриктазой их вестрируют основе фланкирующих (используя генетичную библиотеку амплифицируются в SupI) «хиты» «призлов». Идентифицируют клоны, гибридуемые с олигонуклеотидами, специфичными в отношении к олигонуклеотидной доминантности (A, X, Y), затем субклонировать его, при этом та его часть, кодирующая гибридуется с олигонуклеотидом участка ДНК (B, Y, T), кодирующей на расстоянии 200 п. н. и (используя последовательности



Темные клоны или субклоны можно идентифицировать по Сьюэрти с рестрицированными геномной ДНК различных позвоночных, например с ДНК мыши, крысы, кролика, обезьяны, коровы, человека, рыбы (зобоват, жемчужной бычкинг, бычкинг «Босп лавчел»). Положительная перекрестная гибридизация означает, что данный клон с высокой вероятностью содержит кодирующие последовательности, поскольку многие клоны в то же время не идентифицируются, в то время как повторяющиеся и некодирующие последовательности ДНК, в том числе и интроны, эффективно существуют и являются. Положительный зобоват означает, что клон содержит жемчуг, однако не показывает, есть ли в нем же и исключено зафиксировано.

Выбор клонов позволяет быстро и с высокой эффективностью идентифицировать конкретный клон, содержащий жемчуг, и одновременно идентифицировать соответствующую кДНК. Выбор можно проводить разными способами (включая ДНК геномного клонирования из той области хромосомы, которая содержит ген заболевания, фиксируют на твердой подложке, проводят прегибридизацию с повторяющимися последовательностями ДНК, а затем гибридизуют с линейными векторными молекулами со вставками из кДНК-библиотеки, транскрибируя из тканей, вероятнее всего экспрессирующей ген-кандидат. Негибридуемые векторные молекулы смывают с фильтра, и гибридизованные молекулы идентифицируют методом ПЦР, используя два праймера из векторных последовательностей, фиксирующих кДНК-вставку (рис. 20.28). Если точно неизвестно, в какой ткани экспрессируется ген-кандидат, то кДНК библиотеки разных тканей оптимизируют и проводят гибридизацию с отдельными тканевыми клонами. ПЦР продукт можно затем клонировать и тестировать, с тем чтобы проверить, содержит ли он кодирующую часть гена данной зафиксированной. Для этого можно секвенировать кДНК и провести компьютерное сравнение нуклеотидной последовательности этой ДНК с известными генами. Если будет получена высокая степень совпадения, можно сделать определенные выводы о том, какой тип белка кодирует данный кДНК, и если этот белок известен, что его с высокой вероятностью можно считать кандидатом на

то или иное, то данный(ие) клон(ы) секвенируют и идентифицируют жемчуг, интроны и 5'-, 3'-фланкирующие области. Альтернативный подход состоит в поиске мутаций с целью выявления нуклеотидных различий между ДНК

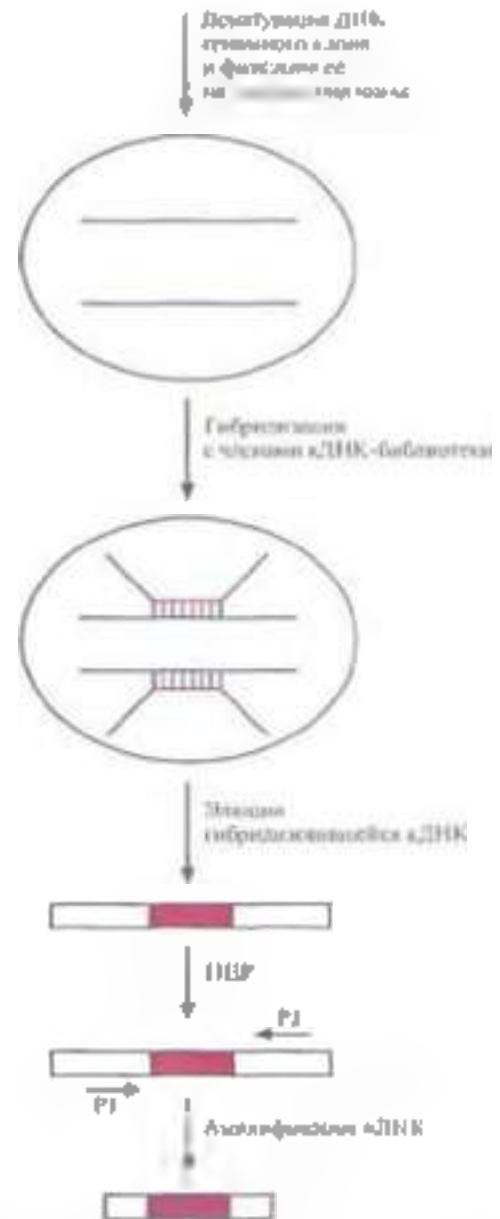


Рис. 20.28. Выбор клонов (гибридизация клонов) и идентификация кДНК (с помощью ПЦР) из кДНК-библиотеки. Клон, содержащий жемчуг, идентифицируют и тестируют.

большим и широким диапазоном. Если подложка, усиленный на определенном участке гомологичный фрагмент ДНК плазмиды-вектора, оказывается отсутствующим, то селективирует и выключает другие гены и гданной области. Реакция при покупке гена-инженерия для забора информации и сфера характеризуется в первую приближении сферу экспоненциально, пока не выйдет наиболее

экспоненциальный ген-кандидат, который исследуют детально, в том числе с помощью мутационного анализа.

Удлинение экзона (+концы) экзона, экзонами функционировать по методу, позволяющему активировать и ингибировать экзона, находящиеся в субъонии, полученных из возможных экзона (рис. 20 29). Его суть состоит в

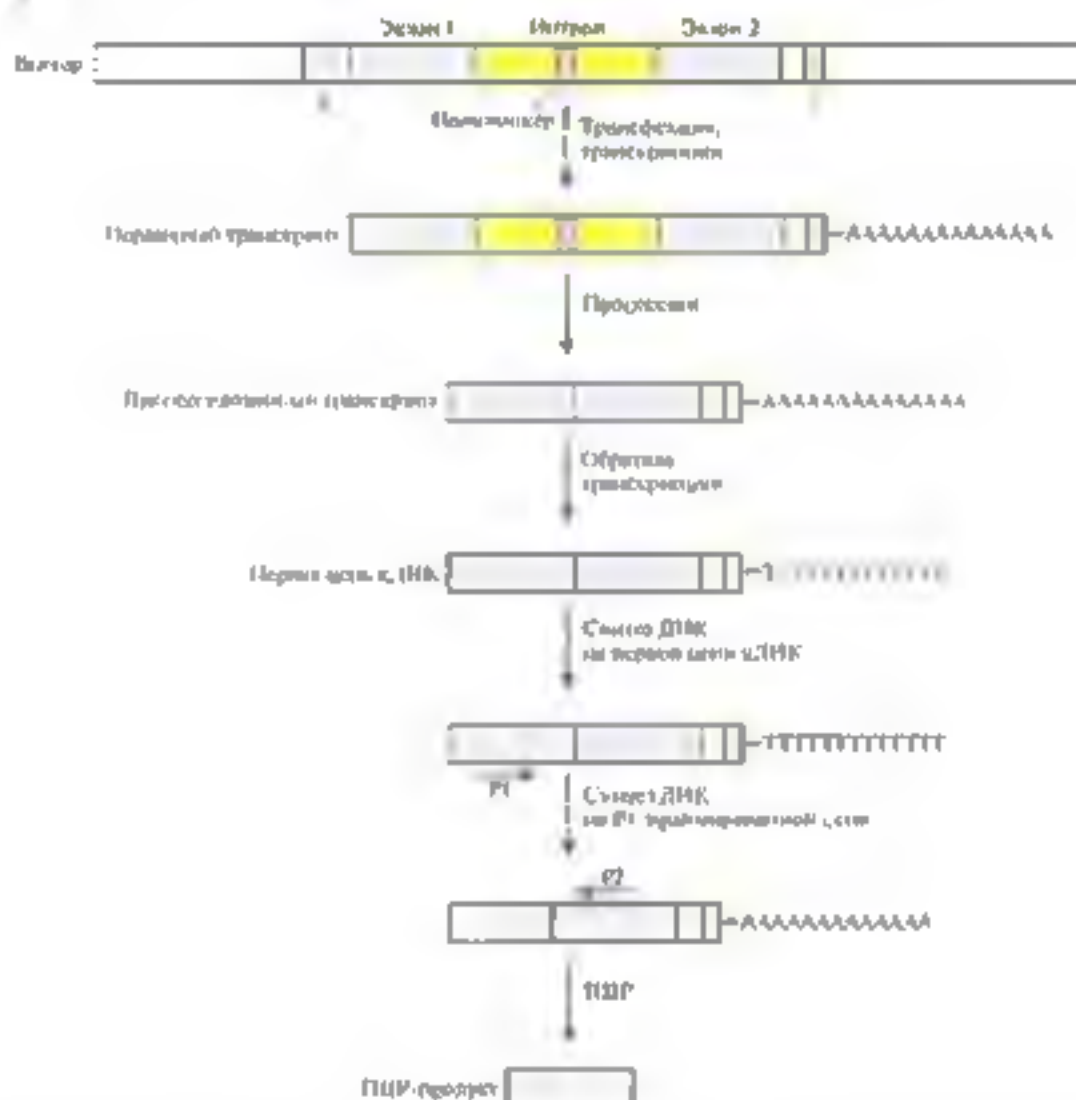


Рис. 20 29 Удлинение экзона. А Вектор для удлинения экзона содержит функциональный ген, состоящий из фрагмента р-ДНК с экзонами, разделенных интроном, который несет полициклонер, и сайт терминирующей транскрипции. После введения вектора в эукариотическую клетку исходный ген транскрибируется и на первом этапе транскрипции удаляется инtron. Для получения ПЦР-продукта определенная ДНК, которая содержит экзон и часть интрона, используется ПЦР-двойными концами обратной транскрипции.

следующим ДНК геномного клонирования расщепляют так, чтобы получить фрагменты длиной 1–6 к.п., и клонируют эти фрагменты в специально сконструированном векторе. Сайт множественного клонирования (polylinker) вектора расщепляют внутри матрично, фланкированного двумя жонгами (жонги 1 и жонги 2) (рис. 29.1). Этот искусствен-

ный ген (жонги 1 и матрично жонги 2) находится под контролем сильного эукариотического промотора и может экспрессироваться в *E. coli* или в культуре клеток млекопитающих. После введения (трансфекции) вектора в клетку эукариотической клетки происходит транскрипция искусственного гена и удаление матрично из век-

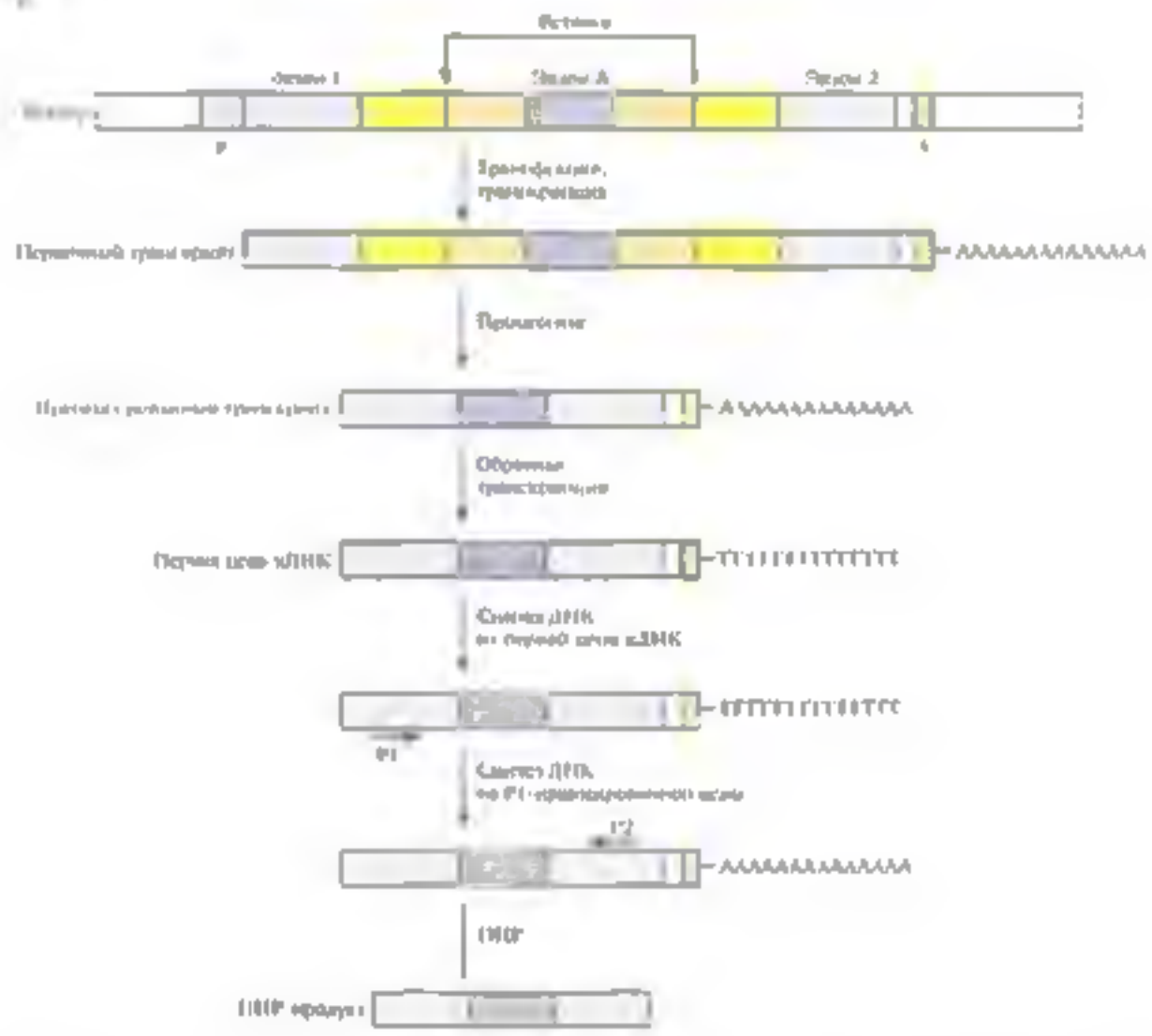


Рис. 29.1. (Продолжение) В данном примере вектор для клонирования в эукариотический организм фрагмент ДНК содержит, а его экспрессия осуществляется в эукариотической клетке (трансфекция). В принципе случай жонги содержит функциональные сайты для рестриктаз и сайты для связывания. При промышленном производстве транскрипция осуществляется на матрице, фланкирующей жонги А, и она осуществляется вектору жонгами 1 и 2. Для получения обратной транскрипции гена жонги А, фланкирующей жонгами 1 и 2 (и следовательно, содержащий сайт для связывания).

интимо трансципта. Процессированную РНК (экзон 1–экзон 2) можно выделить, проведя ПЦР-амплификацию обратного транскрипта. Сначала с помощью обратной транскриптазы на мРНК синтезируют ДНК (синтез первой цепи). Вторую цепь синтезируют при участии праймера, комплементарного части экзона 1 первой цепи. Затем в реакционную смесь добавляют второй праймер, комплементарный части экзона 2 второй цепи ДНК, и проводят ПЦР-амплификацию. Для ПЦР-продукта осуществляют с помощью тель-электрофореза.

Если в сектор встроены рестрикционные фрагменты, содержащий экзон А и фланкирующие его интроны, то после трансфекции процессированным транскриптом будет содержать три экзона: экзон 1–экзон А–экзон 2. Длина ПЦР-продукта будет больше, чем в тех случаях, когда в секторе нет вставок, когда вставка содержит экзон без функциональных сайтов сплайсинга (донорный и акцепторный) или когда вставка вообще не содержит экзона. Если во вставку присутствует более одного экзона, каждый из которых имеет функциональные сайты сплайсинга, то процессированный транскрипт будет содержать все эти экзоны.

В том случае, если в каждом праймере содержатся рестрикционные сайты, клонируют ПЦР-продукт, несущий «попынный» экзон, и производят последний в качестве зонда для скрининга cДНК-библиотеки. Зная нуклеотидную последовательность «попынного» экзона, предпринимают поиск гомологичных ему последовательностей в базе данных. Если есть основания полагать, что «попынный» экзон с большой вероятностью является частью гена данного заболевания, то характеризуют и секвенируют геномные клонны, охватывающие место расположения длинного гена, и исследуют образцы ДНК больных и здоровых индивидов с целью выявления мутаций. Поскольку мутации, ответственные за патологию, не всегда выявляют равномерно распределены по всем экзонам, чем больше размер сканируемой кодирующей области претипируемого гена, тем больше вероятность обнаружения мутации.

Для идентификации экзона используют различные компьютерные программы, например GRAB (Gene Recognition and Analysis

Internet Site). Они являются полезными инструментами характерными для экзона особенностей. Стоит отметить охватываемая нуклеотидная последовательность кодирующей области. Если лаборатория охватывает обширные для идентификации экзона секвенирования, можно секвенировать те же самые клонны, охватывающие область идентифицированного гена, и провести компьютерную обработку полученных данных с целью выявления ошибок. Нуклеотидную последовательность претипируемого экзона можно использовать в качестве гомологичных ей последовательностей в базе данных cДНК идентифицировать на ее основе однонуклеотидный зонд для скрининга cДНК библиотек. Наконец, как и в случае других методов идентификации экзона в геномных клоннах, необходимо доказать, что претипируемый экзон является частью гена-кандидата.

Реакции любого проекта по позиционному картированию гена занимают много времени (в период с 1980 по 1995) с помощью геномного подхода удалось идентифицировать более 50 генов, связанных с болезнью Хантингтона, что можно считать большим достижением. Иногда поиск гена занимает 1–2 года, в то же время для обнаружения гена через Гептингтона консорциум из нескольких исследовательских лабораторий потребовало 10 лет. Отметим, что с клонированием все новизна и новизны в построении транскрипционных карт с высокой разрешением позиционное картирование постепенно уступает место позиционно-кандидатному.

Позиционно-кандидатное картирование

Позиционно-кандидатное картирование состоит в безректенной идентификации локализации гена болезни, продукт которого неизвестен, и последующем анализе связанных генетических и транскрипционных карт, с тем чтобы выявить кодирующие последовательности (гены, интронные EST), находящиеся в этом же регионе (рис. 10.10). Весьма вероятно, что одна из этих последовательностей и окажется геном данного заболевания. Если какой-либо из генов кандидатом характеризуется, можно провести его мутационный анализ. Как альтернативу можно использовать «интронные» EST в качестве зондов, отобрать с их помощью геномные клонны и секвенировать его, а затем так же провести му-

нечаянность размеров генома (до 0,7 сМ (4000 сМ/ST26 допусов), что больше ожидаемой в 1995 г. плотности карты 2-3 сМ в 1996 г. было выявлено при построении физической карты основанной на STS с разрешением 100 г. п. н., то есть один STS-сайт должен был приходиться на каждые 100 г. п. н. ДНК человека Однако уже в 1995 г. была построена полная физическая карта с разрешением 200 г. п. н.

Успехи в оптимизации технологий секвенирования ДНК вполне очевидны, но не стали эффективными. Снизилась себестоимость одного осциллион (снизилась с 5 долл (ША в 1990 г. до 0,3 долл в 1996 г. Скорость секвенирования выросла с 10 000 осцилляций в день в 1990 г. до 50 000 в 1996 г. К 1998 г. предполагается секвенировать 80 м п. н., или 2,5%, генома человека. Если не произойдет никаких кардинальных изменений, то при помощи «фабрик» из 30 автоматических секваторов, работающих круглосуточно, и полного набора физических карт клонированных клавов можно будет секвенировать примерно 100 м п. н. ДНК в в лет, потратив на это ~900 млн долл США. Каким-то образом и средствами придется потратить еще на проверку ошибок и полноты окончательной последовательности. Однако, прежде чем приступить к реализации столь крупномасштабного проекта, ученые пытаются добиться значительного повышения скорости секвенирования при помощи автоматических флуоресцентных секваторов, в которых используется метод Сэнгера. Кроме того, предполагается ввести другие способы быстрого секвенирования ДНК.

Чтобы регулировать работу над различными аспектами всей программы, НСР распределяет финансы между разными исследовательскими группами. В большинстве случаев ответственность за создание генетических и физических карт конкретной хромосомы лежит между собой крупными центрами и небольшими лабораториями, которые сотрудничают друг с другом. Некоторые из наиболее крупных исследовательских институтов занимаются законспектированием данных о генетических и физических картах генома. В результате молекулярно-генетически исследуемый геном человека пишется огромные количества новых данных о полиморфных локусах, STS-клинах, содержании генетических, физиче-

ских и обезличенных карт, рестрикционных ферментов, генетической вариационности и нуклеотидных последовательностях ДНК. Эти данные необходимо собирать, упорядочивать, хранить, обновлять, сравнивать, объединять и предоставлять другим исследователям как в интернете, так и в оффлайновом виде. Эффективное использование этой информации было бы невозможно без компьютерного обеспечения, включающего в себя базы данных, системы управления базами данных, алгоритмы математического моделирования и программы автоматизации экспериментов. Область знаний, которая занимается созданием численных методов обработки информации, называется информатикой. Информатика имеет дело с компьютерным анализом и управлением биологической информацией.

В рамках программы НСР, касающейся использования компьютерных технологий, достигнуты значительные успехи в создании компьютерных программ, позволяющих принимать непосредственно сырые данные по геному человека. Сталины выстроены сайты, где существуют и осуществляется доступ к информации о содержании различных хромосомных карт, включая их интерграфические изображения и методы исследования генома в программном обеспечении. Интернет, WWW-сайт Государственного центра по изучению генома человека в США (<http://www.nih.gov/genemap.html>) содержит информативную программу «Геном человека» и множество ссылок на другие центры, занимающиеся этой проблемой.

С самого начала своего существования НСР лояльно будет решать этические, правовые и социальные проблемы, связанные с картированием генома человека, выработкой стратегии, тактики и разрабатывать соответствующие информационные технологии человека. На самом деле НСР не ставит каких-либо принципиальных норм этически, привержен или социальным вопросам, которые не возникали бы при проведении медико-генетических исследований в целом. Однако реализация НСР неизбежно приведет к идентификации большого числа людей различных заболеваний и к огромным последовательностям многих, и этих, и этих

информации будет использоваться при работе с ДНК-аналитическими тестами.

Здесь возникает множество вопросов для беспрепятства. Не будет ли генетическая информация использоваться для дискриминации людей при медицинском страховании, приеме на работу или иммиграции? Не приведет ли ее доступность к социальному неравенству? Не лишит ли люди работы, чтобы сохранить конфиденциальность персональной генетической информации? Как найти баланс между нуждами личности и общества? Обладают ли частные лаборатории правом и правом, работающие в клиниках, доступными знаниями по черепичной генетике, чтобы они могли определить наличие смысла конкретного генетического теста? Смысл ли генетическое консультирование уменьшает беспрепятственность, обратившись? Не является ли ограничением доступность генетической информации на семейных отношениях? Можно ли надеяться на то, что удастся получить согласие на проведение плегиотического теста у достаточно опасного пациента? Следует ли предлагать тестирование в том случае, когда данное последствиеное заболевание неизлечимо? Как повысить обратимость уровня населения, чтобы оно понимало значение генетической информации? Не эти и многие другие вопросы, возникающие при изучении генетики человека, нет однозначных ответов. В США в рамках подпрограммы по изучению личности, правительством и социальными институтами генетических исследований организована целая ряд мероприятий: разработаны обучающие программы, проводятся семинары и выставки для студентов, учителей, врачей, общественности, адвокатов и судей, исследована возможность генетического тестирования в различных и исследовательских формах ряда различных областей, включая и выставочные, созданы две комиссии (по генетической информации и страхованию, по генетическому тестированию) для исследования изучения конкретных вопросов, разрабатываются предложения для выработки федеральных законов США, которые обеспечат бы конфиденциальность генетической информации, изучаемой при идентификации личности.

На основе этих программ и других исследований были сформулированы пять основных

принципов, которыми следует руководствоваться при использовании генетической информации и в ряде генетических консультаций право на автономию, конфиденциальность, справедливость, беспристрастность и качество. Концепция право на автономию в данном случае означает необходимость соблюдения права человека, обратившись в генетическую консультацию. Например, генетическое тестирование должно проводиться добровольно и только после того, как человек в достаточной степени информирован, тестирование должно проводиться этично, относясь к группе риска, тестирование должно сами решать, будут ли они взаимодействовать с результатами теста. Консультируемые должны быть хорошо осведомлены и всецело ответственны за принятие генетической информации, медицинскими объектами, работе термин, если они нежелательны.

Обычно считается, что генетическая информация отличается от других видов личной информации, поэтому необходимо предусмотреть особые меры предосторожности, гарантирующие ее конфиденциальность. Справедливость и беспристрастность это означает больше повлиять. Несмотря на сложность, что генетическое консультирование должно быть доступно всем, кто в нем нуждается. Как в случае социальных и индивидуальных программ, необходимо защитить право уважения индивидуальных пациентов и детей. Что касается качества, то тестирование должно проводиться высококвалифицированными специалистами, используя при этом наилучшие методы и средства: все шаги должны соответствующим образом контролироваться, чтобы гарантировать приемлемость и надежность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучая родословные семьи, представляемые несколькими поколениями, члены которых имеют часто выходящую патологию, можно определить или предположить много генетических заболеваний. Эти данные наследования в семье, можно установить, является ли данное генетическое заболевание аутозомно-доминантным, аутозомно рецессивным, X сцеп-

ментным доминантным или X-сцепленным ре-
цессивным. В случае X-сцепленного домини-
рующего гена расположенного на X-хромосоме, для вы-
явления болезни хромосомная локализация
гена неизвестна. Чтобы картировать ген в сцеп-
ленным образом различные хромосомы, можно иденти-
фицировать сцепленные с ним маркерные сайты,
используя для этого метод ПДРФ и
STRP картирование. Для выявления сцепления меж-
ду маркерным сайтом и геном заболевания ис-
пользуют метод максимального сцепления.
Порядок расположения ПДРФ- и STRP-сайтов
на хромосоме определяют при помощи анализа
наследования гаплотипов в группе семей, пред-
ставляющих тремя поколениями и имеющая
большое количество детей (STRP семей). Кро-
ме того, порядок расположения на хромосоме
указанным сайтам, идентифицируемым при
помощи ППР (STS), можно проверить, вы-
явившим с использованием различных ги-
бридов. Физические карты хромосом (контини-
ум) строят на основе геномных библиотек, содер-
жащих крупные (LAC, BAC и PAC) и неболь-
шие (cosmid, P1 и λ) фрагменты ДНК челове-
ка, используя STS-картирование или прай-
мер-зонды, в том числе геномную дублировку
Трехкритериальные карты состоят из уча-
стков ДНК и маркерных экспрессируемых по-
слеовательностей (EST), расположенных
шаром хромосомы. Построение генетических,
физических и транскрипционных карт облегче-
ет идентификацию и характеристику генов за-
болевания.

Аутентичность обнаруженного гена человека
можно считать доказанной, если у больных инди-
видов и нем обнаружены (или отсутствуют)
в генах здоровых лиц. Для выявления мутаций
часто используют анализ конформационной по-
лимеризации олигонуклеотидов ДНК (SSCP).

Для идентификации генов человека
используют четыре метода. В первом из них,
функциональным картированием, на основе дан-
ных о геномном продукте синтезируют зонды для
скрининга cДНК-библиотеки. Положительным
cДНК-клон, содержащий кодирующую область
гена-кандидата, используют для отбора геномных
клинков с характеристиками гена в целом. Второй
метод, клонирование картирование, основан
есть на выборе генов, которые по имеющимся

данными могут отвечать за данное генетическое
заболевание. В этом случае проводят поиск му-
тантных генов-кандидатов у больных и здоровых
индивидов и по результатам поиска делают вы-
вод, какой из них является геном заболевания.
Третий подход, позиционный картирование,
применяют в тех случаях, когда ничего не из-
вестно ни о возможном гене заболевания, ни о
его продукте. Этот метод весьма трудоемок и
имеет множество модификаций. Сначала, ис-
пользуя ПДРФ или STRP-зонды и данные о
семьях с наследуемым наследственным заболева-
нием, определяют регион хромосомы, в котором
локализован искомым ген. Затем с помощью зон-
дов, специфичных в отношении тесно сцеплен-
ных с этим маркером, выявляют клоны, содержа-
ющие регион локализации гена заболевания.
Препарат геномных клонов или полученных из
них субклонов интродуцируют в клетки животных. Использо-
вая данные о функциональных последовательностях
различных клонов, в той или иной степени со-
ответствующих функциональной последовательности
гена заболевания, разработывают стратегии по-
иска мутаций. Четвертый подход, позициониро-
ванное картирование, состоит в картиро-
вании генов заболевания и определением района
хромосомы, просмотре функциональных генов
и маркерных экспрессируемых последователь-
ностей, локализованных в том же хромосомном
районе, и выборе тех из них, которые могут яв-
ляться искомым геном. Чтобы определить, ка-
кой именно из генов-кандидатов является иско-
мым за данным геном, используют мутационный
анализ.

«Геном человека» – это широкомасштабная
исследовательская программа, конечной целью
которой является полное секвенирование гено-
ма человека. Различные ее направления включают
построение генетических и физических карт
всех хромосом человека с высоким разрешением;
секвенирование геномной различных модель-
ных организмов типа *E. coli*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*,
M. musculus и *A. thaliana*, создание
квынотерных технологий для обработки и вы-
явления данных по генетическому и физическому
картированию и секвенированию ДНК; инфор-
мирование общественности по всем проблемам,
связанным с получением и использованием
данных по геному человека, включая этиче-

сказ, применены в экспериментальных исследованиях человеческих немеланоцитов. На этом пути уже достигнута впечатляющая скорость, и есть основания полагать, что геном человека будет полностью секвенирован к 2005 г.

ЛИТЕРАТУРА

- Huane-Chantelot C., B. Lacroix, P. Ougen, A. Billault, S. Heaouff, S. Bertrand, I. Georges, F. Gilbert, I. Gros, G. Lacroix, J. Naudin, J. Colant, P. Gessoulin, S. Pouch, G. Vayssels, J. In Kim, F. Ried, D. Ward, I. Chumakov, H. Le Paslier, E. Barillot, H. Cohen. 1992. Mapping the whole human genome by fingerprinting yeast artificial chromosomes. *Cell* 70: 1059-1068.
- Botstein D., R. L. White, M. Skolnick, R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Chumakov I. M., P. Rigault, I. Le Gall, C. Bellare-Chantelot, A. Billault, S. Gollow, P. Noularue, G. Guasconi, E. Poullier, I. Gros, M. Belova, J. Sambucy, P. Gerety, P. Gilbert, S. Heaouff, H. Bol, C. Massart, M. De Tard, F. Dukasz, S. Lecoulant, P. Ougen, V. Perrot, M. Saunier, C. Sorastin, R. Behoumyba, A. Cohen-Akenzie, F. Barillot, S. Bertrand, J. Colant, D. Caterlin, I. Georges, B. Lacroix, G. Lacroix, M. Sabbatou, C. Schmit, M. Sargouard, E. Tabacher, C. Dib, S. Faure, C. Fizames, G. Gyapay, P. Millasseau, S. Nguyen, D. Musclet, A. Vignal, J. Morissette, J. Meuninger, J. Ueman, T. Desay, A. Banks, P. Bray-Ward, D. Ward, T. Hulson, S. Gerety, S. Faure, L. Steh, D. C. Page, E. S. Lander, J. Weissbach, H. Le Paslier, H. Cohen. 1995. A YAC contig map of the human genome. *Nature (London)* 377(Suppl): 175-207.
- Collins F. S. 1995. Positional cloning moves from petri-dish to traditional. *Nat. Genet.* 9: 347-350.
- Collins F., H. Galac. 1993. A new five year plan for the U.S. Human Genome Project. *Science* 262: 41-46.
- Cooperative Human Linkage Center (CHLC): J. C. Murray, K. H. Buetow, J. L. Weber, S. Lathrop, T. Scherphiler-Fiedman, P. Mankin, J. Gullen, V. C. Sheffield, S. Anden, G. M. Dark, Genethon; J. Weissbach, G. Gyapay, C. Dib, J. Morissette, G. M. Lathrop, A. Vignal; University of Utah; R. White, N. Matsumoto, S. Gerken, R. Adels, H. Albertsen, R. Partke, S. Oelberg; Yale University; D. Ward; Centre d'Etude de Polymorphisme Humain (CEPH): J. Dausset, H. Cohen, H. Cunn. 1994. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. *Science* 265: 2049-2054.
- Cox D. R., M. Burnmeister, E. R. Price, S. Kim, R. M. Myers. 1990. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* 250: 245-250.
- Fleket J. W. 1996. Finding genes by computer: the state of the art. *Trends Genet.* 12: 316-320.
- Green E. D., P. Green. 1991. Sequence-tagged site (STS) content mapping of human chromosomes: theoretical considerations and early experiences. *PCR Methods Appl.* 1: 77-90.
- George M. 1993. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat. Genet.* 5: 111-120.
- Geyer M. S., F. S. Collins. 1995. How will the Human Genome Project doing, and what have we learned so far? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10941-10948.
- Gyapay G., J. Morissette, A. Vignal, C. Dib, C. Fizames, P. Millasseau, S. Murr, G. Bernard, M. Lathrop, J. Weissbach. 1990. The 1993-1994 Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet.* 7: 246-287.
- Hulson T. J., J. D. Steh, S. S. Gerety, J. Mu, A. B. Castle, J. Silva, D. B. Skolnik, R. Baptista, L. Krughak, S. Xu, X. Hu, A. M. E. Colbert, C. Rosenberg, M. P. Peave-Daly, S. Koren, L. Han, X. Wu, C. Vestergaard, K. M. Wilson, J. S. Bac, S. Madra, S. Gagliatas, C. A. Evans, M. M. DeAngelis, K. A. Ingalls, R. W. Kahl, L. T. Horton, M. O. Anderson, A. J. Collymore, W. Ye, Y. Kravynjan, I. S. Zemtova, J. Tam, B. Deshp, D. F. Courtney, M. I. Renard, H. Nguyen, T. O'Connor, C. Fizames, S. Faure, G. Gyapay, C. Dib, J. Morissette, J. B. Ohta, R. W. Birren, N. Goodnum, J. Weissbach, T. L. Hartzels, S. Faure, D. C. Page, E. S. Lander. 1995. An STS-based map of the human genome. *Science* 270: 1945-1954.

- Kongers B. M., R. Chadwick. 1996. The Human Genome Project under an international ethical microscope. *Science* 265: 2035–2036
- Lappert M., V. E. Anderson, T. Quattlebaum, D. Stauffer, P. O'Connell, V. Nakamura, J.-M. Labaud, R. White. 1989. Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 70. *Nature (London)* 337: 647–648
- Ott J. 1992. Analysis of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md
- Pousska A., T. M. Pohl, D. P. Barlow, A.-M. Fritschaid, H. Lehrach. 1987. Construction and use of human chromosome jumping libraries from NotI-digested DNA. *Nature (London)* 325: 353–355
- Schuler G. D., M. S. Boggs, E. A. Stewart, L. B. Stein, G. Gyapaj, K. Rice, R. E. White, P. Rodriguez-Tamir, A. Aggarwal, E. Rajnai, S. Benoit, H. B. Bliven, A. Butler, A. B. Castle, N. Chankhachai, A. Chu, C. Cleer, S. Conley, P. J. R. Day, T. Dilling, N. Drouot, J. Durkin, S. Duprat, C. East, C. Edwards, J.-H. Fan, N. Fang, C. Holmes, C. Garrett, I. Green, D. Hadley, M. Harris, P. Harrison, S. Brady, A. Hicks, K. Holloway, I. Hol, S. Huxain, C. Imbidi-Sally, J. Ma, A. MacFhery, C. Mader, A. Marudakum, T. C. Matho, K. B. McKisick, J. Mercurio, A. Mungall, B. Mueller, H. C. Nandham, D. C. Page, A. Peck, S. Perkins, M. Percy, F. Qin, J. Quackenbush, S. Rasky, T. Red, S. Hagen, C. Sanders, X. Shi, J. Silva, D. K. Simin, C. Soderlund, W.-I. Sun, P. Tuber, T. Theodorakis, N. Vepczary, D. Vlahos, S. Vozticky, T. Warner, X. Wu, M. D. Adams, C. Auffray, N. A. R. Walter, R. Brandon, A. Delaja, P. N. Goodfellow, R. Houtgast, J. R. Huben, Jr., S. F. Ide, K. R. Iwto, W. Y. Lee, N. Noll, T. Nupse, K. Ishikawa, N. Nomura, C. Phillips, M. H. Pevsneropoulos, M. Sambolik, K. Schmitt, R. Berry, J. Seaman, R. Torres, J. C. Yeater, J. M. Shida, J. S. Beckman, J. Weisbach, R. M. Myers, D. R. Cox, M. R. James, D. Rintley, P. Debakas, K. S. Lander, T. J. Hudson. 1996. A genome map of the human genome. *Science* 274: 540–546
- Taylor K., N. Hornigold, D. Conway, D. Williams, Z. Huanzhi, M. Agacheba, P. Fattarok, P. De Jong, P. E. R. Little, J. Walle. 1996. Mapping the human Y chromosome by fingerprinting cosmid clones. *Genome Res* 6: 235–248
- Trentheger J. D., J. Ott. 1994. Handbook of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое независимое наследование аллелей?
2. Нарисуйте родословную, исключившую четвертое поколение, у члена которой встречается заболевание. Имейте в виду autosomно-доминантный тип наследования. Пенетрантность заболевания составляет 70%. Что такое пенетрантность? Как неполная пенетрантность влияет на изучение генетических заболеваний человека?
3. Что такое локус? Как он определяется?
4. Что такое генетически полиморфны? Почему полиморфные локусы важны для картирования генов заболевания человека?
5. Как с помощью STRP-маркеров можно локализовать ген заболевания человека?
6. Что такое бинд CERN-селект? Как он «работает»?
7. Что такое STS? Как определяют хромосомную локализацию STS?
8. Что такое концы? Опишите подробно, как строятся концы хромосомы.
9. Как установить, что вставка геничного клона содержит кодирующую область гена?
10. Каковы теоретические абстракционные позиции: какими методами картирования генов?

Таблица 21.1. (Продолжение)

Группы терапии	Вмешательство в это исследование	Число участников	Возраст	Примечание	Примечание
Группы с комбинацией бонна, габригалина и адефовира трибутата и ламивудина	Системное противовирусное лечение, в ряде случаев включающее также интерферон альфа-2b, ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин	1 248 (первичном)	Пациенты	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл	Возрастной диапазон в среднем от 20 до 50 лет
Оригиналы (сравнительная)	3 интерферона альфа-2b Наряду с интерферонами альфа-2b, в ряде случаев также использовались ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин Число участников в каждой группе 274 274 были ранее не лечены (274 были, 274 были, 274 были, и 274 были) Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин	1 091 (3)	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин
Два группы	Мониторинг и наблюдение Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин	1 250 (улучшение)	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл
3-й группы	Средств для лечения гепатита B Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин	1 500 (в том числе участники)	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл Использовались также ламивудин, зидовудин, зальцитидин и зидовудин	Пациенты с вирусной нагрузкой >10 ⁵ копий/мл

разработаны методы получения высококачественных генов, созданы таксономические экспрессионные векторы, стали рутинными экспериментальные переносы генов на мышах B₆H₂ были представлены первая попытка применения (специфичности для лечения SCID) у двух пациентов.

Использовались следующие подходы. Клиническим пациентам АДЖ (аутоиммунная форма АДЖ) были введены в лимфоциты, полученные от каждой из пациентки. Модифицированные клетки, содержащие вирус АДЖ, культивировали в течение двух лет с определенной периодичностью по дням девочкам. Через четыре года после начала лечения у обеих пациенток наблюдались улучшения (ген АДЖ и клинические признаки

симптома SCID). Однако истинная причина улучшения оказалась не совсем ясной. Был ли эффект заместительной терапией (иммунизацией введенным лимфоцитарной формой АДЖ) или собственно развитием естественной Бесспорно одно из них имеет нормальную функциональность вводимой терапии. Схожие результаты были получены и для других пациентов с SCID, однако результаты получены от двух пациентов. Исследования были продолжены на большем числе больных.

В соответствии с рекомендациями ЕМА, прежде чем начать трансплантационную терапию будет разрешено применение, от девяти (применение) четыре страны одобрили клинические исследования

1. Доклинические испытания, которые включают многочисленные эксперименты, проводимые in vitro и in vivo лабораторными животными.
2. I фаза клинических испытаний проводится на небольшом числе (от 6 до 10) пациентов и часто имеет целью проверку безопасности препарата.
3. II фаза клинических испытаний проводится на большем числе пациентов и имеет целью проверку эффективности действия препарата.
4. III фаза клинических испытаний проводится с привлечением большого числа испытуемых и включает исчерпывающий анализ надежности и эффективности препарата, при этом исполняется информация, полученная на предыдущих этапах.

Прежде чем начать проверку препарата, необходимо, чтобы протокол его испытаний был одобрен и утвержден в соответствующих юрисдикционных институтах. С 1990 по 1992 г. было одобрено более десяти протоколов испытаний

на генной терапии, находившихся в I фазе, а в 1997 г. – более 200 протоколов испытаний на генной терапии разных видов иммунодефицита, лейкообразований, гемофилии, СПИДа, муковисцидоза, гиперхолестеролемии, болезней антропоморфического скелета и др. (табл. 21.2). Прежде чем приступать к I фазе клинических испытаний, необходимо учесть ряд важных моментов: предположимое исследование должно быть направлено на разработку методов лечения однозначно диагностируемой болезни, соответствовать существующим принципам проведения медико-биологических экспериментов и осуществляться с минимальным эти генетическим риском.

Почечную болезнь терапия представляет собой иное направление в заболеваниях, которые традиционно лечат с ее помощью, столь различны, рассматривают множество других заболеваний. В настоящее время все исследования по генной терапии направлены на коррекцию генетических дефектов соматически, а не половых (направлены) клетки. Это объясняется этиологией и чисто телесическими причинами, а так-

Таблица 21.2 Некоторые заболевания, терапия которых находится в испытаниях с 1990 г.

Заболевание	Испытуемый препарат	Цель лечения
Тяжелая мышечная дистрофия	Адаптогенная терапия	Получение достаточного количества
Муковисцидоз	Фосфорно-кальциевый обмен	Восстановление нормального метаболизма азотистых веществ в легких и печени
Наследственная слепота (род. ретиналь)	Низерголин-1	Аутологичные клетки сетчатки и слезной железы
Вещное слепота II	Фактор 12	Аутологичные фибробласты сетчатки
Синдром ван дер Веге	Ретиноциты (аутологичные или чужеродные)	Аутологичные фибробласты
Наследственная глухота (род. сенсорная)	Аутоциты (аутологичные)	Клетки слухового нерва
Синдром Фанкони (ПИ) род. сенсорная	Тканевая терапия аутологичными клетками	Клетки слухового нерва
Муковисцидоз	Трансформированные фибробласты (чужеродные) и аутологичные	Замещение недостающих клеток и выделение факторов
Род. слепота (род. слепота)	Фактор 12 (аутологичный или чужеродный) и фибробласты аутологичные	СДМ* клетки сетчатки
Муковисцидоз	Фибробласты аутологичные	Восстановление
Алкоголь	Аутологичные фибробласты аутологичные	Аутологичные фибробласты
Вещное слепота (род. сенсорная) род. слепота	Целлюлярная аутологичная и фактор 12 (N-1) клетки	Панкреатическая ткань аутологичная и фибробласты
Почечная недостаточность (род. почечная)	р53	Клетки сетчатки
Алкоголь Фанкони	Фактор 12 (аутологичный) фибробласты	Клетки сетчатки сетчатки

же соображениями безопасности: вода ДНК, введенная в полные клетки человека, не должна была последующими поколениями.

В широком смысле под генной терапией понимают введение чужеродных генов в клетки человека для коррекции или замены дефектного гена. Однако в узком смысле под генной терапией понимают введение в клетки-мишени функционально активных экспрессирующихся генов. Однако за этим простым определением скрывается целый ряд проблем. Например, как получить доступ в клетки, предназначенные для коррекции? Как осуществить доставку гетерологического гена? Каким образом клетки-мишени должны получать такой ген, чтобы болезнь отсутствовала? Необходимо ли тотальный контроль транскрипции введенного гена для обеспечения ее эффективности? Не вызовет ли избыток экспрессии введенного гена побочных эффектов? Будут ли модифицированные клетки выживать бесконечно или потребуются повторные введения?

Хотя генная терапия соматических клеток делает только свои первые шаги, на ряд вопросов, касающихся некоторых важнейших аспектов, уже получены ответы. Планируются все новые подходы к генной терапии соматических клеток, которые можно разделить на две большие категории: генная терапия *in vivo* и *ex vivo*. Разработываются и специфические лекарственные препараты на основе музелиновых кислот; зинксывозимые олигонуклеотиды; РНК-ферменты, модифицированные с помощью генов анжимерин; олигонуклеотиды, корректирующие геномы музелин *in vivo*.

Генная терапия *ex vivo*

Генная терапия *ex vivo*, как правило, включает следующие этапы (рис. 21.11).

1. Получение клеток от больного
2. Исправление генетического дефекта с помощью переноса музелин гена в культивируемые клетки
3. Выбор и выращивание генетически исправленных клеток
4. Инфузия или трансплантация этих клеток пациенту.

Использование собственных клеток пациента (аутологичных клеток) гарантирует, что после инфузии или трансплантации у него не разовьется иммунный ответ.

Необходимо, чтобы процесс переноса генов, используемый для генной терапии *ex vivo*,

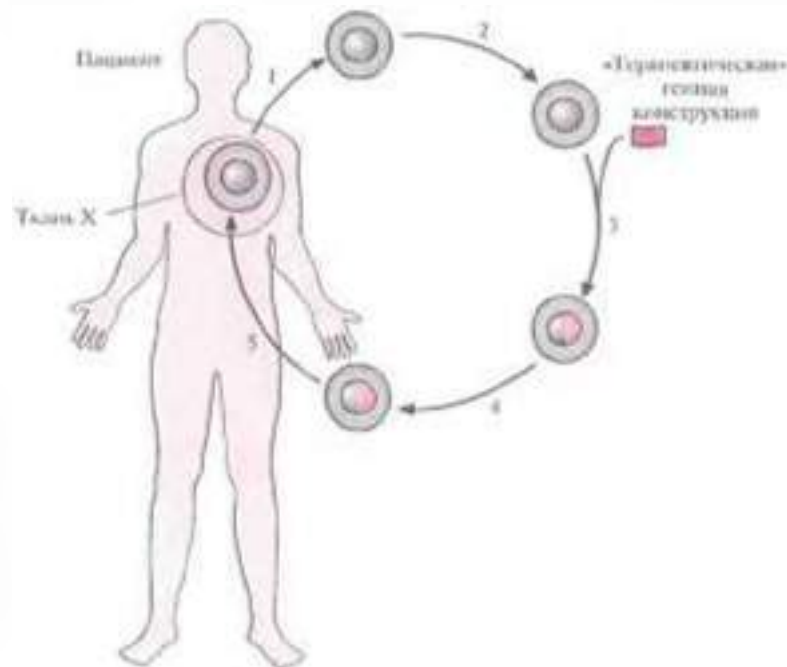


Рис. 21.1. Схематическое представление генной терапии *ex vivo*. Последовательность: 1) извлечение от пациента клеток с геном дефектом, 2) культивирование и генетическая коррекция клеток, 3) выбор и выращивание генетически исправленных клеток, 4) выбор, выращивание и тестирование трансформированных клеток; 5) трансплантация или трансфер трансформированных клеток пациенту.

было эффективной, а «герметической» ген стабильно поддерживался и непрерывно экспрессировался. Этим условиям отвечали векторы, индуцируемые на основе мышиных ретровирусов. Но ретровирусы имеют существенный недостаток – они могут приводить к злокачественной трансформации клеток. Такую вероятность необходимо уменьшать, а лучше полностью исключить.

Геном ретровируса делят на три предельно длинных идентичных панцепочечных молекулярных РНК, каждая из которых состоит из шести участков: дивинного концевой повтора (5'-LTR от *long terminal repeat*); кодирующей последовательности *gag* (ψ'), необходимой для упаковки РНК в вирусную частицу; трех генов, кодирующих структурные белки: матричного белка (*gag*), белка, обладающего функциями обратной транскриптазы и интегразы (*pol*), и белка оболочки (*env*); 3'-LTR (последовательности (рис. 21.2). Жизненный цикл ретровируса включает следующие этапы.

1. Инфицирование клеток мишеней.
2. Синтез ДНК-копии генома с помощью собственной обратной транскриптазы.
3. Транскрипция вирусной ДНК в ядре.
4. Встраивание вирусной ДНК в один из хромосомных сайтов клетки-хозяина.

5. Транскрипцию мРНК с вирусной ДНК под контролем сильного промотора докэпированного в 5'-LTR.
6. Трансляцию белков *Sud*, *Pol* и *Env* в цитоплазме.
7. «Кристиние вирусного капсид» и упаковку в него двух РНК-цепей и молекул обратной транскриптазы.
8. Высвобождение вирусом (1) клеток.

Для получения ретровирусного вектора полноразмерную ДНК ретровируса встраивают в плазмиду, с помощью лигационной реакции удалив большую часть гена *gag* и гены *pol* и *env*, оставив 5'-концевой участок гена *gag* и 5'- и 3'-LTR, в этом районе с ψ' -областью встраивают «герметический» ген, транскрипция которого будет контролироваться 5'-LTR (промотором; при необходимости можно встроить и маркерный селективный ген с собственным промотором (рис. 21.3). Такая конструкция позволяет экспрессировать оба встраиваемых гена. На основе этой схемы созданы различные ретровирусные векторы. Максимальный размер ДНК-вставки, которую может усвоить ретровирусный вектор, – примерно 8 т. п.

ДНК ретровирусного вектора можно использовать для трансформации клеток сразу по себе, но эффективность вставки ее в ядро и интеграции в геном клеток-хозяина крайне низка. При-



Рис. 21.2. Генетическая карта генома ретровируса. ψ' – последовательность, ответственная за упаковку, *gag*, *pol* и *env* – области, кодирующие соответственно белок капсид, белок, обладающий функциями обратной транскриптазы и интегразы, и белок оболочки. 5'-LTR содержит сайты инициации транскрипции, причем весь геном транскрибируется как одна молекула РНК. 3'-LTR содержит сайты терминации транскрипции



Рис. 21.3. Генетическая карта ретровирусного вектора, несущего два гена. Транскрипция «герметического» гена (Gen X) инициируется 5'-LTR-промотором, транскрипция селективного маркерного гена (Neor) – внутренним промотором (p) 3'-LTR содержит сайты терминации транскрипции ψ' – последовательность, ответственная за упаковку.

тому была разработана методика упаковки полноразмерной РНК ретровирусного вектора в интактные вирусные частицы, с высокой частотой проникающие в клетку, что гарантирует эффективное соответствие ее ДНК в геном клетки-хозяина. Для этого с помощью генной инженерии было создано «набухающая» клеточная линия, в ядре которой в участках генома которой содержится $\Delta\psi$ -сегмент 5'-LTR gag 3'-LTR (т. е. сегмент, ответственный функционально за «набухаемость»), но другим — $\Delta\psi$ -сегмент 5'-LTR $\Delta\psi$ -env-3'-LTR. Оба этих сегмента транскрибируются, но из-за отсутствия ψ -последовательности и образования вирусных молекул РНК меньше, чем в норме, размеры формируются пустые вирусные частицы. При трансфекции ДНК ретровирусного вектора в такие клетки она интегрируется в хромосомную ДНК и транскрибируется с «бульварным» полимеразерной РНК ретровируса, содержащей ψ -последовательность. В таких условиях в вирусные капсулы упаковывается только РНК вектора. Обратившиеся интактные вирусные частицы можно использовать для высокоэффективной доставки ретровирусного вектора в клетки-мишени (рис. 21.4).

В «набухающей» клеточной линии не образуются компетентные по репликации ретровирусного дикого типа, способные интегрироваться в геном и приводить к неконтролируемой пролиферации некоторых клеток (т. е. к превращению их в раковые клетки). Это весьма существенно, особенно если частицы ретровирусного вектора предполагается использовать для генной терапии соматических клеток человека. В качестве меры предосторожности же не проводят регулярное тестирование готовых ретровирусных векторов, с тем чтобы выявить ретровирусы дикого типа. Кроме того, в «набухающей» клеточной линии нуклеотидные последовательности ретровируса и вектора локализованы в трех разных областях хромосомы, что делает весьма маловероятной возможность последовательных рекомбинационных событий, которые могли бы привести к образованию компетентного по репликации ретровируса.

Ретровирусы активно инфицируют реплицирующиеся клетки. Для переноса генов в интенсивно растущие клетки «мишени» последние обрабатывают соответствующими частицами упакованной

ретровирусного вектора либо (прежде чем влиять в клеточную культуру) с помощью его клеточной линии, в которой осуществляют дифференциальную селекцию для выделения клеток-мишеней и «набухающих» клеток. Трансдуцированные клетки-мишени (т. е. в которые при помощи вируса была перенесена вирусная ДНК) тестируют, чтобы удостовериться, что: 1) в них синтезируется продукт терминального гена; 2) не образуются компетентные по репликации ретровирусы; 3) ДНК ретровирусного вектора не встроилась в сайт, влияющий на способность клеток к росту либо препятствующий их информационному функционированию. После тестирования трансдуцированные клетки инкубируют в больших количествах и с разными интервалами выдают пациентам.

Наиболее эффективными клеточными для проведения генной терапии *ex vivo* (рис. 21.5) являются миелоиды с (так называемыми) «бульварными», для лечения которых применяют трансдуцирование клеток ψ -Терминальным эффектом трансдукции такой клетки может быть и повышение числа раз делений клеток с тем же темпом в том типотипичных «бульварных» стволовых клетках, которые встречаются с частотой $10^{-4}-10^{-5}$, могут пролиферировать и дифференцироваться в различные типы клеток, такие как В- и Т-лимфоциты (В-клетки и Т-клетки), макрофаги, дендриты, эритроциты и остеоциты. Например, в том случае, когда генная терапия нарушает функцию макрофагов, циркулирующих костного мозга обеспечивает рецидивную популяцию этих компетентных макрофагов, происходящих из популяции плюрипотентных стволовых клеток.

Генноинженерная модификация «бульварных» стволовых клеток с их последующей инфузией или трансплантацией миелоиду для уменьшения утраченного типа клеток или генно (то продукт) может стать основным способом генной терапии *ex vivo*. В качестве примера можно рассмотреть дефект ADA, приводящий к иммунодефициту в зрелом уровне зрелости и дефициту аденозиндезаминазы, токсическое действие которой приводит к гибели В- и Т-лимфоцитов и поэтому тяжело иммунодефициту (Поскольку В- и Т-лимфоциты происходят из тотипотентных стволовых клеток, перенос в последние функционального гена ADA с последующим выделением

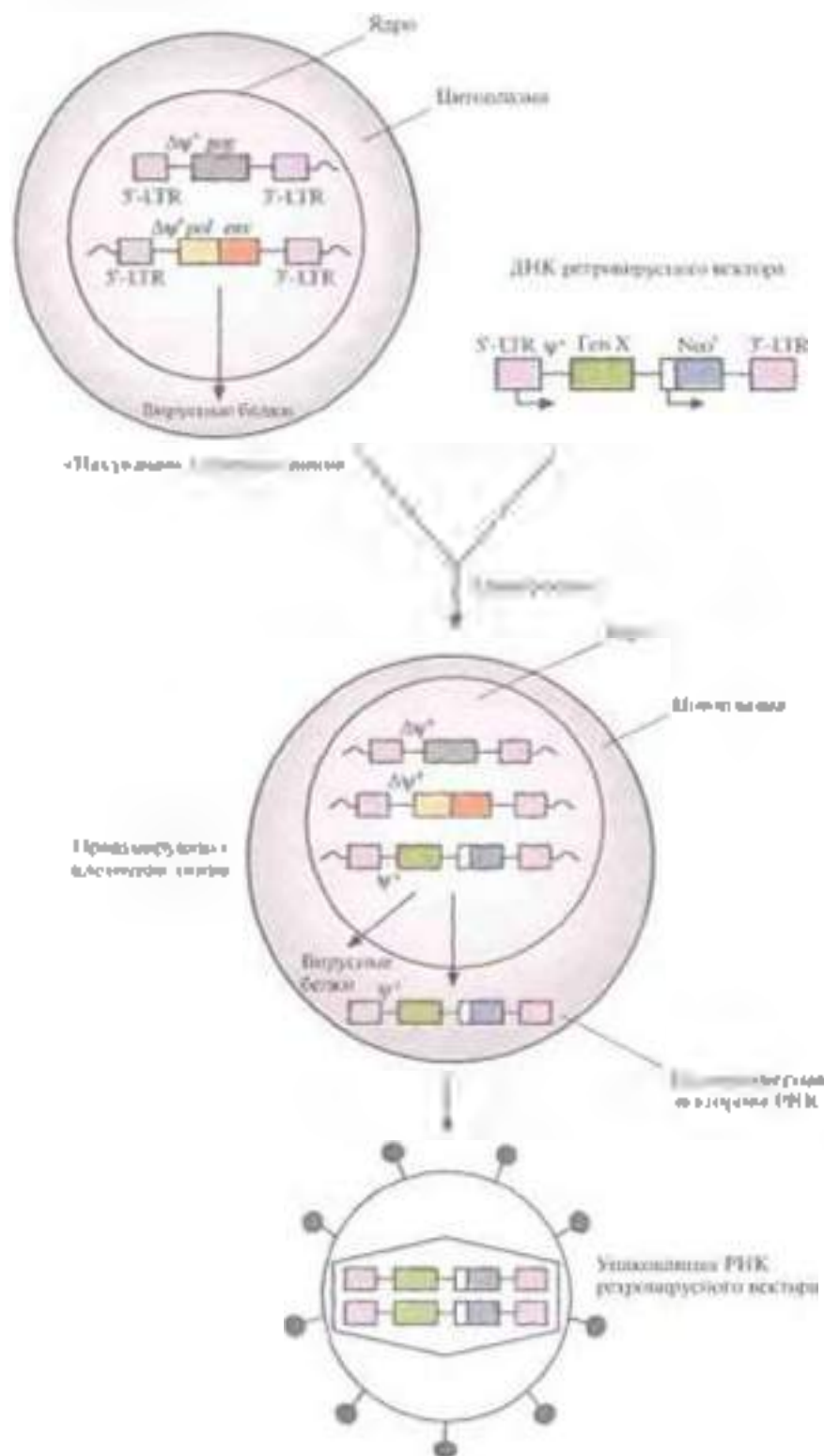


Рис. 21.4. Получение вируса-носителя ретровирусного вектора. В данную клетку вводят хромосомный «транспозон» $\Delta\psi^+$ и вирусный вектор ретровирусной формы. В клетке под действием ψI^+ и ψII^+ происходит транскрипция контролируемых 5' LTR-проявлений; эта реакция является последовательностью, необходимой для упаковки ($\Delta\psi^+$). «Вакцинозный» вирус является компетентным, но из-за отсутствия ψ либидой из ретровирусной иРНК не образуется вирусная частица. После трансфекции «матричного» вирусного вектора, содержащего последовательность (ψ^+), его матричная иРНК транскрибируется и упаковывается в качестве вирусных частиц, не способных реинфицировать в одноклеточные культуры «транспозонный» ген ($\Delta\psi^+$) и селективный маркер (Neo^r).

ВАЖНАЯ ВЕХА

Создание «наукотем» — ключевой линии и ее использование для производства хелпер-неинфекционного дефектного ретровируса

В. Манн, В. С. Мейерс, С. Пайноне
(См. стр. 133-139, 1983)

Вспрос о применении генной терапии всегда пытался ответить на следующие вопросы: почему ученые сотрудничали с У. Фрайманом и Р. Фелбином, которые еще в 1972 г. *Science* (175: 940-954) назвали «Мы считаем, что термин «генотерапия» означает лечение с помощью генетически измененных клеток, поэтому исследователи продолжают исследование, направленные на ее развитие»? Ключевые моменты (генной терапии) — вирусная доставка, экспрессия гена и обеспечение его активности в определенных клетках или тканях. Сначала в качестве основного средства доставки «генетического» гена рассматривали векторы, полученные из вирусных корпускул человека. Это было связано с наличием у них механизмов проникновения в специфические клетки. Наиболее многообещающими считали векторы на основе ретровируса. Но основной ретровирус — это инфекционный агент, который по-

средает клетки в первую очередь в тех тканях, которые трансформируются. Наибольшим достижением на пути практического решения проблемы терапии стала разработка системы для упаковки «сретенсивных» генов в неинфекционные вирусные частицы, сохранившие способность прикрепляться к клеткам-мишеням.

Мэнн и др. сконструировали первую в истории линию для упаковки ретровируса. Для этого они выбрали вирусную линию с предвзвешенно удачной упаковочной способностью, отсутствием в упаковке вирусной ДНК-копировки, которая содержит инклюзивность, инкопированную или упакованную и транскрипционную гены, но не со-

держивающуюся в вирусных частях, которые могут инкопировать или доставить «генетический» ген в нужные клетки. Этот подход был применен на опыте при попытке лечения детей, страдающих тяжелой формой лейкоза «лейкемия» — вирусную линию для упаковки и в это время вирусные векторы.

В 1985 г. были введены в практику Мэнн и др., У. Ашерсон (ссылка) «В последние годы появились эффективные системы лечения лейкоза, которые позволяют сделать лечение германской лейкозиемой» А 22 мая 1985 г. Ашерсон и его коллеги назвали первую клиническую попытку по лечению лейкоза. Прогнозирование и проведение времени попытки генной терапии не отличались особым успехом: поодерживая информация о том, что в будущем был создан вирусный вектор для лечения многих заболеваний.

Мэнн и Индикатик выискивают «генетический» белок.

Неудовлетворительные результаты лечения с помощью вирусных векторов привели к культуре эмбриональных стволов или кератиноцитов кожи, астроцитов мозга, эндотелиальных клеток (стволовые или мезенхимные), и их генетическую модификацию с помощью «генетического» гена. Рекомбинантные клетки активируют и искусственно индуцируют (попытки) мембрану, через которую выделены рекомбинантные белки и интродуцируют в клетки питательные вещества. Мембраны клеток и не выделены белки и интродуцируют питательные вещества. В качестве интродуцирующего материала используют разные варианты

клетчатый — поли-1-лиганд-лиганд, полифосфатидил, полифосфатидил-поли-лиганд (ссылка).

Докладываемые результаты, приведенные в Мэнн и др. (ссылка) показывают, что интродуцированные рекомбинантные клетки могут продуцировать и доставлять в клетки-мишенях большие количества рекомбинантного белка. Чтобы попытаться предотвратить гибель клеток-мишеней, применяющих мембранную интродуцирующую систему, была проведена 1 фаза клинического испытания с использованием интродуцируемых клеток, вырабатывающих интродуцируемый фактор (CNTF, от *conditional neurotrophic factor*). Проведена была первая попытка лечения. Но у пациентов с боковыми

минимизировать риск развития аутоиммунной системы не представляется. При имплантации (инъекции) вирусных CNIF-примиторов в клетки и мочевыводящих путей с помощью индуцированных трансдукторов, модифицированных другими факторами нейротрофическими факторами, через генотипную клетку или их производные. Методы инъекции в клетки, модифицированные с помощью генной инженерии, позволяют на ранней стадии развития, но может стать эффективным способом доставки терапевтически генных препаратов при лечении многих заболеваний.

Генная терапия *in vivo*

Генная терапия *in vivo* представляет доставку «терапевтически» ген непосредственно в клетки определенной ткани организма (рис. 21.6). Ретровирусные векторы адсорбируются на поверхности клетки-мишени, проникают в ядро и интегрируются в геном.

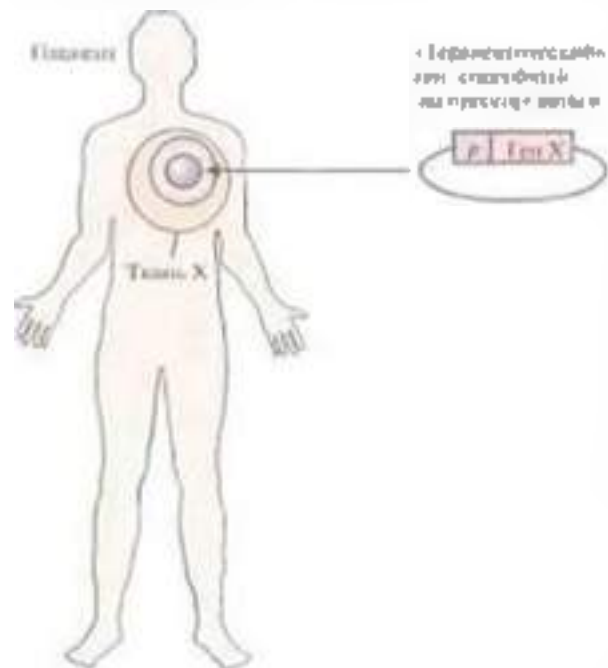


Рис. 21.6. Схематическое представление генной терапии *in vivo*. Клонированный «терапевтический» ген (Ген X) кодирует белок, выполняющий терапевтический эффект. Этот ген интегрируется в ядро определенной клетки-мишени с использованием вирусных векторов и экспрессируется *in vivo*. Примапур р, модифицирует вирусную структуру, обеспечивая селективность.

на которые направлены «генная терапия». Большинство клеток не делится. Поэтому были разработаны различные вирусные и невирусные векторные системы доставки «терапевтически» генов, позволяющие обеспечить доставку и экспрессию генов в различные ткани организма (мышцы, легкие, мозг, клетки крови, железистые клетки, клетки крови) и рассмотреть их в среде цитоплазмы человека «факторы» системы доставки должны обеспечивать высокую эффективность проникновения «терапевтического» гена клетками-мишенями, модифицироваться при трансфекции и работать на уровне экспрессии, доставляя для обеспечения соответствия функции.

Вирусные системы доставки генов

Ретровирусные векторы

Опыт клинических испытаний с участием более 200 пациентов показывает, что дефектные по репликации ретровирусные векторы не вызывают какой-либо неблагоприятных побочных эффектов. Тем не менее безопасность их применения требует продолжать проводить дальнейшие исследования, на этапе или клинической, которая является ретровирусные (с помощью *pac* и *col* на активности или контроле 5' и 3' TR-примитора, а также «структурных» ген и ген *env*, управляемые цитомегаловирусным примитивом. После трансфекции или рекомбинант вирусует образование дефектных по репликации вирусных частиц, причем вероятность рекомбинации с образующим конкурентная по репликации ретровирусных очень высока. Вес вируса может передаваться не более 3,5 т. п. н. ДНК, но и длины большинства повторов-алюминия «терапевтически» ДНК и генов структурной единицы составляет 0,5–2 т. п. н.

В ретровирусную векторную систему внесены модифицированные усовершенствования: увеличен объем обратных транскрипции, повышена эффективность трансдукции, осуществлена генотипная модификация, обеспечивающая их активность в невосприимчивых клетках, повышена специфичность инфекции. В последнем случае гены рекомбинантных ретровирусных векторов унаследованы в (объем) других вируса, белки клинически и определяют специфичность связывания ретровируса и клеток

инфицируемых им клеток. Это явление по-прежнему феноменически смешанным (*chimeric function*). Функциональные смешанный вирус частицы с повышенной конформацией клеточной ядра, которая синтезирует продукты генов *gag* и *pol*, рекомбинантным ретровирусным вектором и вектором, экспрессирующим ген *env* другой вирус. Изменяя ген *env*, можно как сузить спектр инфицируемых вирусом клеток до строго определенных типов, так и расширить его. Кроме того, в ген *env* ретровируса можно встроить нуклеотидную последовательность, кодирующую вирус белок, который взаимодействует с определенным клеточным рецептором и обеспечивает непосредственную рекомбинацию ретровируса с новыми клетками. Наконец, можно добиться специфичности экспрессии терапевтического гена, кодирующего ее (или) вектором промотором, специфичным для определенных клеток.

Аденовирусные векторы

Аденовирусы инфицируют несливающиеся клетки человека и широко используются в качестве живых вакцин, которые предотвращают рекуррентные инфекции и гастроэнтериты, не оказывая побочных действий. Эти свойства делают аденовирусы перспективными для доставки генов в клетки-мишени.

Для получения аденовирусного вектора проведя трансфекцию клеточной линии, синтезирующей предшественник аденовирусного гена F1 двумя участками генома аденовируса (рис. 21.7). Один из них может существовать в виде плазмиды в *F. col* и содержит адено F1-область терминаторного гена, функционирующей нуклеотидными последовательностями аденовируса, в то время представляет собой молекулу ДНК аденовируса, кодирующая 5'-концевую область, включающую F1-область, и имеет перекрывающую область с несущим терминаторным геном плазмиды. Рекомбинация между двумя трансформированными фрагментами ДНК в области их перекрывания приводит к образованию полноразмерного аденовирусного гена, в котором вместо F1-области находится терминаторный ген. Продукты гена F1, вырабатываемые клетками-хозяевами, инициируют образование вирусных частиц, выходящих из клетки в результате лизиса. Клонирование эмкоды аденовирусного вектора

составляет около 7,5 т. п. В искусственных рекомбинантных трансформирующих молекулах ДНК, обладающие неидентичными длинами, не могут упаковываться в вирусные частицы. Вероятность того, что между областями F1 в геноме клетки-хозяина и ДНК рекомбинантно аденовируса произойдет рекомбинация и образуется компетентный по репликации вирус, чрезвычайно мала.

После того как рекомбинантный аденовирус инфицирует клетку-мишень, его ДНК проникает в ядро, где и происходит экспрессия «терапевтического» гена. Рекомбинантная ДНК не интегрируется в хромосомы и сохраняется непродолжительное время, поэтому при проведении повторной с использованием аденовирусных векторов инъекций необходимо использовать определенную эффективность.

Аденовирусные векторы использовались в клинических испытаниях по генной терапии мышечных дистрофий. Первые результаты не обнадеживают: при трансформации регуляторного белка, кодируемого в качестве промотора к мутантной *CFTR*, от отца сына *Alton* (*Alton* *transgene* *therapy*), был перенесен ген в небольшое число клеток печени, в миллиардных шведские рекомбинантно аденовируса и инъекции увеличили экспрессию некоторый аденовирусных генов (привести к созданию у пациента выраженной функциональной печени и стабилизированным клеткам).

Эту проблему решить разными путями. Например, сконструировать «активируемую» аденовирусную линию, содержащую F1-область и ряд аденовирусных генов, которые не входят в состав реплицирующей ДНК и не кодируют в клетке-мишени. Затем удалось добиться того, чтобы ни один из аденовирусных генов не включается в трансформирующую ДНК. Для этого линейно вырезали плазмиду *F. col* (28 т. п. н.), которая обеспечивает экспрессию олиго или большего числа терминаторных генов и не содержит аденовирусных генов, и привели в ее область фрагменты ДНК (по 4 т. п. н.), содержащие точку репликации аденовирусной ДНК, последовательность, ответственную за ее упаковку, и сигнал терминатора. Для того продукта димеризации (36 т. п. н.) соответствует длине генома аденовируса. Затем полученным продуктом и аденовирусным гено-

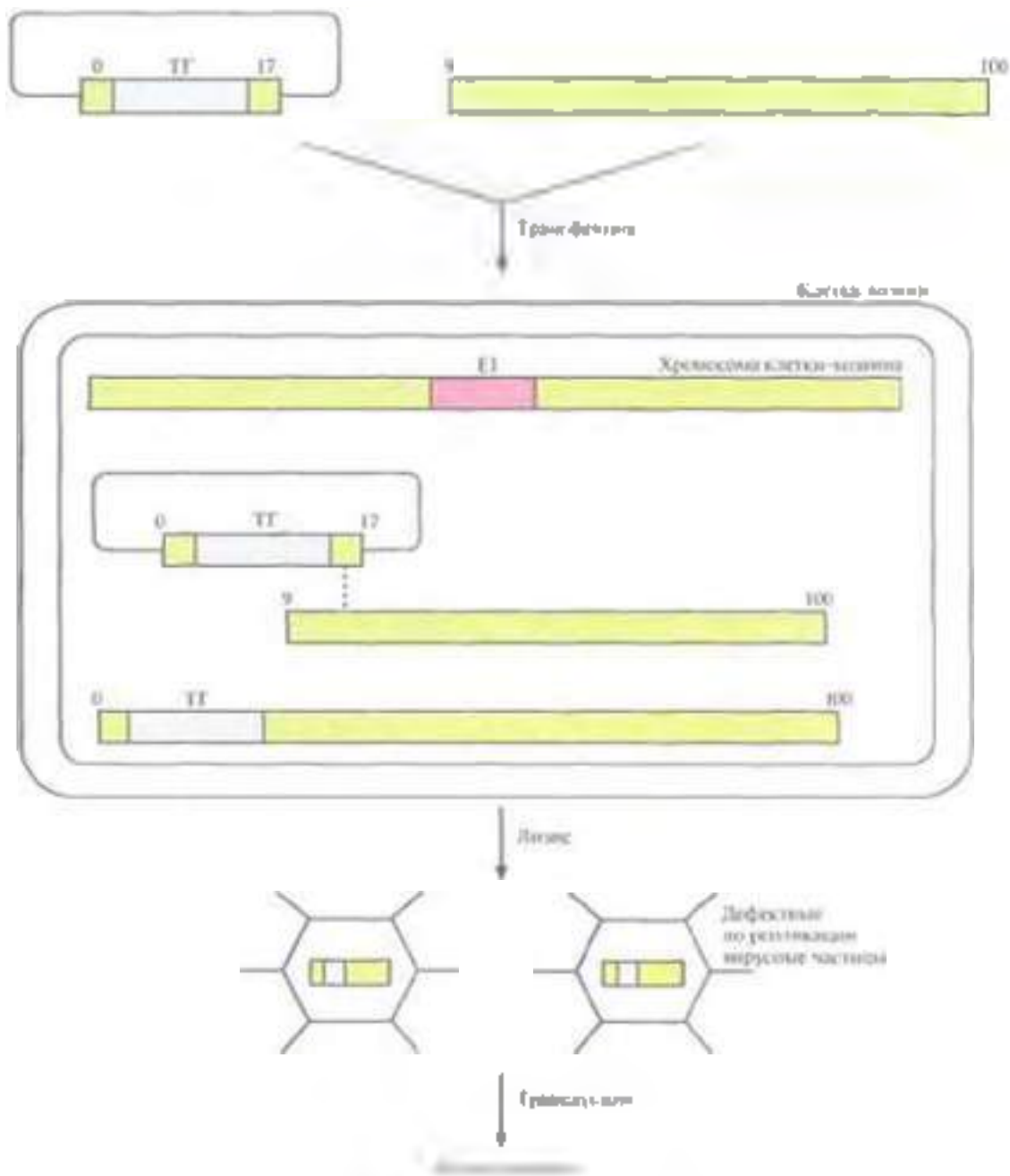


Рис. 23.7. Аденювирусный вектор. В клетку мишени, несущую интегрированный в геномную ДНК фрагмент ДНК (ген E1) экспонировать, чтобы встроиться в сегмент вирусной генома (0–17 единиц карты) плазмиды с «первичными» генами (TG) в участок геномной ДНК (расстояние — 100 единиц карты). Другим геном аденовируса (иной 100 единиц). В результате рекомбинации (стрелочками помечены) между перекрывающимися участками геномной ДНК аденовируса образуется молекула ДНК, которая содержит ингибитор вирусной репликации (ген E1) и вирусные гены (0–17 единиц карты). После лизиса (клеточная) вирусные частицы дефектны по репликации. Интегрированный ДНК фрагмент в клетке мишени функционирует как структура, не являясь на удивление рекомбинантной ДНК (с «чуждыми»)

мы без E1-области и последовательности, ответственной за утилизацию, применяли трансфекцию клетки-хозяина, экспрессирующей G1-гены. Матрицу ДНК аденовируса, дефектная по репликационному утилизатору, составляет лишь единичный компонент вируса, а продукт интродукции реплицируется и утилизирован в вирусные частицы. При этом около 99% матриц каждой вирусной частицы содержат молекулу ДНК с «терминальными» генами (генами) С помощью центрифугирования их можно отделить от дефектных по репликации вирусов, которые все же образуются в незначительном количестве. ДНК копирующая система такой системы занимает 28 г. и т.

Эффективность аденовирус-опосредованного переноса генов можно повысить, если сконструировать вирус, применяющий преимущественно и преферентивно клетку-мишень. Для этого в ген, ответственный за образование нитей аденовируса, следует включить последовательность, кодирующую домен белка, который становится с клеточной специфичным рецептором.

Векторы на основе аденоассоциированных вирусов

Аденоассоциированные вирусы (ААВ) – по величине наименьшие вирусы человека с одноцепочечным ДНК-геномом (4,2 г. и т.), который может интродуцироваться в специфической сайт 19-й хромосомы. Такое название они получили потому, что для продуктивной инфекции им не хватает белков другого вируса (вируса-помощника), например аденовируса. После того как ААВ проникает в ядро, его геном с помощью полимеразы клетки-хозяина репродуцируется в двуцепочечную ДНК и транскрибируется.

Отсутствие патогенности делает ААВ весьма перспективным вектором для доставки в организм человека «терапевтических» генов. Рекомбинантный ААВ получают с помощью трансфекции клеток-хозяина, инфицированных каким-нибудь аденовирусом (вирусом-помощником), двумя плазмидами (рис. 23.8). Одна из них несет «терапевтический» ген, донорский или интродуцированный конкретными повторами (длиной от 125 п. н.) ААВ, а вторая – два его гена, *gP* и *gD*, ответственные за репликацию генома и синтез капсида соответственно. После

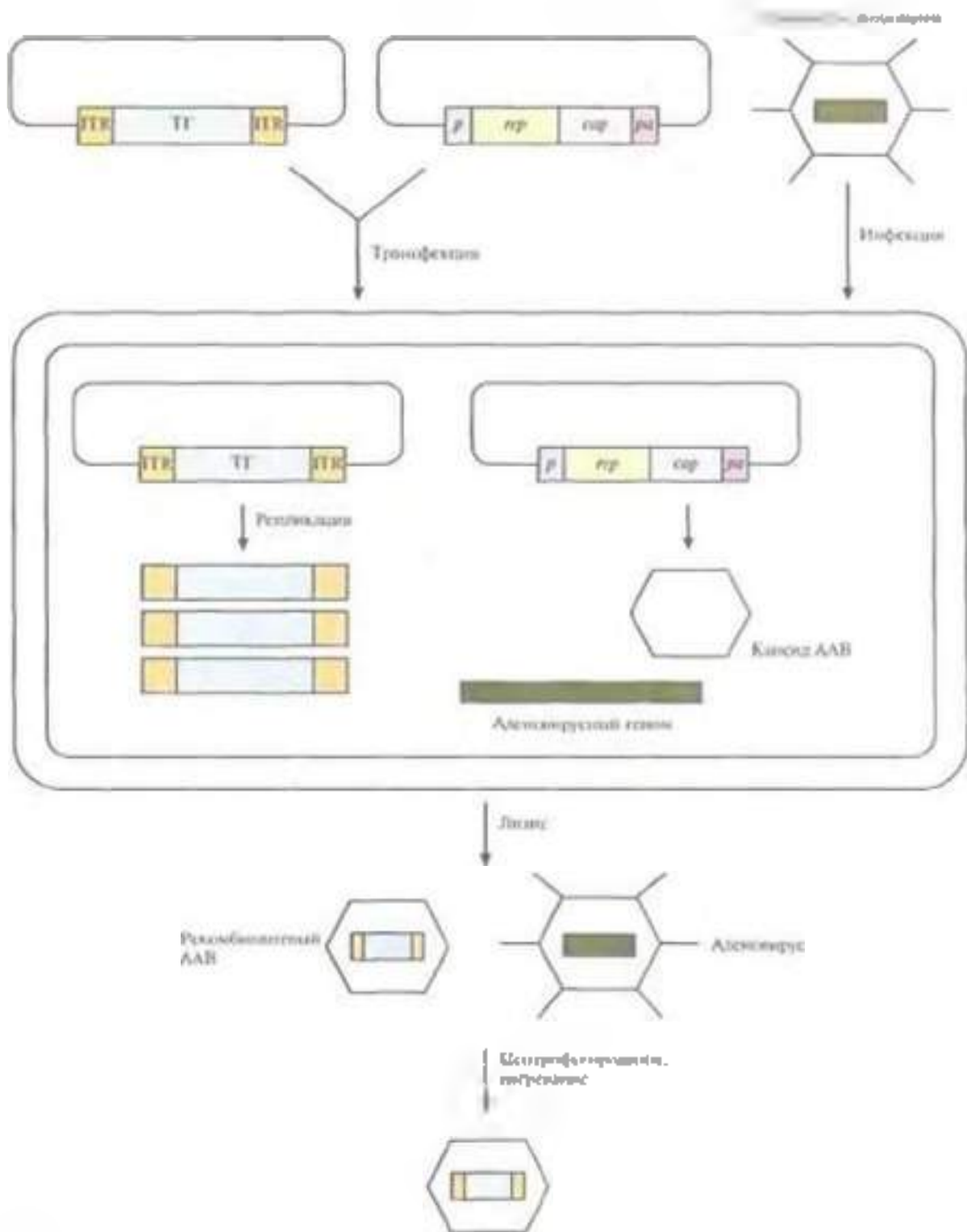
этих же инфицированных клеток рекомбинантные ААВ отделяют от аденовируса с помощью центрифугирования и дигестии, а оставшиеся в образце аденовирусы (вирусы герпеса) инактивируют нагреванием. Рекомбинантный ААВ может нести ДНК-вставку размером до 4,5 г. и т., не вызывая реакции иммунного ответа, поскольку не содержит ААВ генов, и не может интродуцироваться в 19-ю хромосому из-за отсутствия *gP*.

В отличие от аденоассоциированных вирусных векторов, в этих трансдукциях репликация матрицы (рекомбинантный ААВ) инициализируется только в клетках в 90% раз с помощью стандартного обучения вечно живущим клеткам и введения переконструированной (лизоциклин) ААВ. В том случае, когда функция IX системы склеивания генов («терминальные» гены) экспрессировалась в течение как минимум 3 мес на уровне, достаточном для коррекции дефекта при гемофилии. В I фазе клинических испытаний по генной терапии гемофилии А в клетке вводили *СFTR*-ААВ-вектор; при этом не принималась никакая специальная терапия, а вектор сохранялся до 20 сут. Чтобы определить, образуется ли продукт гена *СFTR* в количестве, достаточном для достижения терапевтического эффекта, нужны дальнейшие клинические испытания.

Векторы на основе вируса простого герпеса

Для того чтобы рецис и аденоассоциированные векторы инфицировали специфические типы клеток, нужно модифицировать их с помощью гетеричных векторов, которые и природе существуют вирусом, уже обладающие средствами к определенной

Рис. 23.8. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (ААВ). Проведена трансфекция клеток животного, инфицированных аденовирусом-помощником, двумя плазмидами, одна из которых содержит «терапевтический» ген (ТГ). Формированный вирус ассоциируется с клеточным полимером (ПР) ААВ, а другая – с геном ААВ, ответственным за репликацию (*gP*) и формирование капсида (*gD*), которые кодирует код аденовируса-помощника (*gP*). Последовательность индикаторной гетеричной (IG) флуоресцирует после этого частицы рекомбинантного ААВ и аденовируса разделяют центрифугированием, а оставшиеся аденовирусы частицы инактивируют нагреванием.



ную клетку. Так, вирус простого герпеса 1 типа (HSV) инфицирует нейроны и перемещивается в них, часто вызывая у человека так называемые «простульные» высыпания, а иногда — дисфункции с летальным исходом. Вирус проникает в нейроны в латентной форме, а при стрессе и гормональных нарушениях опосредованно инициирует вирусный цикл.

Существует множество заболеваний, поражающих центральную и периферическую нервную систему: опухоли, метаболические и вирусные поражения, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). Неврологические заболевания, как правило, бывают хроническими и приводят к госпитализации больного чаще, чем все остальные болезни вместе взятые. Вследствие тропности HSV к нервным клеткам он является подходящим вектором для генной терапии таких заболеваний.

Геном HSV представляет собой двуцепочечную молекулу ДНК длиной 152 т. п. н. Каждая вирусная единица с мембраной нейрона, в его ДНК транспортируется в ядро. Репликационный цикл вируса состоит из латентной (репликация ДНК и образование вирусных частиц) и латентной (конденсация вирусных геномов в латентный как минимум двух нуклеосомный латентно-ассоциированный (примкорои) фаз).

Задача создания генома длиной примерно 30 т. п. н. ДНК-вставки не исключает четкого планирования репликации HSV, его широкую или ограниченную специфичность. С другой стороны, большой размер генома HSV затрудняет генетические манипуляции с ним. Для решения этой проблемы в плазмиде *E. coli*, которая может нести до 10 т. п. н. чужеродной ДНК, встроили «условительный» ген HSV, состоящий из точки инициации репликации и последовательности, ответственной за упаковку. Полученная HSV-примкороиная плазмидная конструкция (см. главу 10).

Большинство систем доставки генов на основе HSV представляет собой модифицированные вирусные частицы, которые производят белки, необходимые для репликации и сборки вируса, но не образуют инфекционные вирусные частицы, поскольку его геном модифицирован и не способен упаковываться. Для получения рекомбинантного HSV осуществляют трансфекцию амфиокон-подобными и инфицированными вирусом периферическую клетку-мишень. ДНК ампли-

коны реплицируется (по типу «запаиваются» кольцом): (супер)линейная кольцевая ДНК (ряд митохондрий, а во внешней примкорои разрыв, и к специфичной 3' концевой OH группе линейной присоединяется нуклеотиды). Растущая цепь представляет собой линейную тандемную последовательность сегментов, концевых примкорои внутренней цепи, и, отсоединяясь от нее, сама становится матрицей для синтеза концевых примкорои цепей. В результате образуется линейная дуплетно-нечетная молекула множественная концевая примкорои ДНК: каждая ампликона состоит из 15 т. п. н., поэтому набор из 10 тандемных копий соответствует примерно среднему размеру HSV и упаковывается в HSV-капсид (рис. 21.9).

Рекомбинантный HSV можно получить и с помощью коинфекции клеток-мишеней, в которых вирус не может реплицироваться, с плазмидой ДНК HSV другого типа и плазмидой, которая содержит «терапевтический» ген. Флавопротеинный нуклеокапсидный ДНК не содержит целевых участков HSV-генома. ДНК HSV другого типа реплицируется в ядре клетки-мишени, при этом в результате рекомбинации «терапевтический» ген может встроиться в HSV-геном. Затем частицы как рекомбинантные, так и дикого типа HSV упаковываются и высвобождаются из клеток. Для рекомбинантного HSV в общем вирусном пуле очень мало, поэтому вирусы размножатся, а затем с помощью ПЦР или гибридизации выявляют «терапевтический» ген в обрабатываемых клетках. Рекомбинантный вирус вносят в условия, не допускающие его прикрепления HSV другого типа (рис. 21.10).

Лабораторные испытания на экспериментальных животных показали, что гены, доставляемые с помощью HSV-векторов в клетки мозга и периферической нервной системы, экспрессируются и поддерживаются длительное время. Однако по состоянию на февраль 2004 года клинические испытания HSV-векторов необходимо провести дополнительные исследования.

Невирусные системы доставки генов

В одноцепочечной вирусной упаковке генов участвуют клеточные рецепторы, с которыми вирусный белок прикрепляется к клетке-мишени, не разрушаясь. Активными ферментами, и мембраной

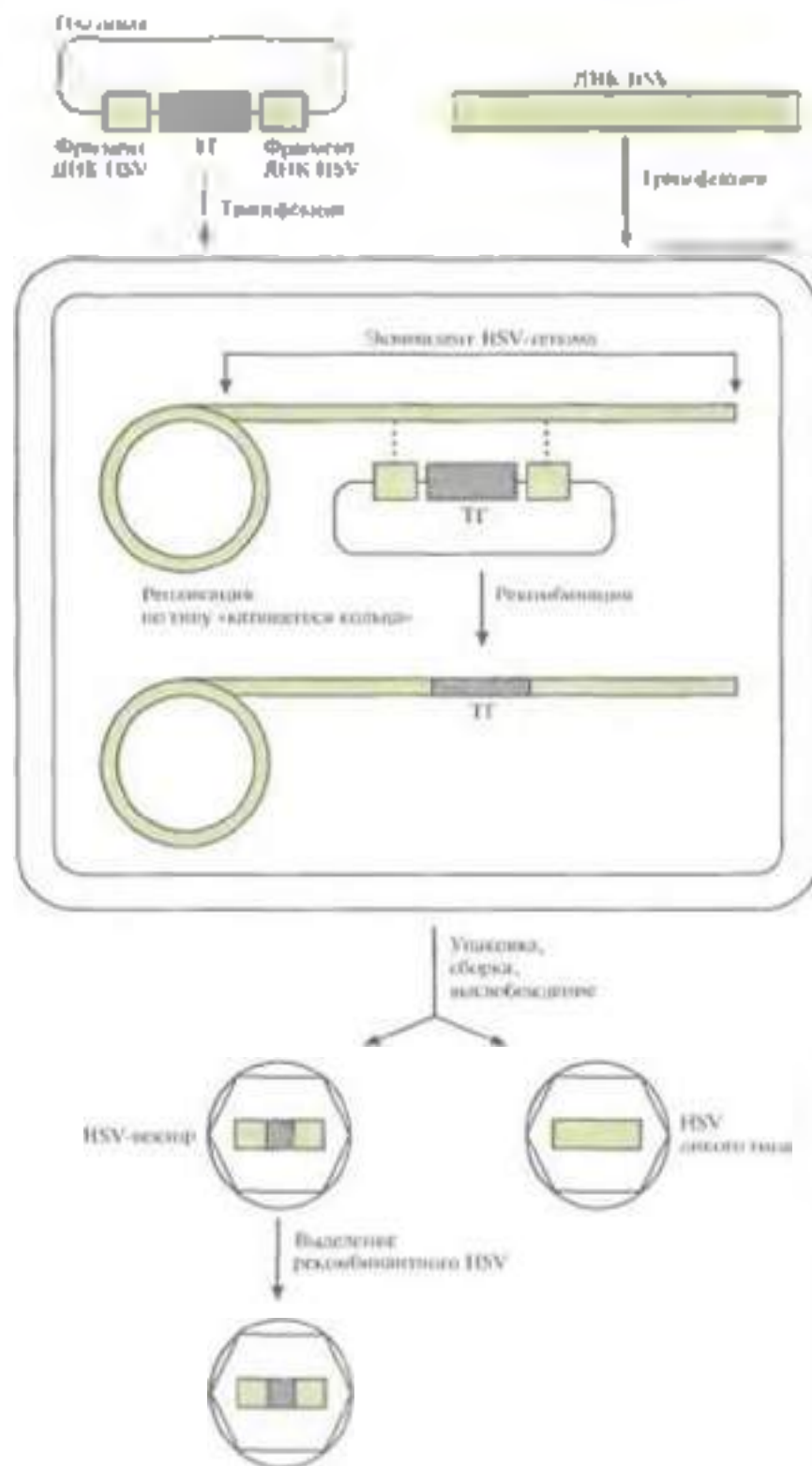


Рис. 21.18 Образование HSV-вектора с помощью рекомбинации. Проводит интранфекцию клетку-хозяина плазмидой, которая содержит «генетический» ген, фланкированный последовательностями ДНК из истинногерпетичной области HSV-гена, и ДНК HSV-виолы типа HSV-гена репродуцируется в клеточном ядре по типу «вставляется кольцо», при этом между фрагментами ДНК HSV, расположенными в составе ДНК HSV, любого типа может произойти рекомбинация (формирование линии). Молекулы ДНК HSV виолы типа и реконструированного HSV укладываются в герпетический капсид, выделяются из клетки после выхода вируса из цитоплазмы и проходят сборку в ядре для интенокапсуляции реконструированных HSV. Полученные HSV-векторы хранят в условиях, исключающих их репликацию. HSV-дефектный

целю генной «ружьей» клетки митоз или через митоз — клетки подложной культуры контролируются с ДНК-частицами: клетка диаметром 1–3 мкм. Введенные таким образом «терминаторы» гены экспрессируются в ткани-мишени, а их продукты поступают в кровь. Это может облегчить доставку терапевтического белка в ткань-мишень, прямой доступ в которую затруднен. Однако большинство белков, в норме не присутствующих в крови, инкапсулируются или разрушаются ее компонентами. Для решения этой проблемы нужны дополнительные исследования.

Проникновение ДНК через клеточную мембрану можно облегчить, окружив генетическую конструкцию искусственной липидной оболочкой, обратной липидной сфере (липосоме) с липиды содержащими. Создание липосом с разными ролями сопоставимо. Например катионные липосомы, поверхность которых заряжена положительными; они легко взаимодействуют с отрицательно заряженной молекулой ДНК, образуя ДНК-липидный комплекс (липидокс). Липидоксы легко образуются, относительно неопасны и неизменны, но эффективность переноса генов с их помощью невысока, поскольку большая часть ДНК после попадания в клетку уничтожается лизосомами и разрушается. Так в одном из классических испытаний по генной терапии муковисцидоза с помощью липидных комплексов липосом — СГТГ-ген частота трансфекции клеток (взрослого животного) оказалась довольно низкой, а экспрессия гена — непродолжительной.

Для доставки в клетки крупных генетических конструкций (>10 г. н. н.) с помощью эмбриональных клеточного транспозона, позволяющего избежать липидного разрушения ДНК, образуют комплексы ДНК с другими молекулами. Для этого поли-1-рядная олионуклеотиновая сыворотка, специфически взаимодействующая со специфическим клеточным рецептором, в шприц добавляют ДНК. В результате получается компактная, плотно скрученная структура (тор), на внешней поверхности которой располагаются сайты связывания с клеточным рецептором (рис. 2). 13). К сожалению, молекулярный механизм, обеспечивающий специфичность, обладает низкой эффективностью трансфекции. Все сходные к мо-

стольному времени испробованные системы доставки имеют два основных недостатка: 1) низкая частота трансфекции, не позволяющая достичь нужного терапевтического эффекта; 2) непродолжительное время экспрессии «терминаторского» гена, не обеспечивающее эффективного лечения.

Возможно, подобная или структурно близкая этому системе искусственная архитектура человека. Это связано с 1) плотностью упаковки и нет протраженную сегментов «жужеридной» ДНК вместе с полным набором регуляторных элементов для одного или нескольких «терминаторских» генов; 2) плотностью использованных элементов карикатуры «терминаторского» гена, обеспечивающей высокую эффективность его экспрессии; 3) стабильностью «терминаторского» гена и его длительной экспрессией как в пролиферирующих, так и в неделящихся клетках-мишенях.

Неклеточная хромосома содержит при определенных участках (теломеры), центромеры и точки инициации репликации. Структура теломерных объектов человека хорошо изучены, хотя нельзя сказать о центромерах и точках инициации репликации, и существуют опасения, что искусственно хромосому человека не удастся сконструировать, пока не будут окончательно изучены все ее элементы. Однако уже получены и культивируются и трансформированной культуре клеток стабильные являющиеся искусственные хромосомы человека (микротрехосомы), содержащие от множества ДНК-интернов (длиной около 1 м. н. н.) центромерной области Y-хромосомы, высокомолекулярных фторидовых олигонуклеотидов ДНК и теломерных участков. В на центромерную область был введен ген устойчивости к неомицину, что позволяло использовать среду G418 в качестве селективной. В нескольких G418 устойчивых клетках были обнаружены микротрехосомы длиной от 6 до 10 м. н. н.

Две из трех микротрехосомы были получены «усеченным» существовавшей хромосомы. В одном случае большая центромера была сдвинута, а в другом месте трансформированной центромерной области Гретия, полностью искусственно, микротрехосомы получали логотипически от 3-го трех трансформированных

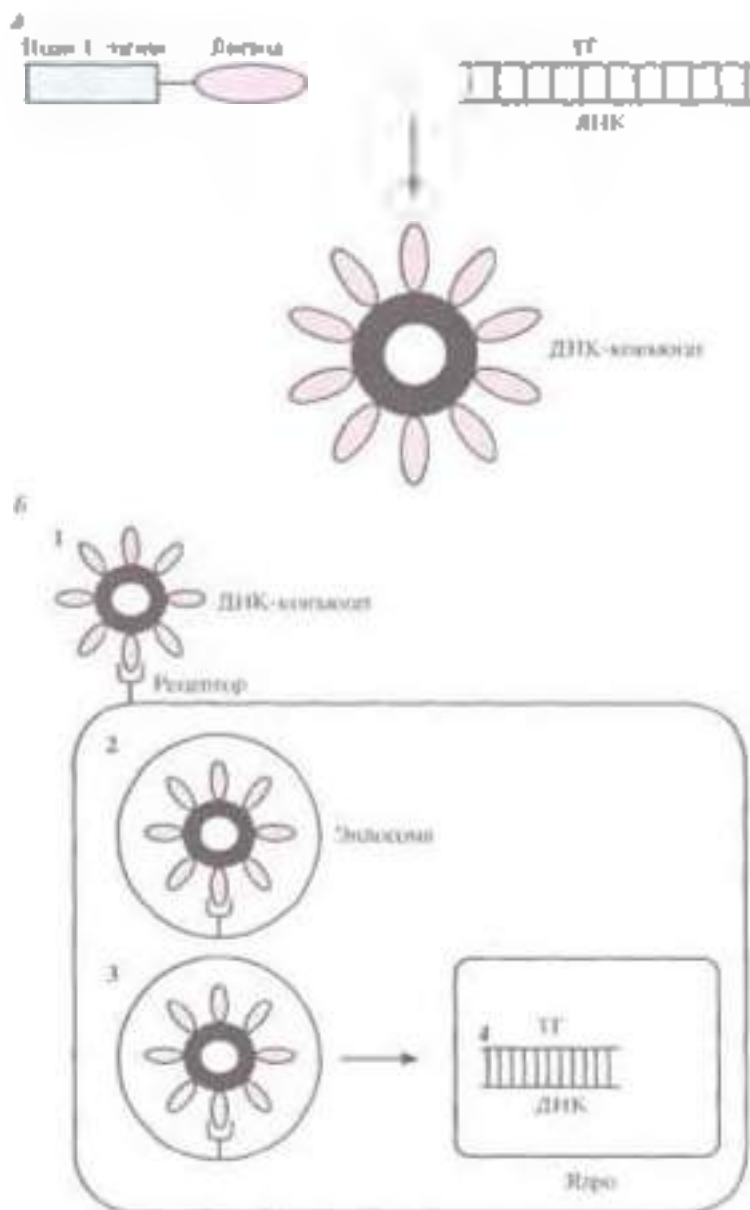


Рис. 21.18. Система доставки «генетически» измененных клеток с использованием ДНК-вируса. А. К концу 1-й стадии преципитации Агента, соединяющегося с рецепторными клеточными рецепторами, в добавление ДНК «интеркарирует» (встраивается) в ДНК. В результате образуется комплексная структура, на поверхности которой располагаются выходы. Б. ДНК-комплекс соединяется со специфическим клеточным рецептором (1) и образует «всплывающую мембрану» (2) с образованием эндосома (3). Цилиарный отросток отходит от эндосома. В эндосоме часть молекул ДНК высвобождается (4) как бы «взрывом» (5), где и происходит «интеркарирование» гена.

ДНК-элементов. Если, что является искусственно (применяется человек), содержатся «генетически» гены, являющиеся, на сегодняшний день проблемой станет доставка этой огромной молекулы ДНК в ядро клетки-мишени. Кроме того, доставка генов, находящихся в составе ДНК-блоков, на которые построена искусственная «транскрипция», может оказаться трудной и сложной на клетки-мишени. Для начала в ткани вирус(ов) можно попытаться инципировать

решить инкапсулирующие клетки с искусственными трансферами.

Активация трехместных лекарственных веществ («примарства»)

Несмотря на широкое применение хирургических методов лечения, лучевой и химиотерапии, злокачественные новообразования из-за вре-

му остается одной из основных причин смерти людей, поэтому задача разработки новых способов их лечения является весьма актуальной. Одним из таких способов является уничтожение пролиферирующих опухолевых клеток с помощью генной терапии [GCV: 9 (1,3-дидеокси-2-гидроксиметил)гуанин], активированного продукта гена тимидинкиназы вирусом простого герпеса (HSVtk). Для этого проводят in vivo трансдукцию или трансфекцию опухолевых клеток геном HSVtk, находящимся под контролем активного промотора, а через несколько дней вводят ганцикловир. Вирусная тимидинкиназа фосфорилирует ганцикловир с образованием ганциквирмонофосфата. Кинезы клеток животного происхождения фосфорилируют ганцикловир, что эффективно присоединяют фосфорные группы к его монофосфату с образованием ганцикловир трифосфата, который ингибирует ДНК-полимеразу и останавливает синтез ДНК, вызывая гибель пролиферирующих клеток. Кроме того, через медь-ионные контакты ганцикловиртрифосфат может проникать в нетрансфицированные опухолевые клетки, приводя к их гибели. Одна экспрессирующая ген HSVtk опухолевая клетка может уничтожить до 10 неэкспрессирующих клеток. Это явление называется «эффектом спящего».

Ген, вызывающий при определенных условиях гибель собственной клетки, называют геном «самоубийства», в термин «целлсмертность» относится к неактивной форме лекарственного вещества, которое активируется с помощью другого компонента терапевтической системы. Разработаны и другие комбинации «лекарство» – ген активатор, но система GCV - HSVtk исследуется чаще других.

Эффективность системы GCV - HSVtk доказана рядом доклинических испытаний. Однако I фаза ее клинических испытаний, в которых участвовали больные с терминальной стадией рака, не показала результатов. Возможно, ген HSVtk был трансдуцирован в слишком малое число опухолевых клеток и, несмотря на «эффект спящего», не мог подавить рост опухоли. В настоящее время разрабатываются новые подходы, которые смогут повысить частоту трансдукции и доставить ген HSVtk в клетки по всему объему опухоли.

Для генной терапии рака разработаны также комбинированные подходы. Исследователи для разных систем генов. В одном из них сочетаются GCV - HSVtk-терапия и генная иммунизация (рис. 21.12). Одну часть опухолевых клеток трансдуцируют геном HSVtk, вторую – клинированной cДНК (или геном) одного из цитокинов. Цитокины (интерлейкин 2, интерлейкин 12 и другие) играют роль сигнала, мобилизуя клетки иммунной системы и стимулируя ее иммунный ответ. Показано, что опухолевые белки, которые высвобождаются из клеток, уничтоженной в результате терапии с помощью гена «самоубийства», взаимодействуют с иммунными клетками, привлекаемыми к месту локализации опухоли циркуляцией, и запускают противопухольную иммунную реакцию. Кроме того, противопухольные агенты, присутствующие в кровотоке и циркулируя по всему организму, предотвращают метастазирование.

Этот подход к лечению терапии рака был апробирован экспериментально в лечении двоякоцистных мышечноинтродукционных клеток рака толстой кишки, рожденных трансдуцированными геном HSVtk одним из цитокинов. Введение ганцикловира оставалось респективным в лечении. Опухоль не возникла и при введении нетрансдуцированных опухолевых клеток в другие части животного. У контрольных животных в различных условиях происходила разрыв опухоли во всех местах введения нетрансдуцированных клеток рака толстой кишки. Несмотря на столь многообещающие результаты, прежде чем приступать к клиническим испытаниям терапии с использованием гена «самоубийства» или различных комбинаций генной терапии, необходимо установить, какие эффекты будут подавляться таким лечением и не вызовет ли оно побочных эффектов.

Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов

В большинстве традиционной генной терапии ex vivo и in vivo используются клонированные генетические конструкции, позволяющие функционизировать форму белка, который не синтезируется в организме больного или синтезируется в дефектной форме. Однако многие заболевания

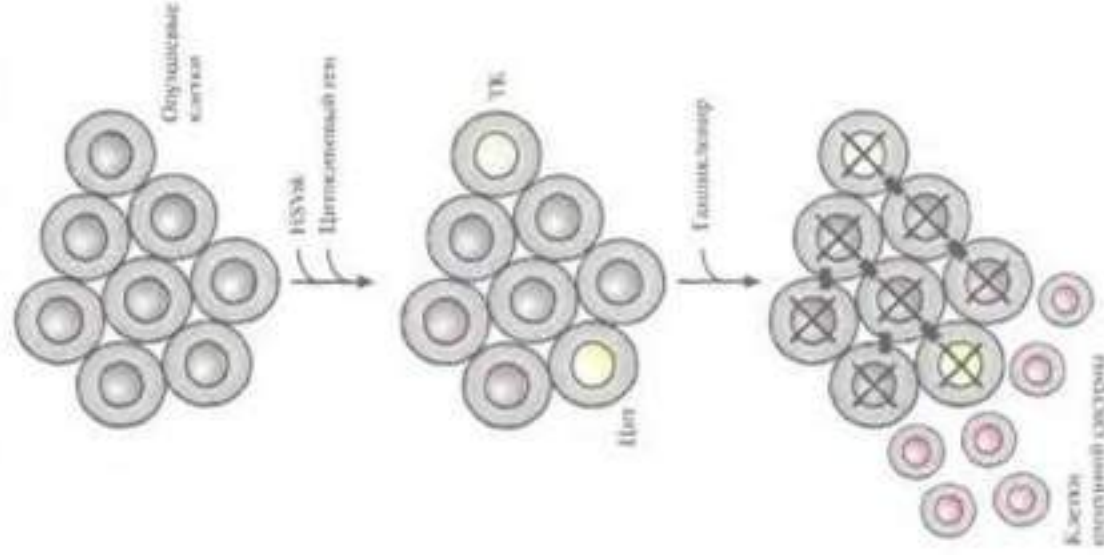


Рис. 21.12. Кольбицированная клетка с использованием HSV-1 HSV1-герпеса и генной инженерии. Опухолевые клетки трансформированы *in vivo* геном Цитопатического вируса простого герпеса (HSV1) и интродуцированы в клетки. Трансформированные клетки опухоль, которые синтезируют цитопатический белок, привлекают иммунные клетки, а те, которые синтезируют цитопатический белок (ТК), фосфорилируют гистонкиназу. Фосфорилированная гистонкиназа привлекает иммунные клетки, которые контактируют с опухолью (связаны с цитопатическим белком), связываясь с ДНК, уничтожают их (X).

человека (рак, воспаление, вирусные и паразитарные инфекции) связаны, напротив, с гиперпродукцией нормального белка. Для лечения таких состояний разработаны терапевтические

системы с использованием олигонуклеотидов. Небольшой олигонуклеотид может гибридизоваться со специфическим геном или мРНК и снизить уровень транскрипции или трансляции, уменьшая тем самым количество синтезируемого белка, ответственного за патологию. Олигонуклеотид, который гибридизуется с самим геном и блокирует его транскрипцию, называется «анти-геномным», а тот, который гибридизуется с соответствующей мРНК, — «анти-мессенджером». Анти-

геномные олигонуклеотиды в настоящее время используются в качестве терапевтических агентов для лечения рака. Для этого олигонуклеотиды синтезируют с помощью методов, описанных в главе 11. Олигонуклеотиды, которые гибридизуются с мРНК, могут использоваться для блокировки трансляции, что приводит к снижению уровня белка. Олигонуклеотиды, которые гибридизуются с самим геном и блокируют его транскрипцию, называются «анти-геномными», а те, которые гибридизуются с соответствующей мРНК, — «анти-мессенджером». Анти-геномные олигонуклеотиды в настоящее время используются в качестве терапевтических агентов для лечения рака. Для этого олигонуклеотиды синтезируют с помощью методов, описанных в главе 11. Олигонуклеотиды, которые гибридизуются с мРНК, могут использоваться для блокировки трансляции, что приводит к снижению уровня белка. Олигонуклеотиды, которые гибридизуются с самим геном и блокируют его транскрипцию, называются «анти-геномными», а те, которые гибридизуются с соответствующей мРНК, — «анти-мессенджером».

Синтез «анти-мессенджерных» мРНК *in vivo*

«Анти-мессенджерные» мРНК, которую предположительно использовать в качестве лекарственного средства, должны связываться с определенной мРНК и ингибировать трансляцию кодируемого ей белка, подавая тем самым патологический процесс (рис. 21.13). Для получения таких мРНК использовали экспрессирующие векторы, несущие ДНК-вставки в такой ориентации, чтобы их транскрипты были антисмысловыми по отношению к мРНК. В качестве примера можно привести элисомные экспрессирующие векторы, в которые встроены кДНК инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) или его рецептора

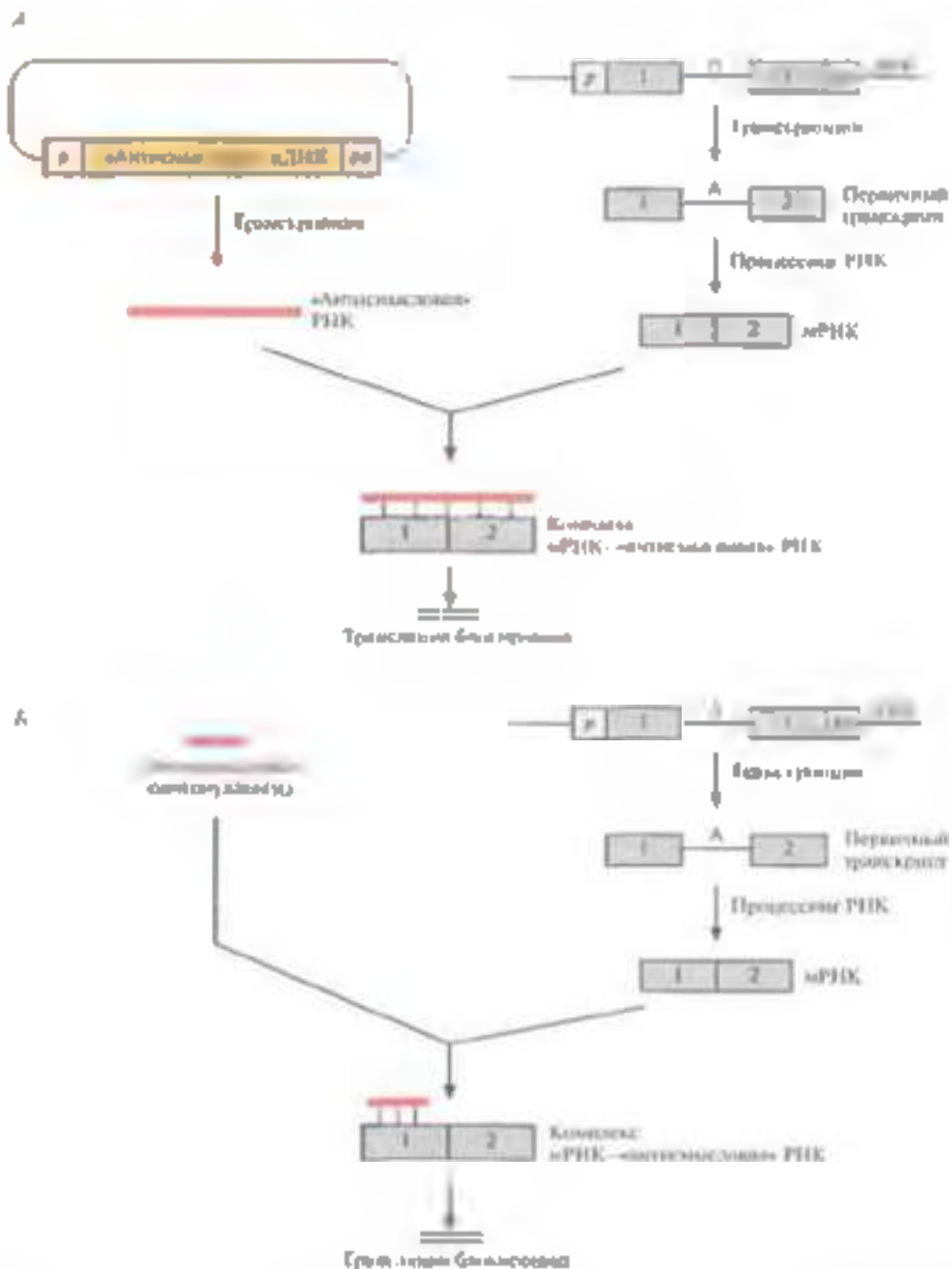


Рис. 24.13. Синтез транскриптов специфических мРНК с помощью «антисмысловых» генов. **А** мРНК синтезируется в эукариотической клетке в «обратной ориентации» и последующая специфическая обработка транскрипта приводит к синтезу «антисмысловых» мРНК. Эта мРНК транскрибируется с мРНК-матрицы и биологически транслируется. **Б** в клетку попадает «смысловый» матричный транскрипт, который транскрибируется с мРНК-матрицы и биологически транслируется. (Исходично р — промотор, Δ — сигнал терминального разрыва, А — инtron, 1 и 2 — экзоны.)

(IGF-1R), «находящиеся в обратной ориентации для минимального метаэпитопического взаимодействия», ингибируемого $ZnSO_4$, IGF-1 нарабатывается в избыточной количестве клетками злокачественными глиомами, наиболее распространенными опухолями головного мозга, в IGF-1R⁺ клетках карциномы предстательной железы.

Вектор, обуславливающий синтез «антисмысловой» мРНК IGF-1, трансфицировалась в культуру клеток глиомы. Если $ZnSO_4$ в культуральной среде отсутствовал, то синтез и трансляция IGF-1 опухолю сократилась, если же в среду добавляли $ZnSO_4$, то она исчезала. Другим эксперименте изучали последствия введения крысам не трансфицированных клеток глиомы в клетки, трансфицированные «антисмысловой» мРНК IGF-1. В первом случае опухоли развивались, а во втором – нет.

Если клетки карциномы предстательной железы крысы, трансфицированные «антисмысловой» мРНК IGF-1R, вводили мышам, то у них образовывались лишь небольшие опухоли или не образовывались совсем. Если же им вводили не трансфицированные или трансфицированные нормальной мРНК IGF-1R клетки, то раковые опухоли были почти в том же размере. По ширинному, в обоих случаях «антисмысловая» РНК гибридизуется с комплементарной ей мРНК и ингибирует трансляцию IGF-1 в IGF-1R, предотвращая пролиферацию опухолевой клетки.

«Антисмысловые» олигонуклеотиды как лекарственные средства

Германитический эффект синтетических «антисмысловых» олигонуклеотидов зависит от специфичности их гибридизации с доступным сайтом мРНК мишени, устойчивости к действию клеточных нуклеаз и наличия системы доставки в клетку. 15-20-нуклеотидные последовательности гибридизуются с уникальными мРНК с достаточно высокой специфичностью. Потенциальные сайты мишени определяют тестируемым набором «антисмысловых» олигонуклеотидов с использованием культуры клеток, синтезирующих мРНК-мишень. Для этого применяют электрофоретическое разделение клеточных белков, в которые включают радиоактивную метку на уровне трансляции, и с помощью

радиоанализа устанавливается, в присутствии или отсутствия «антисмысловых» олигонуклеотидов снижается синтез определенного белка. Никаких особых критериев выбора олигонуклеотидов-мишеней в рамках РНК-транскрипта не существует. Эффективными могут оказаться олигонуклеотиды, комплементарные 5' или 3'-концам мРНК, границам экзона и интрона и даже двучасточечным областям. Однако дезоксирибонуклеотиды разрушаются внутриклеточными нуклеазами, поэтому важно учитывать действие последних так, чтобы они не утратили способности к гибридизации с мишенью. Для этого можно модифицировать определенным образом нуклеозидные основания в дезоксирибозе (рис. 21.14). Так, у наиболее широко применявшихся сейчас «антисмысловых» олигонуклеотидов свободным атомом кислорода фосфодиэфирной связи заменен на сульфогруппу (рис. 21.14, А), в результате чего образуется ионносолевая связь. Модифицированные таким образом олигонуклеотиды растворяются в воде, несут отрицательный заряд и не растворяются под действием эндонуклеаз. При гибридизации с сайтом-мишенью они образуют РНК-ДНК-дуплексы, которые активируют рибонуклеазу (РНКазу) II, действующим ферментом, расщепляющим мРНК в гибридной молекуле. Приведены первые клинические испытания в виде олигонуклеотидов – лекарственных средств «первого поколения». Мишенями являются РНК ангиотензинопруса, пептида минималоцифитоза человека, в том же мРНК-генном присутствующих в раковой опухоли и вирусных заболеваний.

Синтезируются «антисмысловые» олигонуклеотиды с фосфорамидной и фосфоридной (пептидной) группами (рис. 21.14, В и Г). Такие молекулы очень устойчивы к действию нуклеаз. Химические группы, присоединенные к 2'-углеродному атому сахарного остатка и С-5-атому пиримидинона, также защищают «антисмысловые» олигонуклеотиды и обеспечивают их связывание с сайтом-мишенью (рис. 21.14, Д и Е). Все преимущества этих и других модификаций сочетают интеллектуально и изучаются.

Проникновение «антисмысловых» олигонуклеотидов в клетку можно значительно облегчить, привнеся их в антисмысловые клетки высшей

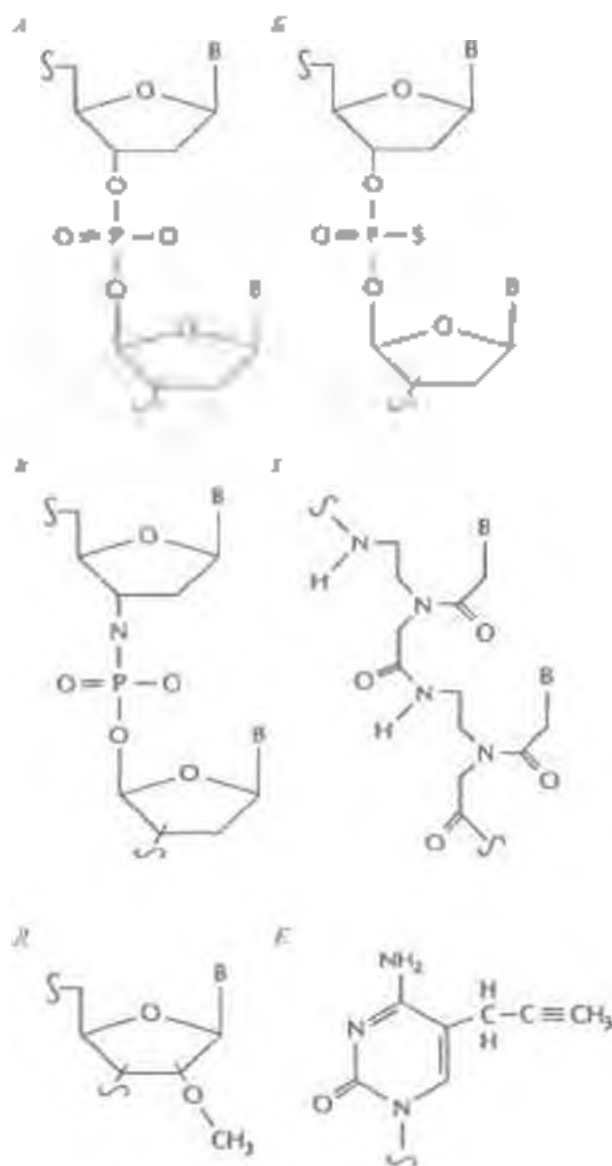


Рис. 2114. Модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды. А. Фосфатно-фосфатная связь. Б. Тетрафосфатная связь. В. Фосфатометилная связь. Г. Тетрафосфатная связь (основываясь на циклическом атоме). Д. 2'-O-метилрибозид. Е. С'-3-дифосфатидинитозин.

эффективной системы доставки позволяет исследовать «антисмысловые» олигонуклеотиды в небольших концентрациях. Если же контролировать анксионы с сайтами самовывода, специфичными для определенных генов, то можно будет осуществлять адресную доставку олигонуклеотидов.

Приведенные доклинические эксперименты показали, что «антисмысловые» олигонуклеотиды являются весьма эффективными лекарственными средствами. Изучено возможность их применения для лечения стеноза коронарной и сонных артерий, который приводит к инфарктам и инсультам. В этих случаях часто прибегают к ангиопластике, расширению артерий с помощью баллонного катетера, но примерно у 40% больных через 6 мес вновь возникает стеноз, поскольку ангиопластика стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток и секрецию межклеточного вещества во внутренней стенке артерий в месте ее расширения. В одном из экспериментов в сонные артерии крыс после ангиопластики вводили «антисмысловые» олигонуклеотиды с тифлофитиновыми сайтами, комплементарные мРНК, которые кодируют важные для клеточного цикла млекопитающих белки; в результате частота повторных стенозов уменьшилась на 90%. Проллиферации гладкомышечных клеток происходят также при атеросклерозе, сахарном диабете, осложненном после коронарного шунтирования. Вероятно, все эти состояния можно будет контролировать анксионными сайтами.

«Антисмысловые» олигонуклеотиды можно применять и для лечения вирусных инфекций и малярии. Кроме того, результаты I фазы клинической испытаний лечения болезни Крона с помощью оральной введения «антисмысловых» олигонуклеотидов противостриггелин чело показали терапевтический эффект без заметных побочных эффектов. В этом случае мРНК-мишень культивата мезэнхимальных адвентициальных фибробластов, например репликациии вируса, гистониз и извешенно колита.

В принципе «антисмысловые» олигонуклеотиды могут образовывать триплексы с участками ДНК и инициировать транскрипцию. Однако пока специфичность «антисмысловых» олигонуклеотидов не соответствует стандартам, принятым для лекарственных средств.

Олигонуклеотиды, связывающиеся с белками, антитромбинный аптамер

Блокировать экспрессию гена-мишени можно не только с помощью «антисенселевой» терапии, но и введенным в клетку олигонуклеотидом, связывающимся с фактором транскрипции или трансляции, однако этот подход пока недостаточно изучен. Далее, поскольку нуклеиновые кислоты способны связываться с белками, можно синтезировать галой олигонуклеотид (так называемый аптамер), который будет присоединяться к гиперэкспонированному белку, и таким образом связываться с какими-либо нуклеиновыми кислотами, и блокировать эти функции. Так, анти-тромбинный аптамер может стать эффективным средством профилактики тромбозов и кровотечения при различных хирургических вмешательствах.

Для его получения использовался набор численно синтезированных олигонуклеотидов, состоящий из 18-нуклеотидных фланкирующих областей (примерно) и центрального 60-нуклеотидного участка, где в каждой из 60 позиций может находиться любой из четырех нуклеотидов. Теоретически таким набором содержатся примерно $1,3 \cdot 10^{36}$ (4^{60}) олигонуклеотидов с разной центральной последовательностью. Образец пропустили через колонку, содержащую связывающие молекулы тромбина, присоединившиеся к тромбину олигонуклеотиды элюировали и повторно пропустили через колонку со связанным тромбином. Эту процедуру повторили не менее трех раз. Конечный набор тромбиновых аптамеров амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали, после чего определяли функциональные и биологические свойства полученных. Те аптамеры, которые обладали высоким специфичностью и анти-тромбиновой активностью, отбирали для более детального анализа.

Таким образом был получен эффективный анти-тромбинный аптамер. К сожалению, поскольку мы живем в мире, где это можно использовать только для временного ингибирования функции тромбина (например, при кардиологическом (гипертонии)), а в остальном, когда необходимыми для лечения являются специфические вещества (например, при онкологических), он ингибирующим (Умояшио, что они-

саями) процедуру идентификации аллельно можно использовать, и в случае других белков-мишеней.

Рибозимы как лекарственные средства

Рибозимы это природные РНК, обладающие каталитической активностью (РНК ферменты); их субстратом является один из присоединенных к комплементарной РНК-мишени с помощью водородных, ионных, других связей, и каталитический расщепляет ее в неспецифическом сайте. Модифицируя субстратную мишень, можно повысить специфичность, можно получить рибозим, специфичный по отношению определенной мРНК (рис. 21.15).

Создание «терапевтического» рибозима – сложный процесс. Связано это с трудностью получения больших количеств синтетически РНК и сохранении их в нативном состоянии в клетке-мишени. В одном из экспериментов синтезировали комплементарную РНК, которая содержит каталитический домен (примерно 20 нуклеотидов). Фланкирующий избирательно связывающийся с мРНК-мишенью последовательности (они же выступают в роли примеров), амплифицировали его, встроили в бактериальный экспрессирующий вектор и трансформировали полученной конструкцией клетки (образовавшиеся после трансформации рибозим расщепили мРНК ми-

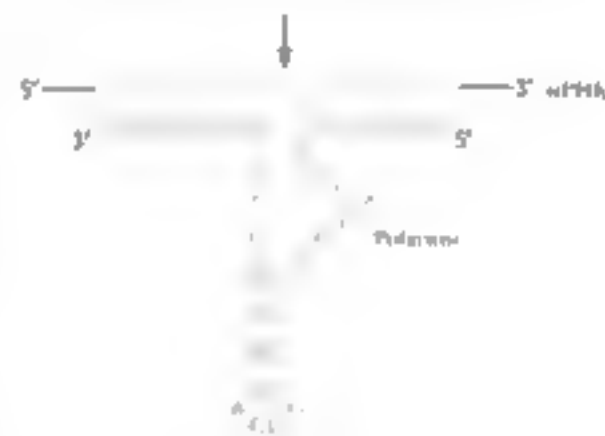


Рис. 21.15. Принцип действия мРНК-мишеней рибозимов. Рибозим, субстратом которого является модифицированный олигонуклеотид (примерно), связывается с мРНК-мишенью и расщепляет ее в неспецифическом сайте (показаны стрелкой). [Из работы Chang et al., in *Gene* 7: 471–476, 1993, с использованием.]

шести и половина транскрипции белка, ответственности за различие того или иного заболевания. Рыбушым, созданные методами генной инженерии, можно использовать для лечения рака и вирусных инфекций.

Природный ДНК-фермент (дезоксирибозимой) пока не обнаружено, но уже синтезированы олигонуклеотиды, обладающие каталитической активностью. Преимуществом дезоксирибозимой состоит в том, что даже на лабораторном уровне использовать «экспрессирующий вектор» ДНК-фермента можно упростить, в частности в доставить в клетку-мишень. Однако создание эффективных ДНК-ферментов на данный пока на начальной стадии развития.

Исправление генетических дефектов с помощью олигонуклеотидов

Многие генетические дефекты можно скорректировать, заменив поврежденный с данным дефектом парой нуклеотидов в мутантном гене на «правильную» пару. В одном из экспериментов для этой цели использовался 68-членный эфирный (ДНК-РНК) олигонуклеотид, который образует структуру с двумя головками и содержит метилированный кислород (на 2' углеродном атоме рибозы) (рис. 21.16). Выбор такого необычного олигонуклеотида основывается на следующих экспериментальных данных: 1) гетеродуплекс РНК-ДНК легче, чем дуплекс ДНК, спаривался с (гомологичными) нуклеотидами последовательности; 2) со-

ловки Шиндек, не участвуя в спаривании, защищают олигонуклеотиды от экзонуклеаз; 3) 2'-O-метилирование предотвращает разрушение молекулы РНКазой H. Важно и расположение нуклеотидов в кимерной молекуле: десять рибонуклеотидов фланкируют пять центральных дезоксирибонуклеотидов, причем этот сегмент имеет каноническую с широким последовательностью и содержит нормальную пару нуклеотидов.

Возможности коррекции мутаций с помощью кимерных олигонуклеотидов изучали с использованием как ДНК, кодирующей в составе п.20 пептида, так и химерной ДНК. В обоих случаях мутантный сайт с высокой частотой заменялся нормальным. Но для того чтобы кимерные олигонуклеотиды стали эффективными лекарственными средствами, необходимы дополнительные исследования.

Если мутация в интроне сопровождается системной процессией РНК как мутантный сайт слайсинга, то в процессированную мРНК включается часть интрона (рис. 21.17, А). Это приводит в свою очередь к синтезу и образованию укороченного белка. При этом количество нормального белка снижается, что может стать причиной заболевания. Разумно предположить, что если «антисмысловый» олионуклеотид, комплементарный мутантному интрону, гибридизуется с ним, то ошибочный сплайсинг блокируется, что повышает вероятность синтеза в нормальном сайте. Это предположение проверяли на β -глобулиновом гене с мутацией на



Рис. 21.16. Исправление генетического дефекта, осуществлено в форме олигонуклеотидов. С помощью кимерной олигонуклеотида (красный указание мутантный сайт) и способности митохондриальной матрицы и нормальная пара нуклеотидов в кимерной олигонуклеотида. Сравнительно с олигонуклеотидами полициклопидов. Препараты были обнаружены дезоксирибонуклеотида, и странными — рибонуклеотиды. Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, «блокирующие» процесс сплайсинга. Вертикальная черта указывает 2' и 3' углеродных атомов рибозы кимерной олигонуклеотида (Из работы Yoon et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 2071–2076, 1996, с изменениями)

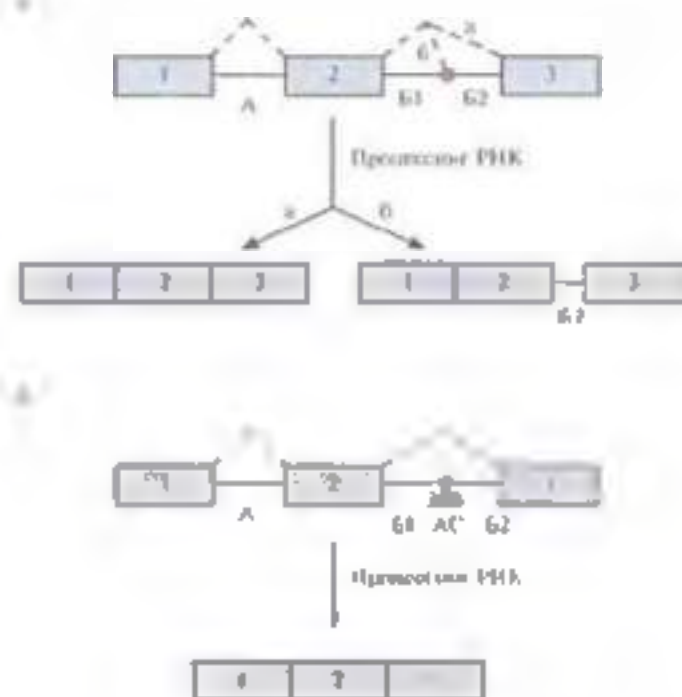


Рис. 21.17. Коррекция дефекта, приводящего к инверсионной сплайсингу, с помощью «анти-смысловых» интронных инверсий. А. Результат сплайсинга, происходящего в соматическом клеточном слое (белые/красные интроны – экзоны). А – первый интрон, В – второй интрон, содержащий инверсию (красный артефакт), расположенную с одной стороны (В1 и В2). Штриховые линии указывают участки РНК, определяемые при сплайсинге. Возможны два варианта сплайсинга: вариант А приводит к образованию функциональной мРНК, вариант В – к образованию РНК, в которой часть второго интрона (В2) и «Анти-смысловая» инверсия (АС), соединяющаяся с мутантным участком экзона, присутствует, что приводит к изменению при трансляции. В результате образуется только функциональная мРНК.

вторым интроном (рис. 21.17. б), обуславливающим одну из форм β -талассемии, наследуемого заболеванием «рети», которое приводит к разрушению эритроцитов (анемия). В клетках, страдающих от мутационного гена (IVS2-654), пептиды содержат инверсионные сайты «анти-смысловые» 1. О метаболитическом, компонентном мутационному сайту сплайсинга. В результате число нормальных β -глобиновых цепей увеличилось на 50%. Дальнейшие исследования показывают, является ли этот подход достаточно эффективным для лечения талассемии в других состояниях, вызванных подобными мутациями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для многих наследственных заболеваний пока что достаточно эффективным способом лечения не существует, и во многом это связано с трудностями получения и адресной доставки соответствующего генного продукта. После разработки методов идентификации и клонирования нормальных вариантов дефектных ге-

нов (часто в виде «ДНК») были предприняты попытки использовать их для коррекции генетических дефектов. Для лечения заболеваний на молекулярном уровне применяются два основных подхода: терапия термини ex vivo и терапия термини in vivo.

При генной терапии ex vivo «терапевтический» ген переносит в клонированные клетки больного с помощью ретровирусных векторов или других систем доставки), транспуцированные клетки культивируют и вводят пациенту. При этом у реципиента не развивается нежелательного иммунного ответа, но сама процедура является весьма дорогостоящей и трудоемкой. Альтернативный способ генной терапии ex vivo использует генно-инженерную модификацию патологических клеток, закреплённых в мембрану, которая предотвращает развитие нежелательного ответа и не препятствует высвобождению «терапевтического» генного продукта.

При генной терапии in vivo «терапевтический» ген вводят непосредственно в клетки пациента мишени больного. Для этого разработаны разные системы доставки: вирусные (ретрови-

русские, аденовирусы, вирусосоединенные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса) и невирусные (инъекции чистой ДНК, бомбардировка гелии ионными частицами ионизирующими с ДНК, шпиги клетками ДНК, включенной в липидную оболочку). Кроме того, разработаны вирусные и невирусные системы доставки генов, специфичные для определенных клеток.

Весьма перспективным способом разрушения быстроделящихся раковых клеток представляется (снова) активация декартезианского вещества. При этом наиболее широко используются водорастворимый иммуноцитотоксический индуктор и растворимые клетки гены модифицированы вирусом простого герпеса (HSV) и ганцикловири. В результате образуется ганцикловирициклофосфат, токсичный для быстроделящихся клеток. Цитобилин и метилсфингозинирующие клетки, контактирующие с HSV-модифицированными клетками («эффект свидетеля»).

В качестве лекарственного средства можно использовать не только ионные продукты, но и антигенные клетки. Стимулирование выделением «антигенных» олионуклеотидов можно повысить (активация или частично экспрессия) генов генов или многовалентными антигенами. Подход (с паразитом там) термини клеточный ген активирует в экспрессии вектор в обратном направлении, в результате чего образуется комплементарная инициальная мРНК ДНК-транскрипт, который связывается с ней и ингибирует трансляцию. У более распространенным явлением является в клетку-мишень «антигенной» олионуклеотидов избирательно со специфический мРНК и блокирует ее трансляцию. Эффективность «антигенной» олионуклеотидов в отношении для повышения в результате модификации, затрагивающих фосфорилирование генов, вымывания и переноса генов. В настоящее время и изучается терапевтическое действие различных олионуклеотидов модифицированных с помощью генов индукции дифференцировки, расщепляющих специфические мРНК, аптамеров, которые связываются со специфическими белками и блокируют их функцию: симбиоз генов, с помощью которых можно корректировать дефекты одной нуклеотидной цепи и мутации, являющиеся в направлении сплайсингу.

ЛИТЕРАТУРА

- Agarwal S. (ed.) 1996. *Antisense Therapeutics*. Humana Press Inc., Totowa, N. J.
- Altman S. 1993. RNA enzyme-directed gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10696-10700.
- Anderson W. F. 1992. Human gene therapy. *Science* 256: 800-813.
- Blaese H. M., K. W. Cohen, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chang, P. Tishchenko, J. J. Greenblatt, S. A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C. A. Stollen, W. J. Ramsey, J. Mudd, R. A. Morgan, W. F. Anderson. 1995. T lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: final trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480.
- Bordignon C., L. D. Notarangelo, N. Nobili, G. Ferrari, G. Casaroli, P. Poilan, T. Mazzuchetti, D. Maggioni, C. Rossi, P. Servida, A. G. I. F. Mazella. 1995. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA immunodeficient patients. *Science* 270: 470-475.
- Beaugar R. R. 1997. DNA enzymes. *Nat. Biotechnol.* 15: 427-431.
- Barford P., C. L. Chernicky, F. Rindland, J. Han, J. Hsu. 1996. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7263-7268.
- Caplan S. J., E. W. F. W. Altman, P. G. Middleton, J. R. Harris, B. J. Stevenson, X. Cao, S. R. Durrant, K. Jeffery, M. I. Hanson, C. Costello, L. Huang, D. J. Porteus, R. Williamson, U. M. Geddes. 1995. Liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* 1: 39-46.
- Cole-Strain A., K. Yoon, Y. Xiang, B. C. Bryce, M. C. Hlee, J. Gryn, W. K. Hildebrand, E. B. Kruse. 1996. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 273: 1386-1389.
- Coppola K., K. A. Morgan, W. F. Anderson. 1991. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Hum Gene Ther* 2: 5-14.
- Crytal R. G. 1995. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404-410.

- Cuñer K. W., F. W. Anderson, R. M. Blaese. 1991. Lymphocyte gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2: 107-109.
- Cuñer K. W., Z. Ram, S. Wallbridge, H. Ishii, E. H. Oldfield, R. M. Blaese. 1992. In vivo trans-*res* with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552.
- Dillingham A. D., R. Conrad. 1995. Aptamers as potential nucleic acid pharmaceuticals. *Bioelectrod. Assoc. Rev.* 1: 185-214.
- Fierich J. F., S. R. Wain, P. M. Hafrayze, M. Peschanski, E.-Y. Chen, Y. Chu, P. McDermott, E. K. Baetge, J. H. Kordover. 1997. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386: 393-394.
- Feeder P., K. W. H. Balgobal, E. Gout, S. Buffet, J. Chroboczek. 1997. Adenovirus deconstruction, a new vector for human gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 15: 52-56.
- Flotte F. R., B. J. Carter. 1995. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 2: 357-362.
- Grossman M., S. E. Haper, k. Kozarsky, E. A. Stein, J. F. Engelhardt, D. Muller, P. J. Lupien, J. M. Wilson. 1994. Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 6: 335-341.
- Harrington J. J., G. V. Bakken, R. W. Mays, K. Gystashaw, H. F. Willard. 1997. Formation of *de novo* centromeres and construction of first generation human artificial microchromosomes. *Ann. Genet.* 15: 345-355.
- Ishii-Morita H., R. Agbaria, C. A. Mullen, H. Hiram, D. A. Kuepke, Z. Ram, E. H. Oldfield, H. G. Johns, R. M. Blaese. 1997. Mechanism of bystander effect killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther.* 4: 244-251.
- Jiao S., P. Williams, R. K. Berg, R. A. Hodgeman, L. Ho, G. Rapetto, J. A. Wolff. 1992. Direct gene transfer into nonhuman primate insulines *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 3: 31-33.
- Jochanek P. R. Clemens, k. Mizal, H.-H. Chen, S. Chen, C. T. Caskey. 1996. A new adenoviral vector replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full length dystrophin and β galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5731-5736.
- Korber D. D., J. E. Alexander, C. L. Hubbert, D. W. Russell, A. D. Miller. 1997. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1426-1431.
- Lanza R. P., J. L. Hayes, W. L. Chick. 1996. Encapsulated cell technology. *Nat. Biotechnol.* 14: 1107-1111.
- Leib D. A., P. D. Otto. 1993. Gene delivery to neurons: is herpes simplex virus the right tool for the job? *BioEssays* 15: 547-554.
- Levy J. G., K.-Y. Liu, A. Korbavate, W. M. Flanagan, M. D. Matteucci, R. B. De Priore, R. A. Mook, Jr., R. W. Hendren, R. W. Wagner. 1996. A serum-resistant cytotectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3176-3181.
- Lyon J., P. Girault. 1995. *Altered Fates Gene Therapy and the Remaking of Human Life*. W. W. Norton & Company, Inc., New York, N.Y.
- Michael S. L., D. T. Curlet. 1994. Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.* 1: 223-232.
- Miller A. D. 1992. Human gene therapy comes of age. *Nature* 357: 455-460.
- Mulligan R. C. 1993. The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-932.
- Pachon N. A.-M., B. Heyd, N. Deglon, J.-M. Joseph, A. D. Yara, F. E. Baetge, J. P. Harwig, M. Goddard, M. Lysaght, F. Kapas, A. C. Kato, M. Schlug, I. Hiri, F. Regli, F. Porchet, N. De Tribolet. 1996. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogeneic cell line engineered to secrete hCNTF. *Hum. Gene Ther.* 7: 851-860.
- Putnam D. A. 1996. Antisense strategies and therapeutic applications. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 53: 151-160.
- Santoro S. W., G. F. Joyce. 1997. A general purpose RNA-cleaving RNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4267-4266.

- Sienkowska H., M. J. Szustade, S. Agrawal, R. Kale. 1996. Repate of thalassemic human β globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12840–12844.
- Sun W. H., J. K. Duckbolder, J. Sun, J. Culp, J. Turner, X. G. Fu, T. P. Fugh, W. B. Erdier, N.-S. Yang. 1995. *In vivo* cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2889–2893.
- Tone T., M. Kasbani-Sabet, T. Furota, T. Shimizu, E. Yoshida, H. I. Kasidani, M. Hama, O. Fohsindt, K. J. Scanlon. 1993. Suppression of EJ cells tumorigenicity. *In Vivo* 7: 471–476.
- Trojan J., B. K. Mossey, T. R. Johnson, S. D. Radin, M. Tykocinski, J. Pan, J. Han. 1992. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by epizyme-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4874–4878.
- Wagner R. W. 1994. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372: 333–335.
- Yoon K., A. Cole-Strauss, E. H. Kasper. 1996. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2071–2076.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое генная терапия *ex vivo*?
2. Опишите использование негематологичных клеток, модифицированных с помощью генной инженерии, для генной терапии *ex vivo*. Почему этот подход представляется весьма перспективным?
3. Что такое генная терапия *in vivo*?
4. Опишите подробно ее критичекие меры для эффективного системного адресного доставки генов.
5. Опишите подробно по крайней мере три наиболее перспективные системы доставки генов.
6. Что такое терапия с использованием «стимуляторов» сингуляризаторов?
7. С помощью каких модификаций можно увеличить время жизни и повысить эффективность «стимуляторов» сингуляризаторов как лекарственных средств?
8. Опишите способ лечения двукратственного ожирения животных с помощью гена PISVd.
9. Как можно модифицировать рибосомы, чтобы его можно было использовать в качестве лекарственного средства?
10. Как выделяют «термостойкий» витамин? В чем преимущества витаминов перед другими видами лекарственных средств?

Контроль исследований в области молекулярной биотехнологии и патентование биотехнологических изобретений

Все революционные технологии так или иначе влияют на развитие общества. С их появлением возникают разные проблемы - экономические, социальные, этические; все они обуславливаются внедрением в практику новых подходов, вытесняющих традиционные методы. Молекулярная биология не является исключением. Более того, имея дело с живыми организмами, она затрагивает действительно жизненно важные, давно сформировавшиеся устои, будоража общество. Возникают вопросы о правомерности использования новых биотехнологических подходов и о том, как обеспечить их контролируемое и безопасное внедрение. В ч. IV мы проанализируем некоторые социально значимые аспекты развития и применения методов молекулярной биотехнологии, в частности вопросы контроля исследований в

области рекомбинантных ДНК, производства генетически модифицированных пищевых продуктов, деятельности служб по контролю за распространением трансгенных организмов в окружающей среде, санкционирования разработок и практического применения методов геной терапии, а также проблемы патентования биотехнологических изобретений.

Контроль применения биотехнологических методов

Внедрение рекомбинантных технологий, в том числе и молекулярной биотехнологии, всегда сопровождается повсеместным вниманием со стороны общественности. Для одних новые технологии — это предвестник неминуемого катастроф, подрывающих самые основы общества. Такие люди считают, что любые новшества неизбежно таит в себе опасность, и избежать ее можно, только превратив весьма развитый. Другие смотрят на новые технологии как на путь к процветанию, из которого ни человечество неслыханно близи, и считают, что любые препятствия на пути развития лишают общество неоспоримых преимуществ. Они полагают, что рынок технологий сдвинет «звонки» вверх и вниз, чтобы они могли принести ожидаемые плоды. Третья группа людей придерживается промежуточной точки зрения. Ее представители считают, что никакие принципиально новые вообще не существует и любая «новая» технология — это развитие старой. Такие люди вполне устроят существующие методы контроля, уменьшающие риск, и эффект от новой технологии неизбежно вытеснит, как только она встанет на ноги.

Поскольку молекулярная биотехнология может оказать влияние на самые разные стороны жизни современного общества, в том числе на сельское хозяйство и медицину, необходимо учитывать все возможные при этом проблемы — этические, правовые, экономические и социальные. Еще в 1971 г. были высказаны серьезные сомнения по поводу безопасности технологии рекомбинантных ДНК. Ученым пришлось даже палочкой во-

ротерной на некоторые исследования в этой области до принятия официальных правил работы с рекомбинантными микроорганизмами. Согласно этим правилам, эксперименты можно было проводить только с теми из них, которые неспособны размножаться вне лаборатории, а сами исследователи родены были бы тщательно отобраны бы то ни было оемности. Правила были приняты в 1974–1975 гг. и после открытия рекомбинантных ДНК под пристальным вниманием прессы, так что общественность получила подлинное представление о последствиях — как негативных, так и позитивных — генетического манипулирования с живыми организмами. Тем не менее в конце 1970-х гг. все еще высказывались сомнения в безопасности работы с рекомбинантными ДНК. В частности, существовало мнение, что попадание генетически модифицированных организмов в окружающую среду может привести к неконтролируемому распространению их в экосистемах. Пришлось ввести дополнительные нормы, уменьшающие и без того небольшую вероятность событий такого рода.

Развернулась широкая дискуссия и по поводу этичности проведения генетических экспериментов на человеке. Цель ее заключалась в том, чтобы попытаться рационализировать то, что совершенно невозможно, и то, что вполне приемлемо. К сожалению, нельзя дать однозначного ответа на все этические, правовые и социальные вопросы, включенные в связи с разработкой различными приложениями молекулярной биотехнологии. Однако ставки в игре чрезвычайно высоки, поэтому детальный анализ проблемы необходим.

Контроль экспериментов с рекомбинантными ДНК

В 1974 г., когда стало ясно, что с помощью технологий рекомбинантных ДНК можно создавать организмы, несущие чужеродные (188), ученые, общественность и официальные лица «были встревожены по поводу безопасности этого нового подхода и возможных технических исследований его применения. Такие выражения, как «чужеродные с выном», «интродуцирование антигена», «самые опасные из проводимых исследований либо научных исследований», «творения человека великим изобретением» все чаще мелькали в прессе. Боялись всего: тревожило то, что случайно, а возможно, и целенаправленно, в военных целях, будут созданы патогенные, ранее не существовавшие и вирусы микроорганизмы, которые станут причиной эпидемий или экологических катастроф. В ответ на эти общественные ожидания группа ведущих молекулярных биологов предложила наложить моратории на некоторые эксперименты с рекомбинантными ДНК, особенно на те, в которых используются патогенные микроорганизмы.

В 1976 г. Национальные институты здравоохранения (NIH, от National Institutes of Health), ведущее исследовательское ведомство США, выделяющее денежные средства на работы в области медицины и здравоохранения, разработали директиву, регламентирующую проведение всех субсидируемых ими экспериментов с рекомбинантными ДНК. В ней четко оговаривались условия работы с рекомбинантными ДНК в лабораториях и выдвигались требования, чтобы в качестве хозяев для чужеродных ДНК использовались только микроорганизмы, неспособные размножаться вне стен лаборатории и передавать свою ДНК другим микроорганизмам. Для экспериментов с известными патогенными организмами, например, было рекомендовано использовать специально сконструированные, находящиеся под постоянным контролем изолированные боксы, в которых поддерживается отрицательное давление, а работы с менее опасными организмами можно было проводить в помещенных, оборудованных высокоэффективными системами фильтрации. Несмотря на то что директивы NIH не имели правового статуса,

большинство компаний, приступивших к работам с применением технологий рекомбинантных ДНК, добровольно выполняли все указанные требования. Более того, другие страны, принимая директивы NIH за основу, разработали собственные директивы для экспериментов с рекомбинантными ДНК.

Исходные директивы NIH были очень жесткими, и многие ученые считали, что их требования избыточны. Например, стоимость необходимого оборудования, обеспечивающего соблюдение всех строгих мер биологической безопасности, была столь высока, что небольшие компании и исследовательские группы были вынуждены отказываться от работ с рекомбинантными ДНК. Для возможного пересмотра этих директив был создан Консультативный комитет NIH по рекомбинантным ДНК (NIH Recombinant DNA Advisory Committee, NIH RAC). Он должен был контролировать исследования, связанные с рекомбинантными ДНК, и при необходимости изменять действующие правила. В его обязанности входило также организовывать открытые дискуссии по обсуждаемым принимаемым решениям, информирование о планируемых заседаниях, согласование времени их проведения. Необходимо было организовывать работу так, чтобы любые члены Комитета, могли обращаться в него по всем вопросам в его компетенции. Большинство членом Комитета составляли ученые, но в него вошли также специалисты по вопросам этики и представители общественности.

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

К 1980 г. первоначальные директивы NIH были пересмотрены в сторону смягчения требований, в основном касающихся экспериментальных данных, полученных в ходе исследований, финансируемых NIH-RAC и NIH. Например, было установлено, что микроорганизмы *Escherichia*

ель K-12, чаще других использовавшийся в лабораториях с рекомбинантными ДНК, не способен размножаться и длительное время существовать вне стен лаборатории. Кроме того, микробиологи убедили molecularных биологов и других заинтересованных лиц в том, что те меры безопасности, которые принимаются при работе с живыми организмами, соответствуют самым высоким стандартам и более жесткие меры не требуются. И наконец, была признана чрезвычайно маловероятным появление патогенного организма, если используемый для клонирования ген не «отщелкает» из патогенные свойства того организма, из которого он был выведен. По мнению большинства, при должном оснащении лабораторий можно обеспечить безопасность работников персонала. Однако в директивах NIH были добавлены специальные правила по обеспечению мер профилактики, исключая случайный выброс и окружающую среду генетически модифицированных организмов при их крупномасштабном культивировании.

После того как требования к мерам безопасности для большинства рутинных экспериментов были смягчены, исключая рекомбинантных ДНК стала быстро развиваться. Работники NIH, RAC и NIH приняли частную сделку существующие ранее условия. Однако остались две важные проблемы. Во-первых, как контролировать цикл производства и потребления пищевых продуктов, содержащих генетически измененные организмы или полученные с их использованием? Во-вторых, как убедиться в предельно возможном уровне безопасности ГМО в окружающую среду?

Третью фундаментальную проблему удалось разрешить, когда контролируемые органы приняли к выводу, что лекарственные препараты, полученные с помощью технологии рекомбинантных ДНК, аналогичны препаратам, полученным традиционными методами. И большинство стран существует четкая установка, что действующим норм, которые регламентируют коммерческое использование лекарственных препаратов, достаточно для того, чтобы обеспечить как производителей, так и потребителей, независимо от способа получения препарата (традиционная технология или технологии рекомбинантных

ДНК). Пользование, согласно которому проверка на безопасность и эффективность должен подвергаться только сам продукт, привело к одобрению лекарственных средств, вакцин, диагностических систем и других продуктов, полученных с помощью технологий рекомбинантных ДНК.

Контроль за производством и потреблением пищевых продуктов и пищевых добавок

В США контроль за производством и поступлением на рынок пищевых продуктов, лекарственных и медицинских средств осуществляет Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA, от англ. Food and Drug Administration). Безопасность пищевых продуктов и пищевых ингредиентов, в том числе добавок, приводящих к продуктам специфический вкус и запах, должна быть гарантирована еще до получения лицензии, разрешающей на введение в оборот и подтверждающей, что такие продукты можно употреблять в пищу. FDA в своей деятельности руководствуется многократной одобренной, но не в полной мере устоявшейся системой сертификации новых пищевых продуктов и пищевых компонентов. Ее разработчики отметили, что эти сертификации ставятся под сомнение интересами промышленными предприятиями и не являлись законными жестами. Как FDA, так и производители пищевых продуктов, чьи интересы представляет Международная совет по пищевой биотехнологии, отстаивают (хотя-то весьма убедительно) ту точку зрения, что все таки необходимы в регулировании новых нормативных актов, регулирующих производство и потребление пищевых продуктов и пищевых компонентов, получаемых с помощью технологий рекомбинантных ДНК, поскольку любой генетически измененный пищевой продукт или пищевой ингредиент (независимо от способа его получения) и так должен пройти проверку на токсичность, чистоту и безопасность. Если в результате генетических манипуляций (например, связанных с процедурой селекции или использованием самой технологии рекомбинантных ДНК) состав утвержденных

ГДА видный продукт или биологический материал изменяется, то компания-производитель, проверив такие продукты на безопасность, должна убедиться их специфическим образом, уже до момента от того, что новый продукт является от традиционных.

Химизм

Новые пищевые продукты обычно подвергаются комплексной проверке. Однако, чтобы упростить процедуру тестирования и снизить себестоимость продукта, при лицензировании учитывается сходство нового продукта с известным, который и предполагается вывести на рынок. Например, FDA утвердила к применению фермент химизма, полученный с помощью технологии рекомбинантного ДНК и предназначенный для производства сырок, если соответствует следующие испытания не были проведены в полном объеме. Химизм, один из ключевых ферментов сычужа животного, является сброженным молоком пробиотическим ферментом, который гидролизует казеин. В результате такого гидролиза в молоке образуется сырок, который в свою очередь ферментируется с брожением сыра. Обычно сброженным молоком вент, используемый при производстве сыра, получают из четвертой части желудка животных (сычужа); он представляет собой смесь веществ, известных под общим названием «сычужный фермент».

Чтобы обеспечить надежный, удобный и по возможности наиболее дешевый промышленный способ получения химизма, клонировали его ген клонировали и экспрессировали в *E. coli* K-12. Готовый продукт был выделен из бактериальных клеток, и в FDA направлена просьба дать разрешение на коммерческое использование рекомбинантного химизма для промышленного производства сыра. Перед FDA встал вопрос: какие критерии использовать в этом случае? Поскольку применение сычужного фермента, содержащего химизма, в сыродельной промышленности имеет долгую историю, FDA решила установить, что если рекомбинантный химизм идентичен природному ферменту, то дополнительное тестирование проводить не обязательно. По существу вино, запрашивающее разрешение, должно было лишь подтвер-

дить, что рекомбинантный химизм идентичен сычужному ферменту. Идентичность клонированного и природного генов химизма была подтверждена рестрикционным картированием, ДНК-гибридизацией и секвенированием ДНК. Кроме того, было показано, что рекомбинантный химизм обладает такой же молекулярной массой, что и природный очищенный химизм телескопа, и идентичной с ним биологической активностью.

Далее, необходимо было показать, что рекомбинантный химизм безопасен для применения. Компания представила данные, подтверждающие, что конечный препарат, экстрагированный из бактериальных телескопов выделения и прошедший все необходимые этапы очистки, не загрязнен целыми бактериальными клетками, клеточным debrisом и другими примесями, в том числе нуклеиновыми кислотами. Кроме того, многочисленные исследования показали, что штамм *E. coli* K-12 нетоксичен и безопасен для человека. Результаты тестирования на животных не выявили никаких побочных эффектов препарата, что свидетельствовало об отсутствии в нем токсинов. После изучения всей полученной информации FDA пришла к выводу, что рекомбинантный химизм может быть разрешен для коммерческого использования.

Триптофан

Привлечением, занимающиеся контролем производства и поступлением на рынок пищевых продуктов и пищевых ингредиентов, полученным с помощью технологии рекомбинантного ДНК, часто руководствуется в своей работе так называемым «привлечением» (case-by-case law). В каждом случае вопрос рассматривается отдельно, и в зависимости от решения официального органа проводится те или иные тесты на безопасность продукта. Производители предпочитают (и оказывают давление на правительство), чтобы соответствующие государственные органы разработали универсальный набор тестов для всех продуктов, полученных методами генной инженерии, однако такое инициатива не получила поддержки. Включение пищевых продуктов, полученных на основе технологии рекомбинантного ДНК, в число това-

рив, разрешенный к употреблению, проводят чрезвычайно осторожно, прежде всего потому, что неприемлемые выводы, изначально казавшиеся пропорциональными, впоследствии могут привести к неожиданным и даже трагическим последствиям.

В течение 1989–1990 гг. в США отмечалось редкое увеличение встречаемости синдрома латентной энцефалопатии (СЭМ). Это в общем-то редкое заболевание характеризуется тяжелыми, мучительными мышечными болями и может закончиться смертью больного в результате спонтаных летальных путей. Большинство пациентов с СЭМ употребляли в качестве пищевой добавки аминокислоту триптофан, причем в больших количествах. Каждый раз, когда пытались установить корреляционные триптофаны, выходящие на одну и ту же химическую комбинацию. Обнаруживались корреляции между потреблением триптофана и развитием СЭМ. Обескураживало, поскольку до этого не было обнаружено никаких негативных последствий применения триптофана в качестве пищевой добавки. В ходе дальнейших исследований обнаружилось, что все партии некачественного триптофана были получены с помощью штамма генетически трансформированных бактерий, специально сконструированных для того, чтобы обеспечить сверхпродукцию триптофана. Компания сошла, что этот штамм идентичен предыдущему и поэтому не стала проводить дополнительные тесты на безопасность продукта. В то же время одна из стадий очистки триптофана, как считалось, несущественная, и исключать, хотя все контрольные тесты на качество очистки конечного продукта оставались прежними.

Как показали результаты химического анализа коммерческих продуктов, полученных с помощью генетически модифицированных штаммов, эти продукты содержат метаболиты триптофана, в том числе 5-гидрокси-триптофан (5HT). Сначала образующие 5HT были связаны с нарушением метаболизма триптофана у новорожденных. Наряду с основным исследованием, целью которого было установить, способен ли 5HT вызывать СЭМ, проводились другие эксперименты, в ходе которых выяснилось, что 5HT продуцируют и штаммы другого

штама. Анализ на токсичность выявил способность 5HT вызывать патологические изменения у крыс, сходные с симптомами СЭМ, а также – что было совсем неожиданно – способность самок триптофана, хотя и в меньшей степени, вызывать некоторые симптомы СЭМ. Как следствие L-триптофан, даже не содержащий никаких примесей, был запрещен в США для употребления человеком. С тех пор было связано повышение 5HT в составе прежде безопасного продукта, как и осталось неизвестным. Большинство сошлось на мнение, что причиной было именно в методе очистки. Возможно, при старом способе очистки 5HT эффективно удалялся, хотя компания об этом не подумала.

Один из уроков, который можно извлечь из этой истории, заключается в том, что хотя генетическая инженерия может оказаться в нишу, биологическая идентичность между исходным штаммом и его генетически модифицированным дубликатом не должна упускаться из виду. Это относится как к штаммам, полученным традиционными способами, так и к штаммам, полученным генноинженерными методами. Более того, производители теперь осознают, что даже несущественные технические изменения в способе очистки могут привести к изменению состава продукта. Другое дело, что они дальше придерживаются. Многие компании не хотят подвергать всестороннему исследованию их токсичности те продукты, которые, как они считают, уже были тщательно проверены. Однако большинство производителей придерживаются мнения, что, несмотря на издержки, «лучше безопасность, чем неприемлемость».

Бычий соматотропин

Безопасность продуктов, полученных с помощью новых технологий, – это только одна из тех проблем, которые возникают перед обществом и связаны с появлением таких технологий. Примером эффективной и безопасной технологии, как принято, однако, обществом с распространяемыми опасениями, может служить получение рекомбинантного бычьего соматотропина (БСТ), и особенно также под его влиянием держки роста крупного рогатого скота.

В 1980-х гг. было показано, что введение БСТ коровам в значительной степени повышает их

удобность. Поскольку получение природного БСТ в больших количествах весьма трудно и дорого, он не нашел широкого применения в молочной промышленности. С помощью технологии рекомбинантных ДНК ген БСТ был клонирован в *E. coli*, синтезированный рекомбинантный БСТ выделен из бактериальных клеток и очищен. Как и ожидалось, уродить коров, которым был введен рекомбинантный БСТ, удалось лишь на 25–30%.

БСТ, содержащийся в молоке, был исследован в обширном эксперименте на безопасность у коров, получавших рекомбинантный БСТ. Его концентрация в молоке была не выше, чем у контрольных животных. Более того, БСТ не влиял в организме человека, и все тесты на токсичность не выявили никаких побочных эффектов. Используя все доступные результаты исследования, FDA привело к выводу, что как мясо, так и молоко коров, получавших рекомбинантный БСТ, безопасно для человека. Это заключение поддержало Ведомство по охране технологий США после того, как был проведен независимый анализ многочисленных данных по тестированию БСТ.

Сначала одна мощная лоббирующая группа выступила единым фронтом за то, чтобы разрешение на использование рекомбинантного БСТ, выданное FDA, было заблокировано. В основе ее действий лежали экономические соображения, касающиеся последствий применения рекомбинантного БСТ для молочной промышленности. Члены группы считали, что это приведет к снижению многочисленных мелких молочных ферм, поскольку для получения того же количества молока понадобится меньше коров. Кроме того, высказывались опасения, что молочная промышленность будет монополизирована крупными корпорациями в ущерб интересам независимых производителей. По мнению, эти экономические аргументы были обоснованными и уж, конечно, любая группа людей имеет право протестовать против того, что может представлять угрозу для ее существования. Однако основной причиной резкой кампании, развернувшейся против использования рекомбинантного БСТ, послужило соображение, что «гормоны», полученные искусственным путем, могут нанести вред человеку и вызвать

образование злокачественных опухолей. То, что для получения БСТ использовалась технология рекомбинантных ДНК, еще более усилила эмоциональный накал.

Начиная экономические аргументов, противники БСТ высказывали соображение, что его использование увеличит частоту бактериальных инфекций молочных желез (маститов) у коров. Это потребует применения большего количества антибиотиков, что приведет к появлению их концентрации в молоке и в связи с чем может вызвать аллергические реакции у людей, употребляющих такое молоко в пищу. Кроме того, повышение количества антибиотиков может привести к усилению явления устойчивости к ним патогенов. Однако Консультативный комитет по безопасности при FDA, проведя соответствующий анализ, пришел к выводу, что частота маститов у коров, получавших БСТ, не выше, чем у коров, не получавших этого препарата.

Рекомбинантный БСТ был лицензирован в США для применения в молочной промышленности в 1994 г. Однако во многих других странах по сих пор существует временный запрет на продажу молока от коров, получающих такой БСТ. По-видимому, этот запрет обуславливается социально-экономическими причинами, а не опасениями возможным влиянием БСТ на здоровье людей.

Многие высказывались в начале 80-х годов, стоявшие с производством и потреблением пищевых продуктов, полученных с помощью технологий рекомбинантных ДНК, постепенно расселись после того, как FDA и аналогичные организации в других странах обеспечили выполнение всех процедур, необходимых для оценки возможности риска от использования таких продуктов. Производители предпочитают, чтобы число тестов, которые должен пройти или иной продукт – начиная с этапа разработки и заканчивая поступлением на рынок, – было минимальным. Двойная ответственность при этом ложится на принимающие организации. Они должны заботиться об охране здоровья общества в целом и в то же время – об устранении любых барьеров на пути внедрения новых разработок. Со временем, по мере накопления новых данных, жесткость существующих норм

может быть ослаблена и приняты более простые тесты. Сильно важно, чтобы все эти изменения не вводились для удобства, в ущерб безопасности.

Контролируемое высвобождение генетически модифицированных организмов в окружающую среду

К 1982 г. стало ясно, что имеет смысл разработать правила проведения открытого тестирования в полевых условиях организмов, полученных с помощью методов генной инженерии, с тем чтобы иметь возможность контролировать их высвобождение в окружающую среду. Однако ни правила, ни протоколы, которые могли бы показать создание таких организмов, какую информацию необходимо включать в заявки на разрешение полевых тестирования, написаны не были. Такая неопределенность объяснялась было малыми средними молекулярными массами, что организмы, полученные с помощью методов генной инженерии, мало чем отличаются от своих немодифицированных предшественников. А если различие все-таки существует, то это легко выявить с помощью подробных биологических тестов.

В 1982 г. в NIH-RAC поступили три заявки на проведение полевых испытаний ГМО. Две из них относились к генетически модифицированным рис-генам (кукурузе и тобачку), а третья касалась тестирования генетически модифицированного штамма микроорганизма *Rhizobium lotiflorum*, предположительно определять, способен ли такой штамм снижать уровень повреждения рис-генной при заморозках. Этот прецедент стал поворотным моментом в регламентировании процедур, применяемых контролировать высвобождение ГМО в окружающую среду.

Rhizobium lotiflorum, не образующие кристаллы льда

Генетическое модифицирование *R. lotiflorum* осуществляло, в частности, удаление гена, который кодирует белок, ответственный за образование кристаллов льда. Тестирование должно было определить, способен ли модифицированный штамм при распылении на листьях растений предотвращать их повреждение при заморозках. *R. lotiflorum* дианома типа, обычно обитающий на

листьях, секретирует белок, который при низких температурах вызывает образование кристаллов льда. Это и является причиной повреждений. Стратегия опыта состояла в нанесении модифицированных бактерий на листья еще до их колонизации бактериями дианома типа. Это мероприятие должно было дать значительный экономический эффект; например, в США ущерб, наносимый заморозками, оценивается в 1 млрд долларов в год.

Получив заявки на проведение полевых испытаний ГМО, NIH-RAC предпринял такие же действия, как и для тестирования экспериментов с рекомбинантными ДНК, а именно:

1. Заявки включались в Федеральный реестр США.
2. Информация о них рассылалась МПР заинтересованным лицам.
3. Предложения рассматривали комитеты экспертов.
4. Какое предложение одобряется, на основании следующих
4. Параллельно заявки рассматривались и самим NIH-RAC, а также Министерством сельского хозяйства США.

После тщательного анализа Министерство и NIH-RAC вынесли положительное решение по заявке на тестирование штамма *R. lotiflorum* с удаленным геном белка, ответственного за образование кристаллов льда, а в 1983 г. директор NIH окончательно одобрил указанный прецедент. Однако в тот самый день, когда было выдано разрешение на проведение полевых испытаний, был подан судебный иск на блокирование. Его подали организации под названием Фонд экологической политики, возглавляемая Дороти Ридманом, которая находилась в безоговорочной оппозиции по отношению ко всем экспериментам в области генной инженерии. Иск был удовлетворен, причем в решении указывалось, что NIH-RAC не провел должных слушаний в соответствии с законодательством США и, что более важно, не затребовал данных о безопасности модифицированных организмов для окружающей среды.

Это судебное решение четко продемонстрировало, что, несмотря на юридически обоснованное

институт NIH-RAC и других научных работников и нем экспертов, существующие нормы, результаты полевых испытаний (МО), нельзя признать адекватными. За пределами NIH-RAC преобладало мнение, что создание генетически модифицированного организма в окружающей среде может иметь отдаленные последствия, поскольку живые микроорганизмы размножаются, персистируют и распространяются в окружающей среде и иногда передают свою генетическую информацию другим микроорганизмам. Некоторые критики программы по регулированию высвобождения ГМО в окружающую среду утверждали, что генетически модифицированные организмы вытеснят существующие виды из из экологических ниш, что приведет к серьезным неблагоприятным изменениям в окружающей среде. Кроме того, высказывались опасения, что гены могут передаваться от ГМО природным (в том числе, могут возникнуть (как и непредвиденным путем) экологически опасные организмы. Конечно, все эти аргументы отчасти минимизированы в крайне маловероятных случаях воздействия ГМО на окружающую среду, однако несомненно, что прибила, регулирующие полевые испытания ГМО, должны были предусматривать достаточно оценку возможного риска.

В настоящее время за оценку рисков, предусматривающих неконтролируемое высвобождение ГМО в окружающую среду, в США отвечает Агентство по охране окружающей среды и Министерство сельского хозяйства. Национальные институты здравоохранения только разработали набор критериев для полевых испытаний ГМО, вitech передали свои правила в этой области другим организациям.

Агентство по охране окружающей среды приняло решение рассмотреть две заявки, которые касались бактерий, дефектных по гену белка, ответственного за образование кристаллического тела, как стандарт для разработки правил, регламентирующих полевые испытания всех ГМО. Каждое предложение подвергалось критическому анализу, который включал оценку испытаний с точки зрения безопасности для окружающей среды, экологических последствий и потенциального влияния на здоровье человека, а также подробное изучение самого ГМО. В

работе принимали участие следующие организации:

- Управление по оценке программ по использованию пестицидов Агентства по охране окружающей среды.
- Комитет по планированию исследований токсичности веществ и Экспертный комитет Агентства по охране окружающей среды.
- Административный совет Агентства по охране окружающей среды.
- Министерство сельского хозяйства, FDA и NIH.
- Научная консультативная группа, состоящая из микробиологов, фитопатологов и специалистов по общей экологии.
- Различные государственные агентства, в том числе Департамент сельского хозяйства шт. Калифорния.

Кроме того, должны были проводиться открытые публичные слушания.

Нельзя было представить, что столь сложная, занимавшая много времени и значительные ресурсы процедура может войти в повседневную практику утверждения полевых испытаний ГМО. Выяснилось преждевременно, что по мере накопления опыта такой подход будет угрожать без потери эффективности оценки возможного вреда для окружающей среды. После очень сложной аналитической процедуры по каждой заявке наконец было выдано разрешение на проведение полевых испытаний (бактерии, дефектных по гену белка, который ответствен за образование кристаллического тела). Однако в обоих случаях, несмотря на различия в условиях испытаний, местными жителями, обеспокоенным высвобождением ГМО в окружающую среду в непосредственной близости от их домов, удалось получить решения суда о временной приостановке таких испытаний. А тем временем Агентство по охране и Министерство сельского хозяйства разработали более совершенные методики оценки риска от создания ГМО в окружающую среду. Кроме того, за это короткое время персонал данных ведомств дополнил свою квалификацию, необходимую для обработки и анализа данных, представленных и заявил на рассмотрение полевых

вых испытаний. Усилиями ученых, в том числе и жоголов, были «запущены» исследовательские программы, позволяющие оценить последствия высвобождения ГМО в окружающую среду на модельных системах, а научные организации сформулировать основные положения, позволяющие решить, оказывает ли данный ГМО побочное воздействие на окружающую среду.

В конце концов в 1987 г. на специально выделенных участках в шт. Калифорния были проведены полевые испытания ускоренных бастерий. Результаты показали, что эти бактерии не распространяются за пределы участков, где проводилось тестирование, и не персистируют ни на территории. На одном из участков обитали в кристаллах льда на рисовых при температуре, на 1 °C более низкой по сравнению с обычной температурой. Сеть «инфицирующей» бактерии практически не используется для защиты сельской местности растений от повреждения при заморозках.

Открытые полевые испытания других генетически модифицированных организмов

С момента первого тестирования бактерий, о котором шла речь выше, было проведено множество открытых полевых испытаний других ГМО. Они показали, что, как правило, внесенные в окружающую среду ГМО не распространяются за пределы участка, где проводилось тестирование, не персистируют, не передают свои гены природным микроорганизмам и проявляют сходную биологическую активность как в лабораторных, так и в природных условиях. Поскольку с каждым ГМО могут быть связаны разные побочные эффекты, при вынесении окончательного решения о полевых испытаниях каждый случай рассматривается в отдельности. Подобного рода испытания проводились в США, Великобритании, Австралии и других странах. Однако биотехнологические компании особенно занимались созданием генетически модифицированных микроорганизмов. Предназначившихся для использования в природных условиях, поскольку стоимость полевых испытаний была чрезвычайно высока, при том что не было уве-

ренности в положительном исходе даже при условии усиленного проведения полевых испытаний. И все же можно констатировать, что становится все больше сторонников точки зрения, что высвобождение в окружающую среду генетически модифицированных микроорганизмов, проведенных лабораторные и полевые испытания, не будет иметь неблагоприятных экологических последствий.

Что касается полевых испытаний генетически модифицированных животных, то специалисты высказываются о них с большой осторожностью. Например, для определения способности некоторых трансгенных рыб существовать в природных условиях в США был построен чрезвычайно сложный аквариум, в котором были воссозданы эти условия. Трансгенными называли рыб и невозможность их отлова браконьерами. В отличие от этого в тестировании трансгенных растений с увеличенной характеристикой, предельно ценными для человека являются в пищу, относились не так строго. Преобладало мнение, что большинство таких растений не отличаются от обычных сортов, полученных путем селекции. В США все генетически модифицированные растения — независимо от способа модификации — должны проходить испытания в полевых условиях и все процедуры тестирования, необходимые для получения лицензий на их применение. При этом в полевых испытаниях трансгенных растений содержались гены инсектицидов или гены, обеспечивающие защиту от вирусной инфекции представляются дополнительными требованиями.

В США трансгенные растения, несущие ген токсина *Bacillus thuringiensis*, в том числе кукуруза, соя, картофель и хлопчатник, были утверждены в качестве основных всеми административными организациями. В противовестительность этому, попытки использовать гены таких растений от Флориды были блокированы международным объединением неправительственных связей, а во Франции было запрещено выращивание (но не потребление) трансгенной Я.д.-кукурузы. Очень многие люди по разным причинам (и по непосредственным последствиям или по социально-экономическим соображениям) по-прежнему относятся с недоверием ко всем ГМО.

ВАЖНАЯ ВЕЩА

Возможная биологическая угроза, связанная с рекомбинантными ДНК

R. Berg, D. Baltimore, H. W. Boyer, S. M. Cohen, K. W. Davis, D. S. Doolittle,
H. Kubli, J. D. Watson, S. Weinberg, and N. D. Zinder

Science 185: 303 (1974)

После того как Коэн и др. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1240-1244, 1973) сообщили о создании экспериментальной репродукции ДНК в плазмиде в присутствии матрицы, возникло серьезное беспокойство по поводу безопасности в этических последствии использования репродукции ДНК. Такие дискуссии привели к созданию временного Комитета по рекомбинантным нуклеиновым кислотам, куда вошли ведущие ученые-завоеватели биологии. Главным делом комитета было рассмотреть все возможные биологические угрозы. В 1974 г. Комитет опубликовал широко обсужденное, так называемое «Письмо Берга», одновременно в трех основных научных журналах: *Science*, *Nature* и *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

В своем сообщении Берг и его соавторы заявили, что экспериментальная репродукция ДНК в присутствии матрицы не представляет угрозы безопасности в лабораторных

условиях, и тем самым общественности сообщили о своем мнении. Их заключение основано на том, что репродукция ДНК в присутствии матрицы происходит в клетках-хозяевах. Более того, автор письма утверждал, что природные структуры, которые представляют интерес общественности, следует разработать, реализовать и проверить рекомбинантными методами, а не экспериментальными с использованием рекомбинантных ДНК. Они также указывали на необходимость проведения международной встречи ученых, с тем чтобы обсудить методы работы с рекомбинантными системами с биологической точки зрения рекомбинантных ДНК. Они не могли бы также не упомянуть о необходимости проведения международной конференции в Калифорнии, на которой ученые могли бы обсудить риск экспериментальной рекомбинантной ДНК и разработать меры безопасности.

Вместо этого необходимо соблюдать в лабораториях при проведении экспериментов, а также при использовании плазмиды-хозяина, репродукции ДНК. В результате конференции (Berg et al., *Science* 185: 991-994, 1975) вышло постановление Национального института здравоохранения в 1976 г. о рекомбинантных ДНК, которое регулирует проведение экспериментов с рекомбинантными ДНК.

После Берга обратило внимание общественности на возможность и осуществимость репродукции рекомбинантных ДНК в живых организмах нуклеиновые кислоты. Это представляет собой интересный пример того, как ученые пытаются оценить риск, связанный с разработкой новой технологии, еще до того, как были известны какие-либо серьезные свидетельства ее существования.

Введение в действие законодательных актов, регулирующих распространение ГМО в окружающую среду, — непростая задача, и лишь немногие страны смогли это. Как мы уже говорили, необходимо гарантировать безопасность применения ГМО для человека и окружающей среды как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе, и в то же время не блокировать полезные разработки. Еще греческий законодатель Солон, живший в 638-559 г. до н. э. однажды сказал: «Законы должны быть такими: все мелкое и мягкое издается, а крупное прощается». Если говорить о контролируемой выработке ГМО в окружающей среде, то ни одно правительство не хочет, чтобы «ручная лопата» ускользнула.

Генная терапия человека

Генная терапия человека в широком смысле предусматривает введение в клетки функционально активного гена (генов) с целью исправления генетического дефекта. Существуют два возможных пути лечения наследственных болезней. В первом случае генетическая трансформация подвергают соматические клетки (клетки, отличные от половых). При этом коррекция генетического дефекта ограничивается определенными органами или тканями. Во втором случае изменяют генотип клеток зародышевых тканей (сперматозоидов или яичных клеток) или оплодотворенных яйцеклеток (зигот), чтобы все клетки развивающегося из них индивидуума носили «исправленные» гены. В результате ген-

ной терапии с использованием клеток зародышевой линии генетические изменения передаются из поколения в поколение.

Политика в области генной терапии соматических клеток

В 1960-е представители католической, протестантской и иудейской общины США написали открытое письмо Президенту с изложением своих взглядов на использование генов человека применительно к человеку. Для оценки этических и социальных аспектов этой проблемы были созданы Президентская комиссия и комиссия Конгресса. Это были очень важные инициативы, поскольку в США введение в действие программы, затрагивающих интересы общества, часто осуществляется на основе рекомендаций подобных комиссий. В окончательных заключенных отчете комиссии провозглашались четкие границы между генной терапией соматических клеток и генной терапией клеток зародышевой линии. Генная терапия соматических клеток была отнесена к стандартным методам медицинского вмешательства в организм, сходным с транскрипционной операцией. В провозглашаемой этому генной терапии клеток зародышевой линии были отмечены этически очень сложной и проблематичной с точки зрения этики, чтобы безответственно начинать ее практическое применение. Был сделан вывод о необходимости выработки четких правил, регулирующих исследования в области генной терапии соматических клеток; разработать подобные документы применительно к генной терапии клеток зародышевой линии были решены преждевременной. Чтобы избежать все нежелательные действия, было решено прекратить все эксперименты в области генной терапии клеток зародышевой линии.

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

лишь адаптированы применительно к биомедицинским целям.

Биомедицинское законодательство было пересмотрено и дополнено в 1970-е гг. в ответ на обнаруженные в 1972 г. результаты 40-летнего эксперимента, проводившегося Национальной службой здравоохранения США в Алабаме на группе из 400 неграмотных афроамериканцев, больных синдромом Эдвардса. Эксперимент был поставлен для того, чтобы изучить естественное развитие указанного заболевания, передается ли по родовому пути, никакого лечения при этом не проводилось. Известие о таком человеческом опыте на территории штата о нем люди попросили многих в США. Конгресс немедленно прекратил эксперимент и издал закон, запрещающий когда-либо вновь проводить подобные исследования.

Среди вопросов, адресованных людям, которые подавали ходатайство на федеральные эксперименты в области генной терапии соматических клеток, были следующие:

- Что представляет собой заболевание, которое предлагается лечить?
- Насколько оно серьезно?
- Существуют ли альтернативные методы лечения?
- Насколько опасно предлагаемое лечение для больных?
- Какова вероятность успеха лечения?
- Как будут отбираться больные для клинических испытаний?
- Будет ли этот набор беспристрастным и непредвзятым?
- Как больные будут информированы об испытаниях?
- Какого рода информацию следует им сообщать?
- Каким образом будет получено их согласие?
- Как будет гарантироваться конфиденциальность сведений о больных и проведении исследований?

Когда эксперименты в области генной терапии только начинались, большая часть заявок на клинические испытания направлялась Комитетом по этике того учреждения, где предполагалось осуществлять исследования, и

только потому они пересматривались в Национальном институте здоровья человека NIH-RAC. Последний оценивал заявки с точки зрения их научной и медицинской значимости, соответствия действующим правилам, убедительности доказательств. Если заявка отклонялась, ее возвращали назад с необязательными комментариями. Авторы заявки могли пересмотреть предложение и переадресовать его. Если заявка утверждалась, то NIH-RAC обсуждал ее в публичных дискуссиях, используя ее же сильные аргументы. После одобрения заявки на этом уровне директор NIH утверждал ее и подписывал разрешение на клинические испытания, без которых они не могли быть приняты. Кроме того, поскольку тестирование методов генной терапии соматическими клетками подразумевает использование новых генетических конструкций, заявка рассматривалась также FDA. В этом последнем случае особое внимание обращалось на способ получения продукта, методы качественного контроля его чистоты, а также на то, какие дополнительные испытания были проведены, чтобы убедиться в безопасности продукта.

Но, поскольку число заявок со временем увеличивалось, а генная терапия становилась, по словам одного комментатора, «высшим приоритетом в медицине», принятая первоначально процедура утверждения заявок была признана непригодной трудоемкой и избыточной. Соответственно после 1991 г. NIH уже не подал в число утверждений, контролируемых исследователями в области генной терапии человека. Если NIH-RAC и будет существовать, то он скорее всего станет организатором форумов по обсуждению этических проблем, связанных с генной терапией человека. А пока требования, согласно которым все заявки в области генной терапии должны обсуждаться публично, сняты. FDA, ответственный за контроль производства и использование биологических продуктов, проводил все необходимые оценки конфиденциально, чтобы гарантировать соблюдение права собственности разработчиков. В настоящее время генная терапия человека считается безопасной медицинской процедурой, так и не особенно эффективной. Пышная уверенность ранее оптимистически рассуждала, и она стала одним из основных нововведений к лечению заболеваний человека.

Большинство специалистов считают процедуру утверждения немыслимой в области генной терапии соматических клеток человека в США. Однако адекватной; она гарантирует беспристрастный отбор больных и их информированность, а также осуществление всех манипуляций самым лучшим образом, без причинения вреда как конкретным больным, так и человеческой популяции в целом. В настоящее время в других странах тоже разрабатываются правила проведения экспериментов в области генной терапии. В США это было сделано в результате тщательного и всестороннего анализа предложения. Как свидетельствуют участники слушаний, организованного NIH-RAC в январе 1989 г., доктор Лерой Уолтерс, директор Центра по биотехнике при Джорджтаунском университете в Вашингтоне, округ Колумбия: «Я не знаю никакой другой биомедицинской науки или технологии, которая бы подвергалась столь всесторонней проверке, как генная терапия».

Никаких дефектных генов в будущем показывает

Существует мнение, что лечение генетически измененных с помощью генной терапии соматических клеток неизбежно приведет к увеличению генфонда человеческой популяции. Это основывается на представлении, что частота дефектного гена в популяции будет увеличиваться от поколения к поколению, поскольку генная терапия будет способствовать передаче мутантных генов следующим поколениям от тех людей, которые до этого были неспособны произвести потомство или не могли дожить до репродуктивного возраста. Однако эти утверждения оказались неверными. По данным популяционной генетики, для существенного повышения частоты вредного или летального гена в результате эффективного лечения требуются тысячи лет. Так, если какое-то редкое генетическое заболевание встречается у одного из 100 000 жизнеспособных новорожденных, то пройдет примерно 2000 лет после начала применения эффективной генной терапии, прежде чем частота указанного заболевания удвоится и составит 1 случай из 50 000.

Помимо того что частота летального гена от поколения к поколению почти не повышется, в результате длительного лечения всех, кто в этом

нуждается, тем более отдельные индивидуумы тоже остаются неизменными. Это положение можно проиллюстрировать примером из истории эволюции Нильми, в том числе и человек. Методы были синтезированы живыми живыми витаминами С, они должны излучать его из внешних источников. Таким образом, можно сказать, что мы все генетически дефекты по гену этого живого витаминного вещества. В противоположность этому инфанти, ретиниты, иници и координативные, неогосподи-еся к витаминам, синтезируют витамин С. И тем не менее генетический дефект, обуславливающий неспособность к биосинтезу витамина С, не «помешал» устойчивой адаптации приматов на протяжении более миллиарда лет. Сходным образом, и коррекция других генетических дефектов не приведет к существенному ухудшению «здоровья» гена и будут иметь последствия.

Генная терапия клеток зародышевой линии

Эксперименты в области генной терапии клеток зародышевой линии человека сейчас строго запрещены, однако придется признать, что исключительно генетические заболевания можно вылечить только таким путем. Методология генной терапии клеток зародышевой линии человека разработана или в недостаточной. Однако не мы ищем сомнений, что с развитием методов генетического манипулирования на животных и эмбрионального трансплантации представляющих как эмбрионов так и пробел будет оплодотворен. Кроме того, поскольку генная терапия соматических клеток становится все более рутинной процедурой, это скажется и на отношении людей к генной терапии клеток зародышевой линии человека, и через некоторое время возникнет необходимость ее тестирования. Остается только надеяться, что к тому времени все проблемы, связанные с последствиями применения генной терапии клеток зародышевой линии человека, в том числе социальные и биологические, будут урегулированы.

Считается, что генная терапия человека может помочь в лечении серьезных заболеваний. Действительно, она способна обеспечить коррекцию ряда физических и химических нарушений, хотя остается неясным, сойдет ли общество приемлемым такое применение генной терапии. Подобно какому-либо другому новому медицинскому вмешательству, генная терапия кле-

ток зародышевой линии человека вызывает многочисленные вопросы, в частности:

- Какова стоимость разработки и внедрения методов генной терапии клеток зародышевой линии человека?
- Должно ли правительство устанавливать приоритеты медицинских исследований?
- Не приведет ли приоритетное развитие генной терапии клеток зародышевой линии к сверхъестественно работ по поиску других способов лечения?
- Удастся ли охватить всех больных, которые в этом нуждаются?
- Сможет ли физическое лицо или компания получить исключительные права на проведение лечения конкретных болезней с помощью генной терапии?

Клонирование человека

Интерес общественности к возможности клонирования человека возник в 1960 г. и, после того как были проведены соответствующие эксперименты на овцах и являл. Эти исследования показали, что ядро оплодотворенной яйцеклетки можно вынуть из ядра недифференцированной клетки, и при этом эмбрион будет развиваться нормально. Таким образом, с помощью можно вынуть ядро из недифференцированной клетки какого либо животного, ввести их в оплодотворенные яйцеклетки того же животного организмов и получить потомство с тем же генотипом, что и у родителя. Другими словами, каждый из организмов-потомков можно считать генетическим клоном исходного донорского организма. В 1960-е гг. казалось, что, несмотря на отсутствие технических возможностей, не составляет труда экспериментально реализовать клонирование животных и человека. В прессе появились многочисленные статьи на эту тему, были даже написаны научно-фантастические произведения. Одним из рассказов был посвящен клонированию верховного учителя президента США Джона Ф. Кеннеди, однако более популярной темой было клонирование забора. Произведения и клонирование человека были не только экстравагантными, но и пролицированными (шпачоную и весьма опасную идею, что личностные особенности, характер и другие качества

человека образованный и высокоинтеллектуально его генотипом. Не самым же диле человек как личность формируются под влиянием как своего генома, так и внешней среды, в частности культурных традиций. Например, хмельная трава, который производит Фитцер, – прекраснейшее поведенческое качество, не определяемое каким-то одним геном или их комбинацией. В другой среде с таким культурным особенностями из «клона» растения Фитцера не обязательно сформируется бы человек, подобный реально существующему Фитцеру. Сложным образом, из «клина» матеря Терезы не обязательно «появятся» бы женщины, посвятившие свою жизнь помощи бедным и больным в Калькутте.

По мере развития методов репродуктивной биологии млекопитающих и создания галлюцинозных препаратов животных становилось все более очевидным, что клонирование человека – дело не столь отдаленного будущего. Предположение стало реальностью в 1997 г., когда была клонирована овечка, названная Долли. Для этого использовалась ядро дифференцированной клетки дощечной сумчатой овцы. Методический подход, который использовался при создании Долли, в принципе пригоден для получения клонов любых млекопитающих, в том числе и человека. И даже если он не оправдает себя применительно к млекопитающим другим видом, по-видимому, не потребуются слишком много экспериментов, чтобы разработать подходящий метод. В результате клонирование человека тотчас станет предметом любой дискуссии, которую вызовет успех или провал генетики и биологической медицины.

Без сомнения, клонирование человека – сложная и противоречивая проблема. Для одних смысл идея в создании клоны уже существующего индивида путем экспериментальных манипуляций представляется неприемлемой. Другие считают, что клонированный индивидум – это то же самое, что и оригинальный индивид, несомненно на равнине в природе. И, следовательно, клонирование по своей природе не законсервировано, хотя, возможно, не так уж необходимо. Клонирование может дать положительный социальный и социальный эффект, оправдывающий его проведение в исключительных случаях. Например, оно может охватиться жизненно важно для ро-

дителей больного ребенка. Ответственно омыти по клонированию человека во взрослых регулируется законодательно, но все исследования, связанные с клонированием человека, запрещены. Таких ограничений недостаточно, чтобы исключить возможность решения любой. Однако вопрос о необходимости клонирования человека обязательно возник в

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Репродуктивные технологии, к которым относятся и молекулярная биотехнология, редко встречаются безотвратною поддержкой. Общественность ответственности по поводу создания различных организмов методами геномной инженерии имела серьезные последствия и привела к разработке строгих правил, регулирующих исследование в области рекомбинантных ДНК, и утверждению требований, которые должны удовлетворять биотехнологические продукты, поступающие на рынок. В этой главе мы рассмотрим различные аспекты регуляции исследований в области рекомбинантных ДНК, промышленности и потребления пищевых продуктов, полученных с помощью методов геномной инженерии, высококачественно генетически модифицированных организмов и окружающей среду, экспериментов, связанных с геномной терапией соматической клеток и клеток зародышевой линии, клонированию человека.

Правила, регулирующие проведение экспериментов с рекомбинантными ДНК, были разработаны Национальным институтом здравоохранения США в конце 1970-х гг. и пересмотрены в начале 1980-х гг. Однако остаются две неурегулированные проблемы. Во-первых, как регулировать производство и поступление на рынок продуктов, полученных с помощью геномной инженерии? Во-вторых, как осуществлять контроль за высококачественно генетически модифицированными организмами в окружающей среду? Производители считают, что никакие специальные правила, регулирующие производство и поступление на рынок продуктов, полученных с помощью генноинженерных технологий, не нужны и аргументируют свою точку зрения тем, что самое главное – продукция продуктов

и его свойства, а не то, как он был получен. Такой подход используется в США для проверки фармацевтических препаратов. Однако это порождает мышечные добавки, полученные с помощью методов генной инженерии, возмущают большинство ученых. В своем FDA США, которая несет ответственность за безопасность как фармацевтических средств, так и пищевых компонентов, использует прецедентный подход для решения вопроса о безопасности мышечных продуктов, полученных с помощью методов генной инженерии. Каждый продукт должен пройти тестирование на соответствие ряду специфических критериев в зависимости от своей природы, прежде чем он будет разрешен к употреблению человеком.

Напротив, высвобождение организмов, полученных с помощью методов генной инженерии, в окружающую среду регулируется на основании общей привилегии. Сразу после того как общественность узнала об экспериментах с рекомбинантным ДНК, возникли опасения, что ученые смогут получить — преднамеренно или случайно — организмы, способные нанести большой вред окружающей среде. В результате в США были разработаны специальные и достаточно жесткие правила, регламентирующие полные испытания организмов, полученных с помощью методов генной инженерии.

Возможность генетического изменения человека всегда вызвала серьезные беспокойства. С методологической точки зрения генная инженерия человека подразделяется на термину терминно соматических клеток и термину терминно клеток зародышевой линии. Поскольку только терминно клеток зародышевой линии может оказать наследуемое воздействие на последующие поколения, в настоящее время они запрещены. В то же время терминно соматических клеток становится все более важным методом лечения различных заболеваний человека. Разработанные в США правила, регламентирующие ее осуществление, включают нормы, регулирующие исследования в области рекомбинантного ДНК, и биомедицинские этические критерии, которым должны соответствовать все эксперименты, связанные с медициной.

После того как в 1997 г. удалось клонировать млекопитающее, ому Долли, вопрос о клони-

ровании человека привлек внимание общественности и вызвал бурные дискуссии. Сейчас все эксперименты по клонированию человека в большинстве стран запрещены. Однако вопрос о принципиальной возможности клонирования человека еще ждет своего решения.

ЛИТЕРАТУРА

- Аллушник. 1990. Biotechnology and food: assuring the safety of foods produced by genetic modification. *Regul Toxicol Pharmacol*. 12: S1-S196.
- Berg P., M. Slinger. 1995. The recombinant DNA controversy: twenty years later. *BioTechnology*. 13: 1132-1134.
- Buchs L., W. B. Lacy, J. Burkhardt, L. H. Lacy. 1991. *Plants, Power, and Profit: Social, Economic, and Ethical Consequences of the New Biotechnologies*. Blackwell Publishers, Cambridge, Mass.
- Carmen I. 1992. Debates, divisions, and decisions: recombinant DNA Advisory Committee (RAC) authorization of the first human gene transfer experiments. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 245-260.
- Cook-Deegan R. M. 1994. *The Gene Wars: Science, Politics and the Human Genome*. W. W. Norton & Co. Inc., New York, N.Y.
- Церам С. 1993. Basic research: the gray zone. *Science* 261: 972-973.
- Drahn D. J. 1991. Field testing of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 9: 157-171.
- Hayes T., J. Rifkin. 1977. *Who Should Play God? The Artificial Creation of Life and What It Means to the Human Race*. Dell Publishing Co., New York, N.Y.
- Judge E. T. 1990. The NIH "Points to Consider" and the limits of human gene therapy. *Hum Gene Ther.* 1: 425-433.
- Jurkiewicz J. C., C. G. Geyer. 1990. Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science* 249: 875-884.
- Katz M. L., J. J. Murphy, J. L. Jones, J. C. Cranan, K. Norderhof, L. F. Harvey, L. A. Swygert, H. Falk, E. M. Kibbourne. 1992. Escherichia-coli syndrome in L-tyrosinase exposed patients. *JAMA* 267: 77-82.
- Kessler D. A., M. R. Taylor, J. H. Maryanski, E. I. Pharo, L. S. Kahl. 1992. The safety of foods

- developed by biotechnology. *Science* 256: 1347-1349.
- Leib M. A., H. S. Strain. 1991. *Risk Assessment in Genetic Engineering*. McGraw Hill, Inc., New York, N.Y.
- Lyon J., P. Garner. 1995. *Altered Fates: Gene Therapy and the Remaking of Human Life*. W. W. Norton & Co. Inc., New York, N.Y.
- Majumder A. N., G. J. Gorsch. 1994. Eosinophilia-myalgia syndrome and tryptophan production: a cautionary tale. *Trends Biotechnol* 12: 346-352.
- Miller H. I. 1992. Putting the kST human health controversy to rest. *Bio/Technology* 10: 147.
- Тедде J. М., R. K. Colwell, Y. L. Grossman, R. E. Nelson, R. E. Izrael, R. N. Stock, P. J. Regal. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 208-215.
- Walters L. 1991. Human gene therapy: ethics and public policy. *Hum Gene Ther* 2: 115-122.
- Wiley M., S. E. Liden. 1993. Release of recombinant organisms. *Ann. Rev. Microbiol* 47: 913-944.
- Wind N., L. Walters. 1993. Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 262: 535-540.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какова роль Национального института здравоохранения и Консультативного комитета по рекомбинантным ДНК (NIH-RAC) в

контроле исследований в области рекомбинантных ДНК?

2. Какие критерии использует FDA при вынесении мнения о возможности использования рекомбинантного белка в качестве пищевого продукта или индустриальной добавки?
3. Обсудите тезис «Генная инженерия – это технология, противоречащая фундаментальным законам природы».
4. Как контролируется создание трансгенных модифицированных организмов, предназначенных для высвобождения в окружающую среду, и почему такой контроль необходим?
5. Обсудите положительные и отрицательные аспекты лицензирования рекомбинантного фактора свертывания.
6. Как регламентируются эксперименты по генной терапии соматических клеток в США?
7. Обсудите тезис «Генная терапия клеток в репродуктивной линии приводит к увеличению частоты встречаемости дефектных генов в будущих поколениях».
8. Объясните, почему запрещены исследования в области геной терапии клеток зародышковой линии.
9. Обсудите положение «Человек – это то, что представляют собой его гены».
10. Подготовьте аргументы для обеих сторон, участвующих в дебатах на тему: «Следует ли запрещать клонирование человека».

Патентование биотехнологических изобретений¹⁾

Основная задача биотехнологии — это создание разнообразных коммерческих продуктов. Однако ни одна компания не будет реализовывать долгосрочные проекты с высоким степенью риска, если не удостоверится в том, что результаты ее разработки будут надежно защищены от использования конкурентами. Со своей стороны, государство старается поощрять инновации, направленные на развитие промышленности Стратегия, объединяющая интересы обеих сторон, заключается в том, что государство предоставляет изобретателям исключительные права на новые продукты или способы их включения. Такие санкционированные привилегии называются правами на интеллектуальную собственность и включают права на коммерческие секреты, авторские разработки, товарные знаки и изобретения. Коммерческие секреты — это конфиденциальная информация о специфических особенностях способа производства и состава продуктов, которые компания хочет сохранить в тайне и оградить от использования третьими лицами. Авторские разработки, в частности опубликованные работы, защищаются от несанкционированного и незаконного использования институтом авторского права. Товарные знаки — это слова или символы, которые приняты идентифицировать определенный продукт или способ, разработанный конкретной компанией. Например, торговый знак Coca-Cola относится к набору для экспериментов in vitro, который содержит уникальную смесь экстракта бактерий фага T и выпускается биотехнологической

компанией Stratagene. Другие фирмы продают сходные наборы под своими собственными торговыми знаками.

Самая важная форма интеллектуальной собственности для биотехнологии — это изобретение. Изобретение является патентом, который представляет собой утвержденный документ, обеспечивающий исключительные права патентообладателя на коммерческое использование изобретения. Более того, он управляет формулой изобретения, защищенную патентом, патентообладатель имеет право разработать другие продукты, которые могут быть получены на основе его изобретения, в то время как конкуренты могут свободно покупать для этого права на использование чужих изобретений. С другой стороны, патент — это общедоступный документ, который содержит подробное описание изобретения и таким образом информирует третьих лиц о существовании и его ограничениях. Это позволяет указанным лицам решить вопрос, стоит ли им продолжать работу в данном направлении или же попытаться использовать запатентованное изобретение в качестве стартовой площадки для других возможных разработок.

Процедуры патентования и патентные законы неодинаковы в разных странах, несмотря на то что предпринимаются попытки их унифицировать. Например, до недавнего времени в США исключительное патентное право сохранялось в течение 17 лет с даты выдачи патента, в Канаде — в течение 20 лет, в во многих европейских странах — в течение 20 лет, но с даты подачи заявки. В настоящее время в соответствии с международ-

^{1) Данные взяты из книги: *Биотехнология: от науки к промышленности*. М.: ИСПА, 2001. 200 с. ISBN 5-89017-001-0. Глава 23, с. 125.}

редшим соглашением и биодизельные страны, в том числе и в США, срок действия патента составляет 20 лет с даты подачи заявки. Однако в отличие от многих других стран правительство США придерживается мнения, что дата подачи заявки важна, чем дата подачи заявки. Обычно с момента подачи заявки на изобретение до публикации патента проходит от двух до пяти лет. В любом случае изданные патенты могут принести значительные дивиденды и стоить не так-то просто получить, поэтому к заявке на изобретение и к своему изобретению предъявляются жесткие требования.

Общие вопросы патентования изобретений

Для того чтобы какой-то продукт или способ были патентоспособны, они должны удовлетворять четырем основным требованиям.

1. Любое изобретение, для которого должна быть возможность практического применения, должно быть новым. Понятие «новый» в данном случае означает, что изобретение прежде не было известно, не описано и к уже существующим продуктам и способам или в отношении не было никаких сведений о нем до даты подачи заявки на патент. Последнее касается всех стран, кроме США, в США же изобретатель имеет право подать заявку на патент не позднее чем через год после того как был опубликован сведения о соответствующем изобретении.
2. Патент не может быть выдан на то, что ранее просто не было известно; изобретение должно обладать изобретательским уровнем, т. е. не должно быть очевидным для специалиста в данной области (заключение о соответствии изобретения условию изобретательского уровня «изобретательского уровня» выносит Национальные ведомства).
3. Изобретение должно быть «техническим» изобретением, т. е. иметь дело с способом, устройством, веществом, микроорганизмом или механическим организмом.
4. Заявка на патент должна содержать описание изобретения, раскрывающее его с полнотой, достаточной для применения специалистом.

К изобретениям относятся не все изобретения, а лишь изобретения, обладающие способностью, основанные на научных теориях, математических методах, технических теориях и терапевтических методах лечения человека и животных¹¹. Кроме того, согласно основному положению патентного права, изобретение не может быть выдано на «природные продукты». Это связано с тем, что общество не заинтересовано в предоставлении кому-либо монополийных прав на то, что существует в природе и принадлежит всем. Однако компания и частные лица часто обходят эти ограничения, подавая патентную заявку на способ очистки продукта и тем самым избегая прямого упоминания о том, что будет защищено патентом: природный продукт или организм, с помощью которого данный продукт получен.

Простой и быстрой системы выдачи патентов не существует. Заявка должна быть подготовлена специалистом, обычно патентным поверенным, и составлена в соответствии с определенными правилами. Заявка, подаваемая в США, должна содержать название изобретения; реферат, в котором кратко изложена сущность изобретения; раздел, называемый «Предисловием создателя изобретения», в котором максимально подробно описывается положение дел в той области, к которой относится изобретение; раздел, называемый «Сущность изобретения», в котором раскрываются основные признаки изобретения; чертежи и рисунки, иллюстрирующие лучше всего существо вопроса; раздел, содержащий сведения, которые подтверждают возможность осуществления изобретения, в частности, формулу изобретения, выражающую его сущность и способствующую пониманию того, каким образом изобретение может быть применено. Заявка на патент подается в Ведомство по патентам и товарным знакам США (PTO, от англ. Patent and Trademark Office), где она подлежит экспертизе на новизну, возможность применения, осуществимость, т. е. на соответствие условиям патентоспособности.

Если эксперт пришел к выводу, что изобретение соответствует условиям патентоспособности, то выносятся решения о выдаче патента,

¹¹ В РФ под это определение попадают также компьютерные программы.

Ознаки полученные патент еще не означают, что можно беспрепятственно производить и продавать запатентованный продукт. До того как продукт поступит на рынок, он должен быть сертифицирован в соответствии с предусмотренными законом требованиями. Например, если патент был выдан на генетически модифицированный микроорганизм, то такое изобретение должно удовлетворять всем критериям, которые разработаны для тестирования продукта, полученного с помощью технологии рекомбинантных ДНК: пропавший должен предоставить данные о безопасности способа культивирования микроорганизма, его распространении и высеивании в окружающую среду. Контроль за соблюдением вытекающих из патента прав возлагается на патентообладателя: это означает, что прося любого лица, которое нарушило действие патента, может быть возбуждено судебное дело. Такие споры решаются в судах, а не в Национальном ведомстве. Схожим образом, если третья сторона (частное лицо или промышленная компания, фирма, организация и т. д.) оплатит неправомерной или незаконной выдачу патента, то оно имеет право подать иск в суд.

Если ведомство отклоняет заявку на патент, то заявитель может подать возражение в Патентную палату жалоб, а в случае отрицательного решения оспорить это в судебном порядке. Для некоторых заявителей патентование это серьезный обременительный процесс. Известны многочисленные патентные тяжбы, где ставки стоят высоки, что судебные разбирательства длиться годами, при этом озадачивают их конфликтующие стороны. Томас Эдисон, который к концу жизни был держателем более тысячи патентов, однажды сказал, что «каждый патент это приключение к судебному процессу».

Среди основных категорий патентов по теме их изобретения патенты на способы. К предметам относятся гибридные растения, компьютеры и различные устройства, к способам — методы получения продуктов, действия и операции, способы использования продуктов (табл. 23.1). Патентование биотехнологических изобретений основано на историческом опыте изобретения изобретений, созданных в области сельского хозяйства, пищевой, микробиологической, фармацевтической и медицинской

промышленности. Одним из таких примеров — получение патента Луи Пастером на способ приготовления пива путем ферментации. В настоящее время большая часть заявок на выдачу патентов в области биотехнологии относятся к охраняемым способам, и патенты на них выдаются без особых проблем. Менее многочисленным был случай с первым патентом, выданным на генетически модифицированный микроорганизм. Заявка была выдана А. Чарльбарти, работавшим в то время в компании General Electric, а изобретение состояло из введения в бактериальную клетку нескольких плазмид, каждая из которых несла свои, ответственные за один из путей расщепления углеводов. Полученный микроорганизм был способен расщеплять многоцеле-

Таблица 23.1 Основные категории патентов в области биотехнологии (за исключением ДНК)

Категория	Примеры
Патенты на продукты	
Вещества	Культуральные среды, рекомбинантные белки, чужеродные гены, штаммы грибов-паразитов, антитела, ферменты, ДНК, мембранные адсорбаты
Компоненты	Полноразмерные микроорганизмы, биотрансформанты, отдельные ферментативные гены, микроорганизмы с трансгенными свойствами
Устройства	Аппарат для культивирования с контролируемой температурой, устройство для селективного действия на микроорганизмы с помощью света в клетках
Патенты на способы	
Методы получения продукта	Введение ДНК в клетки эукариотических организмов, способ формирования организмов, полученных при культивировании рекомбинантных клеток бактерий (НПР), способы лечения и профилактики рака с помощью
Действия и операции	Гибридизация генов, выделение клеток, дистанционное действие звука, способ доставки и введения в клетки рекомбинантных НПР, культивирование организмов
Способы использования	Применение биотехнологий в биомедицине — культивирование клеток тканей и дифференциация клеток, идентификация и характеристика микроорганизмов, способы биологического контроля

ные компоненты сырой нефти и мы принести физическую пользу при отходе от нефтяных загрязнений. Тем не менее патенты здесь были выданы РТО на том основании, что микроорганизмы — это природные продукты и поэтому не являются способами. Однако в 1980 г. в своем знаменитом решении Верховный Суд США постановил, что бактерии *Циклобури* все-таки могут быть широким патентом в сочетании с действующим «конкретным», поскольку «соданный руками человека микроорганизм можно считать (как исключительным объектом изобретения... как продукт или композиция».

Остается дебаты во поводу патентования указанного генетически модифицированного микроорганизма велись вокруг способа его получения. Ранее изобретатель мутagenет с последующей селекцией с целью получения организмов с новыми свойствами уже был признан патентоспособным изобретением. Однако генетически инженерия рассматривалась как процедура, «посылающая нас саму природу», в поэтому выдвигалось возражение, что изобретатель не имеет права получать выгоду от модифицированных «природными продуктами». Такая позиция не имела поддержки, и в США начиная с 1980 г. (а затем и в других странах) в законодательном порядке было регламентировано, что живые организмы — независимо от способа их получения — являются охраняемыми. Чтобы получить решение о выдаче на них патента, необходимо провести экспертизу на их соответствие таким условиям, как «новизна», «изобретательский уровень» («исключительность») и «применимость».

Патентование изобретений в разных странах

Патентные ведомства различных стран часто выдают совершенно разные решения по одной и той же заявке. Например, в 1989 г. биотехнологическая компания Genentech подала в Патентное ведомство Великобритании заявку, которая относилась в том числе к способу получения эквивалентного активатора плазминогена (tPA) человека с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Этот белок, присутствующий в организме человека в небольшом количестве, отвечает за проре-

щение плазминогена в плазмин. Плазмин — это фермент, расщепляющий фибрин кровяного сгустка, и поэтому tPA человека может использоваться как терапевтическое средство для предотвращения и лечения тромбоза коронарных сосудов. После многочисленных попыток компания Genentech получила патентную лицензию на клонирование последовательности, кодирующей геном человека ДНК tPA человека (чДНК), и клонировала ее в *Escherichia coli*, намереваясь синтезировать большие количества чистого tPA. Подняв заявку, компания хотела получить лицензию на tPA человека, синтезирующийся с помощью разработанных ею биотехнологических процедур, а также на клонирующую векторную систему и генетически трансформированный микроорганизм. Кроме того, Genentech заявила свои права на применение tPA в качестве фармацевтического средства. Формула изобретения, представленная в первоначальной заявке, состояла из 21 пункта. Один из них был слишком широким и неконкретным, другие достаточно узкими. Заявка была отклонена Патентным ведомством Великобритании, и Genentech подала иск в Апелляционный суд Великобритании, который после тщательного разбирательства признал все пункты формулы исполнимыми. В судебном решении отмечалось, что изобретение отвечает требованиям новизны, однако некоторые эксперты пришли к выводу об ошибочности вынесенных технических решений и соответствии с невозможности из патентования.

В отличие от этого в США Genentech получила патент на tPA человека. Он не только защищал ту форму tPA человека, которую Genentech выпустила на рынок, но и предоставил этой компании исключительные права на все сходные, но не идентичные формы Genentech независимо от судебных исков к другим биотехнологическим компаниям, которые, как было решено, нарушили права Genentech, хотя они продавали другие формы tPA, чем та, которую выпускала Genentech.

Патент, выданный по той же самой заявке в Японии, ограничивал действия Genentech исключительно последовательностью именно того tPA человека, который был клонирован. Здесь другие компании имели право продавать

изобретения (РА человека). Таким образом, у одной и той же патентной заявки в трех разных странах была разная судьба: в первом случае она была отклонена, во втором принята к рассмотрению с последующей выдачей патента на тонкое зрение, в третьем принята и рассмотрена с выдачей патента на более узкое приращение. Следовательно, в настоящее время могут существовать разные точки зрения на патентоспособность одного и того же изобретения в патентных ведомствах разных стран.

Патентование ДНК-последовательностей

Начиная с 1980 г. в Патентные ведомства всего мира были получены более 5000 заявок на геном-размерные гены, примерно на 1500 из них были выданы патенты. Наиболее значимым патентом, выданным на способ получения продукта с использованием гена человека, можно считать патент на способ получения рекомбинантного эритропоэтина, который принес заявителю за один год только в 1996 г. доход более 1 млрд долларов. Эритропоэтин стимулирует образование эритроцитов и используется для предупреждения анемии у больных с почечной недостаточностью, которые подвержены анемии. Множество других терапевтически нужных геновых последовательностей используются в качестве диагностических зондов (биомаркеры).

С началом осуществления проекта «Геном человека», в том числе с частичным секвенированием кДНК человека из различных тканей и органов, много внимания и усилий стало уделяться патентованию секвенированных генов. В 1991 г. Национальные институты здравоохранения США (NIH) подали патентную заявку на 315 частично секвенированных последовательностей кДНК человека (EST). Еще две заявки увеличили общее число частично секвенированных EST, на которые испрашивались патенты, до 684. В 1994 г. РТО уведомило NIH, что оно намерено отклонить заявки на том основании, что функции последовательностей неизвестны. Другими словами, было сочтено, что сами по себе частично секвенированные геномные последовательности не удовлетворяют условиям патентоспособности «промышленная примени-

мость». NIH принял решение не подавать апелляцию, и вопрос о возможности патентования EST остается открытым до сих пор.

Между тем к 1997 г. было подано свыше 350 патентных заявок на более чем 500 НИОКР-размерных генов, в основном компаниями фирмами. Только в одной из таких заявок испрашивалась патентная защита примерно 18 500 EST. РТО США еще не вынесло решения по одной из таких заявок. Однако в будущем для ускорения процесса экспертизы и более адекватного подбора заявок в число защищаемых изобретений в одну заявку предлагается включать не более 10 последовательностей.

Противники патентования фрагментов ДНК с неизвестной функцией утверждают, что несмотря на несомненную ценность таких последовательностей пока преждевременно обеспечивать их патентную защиту. Кроме того, есть опасность, что выдача таких патентов не только предоставит патентоладельцам слишком широкий круг прав, но и будет препятствовать разработке различных диагностических и терапевтических средств. В связи с этим тысячи EST рассматриваются сейчас как некие промежуточные, а не конечные продукты. С другой стороны, сторонники патентования EST утверждают, что такие последовательности являются новыми, поскольку они комплексированы матричной РНК (мРНК) из различных тканей и органов, а также что они имеют промышленную применимость, поскольку каждый набор EST можно использовать в диагностических целях, с тем чтобы определить, в какой мере то или иное заболевание сопряжено с изменением мРНК в различных органах. Более того, высказывается мнение, что, как показывает история, патентная охрана не сдерживает разработку новых продуктов, а наоборот, стимулирует ее.

Таким образом, проблема патентования EST остается открытой. Может пройти некоторое время, прежде чем она будет окончательно решена, особенно если возникли отклонения РТО заявки подадут в суд. Кроме того, исследования продолжатся, и со временем будут расшифрованы полные последовательности многих частично секвенированных кДНК и полные соответствующие заявки. В таком случае может

определить фундаментальную последовательность соответствующей кДНК или ген в последствие маркерности генетического кода, т. е. при данной информации о последовательности нуклеотидов кДНК, ни последовательность гена не изменится существенно. Другими словами, как сказано в одном из информативных документов, «то, что не является предопределенным, не может считаться изобретением». Тем не менее РТГ США признается существование исключений к патентуемости генов и особенно патентов (по крайней мере еще) сделку на том основании, что методы, которые используются для переноса нуклеотидной последовательности гена, были рутинными и известными. Патентные поверенные в свою очередь считают, что патент на способность и изобретения не зависят от того, каким образом это было сделано, а определяется тем, соответствует ли это условиям патентоспособности. Вопрос о том, является ли использование известного метода получения гена присутствием в приложении такого же изобретения, следует решать в судебном порядке. Поскольку РТГ использует прецедентный подход к альтернативно решенной биотехнологической заявке, инновационной, не существует абсолютного стандарта для оценки соответствующей изобретения, в суды сейчас будут играть инновационную роль при рассмотрении вопроса о патентоспособности генов.

Патентование многоклеточных организмов

Патентование многоклеточных организмов тоже вызывает опасения как этического, так и социальности характера. Однако с точки зрения предоставления исключительных прав на данные организмы здесь нет ничего принципиально нового. Традиционно патентуются микроорганизмы, разработаны нормы соглашения которым селекционерам предоставляются права на патентовать растения, в США и Европе патентуются трансгенные мышь («комоды»), несущая активный ген откладывающий и формирующий шутами, выращенные в лаборатории и изобретениями являются растения, полученные с помощью методов генной инженерии.

Серьезные возражения против патентования растений двоятельно основаны скорее на со-

ображении моральности порядка. Другими словами, вопрос заключается в том, считает ли общество патентование таких животных приемлемым или нет. С точки зрения исторической перспективе мыслители, чтобы часто человеческие соображения могли исключить патентование всех трансгенных животных. Например, если изобретение относится к новому способу лечения человека, то оно соответствует с существующей точкой зрения права и потребности человека преобладают над «интересами» животного. Однако патентование – это не абсолютное право, и правительство в законодательном порядке решает, что может быть соразмерностью, а что нет. Если различные заинтересованные группы считают, что изобретение можно считать неэтичным эволюционным процессом, запрещение сельское хозяйство, то вполне возможно, что патентованием (порядке выданных патентов) будет запрещено. Например, парламент Франции отказался, совместно с другим японские исключаются из сферы интеллектуальной собственности. Таким образом, они не являются объектами патентной защиты.

Патентование и фундаментальные исследования

Не все уверены в целесообразности патентования, некоторые считают, что предоставление монополий прав ограничивает конкуренцию, приводит к неэтичности цен, сдерживает новые разработки, способствует процветанию больших корпораций в ущерб интересам отдельных изобретателей и небольших компаний. Несмотря на все это, патентная система стабильна и хорошо работает. Более того, стало ясно, что патентование не снижает фундаментальные исследования и научную деятельность фирм и компаний. Так, если бы мы случайно серьезно препятствием для инноваций, то патент США № номером 4 237 224, выданный Стэлли Комиз и Герберту Бойеру в 1980 г. на использованные вирусных и плазмидных векторов для создания рекомбинантных ДНК, должен был в значительной степени затормозить развитие молекулярной биотехнологии (рис. 23.1). Совершенно очевидно, что ничего подобного не произошло.

нами. Но есть и другие мнения: некоторые считают, что традиционный путь развития науки устарел и неэффективен, а патентные права и их реализация будут стимулировать новые разработки. Разрешить это противоречие будет нелегко. Ясно лишь, что появление молекулярной биотехнологии поставило множество серьезных проблем, в том числе и проблему пути развития науки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует несколько причин для патентования изобретений. Владелец патента вынужден исключительные права на изобретение, благодаря которым они компенсируют усилия, затраченные им на создание нового продукта, разработку нового способа или устройства. При этом научное сообщество получает детализованную информацию об изобретении и не тратит время и усилия на создание того, что уже известно. Возможность получения прибыли от патента стимулирует компании и отдельных исследователей в различных областях науки. Патентом обеспечивается инновационная и обеспечившая права изобретателя на изобретение или техническое решение. Чтобы патент был выдан, изобретение должно быть новым, неочевидным и полезным. Кроме того, оно не должно быть природным продуктом.

Проблема патентования молекул ДНК весьма противоречива. Возмещение по патентам и торговля генами США (PTO) спикером в начале патентов на частично секвенированные «ДНК», поскольку в законе отсутствовали конкретные данные о их практической пользе; отказано было и в выдаче патентов на гены, идентифицированные с помощью гибридных зондов, которые были синтезированы исходя из опубликованных данных по аминокислотной последовательности. Позже решение PTO было изменено в свете основания того, что вырожденность генетического кода не позволяет однозначно определить нуклеотидную последовательность «ДНК» исходя из данных об аминокислотной последовательности соответствующего белка, в следователи, условие неочевидности, необходимом для патентования такого рода изобретений, выполняется.

Как только в прикладной генетически модифицированных микроорганизмов охраноспособными стали судебные решения касаются рекомбинантных бактерий, созданных А. Черкбаерен. В 1984 г. Верховный суд США постановил, что эти бактерии, полученные в результате генетических манипуляций, могут быть выданы патент. Позднее патенты США были выданы на трансгенную мышь с повышенной частотой продукции антител, трансгенные опунды и некоторые трансгенные растения. Однако патентование животных, полученных с помощью методов геной инженерии, разрешено не во всех странах.

С развитием молекулярной биотехнологии возник вопрос, следует ли разрешать частным компаниям паразитовать организмы, полученные с помощью методов геной инженерии, и предоставлять им исключительные права на них. С одной стороны, без подобных прав субъектам биотехнологические компании не будут иметь стимулы к разработке и исследованию в рыночной оборот новых продуктов. С другой, есть мнение, что такого рода привилегии с моральными точки зрения несправедливы, а патентование сдерживает научные исследования и инновации. Наконец, следует обратить внимание на то, что патентование влияет на пути развития фундаментальной науки.

ЛИТЕРАТУРА

- Adler R. 1984. Biotechnology as an intellectual property. *Science* 224: 357–363.
- Becher M., A. G. Sheward. 1993. Profiting from inventions in academe: American and British perspectives. *Ann. Clin. Biochem.* 30: 1–10.
- Bidey R. E. 1991. Patenting animals in Europe. *BioTechnology* 9: 619–622.
- Canby C. T. 1996. Gene patents—a time to balance access and incentives. *Trends Biotechnol* 14: 298–302.
- Chahine K. G. 1992. Patenting DNA: just when you thought it was safe. *Acc. Chemol* 15: 586–587.
- Crespi R. S. 1992. Biotechnology patents and morality. *Trends Biotechnol* 15: 123–129.
- Eckenswiler C., J. Morrow. 1996. Why patent life forms? *Policy Options* 17: 11–15.

- Johanson E. 1996. A household guide to patents and patenting. *Nat. Biotechnol.* 14: 288–291.
- Marshall E. 1997. Companies push to patent DNA. *Science* 275: 780–781.
- Poole G. 1995. The case for genomic patenting. *Nature* 378: 534–536.
- Saltzman R. 1996. Legal protection for biotechnology, p. 389–401. In A. L. Demain and N. A. Solomon (ed.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tabakoff M. D., W. J. Howe. 1995. Patenting DNA sequences. *BioTechnology* 13: 656–657.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы необходимые условия патентоспособности изобретения?
2. Что такое патент на способ? Патент на продукт? Приведите примеры.
3. Какого рода сведения должны содержаться в заявке на патент?
4. Почему патент является исследованием, осуществляемым его держателем?

5. Каковы цели патентования изобретений?
6. Обсудите проблемы патентования EST.
7. Обсудите решение РТО и Апелляционного суда федерального округа США по поводу патентоспособности генов, идентифицированных с помощью гибриционных методов, которые были сконструированы на основе опубликованных данных об амплонисловых последовательностях соответствующих базов.
8. Подготовьте аргументы для обеих сторон, участвующих в дебатах на тему: «Следует ли лицензировать патентованные многоклеточные организмы, полученные с помощью методов геновой инженерии?»
9. Обсудите вопрос о том, как патентованные изобретения могут повлиять на пути развития фундаментальной науки.
10. Свяжитесь с компьютерной системой сайта РТО (<http://patents.uspto.gov/>), используйте систему поиска Boolean для патентов на рекомбинантные ДНК (например, с помощью ключевых слов «resimilarity» и «DNA») и укажите степень изобретений, защищенных пятью последними патентами.

Словарь терминов

Адаптор (Adaptor) 1. Синтетический или химически модифицированный олигонуклеотид с одним свободным концом и одним концевым. После прикрепления адаптора другим концом к ДНК-матрице последованию можно пристроить в заданном направлении, например, индуцируемый сеп-линией вирус. 2. Синтетический или химически модифицированный олигонуклеотид, у которого после селективной модификации появились концевые группы и внутренний сайт для рестрикции эндонуклеазы. Когда адаптор пристроен к клонированной ДНК, у последователя появляется концевой сайт рестрикции.

Аденин, А (Adenine) Пуринное основание, комплементарное тимину и урацилу. Одно из азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК.

Активатор (Activator) 1. Вещество, стимулирующее транскрипцию специфического гена или оперона. 2. Блок, связывающийся с оператором и усиливающий транскрипцию; используется также название «активаторный белок».

Актин (Actin) Белок мышечных волокон. Входит в состав актомиозина — основного сократительного мышечного белка.

Адапты (Adapt) Одна из двух (или нескольких) альтернативных структурных форм гена.

Адаптерная регуляция (Adaptive regulation) Регуляция активности фермента, осуществляемая эффективной молекулой, которая связывается с участком в молекуле фермента, удаленным от активного центра.

Адипин (Adipate) Полисахарид, синтезируемый растениями из углеводов и бактерийми; состоит из остатков β -D-галактозы и α -L-глюкозы.

Адипиновый окислитель (Adipate oxidase) Соединение и ядро димера, присоединенных комбинация с образующим разветвленным третиимидом и РНК.

Аденозин-1-РНК (Adenosyl-1RNA) Молекула тРНК, к 3'-концу которой присоединены специфические аминокислоты.

Аденозинный сайт, А-сайт (Adenosyl site) Участок рибосомы, с помощью которого тРНК в процессе трансляции.

Аденозинат (Adenosine) Мономерный компонент (структурный блок) белковых молекул.

Аденозин (Adenosine) При наличии сайта присоединения гена 1.

Аденозинная модификация (Adenosylation) Модификация, происходящая в отсутствие контроля.

Аденозин (Adenosine) Вещество, которое является стимулятором и ингибитором активности молекул, взаимодействующих с другими молекулами и рибосомными клетками.

Аденозин (Adenosine) Вещество, которое является стимулятором как мутационное и ингибитором специфической мутации гена — мутационного агента.

Аденозин (Adenosine) Третья из нуклеотидов молекулы тРНК, комплементарная нуклеотиду специфического кодона в молекуле мРНК.

Аденозин (Adenosine) Аденозин (Adenosine) или аденин (Adenine) нуклеотиды нуклеиновых кислот (5' → 3' и 3' → 5') цепей и дисфосфорилированных нуклеотидов нуклеиновых кислот.

«Аденозин» РНК (Adenosine RNA) РНК-последовательность, комплементарная кодонному участку или особым молекулам (неинфицированной мРНК).

«Аденозин» сайт (Adenosine site) 1. Третья из нуклеотидов (нуклеотидный сайт) в молекуле транспортной ДНК. 2. Сайт на сайте в дисфосфорилированной молекуле ДНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна кодонной 3' соответствующей мРНК.

Антибиотик (Antibiotic) Вещь, способная убивать или подавлять рост других организмов.

Антикод (Anticodon) Часть тРНК, которая взаимодействует с кодоном в мРНК во время трансляции в рибосоме. Антикод комплементарен коду, кодируемому в мРНК.

Антифризный белок (Antifreeze protein) Белковый адаптивный белок, вырабатываемый в печени некоторых видов организмов и предотвращающий замерзание плазмы крови. Обнаружен также в клетках некоторых типов морских растений и бактерий, где он регулирует абсорбцию хлорофилла при низких температурах.

Аптамер (Aptamer) Синтетический полипептид, способный связываться с белком, в норме не связывающимся с ним, и подавлять активность.

Аттенуированная (ослабленная) вакцина (Attenuated vaccine) Вакцина, приготовленная с использованием ослабленных тем или иным образом микроорганизмов.

Аутологичные клетки (Autologous cells) Клетки, взятые от данного организма, культивируемые, возможно, генетически измененные и вновь введенные в организм-донор.

Аутосом (Autosome) Любая хромосома, не являющаяся половой. В соматических клетках человека присутствуют 22 пары аутосом и одна пара половых хромосом.

Аутосомное наследование (Autosomal inheritance) Не сцеплено с полом наследование какого-либо признака.

Аутоферезирующий белок (Autofertilizing protein) Незаконсервированный белок, компонент более крупного комплекса, участвующего в биосинтезе жирных кислот или по-другому.

Аэробные микроорганизмы (Aerobes) Микроорганизмы, растущие только в присутствии кислорода.

Azadirachtin Растение с очень небольшим геномом, используемое в качестве модельной системы для изучения процессов роста и развития.

Бакцила (Bacillus) Членистый вектор на основе генома ACMPV, способный существовать в клетках *E. coli* и клетках насекомых.

Биотрансфер (Biotransfer) Вектор, инфицирующий бактерии.

Биотрансформация (Biotransformation) Процесс, с помощью которого микроорганизмы и убитые клетки придают микроорганизмам

биологическую специфичность (bioactivity, *Bioactivity/bioactivity*) (bioactivity/DA) и (био)интеграция в клетку. Может служить как орган для получения биологически активных веществ. ДНК-интерактив, взаимодействует с клеткой для биотрансформации.

В-белки (B proteins) Мембранные белки, активируются после взаимодействия с СТР. Участвуют в передаче сигнала от клеточных рецепторов к ферментам на внутренней поверхности мембран.

Белки теплового шока (Heat-shock proteins) Белки, синтезируемые в ответ на резкое повышение температуры.

Белок одноклеточных организмов, БОО (Single-cell protein) Белковые продукты, синтезируемые монокультурной микросредой и использующиеся в качестве питательных добавок к рациону животных.

Бетаин (Betaine) Низкомолекулярное соединение, служит донором метильной группы при биосинтезе метионина.

Бифидо лакто ДНК (Bifido DNA) Коллекция клонов ДНК, синтезируемых *in vitro* на матрицах мРНК, происходящих на одной ткани или клеточной популяции.

Биофарма векторная система (Biofarm vector system) Двухкомпонентная система *Agrobacterium*, предназначенная для переноса участка Т-ДНК, несущего клонированные гены, в растительные клетки. Гены вводятся в клетки прокариоты на одной плазмиде, а векторный участок Т-ДНК — на другой.

Биофарма деление (Biofarm fusion) Процесс, не связанный с полным процессом репликации прокармитических клеток на примерно одинаковых по размеру дочерних клетках.

Биокоммуникация (Biocommunication) Нахождение какого-либо вещества (например, ДДТ) в организмах данной пищевой цепи.

Биомедиация (Biomediation) Разрушение загрязняющих веществ, попавших в окружающую среду, с помощью живых микроорганизмов.

Биоконтроль (Biocontrol) Процесс, в котором используются живые организмы для ограничения роста и развития патогенных микроорганизмов.

Биофермент (Bioenzyme) Биохимический процесс, который может служить альтернативным источником сырья процесса или биоспецифичности фермента.

Биоинженерия (Bioengineering) 1. Клеточная масса, образующаяся в результате деятельности живых организмов.

- Гаммаглин (Haploglycine)** Конформация аллели на одной хромосоме диплоидного организма.
- Ген (Gene)** Транскрибируемый участок хромосома, кодирующий функциональный белок либо rРНК или рРНК.
- Ген «самоблестна», «существовавший» ген (Selfish gene)** Ген, выполняющий тип определенных устойчивых ибель-собственной клетки.
- Генетический код (Genetic code)** Система записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждая три нуклеотиды, составившие кодон, кодирует одну аминокислоту. Состоит из 64 кодонов, кодирующая все 20 аминокислот и три терминальных кодона.
- Генетический полиморфизм (Genetic polymorphism)** Наличие двух или более аллельных форм отдельных генов.
- Ген-капсидар (Capsidase gene)** Структурный ген в геноме человека. Мутация в котором лишь предположительно (до получения доказательства) является причиной колоректального наследственного заболевания.
- Ген-молния (Light gene)** 1. Кодирующий ген. 2. Ген, кодирующий специфическому воздействию, X, Ген, кодирующий наследственные.
- Генная инженерия (Gene manipulation)** Нацеленная организация выделенного отрезка без включения аппарата, путем включения в клетки гена, кодирующего белок-интерес.
- Генная терапия ex vivo (Ex vivo gene therapy)** Введение гена (или генов) в модифицированные клетки больного. После культивирования и трансформации клетки вводятся в организм больного с помощью трансдукции, индукции или инъекции. Эта процедура позволяет устранить генетические дефекты.
- Генная терапия in vivo (In vivo gene therapy)** Введение гена (генам) непосредственно в ткань или орган с целью установления генетического механизма.
- Генная терапия с использованием клеток зрелых животных (Gene line gene therapy)** Введение гена (генам) в модифицированное животное или клетки животного (на ранней стадии). Чужеродный ген оказывается в клетках клеток размножающегося организма, в том числе половых, и изменяет его фенотип.
- Генная терапия с использованием «антикоагулянтных» пост-трансляционных (Antibiotic therapy)** Лечение in vivo генетического заболевания путем блокирования синтеза белка вмешательством в геном нуклеотидной последовательности, комплементарной специфической мРНК.
- Генная терапия соматических клеток (Somatic cell gene therapy)** Введение гена в клетки, отличную от половой, с целью коррекции генетического дефекта.
- Геном (Genome)** Совокупность генов диплоидного набора хромосом данного организма.
- Геномная библиотека, банк (Библиотека) генов (Genome library)** Набор клонированных фрагментов ДНК, в совокупности составляющих индивидуальной (групповой, видовой) геном. Если речь идет о крупном геноме (макродиплоидном), то получают хромосомспецифичные библиотеки.
- Гепатит (Hepatitis)** Генетические конструктивные организмы, набор всех его аллели.
- Гепатитогенные (Hepatogenic)** Определенные все аллели всех локусов данной хромосомы.
- Ген-регулятор (Regulator gene, repressor gene)** Ген, кодирующий белок-репрессор, который связывается с оператором и регулирует транскрипционно-свойство-оператора.
- Ген-репортер (Reporter gene)** Ген, кодирующий белок, выделенный из генома вышешей природы. Такие гены используются, например, для того, чтобы убедиться, что данная генетическая конструкция успешно введена в клетки, орган или ткань.
- Гены «домашнего хозяйства» (Housefold genes)** Набор основных структурных генов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки.
- Гетерозигота (Heterozygote)** Организм, в геноме которого имеются одна или несколько пар различающихся аллелей.
- Гетерозиготный жук (Heterozygous probe)** Скрининг ДНК одного организма, использующийся для скрининга библиотек скрининга ДНК другого организма.
- Гетерозиготный белок (Heteromeric protein)** Белок, состоящий из двух и более разных полипептидных цепей (субъединиц).
- Гибридизация (Hybridization)** Относительная полинуклеотидная цепь, часто из разных источников, с образцом ДНК/рРНК- или ДНК/ДНК-гибрида, стабильных водородных связей между комплементарными участками ДНК (DNA hybridization) Структурные двух молекул ДНК, часто из разных источников, благодаря образованию водородных связей между комплементар-

ными нуклеотидами. Используется для выявления специфических нуклеотидных последовательностей в паре ДНК.

Гибридный белок, мержерный белок (Fusion protein) Продукт клонированных совместно двух или более кодирующих последовательностей из разных генов. Представляет собой одну полипептидную цепь.

Гибридный ген (Hybrid gene, chimeric gene) Ген, состоящий из частей двух или нескольких генов и экспрессирующийся как единое целое с образованием гибридного (химерного) белка.

Гибридома (Hybridoma) Гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антигенообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител.

3'-терминальная группа (3'-hydroxyl group) Гидроксильная группа, связанная с 3'-атомом углерода сахарного остатка (рибозы или дезоксирибозы) концевой нуклеотида молекулы нуклеиновой кислоты.

Гипервариабельный участок (Hypervariable region) Сайт вариабельной части тяжелой или легкой цепи молекулы иммуноглобулина, характеризующийся большей изменчивостью у антител разной специфичности по сравнению с другими ее сегментами – каркасными участками.

Гликозилирование (Glycosylation) Ковалентное присоединение сахарного остатка к белковой молекуле.

β -1,3-гликаназа (β -1,3-galactase) Растительный фермент, синтезуемый клетками растений в ответ на проникновение в них патогенных грибов. Гидролизует определенные компоненты клеточной стенки последних. Синтезируется также некоторыми бактериями.

Гомодимерный белок (Homodimeric protein) Белок, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей (субъединиц).

Гомозигота по доминантному гену (Homozygous dominant) Организм, у которого оба аллеля данного локуса доминантны.

Гомозигота по рецессивному гену (Homozygous recessive) Организм, у которого оба аллеля данного локуса рецессивны.

Гомозиготность (Homozygosis) Наличие идентичных аллелей в одном или нескольких локусах. Клетка или организм с такими аллелями называется гомозиготой.

Гомологичные хромосомы (Homologous chromosomes) Хромосомы, включающие идентичные наборы генов, одинаково расположенных друг относительно друга. Образуется в результате дупликации пар родитильских хромосом.

Гомологичные (Homologous) Происхождение из одного источника или имеющие сходную структуру или эволюционное происхождение.

Гомомерный белок (Homomeric protein) Белок, состоящий из двух или более идентичных полипептидных цепей (субъединиц).

Гомополимер (Homopolymer) Полимер, состоящий из одинаковых мономерных единиц.

Группа несоместности (Incompatibility group) Группа плазмид, представители которых могут сосуществовать в одной клетке.

Группа совместности (Compatibility group) Группа плазмид, члены которой не способны сосуществовать в одной бактериальной клетке.

Гуанин, G (Guanine) Пуриновое основание, комплементарное цитозину. Одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК.

Гуморальный иммунный ответ (Humoral immune response) Синтез антител В-клетками иммунной системы в ответ на присутствие в организме чужеродных агентов.

Двойная гетерозигота (Double heterozygote) Организм, гетерозиготный одновременно по двум разным локусам.

Двойной кроссинговер (Double crossingover) Кроссинговер, происходящий одновременно в двух точках пары гомологичных хромосом.

Двушхвостый вектор (Bicistronic vector) Клонированный вектор, предназначенный для экспрессии двух генов в одной клетке млекопитающих. Гены находятся под контролем одного промотора и сигнала послепереработки.

Деглакозирирование (Degalactylation) Отщепление глюкозы (галакта, гала, брома, фтора), обычно при биотерапии.

Дезоксирибоза (Deoxyribose) Пятиуглеродный моносахарид, входящий в состав ДНК.

Дезоксирибозим (Deoxyribosyme) Молекула ДНК, обладающая каталитической активностью.

Дезоксирибонуклеаза I, ДНКаз I (Deoxyribonuclease I, DNase I) Фермент, расщепляющий двухцепочечную

ДНК (Используется для очистки препаратов РНК и бесклеточных экстрактов).

Дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК (*Deoxyribonucleic acid, DNA*) Полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидов; односторонний носитель генетической информации.

Деление (*Division*) Выделение участка транскрипта из ее внутренней области.

Демаскировка (*Demasking*) 1. Высвобождение цепи(и) двуцепочечной молекулы ДНК или РНК. 2. Нарушение матричной информации: большинство мазков делаются в результате репликации наследственных (генетических) ошибок.

Дерепрессия (*De-repression*) Нисходящая транскрипция из-за в результате подавления функций репрессора – блокирования его способности с промотором.

Диастроф (*Dystrophy*) Ортоним, способная флюидировать адт.

Диманномечеловая кислота (*Dimethylmaleic acid*) Не посредственным присутствием L-аргинина у бактерий и растений, один из компонентов клеточной сигналы у некоторых бактерий.

Динуклеотиддезокси (Dinucleotide deoxynase) Фермент катализирующий образование тетрациклофосфатной кислоты.

Динуклеотид: аденин, dGTP (*Dinucleotide*) Полученный искусственным путем нуклеотидтрифосфат, состоящий из 2'- и 3'-гидроксильных групп (или углерода) атомов сахарного кольца.

Диплоид (*Diploid*) Наиболее часто встречается в природной популяции фенотипически, детерминированный «диплоидными» (диплоидными) аллелями.

Диплоид (*Diploid*) Организм, клетки которого содержат два соматических набора хромосом.

Дисульфидная связь (*Disulfide bond*) Ковалентная связь между двумя атомами серы, расположенными в соседних цепочках. Стабилизирует третичную структуру полипептидных цепей.

Диссоциация (*Dissociation*) Низкомолекулярный тип образования последовательностей нуклеиновых кислот. Добавляется в буферные растворы в низкой концентрации для предотвращения окисления сульфидных групп в белках. В высоких концентрациях используется для предотвращения дисульфидных связей.

Длинные концевые повторы, LTR (*Long terminal repeats*) Прямые повторения, встречающиеся по последовательности на концах ДНК-копии вируса репродукции.

ДНК-зонд (*DNA probe*) Фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и использующийся для информации со специфическим участком в молекуле ДНК. Позволяет идентифицировать соответствующий ему нуклеотидные последовательности.

ДНК-лигаза (*DNA ligase*) Фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3' гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте ценоциклоничного разрыва молекулы ДНК.

ДНК-маркерный сайт, STR (*Short tandem repeat site*) Уникальный или ланного участка одноцепочечного, но генератор может использоваться для его идентификации методами (PCR).

ДНК-полимераза (*DNA polymerase*) Фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-заправки со свободной 3'-ОН-группой.

ДНК-полимераза Taq (*Taq DNA polymerase*) Термостабильная ДНК-полимераза (сохраняет активность при 95 °C) бактерий *Thermus aquaticus*. Часто применяется в методе ПЦР.

Доминантный аллель (*Dominant allele*) Аллельный вариант, использующийся для детекции белков.

Доминант (*Dominant*) Участок функциональной цепи, которая определяет функцию (например, взаимодействие с белком, трансмембранный домен и т.д.)

Доминантный ген (*Dominant gene*) Ген, кодирующий его в фенотипе (не зависимо от присутствия в геноме другого аллеля этого гена).

Доминантность, доминантность (*Dominance*) Участие гомолога одного аллеля в определении фенотипа у гетерозиготной особи.

Длина участка (*Insertion size*) Максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в векторном векторе.

Диффузия (*Diffusion*) Фермент, катализирующий образование 2-фосфиллинергата в фиделикномитозиме.

Экзодигитон (*Exonuclease*) Фермент, участвующий в синтезе полинуклеотидных цепочек.

Живительная способность (Nourish ability) Организмическая способность к выживанию при введении клеток, тканей или органов животного или человека клеточной или тканевой культуры

Жидкая среда культивирования (Liquid culture medium) Искусственная среда культивирования, состоящая из питательных веществ, витаминов, гормонов, необходимых для развития, поддерживаемая в жидком состоянии

Зона (Zone) 1 Среда обитания, в которой клетки или органы способны и используются для выращивания в культуре **2** Ограниченный участок поверхности для выращивания клеток или органов **3** Ограниченный участок поверхности для выращивания клеток или органов

Измерительная единица (Measurement unit) Единица измерения, используемая для измерения количества клеток или органов **2** Ограниченный участок поверхности для выращивания клеток или органов **3** Ограниченный участок поверхности для выращивания клеток или органов

Инициация (Initiation) Процесс, в котором клетки или органы начинают делиться и размножаться в культуре

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

обеспечивает клеточные компоненты для синтеза белков, углеводов или липидов, в которых участвуют молекулы-носители или убивает клетки

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Инициальный этап (Initial phase) Первый этап в процессе культивирования клеток или органов

Встраивание (Embedding) Встраивание сегмента ДНК (и транскрипты или элементы) в вектор, осуществляемое *in vitro* или *in vivo* с помощью специфического фермента

Векторная библиотека клонов, ВМ (Vacterial artificial chromosome) Векторная система на основе F-плазмиды *E. coli*, позволяющая для клонирования больших (100–300 т.н.н.) неавтономных клонов

Векторная библиотека клонов, УАС (Viral artificial chromosome) Реплицирующаяся ДНК, способная к продолжению репликации и интеграции в хост при применении в качестве объектов активности прокладки и маркерных генов и специфической рестрикции сайтами генетически рестрикции

Векторная библиотека Р1 (P1 artificial chromosome) Векторная система на основе фена Р1, позволяющая для введения в клетки *E. coli* векторы с крупным остатком (100–300 к.н.н.) с высокой эффективностью

Векторная библиотека фаража, ВАС (Viral artificial chromosome) Хромосома, полученная обесцвечиванием клонов, векторы и участки геномной ДНК человека

Векторная библиотека (Cloning bank (cloning)) Структура идентичности или конформации полимера, основанная на принципе возможного превращения

Вектор (Carrier) Белок или оболочка вирусной частицы

Векторные цепи (Gene mapping) Определение положения данного гена на хромосоме относительно других генов

Вексты (Genetic) Группы тандемных реплицируемых, функционально связанных участков (Пример – единственная молекула полимера у дрожжей)

Г-факторизация (H Factorization) Фермент, участвующий в синтезе полинуклеотидных полибиотиков

Генетика (Genetics) Нуклеотидный фермент, один из компонентов комплекса, участвующего в синтезе полинуклеотидов

В-клетки (B cells) Лимфоциты, продуцирующие антитела в сотрудничестве с клетками Т-клеточного типа

Вексты кармальной линии (Gene line cells) Клетки, постоянно превращающиеся в клетки (от первоначальной клетки до собственной линии)

Клеточная линия (Cell line) Группы клеток, поддерживаемая в культуре путем пересевов

Клеточная библиотека (Cellular library) Коллекция (Cellular library) Изучение генов и их активности с помощью методов, в том числе с помощью или другими методами факторами

Клон (Clone) Популяция клеток или молекул, идентичных одной родительской клетке или молекуле

Клонирование (Cloning) Способность процедур, способствующих для получения клонов Клонирование молекулярных организмов, например, включает определение клонированных клеток и селективное выделение гомологичных клонов

Клонирование клеток (Cell cloning) Способность методов, способствующих для получения клонированных ДНК выделение гомологичных или любого-либо организмов, например, в плазмиду (вектор), введение в клетку организмов-хозяев, конъюгация репродукции

Клонированный вектор (Cloning vector) Молекулы ДНК (плазмиды или вирусная ДНК), предназначенные для клонирования ДНК хозяина

Клон (Clone) Три созданы триклоны, клонированы определенную диморфность. Всего существует 64 сочетания нуклеотидов в кодонах, 61 из них кодирует 20 аминокислот, 3 является кодоном-стопом

Клонированная векторная система (Cloning vector system) Двухкомпонентная система, состоящая из вектора для переноса клонированных генов в растительные клетки Клонированный вектор несет участок Т-ДНК, содержащий клонированный ген После введения в клетку *Agrobacterium* он подвергается гомологичной рекомбинации с рестриktion «разрушенной» (линеаризованной) Ti-плазмидой с образованием одной молекулы, несущей генетическую информацию, необходимую для переноса генетической информации области Т-ДНК в растительную клетку

Комбинаторная библиотека (Combinatorial library) Библиотека, полученная встраиваемых в вектор на основе фрагментов ДНК клеток и тканей или в различных условиях на одной комбинации вектора

Комплекс (Complex) Соединение биологических клеток или молекул с трансформацией ДНК (обычно в клетку)

Комплекс (Complex) Белковый комплекс сформирован в клетке, один из основных компонентов биологической системы. Участвует в регуляции процессов

тельных процессов, активации факторов и литическом действии на клеточные мембраны. Активизируется взаимодействием с нуклеиновым комплексом.

Комплементария ДНК, кДНК (Complementary DNA) Молекула ДНК, синтезированная на РНК-матрице с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (общей транскриптазы).

Комплементарные нуклеотидные последовательности (Complementary base sequence) Полнунуклеотидные последовательности, которые взаимодействуют между собой в соответствии с правилами спаривания оснований: аденин (А) образует пару с тимином (Т) [или урацилом (U) в РНК], гуанин (G) – с цитозином (С).

Комплектарный гомополимерный «хвост» (Homopolymeric tail) Гомополимер из дезоксирибонуклеотидомонофосфатов, присоединяемый к 3'-ОН-концам обеих цепей фрагмента ДНК с тулыми концами. Созданье комплектарных «хвостов» [например, poly(A) по астрикционному фрагменту ДНК и poly(T) в векторе] позволяет клонировать фрагмент в составе рекомбинантной плазмиды.

Комплементация (Complementation) Восстановление фенотипа дикого типа (или близкого к нему фенотипа) при объединении в одной клетке двух ДНК с двумя рецессивными мутациями, входящими в *парные* конформации.

Кинкатерные молекулы (Concatemeric molecules) Длинные молекулы ДНК, состоящие из нескольких тандемно повторяющихся единиц. В такой форме находится геном некоторых фатов во время репликации.

Константа Михаэлиса, K_m (Michaelis constant, K_m) Кинетический параметр ферментативной реакции, численно равный концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. Характеризует сростство фермента к субстрату. Чем ниже K_m , тем прочнее связывание между субстратом и ферментом.

Константный домен (Constant domain) Незаменная для данного класса иммуноглобулинов часть полипептидной цепи (легкой или тяжелой).

Конститутивный синтез (Constitutive synthesis) Поступноно происходящий в клетке как целом организме синтез РНК или какого-либо белка.

Контиг (Contig) Непрерывный набор клонов, объединяющих данную область хромосомы или аско хромосому.

Контранфекция (Contransfection) Введение в одну эукариотическую клетку двух разных молекул ДНК. В случае системы экспрессии на основе бакуловирусов – процедура одновременного введения бакуловируса и вектора в клетки насекомых в культуре.

Конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК, SSCP (Single-strand conformational polymorphism) Различие в конформации одноцепочечных ДНК, отличающихся одна от другой всего одним нуклеотидом. Анализируемые ДНК подвергают денатурации. Денатурируемые цепи принимают разную конформацию и при геле-электрофорезе мигрируют с разной скоростью.

Коплягативные плазмиды (Cooperative plasmids) Плазмиды, способные перелаваться от одной клетки другой во время конъюгации.

Коплягация (Coagulation) Форма полового процесса. У бактерий – однонаправленный перенос ДНК из одной контактирующей клетки в другую.

Корепрессор (Corepressor) Небольшая молекула, связывающаяся с неактивным репрессором (аллорепрессором) с образованием комплекса, присоединяющегося к оператору и блокирующего транскрипцию.

Короноватый галл (Crown gall) Опухоль растений, образование которой вызывает бактерия рода *Agrobacterium*.

Короткий концевой повтор, STR (Short tandem repeat) Концевая нуклеотидная последовательность, состоящая из дв. три- или тетра-нуклеотидных повторивающихся элементов.

Косегрегация (Cosegregation) Феномен, состоящий в том, что два признака наследуются совместно, т.е. их гены при кроссинговере не разделяются.

Космида (Cosmid) Вектор, объединивший свойства плазмидного вектора и вектора на основе фага λ . Имеет cos-сайты.

Косупрессия (Cotranspression) Подавление экспрессии специфического растительного гена при трансформации растения дополнительной копией этого гена, включенной в «смысловой» ориентацию.

Кофактор (Cofactor) Низкомолекулярное вещество, необходимое для протекания определенной ферментативной реакции.

Коферментация (Cofementation) Одновременный рост двух микроорганизмов в одном биореакторе.

Бродильный фермент (Stamper-enzyme) Обычно участвует в гидролизе углеводов, пектинов, крахмала (в первую очередь крахмала) и целлюлозы в ферментативной смеси. Называется также ренифицином.

Бродильность (Stamper-ability) Следствие, полученное естественным путем, а не синтезированным другим организмом.

Кислота (Acid) Петтилеровский фермент, основной компонент генипсаиназы.

Культур (Culture) Полученная культура или индивидуальная клетка, адаптированная и интегрированная условиями в чужую.

Культуральная среда (Culture medium) Фермент или ферментная смесь, используемая для выращивания микроорганизмов in vitro.

5'-Кэп (Cap) Метилированный гуанин (на 5'-конце молекул мРНК, эукариот).

k_{cat} Константа скорости ферментативной реакции. Чем выше эта величина, тем быстрее субстрат превращается в продукт.

k_{cat}/K_m Каталитическая эффективность ферментативной реакции. Чем она выше, тем быстрее и эффективнее субстрат превращается в продукт.

«Лейба»-элемент оперона (Leiba-element) Условно названные участки оперона, расположенные между сайтом инициации транскрипции, и контролирующей 5'-областью. Обычно термин транскрибируемые последовательности обозначается как «L», а все «лейба»-элементы — цифрами до «лейба-4».

Лигирование (Ligation) Соединение двух молекул ДНК с помощью фосфата эфирыла связей 5'-OH и 3'-OH катализируется ферментом ДНК-лигазой факта T4.

Лигирование олигонуклеотидных зондов, ДНК (Ligation of oligonucleotide probes to DNA) Метод выявления олигонуклеотидных зондов в клетках с помощью олигонуклеотидных зондов, комплементарных определенному участку тестируемого участка ДНК. Если зонды присоединяются к олигонуклеотидной цепи, то зонды связываются с ДНК, и после добавления в реакционную смесь ДНК-лигазы происходит их связывание (лигирование). В противном случае связывание олигонуклеотидов невозможно.

Лигирование зондов (Ligation of probes) Комплекс олигонуклеотидов и целлюлозы, составляющей структурный каркас клеточной стенки растений.

Лигирование олигонуклеотидов (Ligation of oligonucleotides) Непосредственное последовательное мРНК, расположенное между 5'-концом и комплементарными участками АУГ.

Липаз (Lipase) Разрушение клеточных стенок под действием ферментов, содержащихся в микроорганизмах, или других агентов.

Липиды (Lipids) Пентозиды (сложные бактерии) в своем клеточном мембране. В результате гидролиза липидов ДНК может выщелачиваться с образующимися фрагментами фосфатов.

Липиды (Lipids) Синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции. Используется для соединения с фрагментами мРНК, а концы которого не имеют стандартной структуры последовательности липидов.

Липиды (Lipids) Фермент, расщепляющий липиды.

Липиды зонды (Lipid probes) Взаимодействующие участки ДНК, присутствующие на олигонуклеотидной молекуле: образуются в результате связывания зонда с олигонуклеотидом ДНК.

Липиды зонды (Lipid probes) (Сложные, олигонуклеотиды, связанные с полисахаридом. Один из компонентов клеточной стенки бактерий).

Липиды (Lipids) Путь, образующийся олигонуклеотидной мембраной, состоящей из липидных молекул. Гидрофильная часть этих молекул образует гидрофильную, гидрофобная — гидрофобную. Внутренние липиды могут взаимодействовать с олигонуклеотидными молекулами и т.д., образуя растворимые липиды.

Липиды зонды (Lipid probes) Растворимые олигонуклеотиды, взаимодействующие с липидными молекулами.

Липиды (Lipids) Место на хромосоме, где находится специфический ген.

Матрица (Matrix) (Полученный с помощью метода «матрица» полимерный материал) — полимерный материал, содержащий олигонуклеотиды, олигонуклеотиды и т.д.).

Матрица (Matrix) Крупный фермент, обладающий высокой активностью к олигонуклеотиду.

Матрица олигонуклеотидных зондов (Matrix of oligonucleotide probes) Короткие олигонуклеотидные последовательности, характеризующие один из участков генома человека. Используются для изучения структуры и транскрипционной активности определенных участков генома человека.

поверхности клетки (наиболее часто мембранная форма существования).

Мультиплексная генетическая карта, карта сцепления (Multiplexed map, multiplex linkage map) Карта в которой гены распределены линейно на хромосомных участках организмов.

Мутирование (Mutation) Изменчивые наследные мутации с помощью химических или физических агентов

Мутант (Mutant) Организм, обладающий в результате мутации, как правило, измененной от исходной формой (также типом).

Мутации (Mutations) Структурные и функциональные изменения структуры гена.

Мультигенное сцепление генов (Genetic linkage) Мультиген, связанный с нуклеотидной последовательностью (или несколькими) нуклеотидными (или нуклеотидными) нуклеотидами. Присоединяется к нуклеотидной триплетной кодирующей секвенции (если такая секвенция не формируется)

Нарушение целостности генома (Genome integrity) Наличие в лизисометрической молекуле ДНК одной или нескольких пар некомплементарных оснований

Нестабильная регуляция (Unstable control) Тип регуляции, при котором транскрипция гена регулируется регуляторным белком (репрессором); следовательно при индукции белок-регулятор структурные гены остаются в активном состоянии.

Независимые регуляторные гены (Independent elements) Регуляторные гены, локализованные на разных хромосомах, или локализованные вместе с опероном, но не взаимодействуют с ним. Легко встраиваются в различные регуляторные структуры

Нестабильно регулируемые мутаторы (Unstable mutants) Известны, индуцируемые мутации (индуцибельные мутации), но не взаимодействуют с субстратами, в первую очередь - в плазмидном виде.

Нестабильно регулируемые ферменты (Unstable enzymes) Фермент, индуцирующийся дефинитивно несомненно и индуктивно. Часто локализуется как самостоятельный оперон для транскрипции (систем)

Низкая концентрация (Low level detection) Число генов, принадлежащих конкретному кластеру в группе родственных организмов. Характерна для биологических мутирующих агентов.

Нестабильно регулируемые (Unstable genes) Культуральная мутация индуцируемая при непереносимости субстрата среды и выведенная типично для обычных культур

Носитель-флажок (Carrier flag) Переносчик молекулы РНК, полимеризуемая электрофорезу, в том же направлении подложку (матрицу) нуклеотида или нуклеотидный фильтр с последующей ДНК-РНК-гибридизацией

«Носитель» (Carrier) Цитрикохром c (решетчатая форма с помощью связывающей полибиполиции).

Нуклеазы 5' (5' nuclease) Фермент, специфически деградировать одноцепочечную ДНК.

Нуклеозид (Nucleoside) Пуриновое или пиримидиновое азотистое основание, ковалентно связанное с пятиуглеродным сахаром (пентозой). Если сахаром является рибоза, то это нуклеозид рибонуклеотидный, а если дезоксирибоза, то это дезоксирибонуклеотидный.

Нуклеотид (Nucleotide) Нуклеотид, в котором присоединены одна или более фосфатных групп; представляет собой производное от 5'-углерода нуклеозидного основания. Нуклеотиды, связанные с рибозой называются рибонуклеотидными нуклеотидными (rNMP), рибонуклеотидными нуклеотидными (rNTP) или рибонуклеотидными нуклеотидными (rNTP). Для дезоксирибозы, соответствующие нуклеотиды называются дезоксирибонуклеотидными-, пи- и трифосфаты (dNMP, dNDP, dNTP)

Н-цепочка (N chain) Первичная аминокислота (или несколько аминокислот) в белковой молекуле.

Обратная транскрипция (Reverse transcription) РНК-зависимая ДНК-полимераза, использующая матрицу РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК.

Обратная транскрипция по номерам генов рибозы (Reverse transcription-ribosome clock) Способ получения в большом количестве cДНК, состоящей из двух цепей. Включает в себя синтез обратной cДНК, с помощью обратной транскриптазы, cРНК в качестве матрицы и oligo(dT) в качестве праймера. Затем cДНК инсинкривировать с полимеразами матричной цепи и репрессором (MMP) использовать для праймера цепи комплементарной (цепь) второй цепи cДНК, и вторая - другой цепью, инсинкривировать первую.

Однородный (homogeneous) Рядом факторы дифференциальной селективности нуклеотидов в одной цепи ДНК

ного интервала времени. Свою среду культивируют в жестком матрицале и проводят культивирование в непереносимом режиме, не добавляя новых порций среды и не удаляя продукты, пока процесс не завершится сам собой.

Периодическая ферментация с добавлением субстрата (Fed-Batch Fermentation) Культивирование микроорганизмов в течение ограниченного интервала времени с периодически добавляемым субстратом и сбором продуктов только по завершении процесса.

Периодическое пространство (Periodic batch space) Пространство между кламатическими мембраной биореакторной клетки и поружной мембраной или клеточной стенкой.

Периодиды (Pulsidines) Один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеотидных кислот; в периодидом относятся тимин, цитозин и урацил. Второй тип оснований – пурины; к ним относятся аденин и гуанин.

Период (Period) Вещество, продуцируемое бактериями и позволяющее повысить температуру у человека.

Плазмиды (Plasmid) Внехромосомный генетический элемент, способный к самостоятельному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК длиной 1–200 т.д.н.

Плазмида-плазмиды (Helper plasmid) Плазмиды, осуществляющие функцию другой плазмиды в той же клетке. Некоторые плазмиды-помощники способны перенести некомогативных плазмид из донорной клетки в реципиентную.

2-мем-плазмиды (2 mem plasmid) Существование в определенных условиях двухцепочечной кольцевидной плазмиды длиной 6318 п.н., обнаруженной в клоне *Saccharomyces cerevisiae*. На ее основе получены многие плазмидные векторы для дрожжевых клеток.

Плазмидная несовместимость (Plasmid incompatibility) Механизм регуляции числа копий плазмид одного типа в биореакторной клетке. Обеспечивает несовместимость внутривидового существования плазмиды, принадлежавшей к одной группе совместимости.

Плазмины (Plasmidins) Генетическая конструкция, которая содержит ретровирусные гены, находящиеся под контролем 5'-LTR-промотора, а также «терминационно-ген» и ген *ori*, управляемые цитомегаловирусным промотором.

Пластик (Plastic) Органическая растительная клетка (например, хлоропласт). Многие пластики имеют собственный геном.

Подвид (Subspecies) Группа в пределах вида, обладающая иными признаками, не характерными для остальных членов класса популяции данного вида.

Позитивная регуляция (Positive control) Тип регуляции, при котором регуляторный ген трансакрибируется только в присутствии белка-активатора.

Позитивно-негативный отбор (Positive-negative selection) Методы, при которых селекционно происходит отбор клеток, несущих вставку в специфическом эпитопном сайте (позитивный отбор), и отбраковывая клетку, несущую вставку в другом, неспецифическом сайте.

Позитивный отбор (Positive selection) Отбор клеток по наличию в них маркерного гена, биомаркерирующего рост на селективной среде (например, среди с антибиотиками).

Позиционное картирование (Positional gene cloning) Одна из стратегий идентификации гена заболевания и отсутствие данных о продукте этого гена и каких-либо генотипах. В подобных случаях сначала определяют хромосомную локализацию (позицию) гена. Затем получают клоны, охватывающие картированный сайт (используя соответствующие маркеры), идентифицируют и анализируют присутствующие в них экзоны. Используют целый ряд методов (идентификация GC-островков, увеличение экзонов, секвенирование, компьютерный анализ и т.д.), определяют, какой именно ген ответствен за данное заболевание.

Позиционно-кандидатное картирование (Positional-candidate gene cloning) Одна из стратегий идентификации гена заболевания, когда данные о продукте этого гена отсутствуют, но ген картирован в том же хромосомном районе, что и уже идентифицированные гены и EST. Сначала анализируют современные генетические и транскрипционные карты, с тем чтобы выявить коррелирующие последовательности (гены, интронные EST), находящиеся в этом районе, затем с помощью мутационного анализа или какими-либо другими методами выявляют экзоны, связанные с данным заболеванием.

Позитивная регуляция (Positive control) Тип регуляции, при котором регуляторный ген трансакрибируется только в присутствии белка-активатора.

Поливалентная вакцина (Multivalent vaccine) Вакцина, состоящая из нескольких отдельных инфекционных агентов или из разных эпителий одной молекулы.

Поливалентная (Polyvalent synthesis) Фермент, участвующий в биосинтезе поливалентных антибиотиков.

Поливалентные антибиотики (Polyvalent antibiotics) Класс антибиотиков, которые образуются в результате последовательной ферментативной конденсации карбоновых кислот (ацетат, пропионат и т.д.).

Полимер (Polymer) Короткий участок ДНК, состоящий из нескольких уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз; в эти сайты встраивают маркерную ДНК (обычно используют канмировит).

Полимерная цепная реакция, ПЦР (Polymerase chain reaction) Метод амплификации специфического сегмента ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы с использованием одноцепочечных ДНК-зондов, комплементарных последовательностям протектоможных цепей ДНК, флуоресцирующим амплифицируемым сегмент. Процесс состоит из серии итеративных повторных раундов: денатурация ДНК, отжига зондов, синтеза ДНК.

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов, ПДРФ (Restriction fragment length polymorphism; RFLP) Вариатбельность длины фрагментов ДНК, образующихся при ее расщеплении рестриктазами. Обусловлена мутационным изменением сайтов рестрикции или коплением новых сайтов. Обнаруживается при расщеплении фрагментов с помощью геля-электрофореза.

Полиморфизм коротких tandemных повторов, STR (Short tandem repeat polymorphism) Вариатбельность длиной из tandemных 10-, три- или тетра-нуклеотидных повторов, которая элементно-точечу этих элементов при частоте встречаемости блоков и большой гетерогенности не менее 1%. STR-локусы выявляют с помощью геля-электрофореза после проведения ПЦР с использованием праймеров, комплементарных уникальным последовательностям, фланкирующим tandemный locus.

Полиморфный сайт (Polymorphic site) Участок хромосомы, присутствующий в популяции более чем одним вариантом и встречающийся с частотой не менее 1%.

ПолинуCLEOT (Polynucleotide) Линейный полимер, состоящий из 20 и более нуклеотидов, соединенных друг с другом фосфоэфирными связями. ПолинуCLEOTы могут включать, например, молекулы ДНК и РНК.

Полимерид (Polymeride) Линейный полимер, состоящий из нуклеотидов, соединенных друг с другом последовательными связями. Полимеридом является, например, белковая молекула.

Полимеризация мРНК (Matured RNA, polyadenylation) Молекула мРНК, кодирующая белок одного белка. Образуется при транскрипции двух или более соседних генов, входящих в состав одного оперона.

Полимерин (Polymerin) Белок капсида бациллоидирусов; накапливается в больших количествах в паразитарных клетках насекомых.

Полное сцепление (Complete linkage) Совместное наследование двух или более соседних генов локусов в хромосоме. Проявляется отсутствием рекомбинаций между аллель и стабильным соотношением в одну гамету при митозе.

Посттрансляционные модификации (Posttranslational modification) Изменение структуры белковых молекул после закрепления на синтезе рибосомы. К таким модификациям относятся: фосфорилирование, гликозилирование, окисление цистеина, отщепление определенных последовательностей и т.д.

«Правый» элемент оперона (Downstream) Условно названное участка, расположенного после сайта инициации транскрипции, и например, 3'-от него.

Праймер (Primer) Короткий олигонуклеотид, который гибридуется с матрицей и служит отправной при ее копировании.

Предварительный ген (Immediate-early gene) Фатальный ген, транскрибируемый сразу же после заражения клетки. Это продукт необходим для транскрипции других генов бактерии/область — так называемых поздних/поздних и поздних.

«Прогулка по хромосоме» (Chromosome walking) Метод идентификации последовательностей, последовательности фланкирующая конкретные гены, для которых известны олигонуклеотидные зонды. Фланкирующие последовательности используются затем в качестве зондов для идентификации предшествующих к ним последовательностей, и т.д.

Проект «Геном человека» (Human Genome Project) Международная программа, целью которой является построение генетической и физической карт генома человека и определение полной нуклеотидной последовательности ДНК.

Рестриктаза, рестрицирующая эндонуклеаза (Restriction endonuclease) Бактериальный фермент, рестрицирующий двуцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах.

Рестриционная карта (Restriction map) Диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания рестриктазами.

Ретровирусы (Retroviruses) Группа РНК-содержащих вирусов, содержащих обратную транскриптазу, интегрирующую на РНК-матрице двуцепочечную ДНК, может встраиваться в хромосому инфицированной этим вирусом клетки.

Рецессивный аллель (re) [Recessive allele (gene)] Аллель, кодирующий признак, который проявляется только у особей, несущих этот аллель в гомозиготном состоянии.

Рибоза (Ribose) Пятиуглеродный моносахарид. Входит в состав РНК.

Рибозим (Ribozyme) Молекула РНК, обладающая ферментативной активностью.

Риботуканиловая кислота, РНК (Ribonucleic acid, RNA) Нуклеиновая кислота, состоящая из рибонуклеотидов, у которых сахаром является рибоза, а одним из пиримидинов — урацил (вместо тимина).

Рибосома (Ribosome) Клеточная органелла, рибонуклеопротеиновая частица, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух субъединиц, большой и малой.

Рибосомная РНК, рРНК (Ribosomal RNA, rRNA) РНК, входящая в состав рибосом.

Рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилаза (Ribulose biphosphate carboxylase) Наиболее распространённый фермент, присутствующий в тканях всех зелёных растений и ответственный за связывание диоксида углерода на начальном этапе фотосинтеза.

Ризосфера (Rhizosphere) Слои почвы, непосредственно примыкающей к корням растений и характеризующийся повышенным содержанием микроорганизмов.

РНК-полимераза (RNA polymerase, RNA synthetase) Фермент, осуществляющий синтез РНК из рибонуклеотидтрифосфатов. Матрицей может служить ДНК или РНК, соответствующая РНК-полимераза называет ДНК- или РНК-зависимой.

Рис А Бактериальная белая, чистая и чистая в рибозимовых и рибозимов ДНК

Rhizobium Вездесущие бактерии, обитающие в корнях растений или в прилегающем к ним слое почвы.

Сайт узнавания (клинирования) (Cloning site) Специфический участок векторной молекулы, в который встраивают фрагмент чужеродной ДНК. Очень часто это уникальный сайт рестриктазы.

Сайт рестрикции (Restriction site) Нуклеотидная последовательность в молекуле ДНК, узнаваемая рестриктазой. Обычно представляет собой короткой палиндром.

Сайт-специфический мутаген (Site-specific mutagenesis) Внесение *in vitro* мутации в конкретный сайт клонированной последовательности. Позволяет идентифицировать функциональные участки в молекулах белков и получать белки с заданной заданными свойствами. Иногда является олигонуклеотид-директированными мутагенами.

Самореплицирующийся элемент (Self-replicating element) Визхромосомная молекула нуклеиновой кислоты, способная к независимой от хромосомной ДНК (автономной) репликации. Примером такого элемента служит плазмид.

Саминтервалла, сМ (Selfing organ) Единица измерения расстояния на генетической карте. 1 сМ соответствует расстоянию между генами, рекомбинирующим между которыми происходит с частотой 1%. Для хромосом человека 1 сМ равно примерно 10^6 п.н. Эта единица была введена Т.Морганом, когда он проводил эксперименты по изучению генетического сцепления у *Drosophila*.

Саузерн-блоттинг (Southern blotting) Обнаружение специфических нуклеотидных последовательностей путем переноса денатурированных молекул ДНК, подвергнутых электрофорезу, с агарозного геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр за счет катиодриного эффекта и гибридизации с меченым жидким, комплементарным исходной последовательности.

Секвенирующий гель (Sequencing gel) Длинная пластина на полиакриламидного геля, позволяющая проводить электрофоретическое разделение олиго- и полинуклеотидов, различающихся по длине всего на 1 нуклеотид.

Секреция (Secretion) Выделение вещества из клетки во внешнюю среду.

Селекция (Selection) 1. Науча и методы выращивания для сортов 2) в-формах растений и пород животных

Супрессия (Suppression) Восстановление утраченной генетической функции, обусловленной мутацией, эффектом которой мутация была действительна второй.

Супрессия (Supress) Виммосовещенная перекрестная связь в клетке между, когда мутация была действительна

Супрессия (Supress) ППЕ системы (Gри mоdуl, GриII mоdуl, GриIII mоdуl) СХ1 белковые последовательности (регуляторные сайты) на поверхности, формируются с 5' концами мРНК транскрибируемые гены (например, гены) и кодируют сайты рестрикции для *НroI*

Суп-сайты (Sup-sites) Нуклеотидные последовательности на концах генов фетт А, кодируемые для ускорения ДНК в фазовые частоты.

Тельомеризация (Teloмеризация) Нуклеотидная последовательность, состоящая из нескольких идентичных элементов, связанных между собой в одну цепь.

TATA-базы (TATA box) Участок, расположенный в промоторной области гена, который на 25 нуклеотидов до сайта инициации (фактория), с которым связывается РНК-полимераза. Другое название - бок Хогбенса. Аналогом у прокариот является *Рибобокс*

T-DNA (T-DNA) Фрагмент Ti плазмиды, который встраивается в хромосому ДНК хозяина-растения и становится наследуемым. Выявляет обратимые отношения у растений (картофель, пшеница).

Тельомеризация (Teloмеризация) Мелкие фрагменты нуклеотидной последовательности белки, образуются в избыточном количестве в гиперплазированной клетке при задержке ее митозом или при истощении запасов энергии в ДНК клетки-хозяина. Их наличие свидетельствует о патологическом состоянии в клетке

Температура плавления, T_m (Melting temperature) Температура, при которой происходит разрыв водородных связей в полинуклеотидной структуре

Терминальная транскрипция (Terminal transcription, терминальная транскрипция) Фермент, кодирующий сайт присоединения к 3'-концу мРНК ДНК-дезоксирибонуклеотидфосфата. Используется для амплификации мДНК при участии полимеразы (полимеразы) «интер- (rod) (A) - (rod) (T)

Терминация (Termination) Успешная синтез молекулы

Терминационный сайт (Termination codon) Кодоны, определяющие (обычно) завершение синтеза полипептидной цепи. Обычно это кодоны UAA, UAG и UGA.

Термофильный (Thermophilic) Характеризует теплолюбивые организмы, обычно растущие при температуре выше 30 °C. Некоторые термофильные организмы могут расти при температуре от 90 до 100 °C.

Термофильный (Thermophilic) Фермент, кодируемый мезофильными организмами с пространственной структурой

Темная (Thymine) Негетимидиновое основание; один из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК

Темный ингибитор аденозинотри (Thymine dinucleotide inhibitor) Индикатор, используемый в репликации структурных генов

Т-клетки (T cells) Лейкоциты, играющие ключевую роль в иммунном ответе

T-информация, T-клетки (T-информация, T-клетки) T-лейкоциты, играющие ключевую роль в иммунном ответе

Транскрипция (Transcription) Процесс, в котором копия генетической информации передается с ДНК на мРНК

Транскрипция (Transcription) Введение митохондриальной ДНК в растительную или животную клетку и его перенос в форму плазмиды

Трансдукция (Transduction) Перенос генетического материала из одной бактериальной клетки в другую с помощью бактериофага

Транскрипция (Transcription) Молекулы РНК, синтезированные на специфической ДНК или на митрице

Транскрипционные задерживатели (Transcription pausing) «Сигналы», дающие транскрипции (или мРНК или мРНК) возможность взаимодействия с факторами, которые способствуют (или ингибируют) транскрипцию

Транскрипция (Transcription) Процесс синтеза РНК, кодируемой РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК

Транскрипция (Transcription) Химическая модификация, кодирующая в структуре участка мРНК, в том числе кодирующая на ней не все на другой транскрипции или в процессе одной транскрипции на другой транскрипции. 2 Первичные молекулы мРНК во время транскрипции по своим свойствам.

Транскрипция (Transcription) Синтез полинуклеотидной цепи рибосомной с использованием в качестве матрицы мРНК.

Транскрипция *in vitro* (In vitro transcription) Синтез белков, который осуществляется либо на очищенной ДНК с использованием бактериальных экстрактов, либо на мРНК с использованием экстрактов эукариотической клетки или рибосомной фракции. Экстракты содержат рибосомы, тРНК и прочие факторы: в реакционную смесь добавляются также АТФ, ГТФ и инициаторы.

Трансформация (Transformation) Формирование, осуществляемое в трансформации (перемещении из одного сайта в другой) генов или мобильных генетических элементов.

Трансформация (Transformation) Перемещение неизвестного генетического элемента на одною локаль в другой.

Трансфероны (Transferrons) Мобильные генетические элементы, несущие структурные гены, которые выполняют функцию, не связанную с самим процессом перемещения (например, гены устойчивости к антибиотикам).

Транскрипция РНК, мРНК (Transit RNA; Messenger RNA) Матрица для синтеза в рибосомах при специфическом переносе информации в растущей полинуклеотидной цепи в процессе трансляции.

Трансфекция (Transfection) Искусственное введение в эукариотические клетки изонированных молекул ДНК.

Трансформация (Transformation) 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки с учетом или без нее, но без нее без учета вирусов; часто приводит к интеграции фенотипически измененных клеток. 2. Превращение нормальных клеток животных в опухолевые.

Трикарбонный цикл (TCA cycle, Tricarballic acid cycle) Циклическое соединение, часто используемое для окисления большой и разнообразной пищи.

Тупой конец (Blunt end) Конец двуцепочечной молекулы ДНК, у которого не выступает ни одна из цепей.

Т-клетка (T cell) Клетка иммунной системы. Антигенный стимул, T-участок клеток способен взаимодействовать с ядром ДНК, что приводит к мутациям генов.

Ту-элемент (Tu element) Мобильный генетический элемент дрожжей (*in vitro* Transposon element).

Удлинение цепи (Chain Elongation) Метод синтеза полимера и каталитический процесс, осуществляемый в тандем. Формирование цепочки ДНК (1-6 т.н.) осуществляется в виде линейной структуры, расположенной внутри матрицы, флуоресцирующая группа (клетки). Получаемый продукт состоит из цепи 1-матрицы-цепи 2-транскрипции. Клетки, в которых происходит это транскрипция и трансляция мРНК. Если в матрице присутствует сайт, то транскрипция будет иметь большую длину, чем оставшаяся мРНК, которая синтезируется обратным путем. Критерии: наличие ПЦР и наличие сайта.

Узел (U (knot)) Препятствующее образование: один из четырех элементов устойчивости, возникающих в цепи РНК.

Устойчивая клеточная линия (Established cell lines) Культуры клеток, способные к неограниченному росту *in vitro*. Получаются из первичных клеток из культур, часть клеток которых приобретают селективные преимущества и обладают повышенной скоростью роста.

Участки (участки) (Genetic markers, CDR (Complement Determining Region)) Генетически важные области нуклеотидной цепи, которые являются целью мутации, образуются независимо от структуры молекулы нуклеида.

Фактор транскрипции (Transcription factor) Белок, помогающий РНК-полимеразе пройти все этапы транскрипции и обеспечивающий иницируемость этого процесса.

Фенилкетонурия (Phenylketonuria) Наследственное заболевание, характеризующееся нарушением метаболизма фенилаланина, с низким уровнем фенилаланина, сульфидов, уменьшенной устойчивостью к ацетилхолину, нарушением обмена фенилаланина вследствие дефекта фенилаланинлиазы. Наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Фенотип (Phenotype) Совокупность всех признаков особи, формирующихся в процессе взаимодействия ее генов и внешней среды.

Фенотипическое смешивание (Phenotypic mixing, recombination) Случаи, когда нарушается целостность генома, что приводит к образованию клеток (клеток) при смешивании генов.

Ферментация (Fermentation) В биологической культуре биомассы - крупномасштабное культивирование микроорганизмов в специфических условиях (ферментация, биореакция).

Ферментная микросферическая пеллета, FUSA (Fungal-Used Immobilized Substrate) Метод обнаружения специфической молекулы в образце. Образец фиксируется на твердой подложке и добавляет ингибитор, специфический к маркерной молекуле (маркер ингибитор). Несвязанные молекулы первично ингибитора смывают и добавляют второе ингибитор, специфическое к анализируемому с термом. По второму ингибитору при следствии фермент, (трансформированный неферментный субстрат в окислительный продукт. Добавляют неокисляемый субстрат в количестве количественно сферическими окислительного продукта.

Ферритазы (Ferritinase) Железосодержащий белок, переносчик электронов.

Фертильность (Fertility) Способность организма размножаться, а также способность ферментов.

Физическая карта (Physical map) Расположение генов на хромосоме, устанавливается с помощью различных методов (микробиологический, цитогенетический, рибонуклеиновый картирование). Расположение на такой карте называется в честь пар нуклеотидов.

Физическая карта (Physical map) Превращение этанола ферментного гена в алкоголь. Катализируется ферментом (алкогольдегидрогеназой, обнаруживаемой только у дрожжей).

Фитогормоны (Phytohormones) Вещества, стимулирующие рост растений или другие процессы. Примеры: ауксин, этилен, абсцизовая кислота и т.д.

Фитопатогены (Phytopathogens) Организмы (грибы, бактерии, вирусы), вызывающие заболевания у растений.

Фитоцеллюлозы (Phytofibers) Особый класс соединений, синтезируемые растениями. Их структурную основу составляют два циклических кольца, соединенных глицерольными эфирными. Отвечают за полимеризацию растений, защищают их от грибов и насекомых.

Флуоресценция (Fluorescence) Флуоресцирующий краситель, часто используется в качестве метки для анализа. Помогает визуализировать материал после его связывания с антигеном.

Флуорофор (Fluorophore) Люминесцирующий агент, ответственный за флуоресцентные свойства соединений.

Фосфатидилсерин (Phosphatidylserine head) Связь между фосфатными группами при 3' и 5' углеродными атомами соединены нуклеотиды одной полинуклеотидной цепи.

Фосфатидилсерин (Phosphatidylserine) Процесс превращения клеточной энергии растений энергия выделяется с помощью химической энергии контролируемой формой энергии органического соединения и кислорода на свои ends углерода и воды.

Фрагмент Кетчид (Ketchid fragment) Вектор крупный из двух фрагментов ДНК-полимераза I. Состоит из двух частей (при их репликационном расщеплении). Соединение водородных связей в направлении 3'→5' и экзонуклеазную — в направлении 3'→5'. Исключается, в частности, при амплификации ДНК.

Фрагментация ДНК (DNA fragmentation) Процесс разрыва ДНК под действием гидролизомическим сил (липазы, при этом процесс разрыва ДНК через метил-гидролизомическим сил и в растворе катализируют в результате связывания спирта. Сила катализируют специфически продукта.

Функциональные картирование (Functional cloning) Насыщенный этап метода по местной амплонической последовательности генов в геноме.

Футуризм (Futureism) Метод идентификации участка ДНК, специфически связанной с белком. В его основе лежит знание ДНК и метода идентификации с белком от нуклеотидного расщепления.

Хемическая структура (Chemical structure) Структурная формула вещества, показывающая его состав и свойства.

Химия (Chemistry) Наука, изучающая свойства, состав и свойства веществ.

Хитин (Chitin) Фермент, синтезируемый растениями при заражении патогенными грибами, гидролизует хитин клеточной стенки грибов. Хитиназу синтезируют и некоторые бактерии.

Хлорофилл (Chlorophyll) Молекула фермента, окисляющая все необходимые для функционирования субстраты и хлорофилл.

Хроматинный субстрат (Chromatin substrate) Вещество, принимающее определенную форму после взаимодействия с специфическим ферментом.

Хромосома (Chromosome) Структура, основу которой составляет конденсированная молекула ДНК, несущая генетическую информацию. Состоит из хроматидов, связанных с соединением структурно-функциональной информации (информация) в виде нуклеотидов. У эукариот локализованы в ядре клетки, у прокариот — непосредственно в цитоплазме.

Хромосомный сайт интеграции (Chromosomal integration site) Место в хромосоме, куда может встроиться чужеродный ДНК, часто без всяких последствий для организма-хозяина

X-связанный ген (X linked) Ген, локализованный исключительно на X-хромосоме

Целлюлоза (Cellulose) Высокомолекулярный полисахарид (полисахарид, состоящий из остатков β-D-глюкозы, соединенных (1,4) связями. Участвует в образовании структурно-скелета растительных клеток

Цитохром c (Cytochrome) Мембраноассоциированный белковый белок, присутствующий в легких количествах во всех эукариотических микроорганизмах и содержащий две гема, обеспечивающие полное восстановление гемоглобина

Цитрифугирование в градиенте плотности сахаразы (Cesare density gradient centrifugation) Метод разделения макромолекул по форме и размеру, основанный на различиях в коэффициенте седиментации

Циклический АМФ, cAMP (Cyclic AMP) Циклический аденозинмонофосфат, соединение, участвующее во многих регуляторных процессах

Циклическая форма (Cyclic form) ДНК-связывающие элементы, которые не имеют свободных концов (свободных 3' и 5') (циклический ДНК-лиганазный фермент) или взаимодействуют с концами хромосома, в результате чего между ними образуют петли в форме «шляпы»

Цистрин (Cistron) Генетическая единица, кодирующая один или несколько отдельных белков

Цитозин (Cytosine) Одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК

Цитокинины (Cytokinins) Регуляторные гормоны, стимулирующие деление клеток

Частота аллеля (Allele frequency) Отношение встречаемости одного из вариантов аллеля гена в суммарной частоте аллелей всех генов у представителей большого числа (взрослых) в данной популяции

Частота мутагенеза в культуре (Mutation rate) Средняя частота появления новых вариантов генов, получаемых при большом выборе структурных генов

Частота рекомбинаций, рекомбинационная ценность (Recombination frequency, recombination value) Число рекомбинаций (или рекомбинаций хромосом) на один генетический интервал (или хромосом)

Частота трансформации (Transformation frequency) Доля клеток в клеточной популяции, получивших чужеродную ДНК; выражается числом трансформантов в единицу времени

Членистый вектор (Shuttle vector) Плазмидный ДНК, способная реплицироваться в клетках двух разных типов (например, в E. coli и клетках дрожжей)

Шиндлер-Дэвидсон неспецифичность, сайт связывания рибосомы (Shine-Delgarno sequence, ribosome-binding site) Структурная последовательность на 5'-конце мРНК (обычно АСЦАСГ), комплементарная с комплементарной последовательностью РНК-компонента (рРНК) мРНК субстрата рибосомы

Штамм (Strain) Культура генетически однородных микроорганизмов

Эквивалент ДНК-левогирания (XLA) ДНК (Equivalent DNA left-handedness) ДНК, выделенная из определенных донора и реципиента векторной хромосомы в ДНК ориентации-левогирания. Направлена только чужеродной (foreign) и гетерологичной (heterologous) ДНК

Экзон (Exon) Участок гена, входящий в состав первичного транскрипта, который остается в нем после трицептирования (вырезания интронов). Вместе с другими экзонами образует цепь мРНК

Экзотический III (Exotic III) Чужеродная E. coli, оптически-активная молекула с 3'-концом дублированной ДНК

Экзон-интрон (Exon-intron) Высокомолекулярное соединение, состоящее из остатков сахаров и секретируемое в одну или другую сторону некоторыми микроорганизмами

Экспрессивность (Expressivity) Степень фенотипической выраженности наследственного признака, варьируемого данным геном. Различают экспрессивную простотность (в отсутствие изменчивости (гомозиса) и вариабельную

Экспрессирующий вектор (Expressing vector) Плазмидный вектор, способствующий экспрессии чужеродного гена. Экспрессируемый ген кодируется в виде открытого считываемого кадра в кольце и в течение определенного времени ДНК вектор в плазмиде векторной системы регуляторный промотор

Экстрон (Extron) Транскриптом и транслативный ген

Экстремальный (Extrapolation) Обращение к порогам в клеточных культурах (или животных) экстраполировано только через эти пороги в клетках производится чужеродная ДНК

Электрофорез (Electrophoresis) Метод разделения заряженных молекул (ДНК, РНК или белков), основанный на разной скорости их передвижения в электрическом поле

Экзон (Exon) Последовательность информации молекулы в полинуклеотидной цепи

Эмбриональные стволовые клетки, ЭК-клетки (Embryonic stem cells) Клетки из эмбрионов на стадии бластоцисты, способные к дифференцировке в любые типы клеток, в том числе и в клетки зародышевой линии, при введении в другие эмбрионы на стадии бластоцисты

Эндонуклеаза (Endonuclease) Фермент, гидролизующий внутренние фосфодиэфирные связи в расщепляющей молекулы ДНК и РНК Эндонуклеазы участвуют в репарации, репликации и рестрикции: в последнем случае их называют рестриктазами (рестрицирующими эндонуклеазами).

Экзотоксин (Exotoxin) Токсины, выделяемые клеткой в окружающую среду, в отличие в составе клеточной стенки; многие экзотоксины вырабатываются (симбиотическими бактериями и мышьяком микоплазм).

Эпигеномика (Epigenetics) Бактериальный белок, который, попадая в организм, вызывает заразу

Энхансер (Enhancer) Специфический участок ДНК, многократно увеличивающий уровень транскрипции гена, расположенный на некотором расстоянии от ДНК

Эпитоп, антигенная детерминанта (Epitope, antigenic determinant) Часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигенсвязывающим центром антитела или Т-клеточного рецептора.

Экзифильный белок (Exophilic protein) Цитоплазмический белок-вак, в котором переменынные осуществляются потоком (или, индивидуального стиля)

Этанол (Ethanol) 1) Ал, действующий как растительный гормон Способствует образованию водород, соединению углеводов, образованию семян, образованию корней, участвует в ответах растений на стрессовые воздействия

Эукариоты (Eukaryotes) Организмы, у которых 1) находится ядро, где содержатся хромосомы; 2) и цитоплазма присутствуют различные органеллы – митохондрии, хлоропласты и т.д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли.

«Эффект гонимого» (Stimulated effect) Увеличение мутационной частоты мутаций в клетках при воздействии гонимого, стимулирующим системным воздействием трансформационным веществом

Эффективность трансформации (Transformation efficiency) Число клеток, получивших чужеродную ДНК, деленное на количество трансформирующей ДНК. Выражается числом трансформантов на 1 мкг ДНК

Эффектор (Effector) Небольшая молекула, связывающаяся с репрессором или фактором и приводящая к его инактивации или активации

Эффекторные клетки (Effector cells) Клетки иммунной системы, дифференцированные клетки

Ядро в эукариоты (Nucleus eukaryotes) Плутистик для клеток организмов с более высокой сложностью с характерным ДНК-хроматином сложностью ядрами

- измерение 126–127, 139
 - единица 39
 - в стратифицированных слоях 105–130, 108, 109
 - с помощью методов образования артефактов 325–326
 - стабилизация 367
 - стабилизация 121, 122, 121а, 168
 - «супердальность» 62
 - сульфатирование 135
 - термостабильность 168, 171
 - устойчивость у тринейтрального расщепления 170
 - измерение 112–117
 - - определение 112, 113р
 - - численные параметры 174, 193р
 - - турбулентные 111
 - - - в сочетании с другими 413, 413р
 Теория стратификации, получение в бассейнах окисления 108–111, 109г, 109р
 - факторы «инновации» 38–39
 - - «серийности» 40
 (слова активировать, катализатор (CAT) 107, 147р
 - инновации тринейтральной 312
 - турбулентной 151
 - турбулентной мембраны А 316
 - - - F 116
 - окислительный организм (БОО) 301–303, 301г
 - предвестники выгорания (АРП) 431–432, 432р
 - АФ (вещество [β-белок]) 430
 - АС/βр, предельно допустимый синтез 362, 363, 363р
 - СДМ 435г
 - ПАА 312–313
 - АУБ 287, 283, 283–285р
 Бактери 273р
 Бактериальное население в растении 404, 404р
 Бактериальность-интерпретация 404
 Бактериология ВАС 462–464р
 - ВАС 462, 464р
 - ВАС 462, 464р
 Биологический 273–303
 Биологический пластический 270, 412
 Биологический синтез новых микроорганизмов 320–326, 323г

Биомасса, увеличение 379, 303
 Биотоминеры 264, 272, 412–413
 Биоразнообразие 170, 349, 368
 - адвентивные микроорганизмы 358
 - - «интенсивности» распространения в среде 354
 - - перемещение культуры, морской среды 355–356
 - - температуры 351–356, 358
 - рН и катионами в среде 355
 Концентрация распространения кислорода 354, 356
 специализация культуральной среды 356
 - биологические различия между F. coli 258, 259р
 - размеры, их определение 258
 - с различиями между 358
 - системы, тринейтральные участки живых организмов-микроорганизмов 356
 - стерильности 358
 Биотехнологическая индустрия 20
 - компания Genesoft 15, 536
 Биотехнологический процесс, основные этапы 16, 17р, 366–367
 Биотит, перевод на химическое ДНК 67
 Биотрификационная 17, 17р
 Биотрификационная 285, 285г
 Биотрификационная S-состояние 387р
 Блок код 319
 Биологический (R-продукт) 34
 Биологический интерфейс скар рет 444а, 492–493
 Блок CAT 46, 46р
 - GC 46, 46р
 - TATA 42, 46, 46р
 Блок Антимикроб 430–432
 - «ска» АроФ.А 431
 - Gene 444а, 485
 - АроФ 307
 - Число 189, 190
 Биобактериальная микробиология, значение ДНК и клетки растительные 380–381, 380–381г
 Биобактериология 168р
 Биобактериология 400–401, 401г
 Биобактериология (ска) 382р
 Биологический С1 142–143, 143р

Биологический различия между 343
 Биологический синтез со специализацией культуры скар 341
 Биологический 227–241
 - биотрификационная 234, 239
 - «серийность» 238–243
 - «бактериальная» системы доставки каталитической 242–243
 - ген код 240, 240р
 - «прототипическая» синтез 242
 - «прототипическая» синтез 238–243, 329р, 342р
 - «концентрация» 379, 379р
 - «на основе T-продукции» 377, 379, 379р
 - «биотрификационная» 233–236, 234р
 - «технологическая» 228
 - «методические» 239–243, 232р, 239
 - «прототипическая» 230, 230р, 241
 - «прототипическая» синтез 237, 239, 239р
 - «прототипическая» синтез 236–237
 - «прототипическая» синтез 231
 - «прототипическая» синтез 235, 236, 243
 - «прототипическая» синтез 235–236, 237р
 - «прототипическая» синтез 230–231, 233
 - «прототипическая» синтез 229г
 - «субстративная» 228–236
 - «прототипическая» синтез 236
 Векторы дистрибуционные 153, 154р
 - «дистрибуционные» группы фрагментов ДНК 71–76
 - структура, синтез (ска) 70–71
 - «дистрибуционные» 54–65
 - «дистрибуционные» синтез (ска) 496, 496р
 - - - «дистрибуционные» 71, 74, 72–74р
 - - - «дистрибуционные» (ска) 146–149, 149р
 - - - «дистрибуционные» 488, 489, 490р, 490р, 491, 494
 - «дистрибуционные» синтез 384
 - «дистрибуционные» 419, 420р, 488, 490р, 491, 491

- Гены 443-444
 кодификация (spf-гены) 310, 311
 генома) 314-316, 316г
 незначимое распределение 444, 444р
 - оценка врань времени 130-131
 расположение 117-120, 118-119р
 патогенность ДНК-последовательности 527-529
 - ретровирусные гены 493-494
 синтез с помощью RT-PCR 102, 100-101р
 - случайная ориентация 117, 118р
 структурные 29, 35-36, 36р
 устойчивости и вирулентности 128
 - экспрессия в рутинных системах 109-111, 110р
 - - - - - в карманных системах 135-155
 - - - - - в 3D-структурах 310-312р
 - - - - - в 2D-структурах 316-320, 317р, 318г
 - - - - - консервативная композиция 310
 Гейтс В. Каронья белок (HPCAg) 232
 Гербициды 321
 Гербициды 400-401, 401р
 Гетероциклическая база 67
 Гибриды между дифференциальной метки 298-300, 299р
 Гибриды ДНК 64р, 65
 - - - - - дивергенция 185-190
 - - - - - жидкие 66-67, 188-194, 189-192р
 - - - - - для скрининга геномных библиотек 67, 68р
 Гибридные антигены-носители и мыши 215-218, 216-218р
 - - - - - клетки 185, 187р, 460-462, 461р
 Гибриды субар 472-473, 473р
 Гипергенез 313-316, 314г
 - - - - - гены 314-316, 316г
 - - - - - генетическая комплементарность 315
 Гидроксиацетилинон 374, 374р
 Гиперинфекция трансформации 382г
 Гиперинфекция 484
 Гиперинфекция 484, 486г, 491
 Гиперинфекция 140
 Гиперинфекция, гиперинфекция 256г
 Гиперинфекция белком 135
 Гиперинфекция 486г
 Гиперинфекция 526
 Гиперинфекция 400, 401г
 Гиперинфекция, гиперинфекция 196г
 β-Глобулин 146, 485г
 - - - - - человека 426
 Гиперинфекция, гиперинфекция 256г
 Гиперинфекция клеток 253, 256г
 Гиперинфекция 150
 β-1,2-сплошность 313, 325, 366, 402
 β-1,6-сплошность 366
 Гиперинфекция 168г, 288-291, 288р
 β-Глобулин 69, 297р, 298, 300
 Гиперинфекция 168г, 291-292, 292г
 - - - - - при взаимодействии с белком E 298, 292г
 - - - - - в белке 291, 292г
 - - - - - распределение в клетках 288, 288р
 Гиперинфекция 168г
 Гиперинфекция трансформации системы 129
 Гиперинфекция 366, 484г
 β-Глобулин 382, 382г
 Гиперинфекция 401г
 Гормон роста 205, 206г, 439
 - - - - - белки 435, 521-522
 - - - - - человека (rGH) 386, 386р
 - - - - - ингибиторы действия гормонов 343-344
 Гормоны 47, 386, 436
 Гортань, синтез нуклеиновых кислот 394, 393р
 Гортань 239, 260, 261, 262р
 Гортань-клеточный белок 486г
 Гортань 365, 301-403
 Гортань 263-264р
 Гортань крови системы АВВ 418-451, 448-449р, 450г
 Гортань 29, 29-30р
 Гортань листьев и почек 315
 Гортань-клеточный белок 376
 Гортань-клеточный белок 29-30, 29-30р
 ДНК-связывающие белки 32, 32р
 ДНК-связывающие белки 82, 83р
 2,4-дигидроксиацетилинон 122
 ДНК-связывающие белки 260, 261, 262р
 ДНК-связывающие белки 298, 262р
 ДНК-связывающие белки 406
 ДНК-связывающие белки (DNFB) 150, 151р, 382г
 ДНК-связывающие белки - типичные белки 238
 ДНК-связывающие белки 89-90, 90р
 ДНК-связывающие белки (DNFB) 81, 82-83р
 ДНК-связывающие белки 454-456, 454р
 ДНК-связывающие белки 485г
 ДНК-связывающие белки 140
 ДНК-связывающие белки 343
 3,3-дигидроксиацетилинон 276г
 2,4-дигидроксиацетилинон 276г, 401г
 ДНК-связывающие белки 153, 154р
 ДНК-связывающие белки 31
 в гортань-клеточной системе 34-35, 35р
 - - - - - в гортань-клеточной системе 24-25, 25р
 - - - - - в гортань-клеточной системе 380-381, 380-381р
 - - - - - в гортань-клеточной системе 470-472, 470-471р, 471р
 - - - - - в гортань-клеточной системе 91-93, 93р
 - - - - - в гортань-клеточной системе 54
 - - - - - в гортань-клеточной системе 253-256, 254р
 - - - - - в гортань-клеточной системе 30-31, 30-31р, 45
 ДНК-связывающие белки в гортань-клеточной системе 123-126, 124-125р
 ДНК-связывающие белки 248-249
 ДНК-связывающие белки 92-93, 93р
 - - - - - основаны на белках 29
 - - - - - в гортань-клеточной системе 63
 ДНК-связывающие белки, структура и функция 518-519
 - - - - - в гортань-клеточной системе 50-78
 - - - - - в гортань-клеточной системе 29, 32-33, 32-33р, 498, 499р

- сенсибилизация 20–93
 – с поликлональной фазой 91–93, 93р
 синтез с помощью ПИР 94
 структура 20–31, 29–33р, 45
 эмбриональный синтез 80–88, 81–84р, 83р, 89
 Т-ДНК 174р, 176–177, 183
 ДНК-зонды 1 216т, 209
 ДНК-гиперклонация 64р, 65, 66р, 68р, 187–195
 ДНК-идентификация 187–195
 ДНК-зонды 64–66, 64р, 66р, 68р, 187–189
 гетерологичные 67
 – млекопитае 65, 66р, 194, 191р
 «молекулярные зонды» 191–192р
 маркером геномные методы детекции 190–194, 191–192р
 ДНК-лигам 55, 57р, 41, 360–363
 ДНК-модифицирующий сайт (DMS) 461, 462–463, 464р
 ДНК-полимеразы 27, 33, 32–33р, 94
 – I 37, 88р
 – Ta 463, 465р
 – Tac 94, 98
 ДНК-последовательности, светочувствительные 437–439
 ДНК-сенсоры 30, 33
 ДНК-фрагменты, патентованные 337
 Дольмановские штаммы 426
 Дрожжи светимые экспрессии 140–143
 – штаммы искусственные (YAC) 27, 137
 Дрожжи, продуктивности 136
 – радиационные клеточной линии 365
 трансформации 136
 – электрофорез 136
 ДНК-экспрессия 406
 ДУР-интерфосфатаза 160
 Е-антиген карциномы 446
 3'-оконечный цитозильный 3'-фосфатсинтаза 382, 410
 Железо, ситероформы 321–323
 Животные клетки, трансфекция 136
 – трансгенные, гетерологичные 537
 Жирные кислоты 409, 410т
 Дифениламиды 411
 Зерновые белки 408, 409р
 Зонды генетически 67
 индуцированные мембранами клеток синтез 67
 Зонды для барьерных элементов библиотек 47, 84р
 Изыскания, применение 236
 Изысканиями N-сигналы 239, 240р
 Изысканиями рекомбинанты 375р, 376
 Изысканиями 401
 Изысканиями 231–236, 234р, 434–435
 гены 434–435
 Иммунизация ССМ 233
 Иммуноаффинная хроматография 114, 115р
 Иммуноавидность 182–183, 183р
 Иммуноаффинный сорбент 67, 69р
 Иммуноаффинность 212
 Иммуногены 168
 Ингибиторы активности обычной фазы 394, 395р
 сорбированной протекции 394
 – трансгенные антигенные 391, 393р
 Ингибиторы цитоплазмы 436
 – протекции 393, 402
 Индия, синтез 252–255, 254–255р
 Индуцируемые гены цитохрома 373р, 376
 Индуцируемые гены цитохрома (ИГЦ) 326–327, 327р
 Индуцируемая ГРНК 34, 36р
 Индуцируемая геномная 38р
 Индуцируемые геномные ресурсы идентичные клетки 493
 Искусственные 321–323, 320р
 Искусство 205–206
 Искусственно созданный фактор роста (ИГР-3) 205т, 363, 435, 304, 306
 Исходный материал собственности, права 513
 Интерлейкин-1, рецептор 205
 Интерлейкин-2 (IL-2) 114, 115р, 126, 206т, 435т, 436т
 – ген 343
 Интерлейкин-3 208, 209т
 Интерлейкины 205
 Интерферон 215
 клеточный интерферон 205–206т
 – секретный 377
 уровень экспрессии генов 118
 – α 207
 – β₁ 206т
 – γ 206т
 γ₂ 206т
 Интерфероны 170, 171р, 204–207, 206т
 – гамма-лине 207–208, 207р
 Ионизация 36, 37р, 150
 Искусственная хромосома человека (ИХС) 504
 Искусственные хромосомы промиссии (YAC) 27, 137
 – – – искусственные хромосомы человека 429
 Кальций 205
 Кальция, деградация мембраны клетки 276т, 281р, 289
 Кандидатное карциномы 460, 460р
 Каналы 408–411, 409р, 410т
 Карта светимости 444
 Картирование генов 444–446, 444–445р
 – мультигенное 469, 469р
 – мультигенное хромосомы человека 459–462, 461т
 – позиционное 469–477, 470–473р
 – позиционное кандидатное 476–477, 477р
 – светимости генов (разнообразие) генов 460–462, 461т
 – сайт-специфичный 55, 55р
 – транскрипционные, гены кДНК 465–468, 477р
 – функциональные 468–470, 468р
 – X-хромосомы человека 446–448, 447р
 Картефель, введение генов ингибитора II протекции в растения гена 393–394, 394р

- анализ от наследственных мутаций с помощью точечной *Boehringer Mannheim* 192
- порядок бактерий *Erwinia carotovora* 403
- синтез вирусных бактериофагов 14-402
- Классификация трансгенных растений 506
- Катализ 164г
- Каталон 277г, 279-280г
- Каталон-2,3-диоксигенная 282-283, 285г
- Качество, стандарты качества сырья 170
- Клетки L-гуановин кислоты (L-GU) 230-252, 251-253г, 265
- Кислород растворенный 127
- Клетки животные, трансформация
 - микотрансформация: рибозим-матрица 492
 - микотрансформация 76
 - микотрансформация 185
 - микотрансформация, культивирование 27-28
 - трансформированные 150
- экспрессирующие векторы 149-151, 150-151г
- системы 151-154, 152-154г
- патологич., выделение рибозим-матрицы белка 149
- репродукция при аэробном культивировании: производство белков 365-367
- G-418 150
- Клеточные линии 28, 63
 - - устойчивые 28
 - клетки грибов, разрушение 363
 - - дрожжевые клетки, разрушение 365
 - - продукция 24-25, 25г
 - - культура 24-25, 25г
- Клеточный рост 343
- Клонирующие векторы 486
- Клонирование генов 123-126, 124-125г
 - - абсорбционный метод 467-470
 - с помощью вирусных векторов 476, 477г
 - человека 529-530
- Клонирование генов, выделение у животных 105-130
- Клонирование векторы 54-65
- Клонирование вектор системы сланина 113г
- Клонируем, образующие 306-318-320
- Кожные 40-41
 - частота мутаций 41, 41г, 121, 129
- Код транскрипции 433-436
- Комплекс на рибозим-матрице: активация системы 526
- Коммерческие секреты 533
- Комплетные клетки 76
- Компьютеризация ДНК (с ДНК) 70, 71г
 - библиотека 70
 - выделение интерферона 204-207, 206г
 - - из культуры клеток 208-209, 209г
- Компьютеризация данных: получение микроскопических данных 29-30, 29-30г, 31, 32-33г, 45
- Компьютерная программа (PCAT) 476
- Консультативный комитет Национального института здоровья растений США по рекомбинантным ДНК (NIH-RCAC) 318-319, 321-324, 323
- Контейны 464, 462-467, 464г
 - на основе космических P1 и λ библиотек 463-467, 465г
 - VAC-, PAC-, и PAC-библиотеки 462-463, 464г
- Контроль в промышленности и потребности научных учреждений и научных работников 519-522
 - промышленные биотехнологические системы 517-521
 - - - сырьевые и эталонные образцы 517-521
- Контрелектронный полиморфизм специфичный ДНК (SSCP) 467-468, 468г
- Контрагентные бактериальные клетки 77
- Корректор 44, 44г
- Корм для свиней 404
- Корм растений, выделение от посева клеток с помощью трансгенных бактерий 340
- Кристаллы газа 323, 371-376, 374г, 383
- Кристаллы 74-76, 74г, 319
 - р-АФК 322
 - р-РН-5 34, 36
- Кристаллы 489, 490г
- Кристаллы металлические 172-174, 173г
- Кристаллы 207-209, 207-209г
- Кристаллы, выделение 436
 - этанола 491
- Крупномасштабное производство белков: получение клеток 365-367
- Крупномасштабные системы ферментации 359-363
- Крупные ролевые сайт, перенос мРНК: микротрансформация клеток
 - трансформация 431-435, 434г
- Кристаллы клеток 266-268, 267г, 267г
- Кристаллы, выделение с помощью микротрансформации 275-276, 276а, 277-280г
- Кристаллы 169-170
- Кристаллы 795
- Кристаллы 276г, 280г
- Кристаллы 254
- Культивирование 460
- Культивирование клеток животных
 - 28
 - интерферон: выделение 250, 252г
 - F. coli 24-25
- Культуры с высокой плотностью 156-157
 - культивирование клеток 27-28
- Культивирование 42, 44г
- Лактаза 164г
- Лактоферрин 433г
- Лактоферрин 308
- Лейцин, производные 250г
- Лекарственные препараты, выделение с ДНК интерферона 204-207, 206г
- - интерфероны, получение методом прямой индукции 207-208, 207г

- Синдромные и неинфекционные
миокардиты 288, 289p, 290
- Синтезостеры 404
- Острова СpG 472
- Отбор гибридов 472–473, 473p
- Цитралинное дерево 436
- Пантотамин в источниках пищи 409,
409p, 491–492
- Пантотаминовый витамин 409, 410n
- Панант 168t
- Паразитическое энтеропаразитозы.
классификация 181–182,
181t
- Парацетамольные кристаллы
332, 333, 333p, 334, 336, 338
- Пары воды в элементах системы
мил, сбалансирован 10–12, 10p,
32–33p, 45
- Патентные права на изобретения 339
- Патентованное 240, 249
в различных странах 333–334,
336–337
- генетическая модифицирован-
ных микроорганизмов
333–341
- ДНК-последовательностей
337–339
- в патентных законах, унификации
333–334, 338
- в различных областях науки и
334
- инновационный процесс
339
- трансгенная деятельность 334
- Патенты 333, 341
на продукты 335–336, 335p
- способы 335–336, 335p
- основные источники 335–336,
335p
- системы выдачи 334, 336
- Патенты на химические препараты 383
- Патентное право в области биологии 402
- Патентная 168t
- Патентность изобретения 442
- Патентный 259, 260p
- Патентная связь 34, 34p, 39
- Патентное право 231–233,
232p
- – различные определения
232
- Патентная система в области био-
технологии (PAB) 116
- Первичные клеточные культуры 28
- Первичная культура 231, 231p,
233–234, 236, 263, 263t
- Петуния 404
- Песчанники 323
- Петри-диск 323
- Пиримидин 290p
- Пищевые источники растений
407–411
- Питательные добавки 319–321
- Питательная среда 276, 279
- PHN 276, 279
- PHN1 252
- PHN 276, 279
- рАК94 223, 224p
- рАV10 110–112, 112p
- рВС619 260p
- рВК620,3 260p
- рВК322 58, 58p, 60, 284–285p
- – для устойчивости в штаммах
58
- рС13 100, 100t, 100p
- рЕТ-векторы 100
- рВ1303 254, 260, 262p
- рВК401 109, 109p
- рРLc2813 108, 109p
- рВК290 111
- рVВ110 250
- рVС19 60–62, 60p
- рВМ20 287–288, 288p
- SAI 281
- T1 374–376, 374p
- – генетическая информация (ген) 373,
374p
- получение трансгенных расте-
ний табака 391
- рекомбинантные организмы рас-
тения 383
- репродукция 376, 377, 376p
- репродукция и цветочные
375p, 376–377
- репродукция растений
377–377, 374–376p
- ХУВ, 276, 279
- Питательные 36, 63
- биологические 276–282, 281p
- группы по составности 57
- возможности их системы 110, 110p
- модифицированные биологические
ресурсы клеток 123,
127–130, 128p
- Классификация истории 57
- классификация ферментов: принцип
своеобразие 289
- классификация 123, 124p
- классификация связей 77
- классификация 57, 117, 121, 121n
- 2-мил 130
- классификация 57, 123
- мутации 162p, 163
- мутации в области 100
- получение 21
- размеры 57
- условия спектров данных 57
- – широтой спектров данных 57
- сайт информации репликация
57
- схематичная клетка, структура
ДНК-матрицы 60
- трансформация клеток животных
58–60
- число клеток 37, 108, 193t, 117,
127, 128t
- условия клетки 123, 127
- Редукция 276t
- Планирование 493–494
- Планирование биологических
270, 412
- Плоды, химическое вещество ка-
чество 410–412
- содержание 405, 406
- Плоскостные системы для работы и
тканей 406
- Плотность СА 454–455, 454p
- Плотность метаболомических
422, 424p
- Плотность картриджа
469, 477, 478–479p
- Плотность-кабинетное карто-
рирование 476–477, 477p
- Плотность 405
- Плотность антибиотиков
260–263, 263, 264p
- Плотность клеток 261–263,
263–264p
- Плотностьные анализы 164
- Плотность культуры 270
- Плотностьные условия реакции
(P1)P 27, 88, 94, 103,
95–97p
- различные материалы 95–96, 95p
- – использование флуоресцен-
тной метки 190–191, 191p
- – различные материалы 96

Указатель латинских названий

Ascocharis subglobosa 231p
Asciptium chrysosporium 27s, 265, 266p
Aspidocarpum radiobarium 323, 314p
– *umbellatum* 63, 173, 379, 379p
Atractodes 118
– *subglobosa* 270–272, 271p
Atractodes thalictroides 413
Atractodes o-montani 290
– *subulata* 127
– 219–290
Atractodes excavatum 340
Atractodes californica 144, 144–145p, 344
Atractodes chrysosporium 307

Banisteria argyroleptocarpa 174, 172, 173s, 204–290
– *brevis* 27r, 291, 292r
– *curvata* 160
– *leptocarpa* 200, 209r
– *marginatum* 307
– *microdactyloides* 171–172, 172r, 290
– *subulata* 62, 124–125, 125r, 125p, 140, 210p, 290
– 291–292, 27s, 132–142, 144p, 343r, 335p, 379p, 381s, 341p, 389–393, 390s, 325
Banisteria subulata 307, 308r, 314–315, 115r, 320
Banisteria 410
Banisteria thalictroides 253–256

Campylodactylus hyalinus 109
Campylodactylus 301s
Campylodactylus recurvatus 340

Campylodactylus 301
Campylodactylus subulata 301s
Campylodactylus 346, 347
Campylodactylus thalictroides 291, 292s
Campylodactylus thalictroides 211
– *subulata* 27, 27r, 123, 240, 252p, 255–257, 256s, 257p

Entrochium chrysosporium 125
– *subulata* 311
Epitaxia constricta 402
– *subulata* 27s, 251–253p
Epitaxia subulata 24–27, 27p, 41, 50, 51, 58, 76–77, 105, 115–116, 122–123, 126–127, 146–147, 149p, 160–162, 163p, 189, 215, 218–221, 189–231p, 247, 340, 340p, 254–255, 254, 255p, 267–268, 268p, 271, 271p, 285–286, 286p, 291, 292r, 130, 135–136, 300–363, 361p, 367, 379, 379p, 400, 520, 522

Epitaxia thalictroides 174
Epitaxia subulata 265

Epitaxia thalictroides 53
Epitaxia thalictroides 27, 141–142
Epitaxia thalictroides 343

Epitaxia thalictroides 401, 401p
– *subulata* 111, 110, 110s, 312, 312p
Epitaxia thalictroides 301s
– *subulata* 27, 140

Epitaxia thalictroides 294, 295p
Epitaxia thalictroides 189
Epitaxia thalictroides 193
Epitaxia thalictroides 237–238, 238p

Epitaxia thalictroides 301–302, 301s
Epitaxia thalictroides 260, 260p

Epitaxia thalictroides 259, 260p
Epitaxia thalictroides 27, 141, 142, 142–143p
Epitaxia thalictroides 240, 240p
Epitaxia thalictroides 27s, 223, 223p, 252, 254–255p, 275–276, 276s, 282–286, 283p, 286s
– *subulata* 116
– *subulata* 121
– *subulata* 265
– *subulata* 111, 122, 122p, 323r, 340, 341p
– *subulata* 291, 282r, 322, 322p
– *subulata* 111
– *subulata* 325, 523
Epitaxia thalictroides 123, 123s

Epitaxia thalictroides 27s, 307–308, 308s, 314–315, 315–316s, 316–320, 118
– *subulata* 315, 316s
– *subulata* 313, 316, 320, 347p, 125
Epitaxia thalictroides 323, 325
Epitaxia thalictroides 243

Epitaxia thalictroides 27, 236–140, 139p, 170, 170s, 290, 301, 477

- distalicus 27
- Saccaromyces*
- Saccaromyces erythraeus* 261
- Sakomurella* 236, 243
- *typici* 189
- Schizosaccharomyces pombe* 27, 141, 143
- Serratia marcescens* 111, 325
- Shigella flexneri* 234
- Spirulina maxima* 301*
- Sterigmatocyti* 27*, 257–258, 258p, 260, 261*, 262p, 263, 266p
- *arthralicus* 268
- *cochleolar* 259
- *hollandi* 123
- Synechococcus* 340
- Synechocystis* 340
- Thermus thermophilus* 291, 292*
- Trichoderma harzianum* 325
- *reesei* 27*, 300
- Trypanosoma cruzi* 189–190
- Vibrio*
- Vibrio* 122–130, 264, 355–356
- Xanthomonas campestris* 27*, 266–267, 267p, 267*
- *multiseptata* 123
- Xeromyces lipolyticus* 27, 141
- Zygomycetes* 27*, 292–294, 292*, 300, 393p

Регулируемые промоторы	107
Получение больших количества белковых продуктов	108
Крупномасштабные системы	109
Использование для экспрессии других микроорганизмов	111
Химерные белки	112
Фиксирование химерных белков	112
Применение химерных белков	113
Выявление белков в люциферозных структурах	115
Однонаправленное тагирование расположения генов	117
Гранулированные экспрессирующие векторы	118
Стабилизация белков	121
Рост в условиях недостатка кислорода	122
Применение интратканевой плазмы с антицитом протенин	122
Бактериальная «теплолюбив»	122
Интродукция химерной ДНК в хромосому хозяина	123
Повышение эффективности секреции	126
Метаболическая перегрузка	127
Заключение	130
Литература	131
Контрольные вопросы	133
Глава 7. Получение рекомбинантных белков с помощью транскрипционных систем	135
Системы экспрессии <i>Xenopus laevis</i> oocyte	136
Векторы для <i>S. cerevisiae</i>	137
Прямая экспрессия в <i>S. cerevisiae</i>	137
Секреция гетерологичных белков, синтезируемых <i>S. cerevisiae</i>	139
Другие дрожжевые системы экспрессии	140
Синтез поперечностью антитела вируса гепатита В	141
Синтез бычьего антитела С2	142
Системы экспрессии с использованием культур клеток млекопитающих	143
Система экспрессирующая вектор на основе биколомисов	144
Получение рекомбинантных биколомисов	145
Создание членичного вектора на основе биколомисов для <i>F. coli</i> и клеток млекопитающих	146
Выявление рекомбинантных белков в клетках насекомых с помощью аффинного связывания	149

Экспрессирующие векторы для работы с клетками млекопитающих	149
Селективные маркерные гены	150
Экспрессия паучьих клонированных генов в одной клетке млекопитающих	151
Заключение	154
Литература	155
Контрольные вопросы	156

Глава 8. Новые типы мутагенов и методы тагирования белков

Направленный мутагенез: методика	158
Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК фига M13	159
Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием таг-мишени ДНК	161
Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации (случайный мутагенез) с использованием «перекрестных» олигонуклеотидных праймеров	163
Случайный мутагенез с использованием аналогов нуклеотидов	166
Сильная индукция белков	168
Образование дополнительных дисульфидных связей	168
Замена аспаргина на другие аминокислоты	170
Уменьшение числа свободных сульфгидрильных групп	170
Повышение ферментативной активности	171
Изменение потребности ферментов в металлических кофакторах	172
Изменение специфичности ферментов	173
Повышение стабильности и специфичности ферментов	174
Заключение	175
Литература	175
Контрольные вопросы	176

ЧАСТЬ II МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Глава 9. Молекулярная инженерия	181
Методы иммобилизации	182
Ферментный иммобилизованный анализ	182
Моноклональные антитела	184
Образование и сбор гибридных клеток	185
Идентификация гибридных клеток, способных секретировать специфические антитела	185

Системы ДНК-двойностики	187	Пептидные вакцины	231
Гибридные зонные зонды	188	Генная иммунная защита	233
Линейные зонды матрицы	188	Аттенуированные вакцины	234
Выделение <i>Tetrahymena sp.</i>	189	Противирусные вакцины	235
Исрациклоксимные металлы доставки	190	Противосальмонеллезные вакцины	236
Геномная таксономия	192	Противосифилизных вакцин	237
Использование геномных ДНК-маркеров ..	194	«Векторные» вакцины	238
Молекулярная динамика генетических ..	195	Противовирусные вакцины	238
заболеваний	195	Противобактериальные вакцины	242
Серповидная форма эритроцитов	195	Бактерии как системы доставки штам-	
Метод ПЦР/ЛОЗ	196	генов	242
Генноинженерия с использованием флу-		Заключение	243
ресцентно-меченных ПЦР-примеров	198	Литература	244
Мутации в разных сайтах одного гена	199	Контрольные вопросы	246
Перспективы	201		
Заключение	201		
Литература	202		
Контрольные вопросы	203		
		Глава 12. Использование рецидивизма	
		интерферонов для лечения иммуноде-	
		фицитных заболеваний	247
Глава 10. Минимальное количество		Эндонуклеазы рестрикции	247
лекарственных средств	204	Малые биологические молекулы	250
Лекарственные препараты	204	Синтез I-аскорбиновой кислоты	250
Выделение cДНК интерферона	204	Синтез нуклео	252
Интерфероны человека, полученные ме-		Синтез аминокислот	253
тодом генной инженерии	207	Антибиотики	253
Гормон роста человека, полученный ме-		Классификация генноинженерных антибио-	
тодом генной инженерии	208	тиков	259
Оптимизация генной экспрессии	208	Синтез новых антибиотиков	259
Ферменты	209	Разработка новых методов получения по-	
ДНКазы I	209	ликетных антибиотиков	260
Альгинат-дезазаза	209	Усовершенствование генноинженерных	
Микроклональные культуры из лекарствен-		антибиотиков	263
ных средств	210	Биополимеры	266
Структура и функции антигенов	211	Создание рекомбинантных бактерий	
Профилактика отравления транса-зигма-		<i>Халидолат</i> с целью получения	
риновой инфекции	212	кашляющей слизи	266
Лекарственные вещества, связанные с му-		Выделение генов биосинтеза меланина	267
ноклональными антигенами	212	Микробиоинженерный синтез длинных	
Моноклональные антитела человека	214	белков, синтез с использованием	
Гибридные моноклональные антитела че-		белков, синтез с использованием	
ловека и мыши	215	Микробиологический синтез коучуна	270
Производство антител с помощью <i>E. coli</i>	218	Микробиологический синтез полицикло-	
Лекарственные средства против ВИЧ	222	сидкалота (I)	270
Заключение	224	Заключение	272
Литература	224	Литература	272
Контрольные вопросы	226	Контрольные вопросы	274
Глава 11. Вакцины	227	Глава 13. Биодegradация химических соеди-	
Субъединичные вакцины	228	нений и их влияние на биосферу	275
Противокератитические вакцины	230	Деградация микроорганизмов с помощью	
Противовирусные вакцины	230	микробиологической	275
Противотуберкулезные вакцины	231	Метаболические пути биодegradации ко-	
		лоидиальных, созданные методами генной	
		инженерии	276

Перенос плазмид.....	276
И тесные связи.....	281
Утилизация крахмала и сахаров.....	286
Промышленное производство фруктозы и глицерола.....	287
Повышенные эффективности производства фруктозы и глицерола.....	289
Заквашивание пива.....	292
Получение сычужка.....	294
Утилизация целлюлозы.....	294
Компоненты динамического анализа.....	298
Выделение прокаротиновых ферментов из пива.....	298
Выделение эфирных масел из пива.....	298
Манипуляции с целлюлозными генами.....	300
Белок однолеточных организмов.....	301
Заквашивание.....	302
Литература.....	303
Контрольные вопросы.....	305
Глава 14. Факторы, стимулирующие рост растений.....	306
Фиксация азота.....	306
Нитрогеназа.....	308
Классификация.....	308
Гены нитрогеназы кластера генов нитро- геназы.....	310
Гликолиз.....	313
Метаболизм водорода.....	313
Идентификация генов нитрогеназы.....	314
Образование клубеньков.....	316
Клиренсы среди грибов, образую- ющих клубеньки.....	316
Манипуляции с генами образования клу- беньков.....	318
Биоконтроль патогенных микроорганизмов.....	320
Синергизм.....	321
Антибиотик.....	322
Ферменты.....	322
Образование кристаллов ядов и антифриз- ные белки.....	325
Стимуляция роста растений свободными ионами бактерий.....	326
Заквашивание.....	327
Литература.....	328
Контрольные вопросы.....	330
Глава 15. Микробы как источники токсинов, синтезируемый <i>Barbituric</i> <i>Acid</i>.....	331
Механизм действия и использование.....	332
Идентификация генов токсина.....	335

Гены нитрогеназы генов токсина.....	335
<i>Barbituric Acid</i>	335
Как конструировать как инструменты биокон- троля.....	342
Механизм действия.....	342
Усиление биоконтроля с помощью пива.....	343
Идентификация.....	344
Литература.....	345
Контрольные вопросы.....	347

Глава 16. Промышленный синтез белков при участии реконструированных микроорганизмов.....	349
Рост микроорганизмов.....	350
Периодическая культура.....	351
Периодическая культура с добавлением субстрата.....	352
Непрерывная культура.....	353
Повышение эффективности ферментации.....	354
Культуры с высокой плотностью.....	356
Биореакторы.....	357
Иммуноферментационные системы.....	359
Ферментация.....	359
Двухступенчатая ферментация в непрерыв- ных эрмиональных биореакторах.....	360
Двухступенчатая ферментация в одной ре- акторе с метанолем перемешиванием.....	362
Нерасширенная ферментация и непрерыв- ная ферментация с добавлением суб- страта.....	363
Сбор клеток.....	363
Разрушение клеток.....	365
Дальнейшая обработка.....	366
Сольбилизация белков.....	367
Заквашивание.....	367
Литература.....	368
Контрольные вопросы.....	369

ЧАСТЬ III ЗУКАРИНОПЕПТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ.....371

Глава 17. Гены нитрогеназы растений: ме- тодика.....	373
Трансформация растений Ti-плазмой.....	373
Извлечение генов нитрогеназы.....	377
Векторные системы на основе Ti-плазмиды.....	377
Физические методы переноса генов в рас- тельные клетки.....	379
Бомбардировка микрочастицами.....	380
Применение репортерных генов при транс- формации клеток растений.....	381

Эксперименты по экспрессии чужеродных генов в растениях	382
Выявление различных промоторов и их использование	383
Введение чужеродных генов в хлоропластную ДНК	384
Получение трансгенных растений, не содержащих ядерных генов	386
Заключение	386
Литература	387
Контрольные вопросы	388

Глава 18. Генная инженерия растений: применение	389
Выделение растений, устойчивых к насекомым-вредителям, вирусам и гербицидам	389
Растения, устойчивые к насекомым-вредителям	389
Растения, устойчивые к вирусам	393
Растения, устойчивые к гербицидам	400
Растения, устойчивые к грибам и бактериям	401
Получение растений, противостоящих неблагоприятным воздействиям и старению	403
Оxidательный стресс	403
Солевой стресс	404
Старение плодов	404
Изменение окраски цветков	406
Изменение пищевой ценности растений	407
Аминокислоты	408
Липиды	408
Изменение вкуса и внешнего вида плодов	410
Изменение внешнего вида	411
Изменение вкуса	411
Растения как биореакторы	412
Аптеки	412
Примеры	412
Чужеродные белки, выражаемые в семенах в соевых	413
Заключение	413
Литература	413
Контрольные вопросы	416

Глава 19. Трансгенные животные	418
Трансгенные мыши: методология	419
Использование ретровирусных векторов	419
Метод микродекции ДНК	420
Использование мидифицированных эмбриональных стволовых клеток	422
Клонирование с целью переноса шкур	422

Перенос генов с помощью искусственных вирусных векторов	426
Трансгенные мыши: применение	430
Трансгенные вирусы и ретровирусный вектор	433
Трансгенные овцы, козы и свиньи	435
Трансгенные птицы	436
Трансгенные рыбы	438
Заключение	439
Литература	439
Контрольные вопросы	441

Глава 20. Молекулярная генетика человека	442
Генетическое сцепление и картирование генов	444
Обнаружение и оценка генетического сцепления у человека	446
Анализ сцепления методом множественного кроссинговера: метод соотношения шпиков (род-балл)	447
Построение генетических карт человека	450
Генетический полиморфизм	450
Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	451
Полиморфизм коротких tandemных повторов	454
Картирование локуса генетического заболевания в определенной области хромосомы	454

Построение мультилокусных хромосомных карт человека	459
Локализация гена заболевания на карте сцепления	460
Картирование с использованием рекомбинантных гибридов	461
Физические картирование генов человека	462
Построение зондов и YAC-, BAC- и PAC-библиотек	462
Построение зондов из космидных, P1- и λ -библиотек	463
Транскрипционные картирование	465
Картирование генов заболелый человек	467
Выявление мутаций в генах человека	467
Функциональное картирование	468
Классификация картирование	469
Позиционное картирование	469
Позиционно-кандидатное картирование	476
Программа «Гены человека»	477
Заключение	479
Литература	481
Контрольные вопросы	482

Глава 21. Генная терапия.....	483	Тригофан.....	520
Генная терапия <i>in vivo</i>	487	Белки соматотропина.....	521
Генная терапия <i>in vitro</i>	493	Контролируемое высвобождение генети- чески модифицированных организмов в окружающую среду.....	523
Вирусные системы доставки генов.....	493	<i>Leishmania</i> и другие, не образующие кри- сталлов льда.....	523
Ретровирусные векторы.....	493	Открытые позитивные испытания других ге- нетически модифицированных организ- мов.....	525
Аденовирусные векторы.....	494	Генная терапия человека.....	526
Векторы на основе аденоассоциированных вирусов.....	496	Поиск в области генной терапии соматических клеток.....	527
Векторы на основе нанопространств.....	496	Наследование дефектных генов в будущем поколении.....	528
Невирусные системы доставки генов.....	498	Генная терапия в темноте.....	529
Активация преддискретивных лекарственных средств («пролекарств»).....	502	Клонирование человека.....	530
Лекарственные средства на основе олиго- нуклеотидов.....	503	Заклучение.....	531
Синтез «липидомиметических» мРНК <i>in vivo</i>	504	Литература.....	531
«Липидомиметические» олигонуклеотиды как лекарственные средства.....	506	Контрольные вопросы.....	532
Олигонуклеотиды, соединяющиеся с бел- ками: интратромбинный агентам.....	508	Глава 23. Патентование биотехнологичес- ких изобретений.....	533
Рибозимы как лекарственные средства.....	508	Общие вопросы патентования изобретений.....	534
Коррекция генетических дефектов с помо- щью олигонуклеотидов.....	509	Патентование изобретений в разных стра- нах.....	536
Заклучение.....	510	Патентование ДНК-последовательностей.....	537
Литература.....	511	Патентование многоклеточных организмов.....	539
Контрольные вопросы.....	513	Патентование и фундаментальные иссле- дования.....	539
Часть IV КОНТРОЛЬ И СЕРТИФИКАЦИЯ В ОБЛА- СТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛО- ГИИ И ПАТЕНТОВАНИЕ БИОТЕХНОЛО- ГИЧЕСКИХ ИЗОБРЕТЕНИЙ.....	515	Заклучение.....	541
Глава 22. Контроль применения биотехноло- гических методов.....	517	Литература.....	541
Контроль экспериментов с рекомбинант- ными ДНК.....	518	Контрольные вопросы.....	542
Контроль за производством и потреблением пищевых продуктов и пищевых добавок.....	519	Сюжет термина.....	543
Химозин.....	520	Предметный указатель.....	564
		Указатель латинских названий.....	577

Учебные издания

Бернхард Глик, Джек Пастерник

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Зем редакционен ыдно, бинар наука М. Р. Поповбеком

Всупоний редактор Н. И. Шифрамонская

Редактор Р. Ф. Куликова

Художник И. В. Зорев

Технически редактор Е. В. Денисова

Корректор Р. Ф. Куликова

Оригинал макет подготовлен Л. К. Васильевни

График-дизайнер С. В. Машин

Перевод П. Е. Кизилова

Лицензия ПР № 010174 от 20.05.97 г.

Пашпона : печати (0 09 01) Формат 84 х 108¹/₄. Бумага офсетная

Печать офсетная. Гарнитур НевинС. Объем 18,50 бум. л

Усл. печ. л. 67,16. Уч.-изд. л. 42,87. Изд. № 47646.

Тираж 5000 экз. Зам. 5185

Издательство «Мир» Министерства РФ по делам печати,
внешним связям и средствам массовой информации
107006, ТСП 4, Москва, 1-й Рязанский пер., 2.

Дизайны подготовлены в издательстве «Мир»

Отпечатано в полном соответствии

с качеством оригинальной компьютерной

в ОАО «Московский полиграфический комбинат»

142800, г. Мытищи, ул. Мира, 93

ЛУЧШИЙ
ЗАРУБЕЖНЫЙ
УЧЕБНИК

Б. Глик, Дж. Пастернак

Молекулярная биотехнология

Принципы и применение

Книга несомненно войдет в ряд лучших переводных изданий по биологии и станет незаменимым учебным пособием для студентов биологов, химиков, врачей, фармацевтов, агрономов, ветеринаров — всех тех, кто хочет специализироваться в области генной инженерии.

д-р биол. наук Н. К. Янковский



ISBN 5-03-003328-9



9 785030 033280