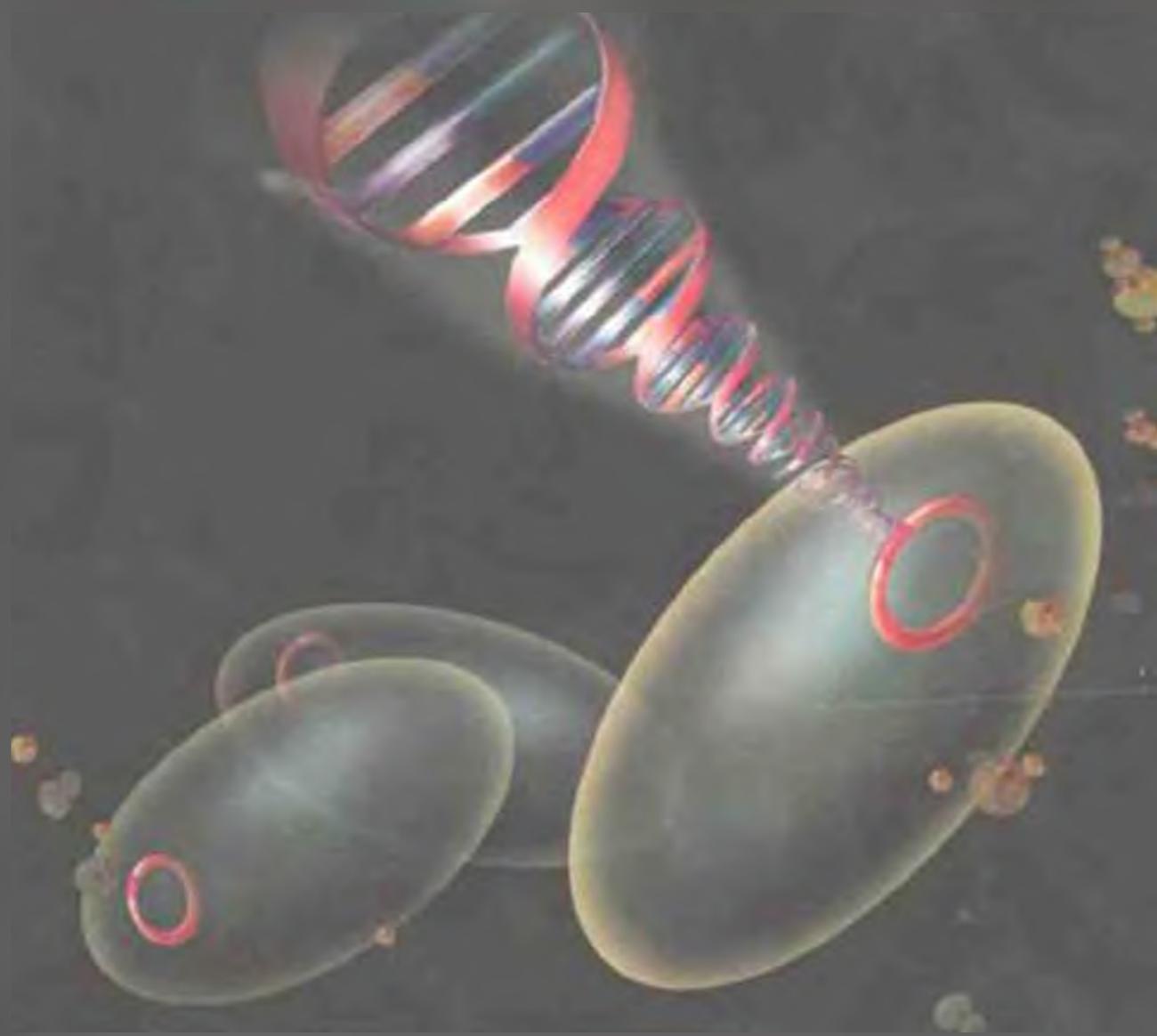


ЛУЧШИЙ  
ЗАРУБЕЖНЫЙ  
УЧЕБНИК

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. Кидесницкой,

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

УДК 591.1  
ББК 28.69  
Г54

Ганс Б., Цистерман Дж.

Г54 Молекулярная биотехнология. Принципы и приложения. Пер. с англ. М.: Мир, 2002. — 589 с., ил.

ISBN 5-03-003328-9

Современное руководство по биотехнологии, написанное авторами-ветеранами академического обучения. В книге изложены основы генной инженерии: методы клонирования, трансформации и трансфекции; методы электропорации, диффузии и селекционной ДНК; докстрирование рекомбинантных ДНК; введение плазмидных векторов-мишеней в клетки микроорганизмов, растений и животных, а также применение принципов генной инженерии для разработки лекарственных веществ, вакцин, ферментов, гормонов и т.д. Включены тематические задания, тесты, вопросы и ответы, а также для решения проблем. Рассмотрены биотехнологические приложения и способы их улучшения.

Для студентов университетов, сельскохозяйственных и медицинских институтов, а также для научных работников и специалистов по биотехнологии.

ББК 28.69

Федеральная программа «Качество жизни» России

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-003328-9 (рус.)  
ISBN 1-891111-13-1 (англ.)

- © 1998 by American Society for Microbiology.  
All rights reserved. Translated and published  
by arrangement with the American Society  
for Microbiology.
- © перевод на русский язык, оформление  
— Мир, 2002

## От редактора перевода

Книга, которую вы держите в руках, — это прекраснейшее руководство по молекулярной биотехнологии с подробным изложением ее принципов, методов и сфер применения. В ней обобщен многолетний опыт чтения текстов 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 следования их функционирования, определения качества и количества целевых продуктов. Текст прерывается таблицами, иллюстрирующими «Важная вещь» Они представляют собой рефераты ключевых научных статей, которые легко вытекают (или являются) основой 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 изобретений селекционированных

юнная исследователю ДНК, а также результатов биотехнологических разработок в случае митохондриальных 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 фармацевтических препаратов (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. Препродукты целого из трансгенных растений, свин, поставлены 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 Arji, Susan Birch, Greg Payne, Jeff Hoffmeier, за их постоянную помощь и поддержку, а также Susan Schmidt за превосходное, как всегда, оформление книги. Хотим также выразить благодарность Ken Arji за неизменное внимание в рукописи и сильное терпение в общении с нами.

*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 развивается 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 или менее 200); мы убеждены, что цветные рисунки делают статью больше, нежели тысячи слов. I издание читателя с основным текстом первой биотехнологии и несколькими американскими аспектами, в следующие пять глав (гл. 2–6) — с ее метафизикой. 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, жидкокристаллических для диалектики, в том же метаболитов удобрений и лекарств. В гл. 13 описаны способы крупномасштабно 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 на 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 собственном изложении. 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. Amoson, 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 E. Stem, 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; Rith Siegel, менеджеру; Indi Simpson, литературному редактору; Susan Schindler, главному художнику; Peg Matkow из Ruffe, Shaw & Westcott, Inc., главному менеджеру проектов; художникам Norwalk Graphics; и наконец, Patrice Fitzgerald, директору ASM Press, который всеми доступными способами помог превратить наше видение в жизнь.

*Бернард Р. Глик  
Дэвид Дж. Постернак*

# ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

**М**олекулярная 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 генной инженерии (технология рекомбинантных ДНК). В большинстве случаев целью такого переноса является создание нового продукта или получение уже известного продукта в промышленных масштабах. В 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 конечных продуктов, модифицируя клонированные гены путем введения в них специфических нуклеотидных замен (мутагенез *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 незабываемая 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 фрагмент гена (последовательности ДНК), кодирующей человеческий инсулин, и перенести на него генетические элементы (клеточные векторы), 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 событие представля-

лось невероятным, им сродни все то стало вполне привычным.

Головокружительный взлет стоимости акций компании Genentech предопределился как реальной оценкой потенциала 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, порождаями-важностью биржевые бумажки и учую-фрагменты человеческими клетками. Воспринимая бурно развивавшиеся технологии выращивания микроорганизмов, растений и животных, созданные человеком. Энтузиасты предсказали, что генноинженерные микроорганизмы вытеснят химические удобрения, будут уничтожать различные виды, появляться растения и передающиеся по наследству устойчивости 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, увлечение этой идеей являлось основой. Прошла немалый более предшествующих лет, и многие забытые результаты работы стали реальностью. Вспомните также мы рассказали о том, как это произошло и каковы перспективы применения технологии рекомбинантных ДНК.

Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой была разработана экспериментальными учеными Стэнли Коэном и Гербертом Бойером в 1973 г. И Коэну, и Бойеру, 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 «маркировка» на некоторых биотехнологических экспериментах, считавшихся исключительно «описанным Запрет на собственные исследования был провозглашен группой молекулярных биологов, включая Коэна и Бойера. Они считали, что обилие 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 работы, и страсти постепенно улеглись. Временное прекращение публикации 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 рекомбинантных генах, осуществленном Коэном и Бойером, облетела весь мир. Многие исследователи немедленно осознали все преимущества этой стратегии и создали огромное количество методик, следуя которым, можно было с высокой эффективностью и относительно просто клонировать, выключить, характеризовать и использовать гены. Эти технологические разработки внесли значительный вклад в развитие практически всех биологических дисциплин, включая науку о поведении животных, биологию растений, молекулярную физиологию, кетонизирующую биологию и генетику человека, однако наиболее глубоко изменения произошли в области биотехнологии.

## Возникновение молекулярной биотехнологии

В начале 70-х годов традиционная биотехнология как таковая действительно 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 заимствует производство коммерческих продуктов, обращаясь микроорганизмами в результате их жизнедеятельности. Более формально биотехнология можно определять как «применение научных и инженерных принципов к обработке материалов живыми организмами с целью создания товаров и услуг». В историческом смысле биотехнология возникла тогда, когда продолжилась впервые использоваться при производстве пива, в бактериях – для получения инсулина.

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 используются материалы с помощью живых организмов производятся (с или иные 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 не является экономичной. 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 них присутствуют микробы, они являются биологически и химически инертными.

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов 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 естественную конституцию существующих штаммов-продуцентов с помощью химической мутагенеза или ультрафиолетового облучения. При таком подходе уровень повышения производства обычно лимитировался числом биологическими факторами. Например, если мутантный штамм синтезировал слишком много того или иного вещества, часто это отрицательно влияло на другие метаболические процессы 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 новаторскими 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. И все же к концу 70-х годов таким образом были усовершенствованы производственные процессы получения некоего ряда продуктов.

С развитием технологии рекомбинантных ДНК природные биотехнологии и ферментативная и биотехнология Пастера как возможность оптимально использовать биотрансформацию в качестве пути, создавать, а не просто отбирать энзимы и ферменты, а также, делать ювенильные клетки как «биологические фабрики» для производства витаминов, интерферона, гормонов роста, нуклеотидов и нуклеотидов других белков. Технологии рекомбинантных ДНК позволяют изучать в больших количествах новые молекулярные структуры и микроорганизмы, 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 методами мутационной селекции или селективными. Наконец, 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, как и молекулярная биология в период своего становления, весьма амбициозные, замысловатые и притягательные не всегда соответствующие реальности возможности. Ее стратегия и генеративная была претерпевала быстрое изменение, одни подходы все время вытесня-

Таблица 1.1. Основные события в истории молекулярной биотехнологии

Год	Событие
1917	Карл Дриш и Макс Терман «Биотехнология»
1941	Чуанг-чунг (применение в ферментативной химии)
1944	Уэвер, Мейлион и МакКарти показали что трансформация бактерий происходит с помощью ДНК
1947	Уотсон и Крик описали структуру молекулы ДНК
1961	Уорланд журнал "Molecular Biology and Evolution"
1961-1966	Риски, чтобы осветить область
1970	Выявлено первые рестриктазы (ограничители)
1971	Кригер и Дор синтезировали полинуклеотид с помощью ДНК
1972	Билли и Билли описали метод клонирования рекомбинантных ДНК
1975	Келер и Миллштейн описали метод получения моноклональных антител
1976	Низкая первая рекомбинантная рекомбинантная работа с рекомбинантными ДНК
1976	Пудрибинский метод определения активности молекулярности ДНК
1978	Ферри Селестини описали метод синтеза молекул, полученных с помощью С. и др.
1980	Вершинский США, США и др. Доклад о работе Чарльза Дарвина, описавший, что микробы могут быть использованы для производства различных веществ, таких как, спирт и т.д.
1981	Исследования в области генетической инженерии ДНК
1981	Гарретт и др. описали метод в США описали метод определения молекулярности молекул
1982	Пудрибинский метод определения активности молекулярности ДНК
1983	Два метода определения активности молекулярности ДНК
1983	Полли США и др. описали метод определения активности молекулярности ДНК
1983	США и др. описали метод определения активности молекулярности ДНК
1984	В США описали метод определения активности молекулярности ДНК
1985	Французские методы работы с рекомбинантными ДНК
1984-1993	США и др. описали метод определения активности молекулярности ДНК
1986	США и др. описали метод определения активности молекулярности ДНК
1986	США и др. описали метод определения активности молекулярности ДНК
1987	Канадские методы определения активности молекулярности ДНК



Рис. 1.2. Молекулярная биотехнология объединяет различные научные области и интегрирует создаваемые научные исследования коммерчески применимые продукты и методы

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

Ученые редко новые научные дисциплины открывают «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 эукариотных клеток (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. Конечно,

особенно ее развитие обуславливается не только экономическими факторами, sondern на первом плане всегда встает вопрос о том, насколько наука была связана с возможностью 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 бузитами и заинтересованность частных владельцев. Выгодам Гербертом Бернером, 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, Cetus, Eucel, Genex, Genzyme. На сегодняшний день в США свыше 1500 биотехнологических компаний, а во

всем мире их более 3000. Кроме того, большой вклад в развитие молекулярной биотехнологии внесли все крупные международные химические и фармацевтические компании, 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 проходят 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 млрд. долларов в 1986 г. до примерно 70 млрд в 1996 г. Икстати, к 2000 г. объем продаж препаратов, 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 представлению — 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 их компания, выпускающая полученные генноинженерными методами анти-тела, которые предназначены для лечения инфекционных заболеваний, рака и других болезней человека Immunex, Immunologic, Immunocore, Immunopoint, Immunovaccine.

Большая часть коммерческих разработок в области молекулярной биотехнологии происходит из Соединенных Штатов. И другая страна, как инвестиционная страна не столь благоприятна и бизнес менее активен, главную роль в создании молекулярно-биотехнологических предприятий играют крупные корпорации и государство. Так, правительство Японии обычно биотехнологиям «стратегической индустрии» и национальным приоритетом. За дело вступили 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 генноинженерные продукты.

Европейская биотехнологическая индустрия тоже неуклонно развивается: к 1995 г. в странах Европы было создано более 600 биотехнологических компаний. И экономически менее развитых странах роль «пожирателей» и развитие индустрии взяло 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 лишённой 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 лабораторным 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

**ВАЖНАЯ ВЕХА**

**Создание функциональных бактериальных плазмид *in vitro***

S.N. Cohen, A.C.Y. Chang, H.W. Boyer, R.B. Helling  
*Proc Natl Acad Sci USA 76: 1203-1207, 1973*

Отсутствием естественных регуляторов (вместо ДНК наследия с работы Коэн и др., которые показали, как, обладая генетическими элементами в естественном, мы можем создать искусственный регулятор наследия) структуру Косм и др. позволили искусственно синтезировать в бактериальной клетке искусственно созданные элементы наследия. В своей предыдущей работе (Cohen, Chang, Boyer, Helling, *Proc Natl Acad Sci USA 70: 1203-1207, 1973*) авторы получили возможность синтезировать искусственный регулятор наследия, используя искусственно созданные элементы наследия и синтезировать в клетке *E. coli* Оперон из того же функционального размера генов 1/31 размера естественной плазмиды «ризабон» в бактериальной клетке как фундаментальным принципом Чоэн и др. исследовали фактор спонтанности, присутствующий в естественной структуре, и сделали искусственный регулятор наследия генетическим элементом (который более эффективно, Косм и др. решили использовать фермент (рестриктаза) энзимолитазу), который расщепляет плаз-

миду ДНК в строго определенном месте с образованием фрагментов с выступающими концами (липкими концами) Функциональные плазмиды плазмида ДНК, образующаяся в том же ферментом, как и естественные естественные концы в при этом сохраняются. Таким образом, если расщепить ДНК из разных источников опции и той же рестриктазой, то образуются искусственно созданные плазмиды ДНК, не способные прежде Косм и др. не только сжать естественный генетический элемент в вирусе, но и показать, что при этом искусственно созданные элементы наследия могут быть синтезированы искусственно. Таким образом, авторы обнаружили, что при этом искусственно созданные элементы наследия могут быть синтезированы искусственно. Таким образом, авторы обнаружили, что при этом искусственно созданные элементы наследия могут быть синтезированы искусственно.

не различаются в своей структуре, и при этом, возможно, будет синтезироваться белок, регулируемый лабораторными генами. Промышленность интересуется возможностью искусственного генов, Косм и др. создали искусственно созданные концы ДНК, показали, что плазмиды могут служить носителями в естественных клетках генов. Таким образом, авторы обнаружили, что при этом искусственно созданные элементы наследия могут быть синтезированы искусственно. Таким образом, авторы обнаружили, что при этом искусственно созданные элементы наследия могут быть синтезированы искусственно.

ростения, устойчивых к вредителям, грибковым и вирусным инфекциям и вредным заболеваниям окружающей среде

- создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения, антибиотики, полимеры, аминокислоты, ферменты
- создание пород сельскохозяйственных и других животных с улучшенными наследственными признаками
- переработка отходов, загрязняющих окружающую среду.

Обсудить все блага, которые нас ожидают, нельзя и принятию, но одновременно нельзя забывать и о рисках, к которым может привести столь бурное развитие молекулярной биотехно-

логии. Эта новая отрасль расширяла свои сети тем паче, что общество вправе получить ответы на свои вопросы:

- не будут ли опасны, полученные методами клонирования, оказывать вредное воздействие на другие живые организмы или на окружающую среду?
- не приведет ли создание и распространение генетически модифицированных организмов к уменьшению природного биологического разнообразия?
- приведет ли, используя всеобщедоступные методы, изменить генетическую природу человека?

- Вмешательств ли применение новых биомолекулярных методов при человечески непереносимости частной жизни?
- Следует ли патентовать животных, полученных генноинженерными методами?
- Не будет ли опасно финансирование молекулярной биотехнологии свершить различные другие важные технологии?
- Не приведет ли стремление к получению максимальной прибыли к тому, что преимущественно молекулярной биотехнологии смогут воспользоваться только состоятельные люди?
- Не нанесет ли молекулярная биотехнология ущерб традиционному сельскому хозяйству?
- Не нанесет ли удары к лечению, основанные на восстановлении молекулярной биотехнологии, традиционные, столь же эффективные методы лечения?
- Не помешает ли борьба за приоритеты свободному обмену идеями между учеными?

Эти и многие другие вопросы рассматривали при обсуждении лекции, активно обсуждали на конференциях и в научных публикациях ученые. О них глубоко мысленно раздумают авторы публикуемых изданий. На этой широчайшей основе были сформулированы соответствующие планы и конструкции, выданы рекомендации и выработаны политические решения. И тем не менее, участие и участие, и ответственность, но некоторые притворяться все же остались.

За сравнительно короткий период молекулярная биотехнология превратилась в международную коммерческую предприятие, в значительной степени коммерциализированное. Его основатели сорганизовали множество научных и деловых публикаций, в университетах всего мира студентам и аспирантам читают учебные курсы по молекулярной биотехнологии (обратите внимание, с которыми типично отстает страна по количеству научных работников (НН) в 1987 г., следовательно имеет следующее замечание: «Молекулярная биотехнология — это новая (или) еще одна революция науки, которая может изменить жизнь в будущем... Являясь так же революцией, как и теория относительности, революция для нас была и является огромной революцией в истории науки. Возможность (использования) манипулирования генетическими материалами, обещает великие перемены в нашей жизни».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1971 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 появления биотехнологии. Биотехнология в значительной мере опирается на получение с помощью микроорганизмов (грибов, дрожжей, животных комменсальных бактерий) 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 незначительные черты существующих 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 участии частного капитала быстрое создание новых компаний, во главе которых стояли ученые, занимающиеся (технически) рекомбинантными ДНК. Правда, на то, чтобы реализовать свою предельную рыночную стоимость, потребовалось времени несколько больше, чем ожидалось, но уже сейчас множество биотехнологических предприятий имеется в прошлом и силе больше появились в ближайшем будущем.

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

ҳақиқатини билдириш, ҳам белгиланган ҳолатларда, ҳақиқатини билдириш ва оқшайдикини билдириш. Ҳақиқатини билдириш ва оқшайдикини билдириш. Ҳақиқатини билдириш ва оқшайдикини билдириш.

## ЛИТЕРАТУРА

- Алварес. 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: 415-457
- Hall R. 1993. *The Uses of Life: a History of Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Beck L., W.B. Lacy, J. Baskin, I. R. Lacy. 1992. *Plants, Power, and Profit: Social, Economic and Ethical Consequences of the New Biotechnologies*. Blackwell Publishers, Cambridge, Mass.
- Cohen S., A.C.Y. Chang, I.W. Boyer, R.B. Helling. 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 Powers and Perils*. Trifolium Press, Inc., Toronto, Canada.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Укажите недостатки методов «мутации» и «селекция» для получения биомассы коммерчески ценной организмов с улучшенными свойствами.
2. В чем состоит революционность работы Коэна, Боуера и др., опубликованной в 1973 г.?
3. Какое отношение к биотехнологии имеет Кэри Эрки?
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 объектами являются плазмиды бактерий *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 клонированным геном, 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

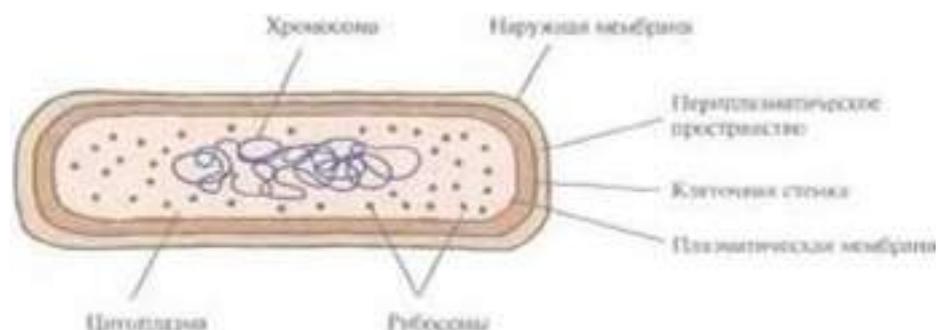
Все живые организмы можно разделить на две группы: прокариоты и эукариоты. В основе

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; и 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* — один 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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  и  $\text{SO}_4^{2-}$ , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), *E. coli* ста-

А



Б

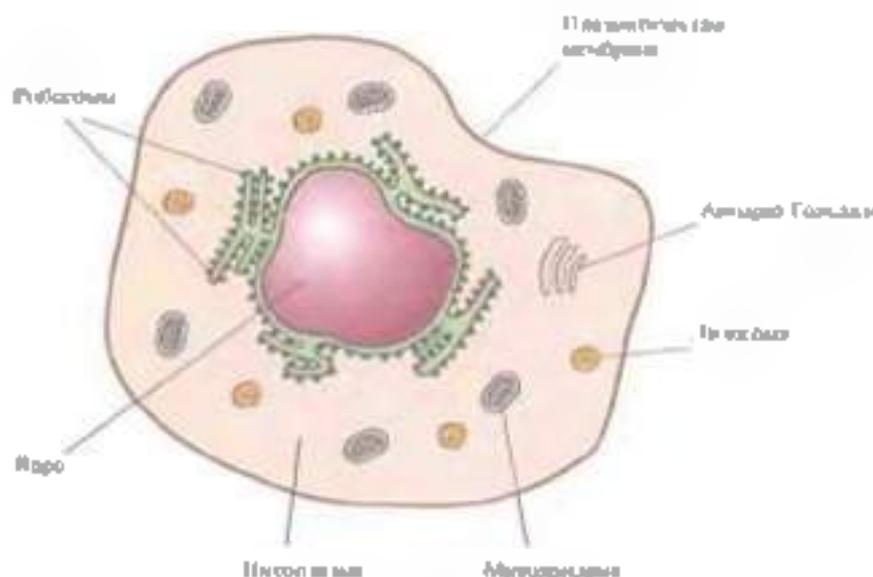


Рис. 2.1. Схематическое изображение (не пропорциональное) клетки (а) и эукариотической животной клетки (б).

ва изучаемым 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

## ВАЖНАЯ ВЕЩА

## Новые типы новых типов в смешанной культуре биохимических мутантов бактерий

I Lederberg, E. L. Tatum

*Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 10: 112-114, 1946

Начиная с двадцатых годов XX в. среди биологов господствовало мнение, что в отличие от других живых организмов бактерии (пробактериоты) являются почти исключительно диплоидными существами (диплоидными), а следовательно, что мутации при микробном размножении случаев вызываются мутациями в гомозиготных организмах, а не в гетерозиготных организмах. Эта теория была опровергнута исследованиями С.Е. Ледерберга и М. Дембрика (Lederberg S. E., Dembrick M., *Genetics* 28: 491-511, 1943), которые доказали, что у дрожжей *S. cerevisiae* (бактериофагам) образуются новые промисцелированные в них мутанты, в не редкой бактерии на протяжении роста споры бактериофага. Эти данные имеют большое значение в работе других авторов, изучавших наследственные черты микробных организмов. Исследования Ледерберга и Дембрика показали, что микробные организмы размножаются

в 1946 г. Ледерберг и Татум продемонстрировали, что в культурах генетически неоднородных организмов *E. coli* может возникнуть особый генетический мутант и что при этом, как и у других организмов, в результате физического обмена между организмами могут возникнуть новые генетически комбинации (генетическая рекомбинация). Обнаружение этого комбинационного фактора позволило *E. coli* в гетерозиготной форме генетически исследовать Ледерберг и Татум создать различные штаммы *E. coli*, отличающиеся по разным и отбором скрещиваниями палочковидными дефектными метаболитами. Например, один штамм культуры имел синтезировать вещества А, В и С, но не D или E (рекомбинант ABCde). Другой штамм создавал культуру abcDE. Смешав эти культуры, получили бактерии ABCDE. Ни в одной из чистых культур ни ABCde не возникало комбинации. Экспериментально

исключив остальные возможные причины образования комбинации ABCDE, Ледерберг и Татум пришли к выводу, что она возникает в результате физического обмена генетическим материалом между двумя организмами. Другими словами, у *E. coli* существует некое подобие митоза (полового размножения), которое, как и у других организмов, обеспечивает создание новых комбинаций генов.

Как заявил Лурно, не открытые могут стать основой для наиболее плодотворных исследований в истории развития биотехнологии, что последствием в исследовании. Исследованиями не для серии биохимических работ самого Ледерберга и других авторов, которые позволили установить, как работает генетическая система *E. coli*. Этот микроорганизм широко использовался как модельная система для изучения микробных систем синтеза углеводов, аминокислот и белков, в том же ряду подтверждены биохимические процессы

термостабильные ферменты, которые функционируют в промышленных процессах, в генетически выведенные генотипы используются для фиксации кислорода, содержащихся в атмосфере, содержащихся в атмосфере, при высоких температурах.

*E. coli* можно культивировать как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Если целью культивирования бактерий в лабораторных условиях является синтез и выделение среднемолекулярного белка, то культуры выращивают на сложных жидких питательных средах в колбах. Для поддержания нужной темпера-

туры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню или термостатированную ванну и непрерывно встряхивают. Такой режим достаточно для размножения клеток, но не всегда — для синтеза белка. Рост клеточной массы и продукция белка стимулируются не содержанием в питательной среде источников углерода или азота, а содержанием питательного кислорода. При 20 °C они растут примерно девяти миллиардным путем. Это становится особенно важным при промышленном получении рекомбинантных белков с помощью микробных культур. Для обеспечения условий, оптимальных для максимальной продукции белка, используют специальные ферменты и создают системы аэрации.

Таблица 2.1. Исколюричные системы в микробиологии (по Вильямсу [1996]).

<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>Paramecium</i>
<i>Plasmodium</i> <i>Trichomonas</i>
<i>Trypanosoma</i> <i>Yeast</i>
<i>Zoochlorella</i> <i>Zygomycetes</i>

Почему *E. coli*, в микробиологической биохимии используют в качестве других микробиологических (табл. 2.1). Их можно разделить на две группы: микробиологи 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 микробиологов относятся, например, различные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, которые используются в качестве модельных организмов, например, в отношении генов, например, *URA3*, которые используются в качестве маркера при скрининге промышленных выхих 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 грибов *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 использовались для изготовления алкогольных напитков и хлеба. Известные штаммы широко используются в мире в качестве

Табл. 2.1. Исколюричные системы. Дрожжи *S. cerevisiae* представляют собой большую группу интереса. В частности, они являются важным модельным организмом для исследования других организмов, в том числе человека, выходящих за пределы, ответственные за регуляцию клеточного цикла. Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Широко используются в качестве системы дрожжей (искусственно созданные) в качестве переносимых участниками всех исследований по изучению ДНК человека. В 1996 г. была определена полная «куча» генов человека, что еще более увеличило ценность штамма *S. cerevisiae*, что еще более увеличило ценность штамма *S. cerevisiae* для микробиологических исследований. Такая работа на дрожжах была выполнена впервые.

Связь микробиологической биологии и дрожжей дрожжевой клеткой 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*, и там же другие штаммы дрожжей: *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces diastolicus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula rotulifera*. Наиболее эффективными проученными полициклическими дрожжевыми белками являются *P. pastoris* и *H. rotulifera*.

### Культуры дрожжевых клеток

При всех различиях между типами дрожжевых культур (например, дрожжи и млекопитающих и микробов), растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек почвы, дрожжи сформированы и обрабатывают его ферментативными ферментами, растительными (или белками) межклеточных материалов (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 гибель. 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 in vitro и называемые устойчивыми клеточными линиями. Среди клеточных линий (выделяют) основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются выделительные хромопласты или митохондрии, в которых не отмечается увеличение числа своих хромопластов и потерю других. В молекулярной биологии часто используют устойчивые клеточные линии для выделения белков, которые кодируются хромосомными реплицируемыми ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и recombinant белков.

## 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.
- Dujon 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?



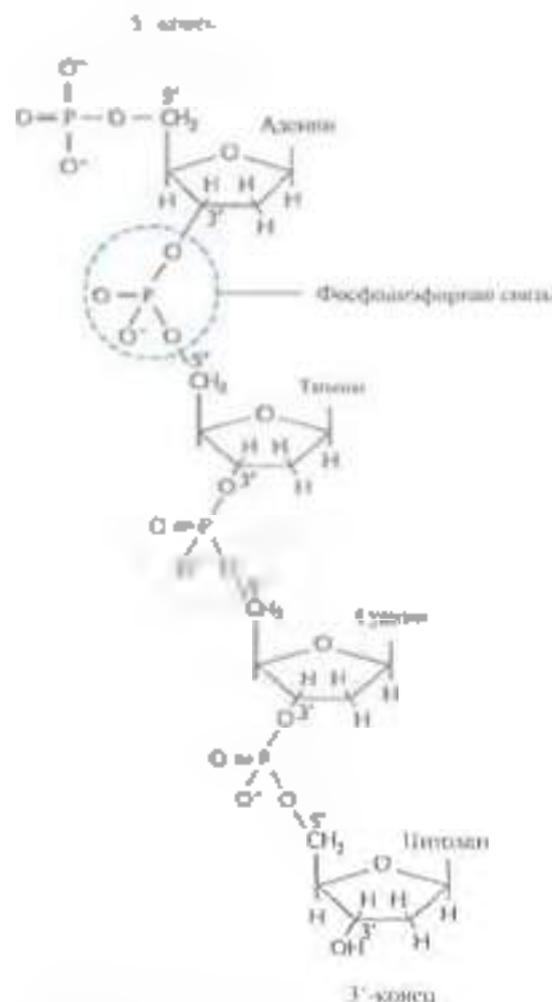


Рис. 3.2. Структурная формула участка ДНК.

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-

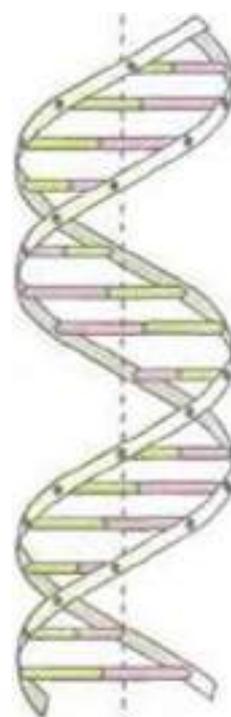


Рис. 3.3. Модель двойной спирали ДНК. Поперечные черточки — комплементарные пары оснований, «бечевки» — сахарофосфатный остов.

гидроксильную группу (ОН), а в РНК — выходящей для гидроксильные группы. Нуклеотиды соединены друг с другом фосфодиэфирными связями, 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 парами комплементарных цепей (рис. 3.4). При этом аденин образует пару только с тиминем, а гуанин — с цитозином. Пары оснований А-Т стабилизируются двумя водородными свя-

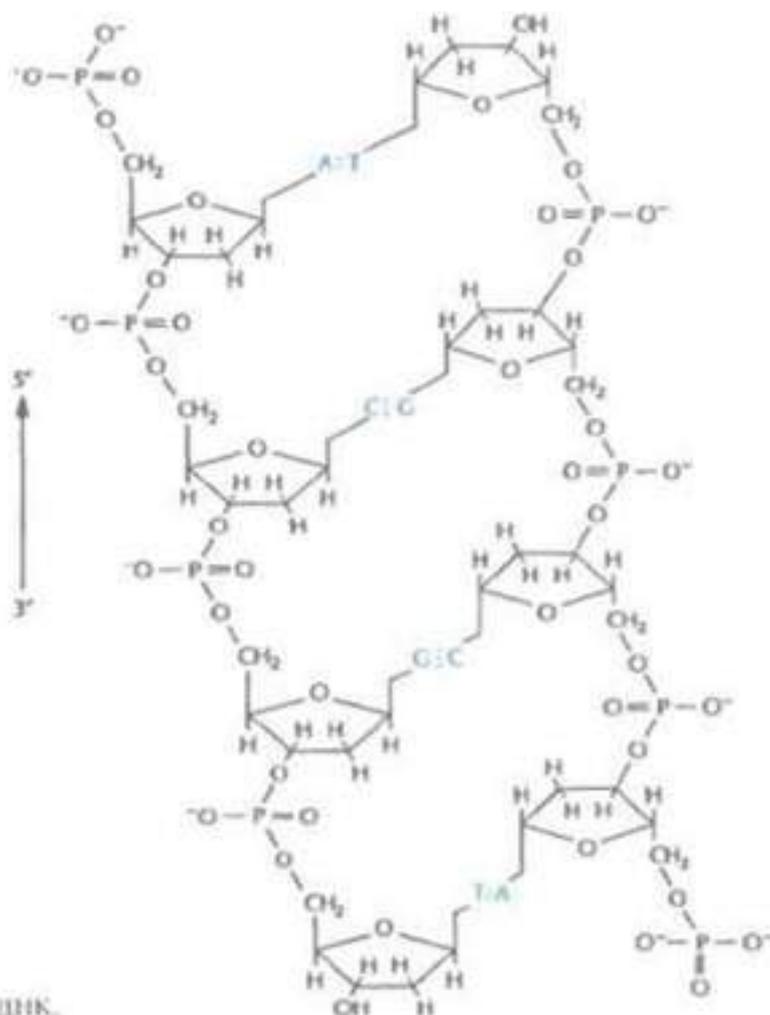


Рис. 3.4. Фрагмент двуцепочечной ДНК.

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  $C-G$  — 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 выделено нуклеотидная последовательность 3'-ATCCGTA-5'. В этой статье для удобства чтения будет употребляться следующий образ:

5'-TAGGCA-3'

3'-ATCCGTA-5'

В таком порядке 5'-цепи всегда идут сверху, а 3'-цепи — снизу.

Нуклеотид, генетическая информация которой заключается в двух основных требованиях: правильно кодировать (реципировать) с высокой точностью и определять (идентифицировать) 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 жизни, 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 белкам.

**Репликация**

Согласно модели Уотсона–Крика, каждая цепь ДНК служит матрицей при синтезе новой комплементарной цепи, в последовательности 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.

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

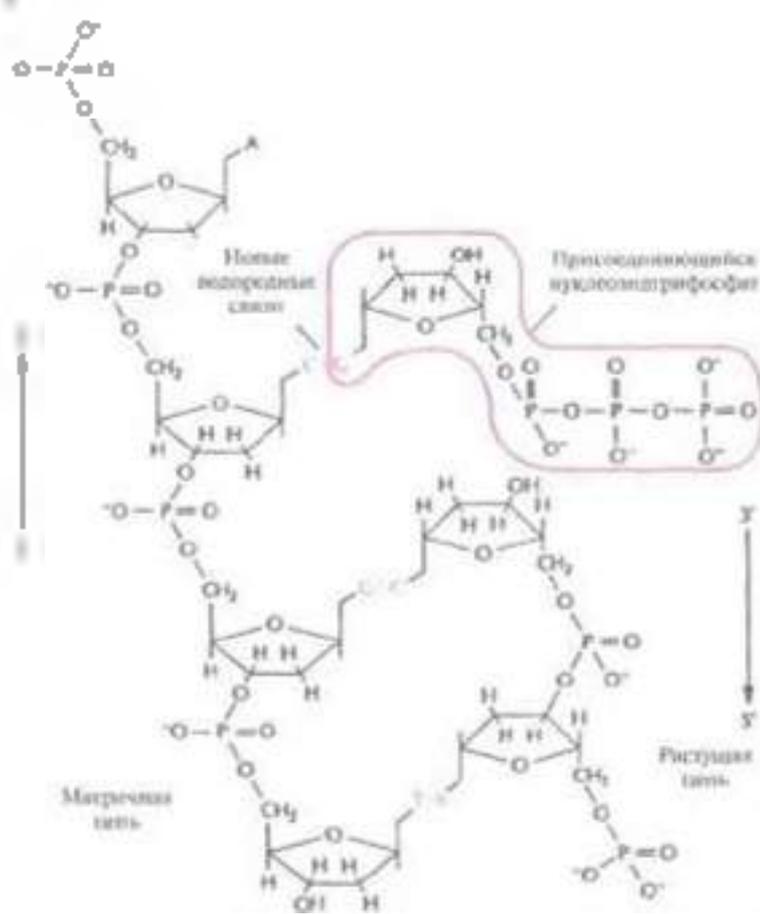


Рис. 3.6. Репликация ДНК. А (маркировка) очерчивает дезоксирибонуклеотидтрифосфат с минимальным числом оснований ДНК-матрицы.

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 каноническими парами 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 независимо от 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 зашифрованном виде информацию о синтезе белка. Белки – это биологические молекулы, участвующие практически во всех процессах протекающих в живых системах. Они служат катализаторами разнообразных биохимических ре-

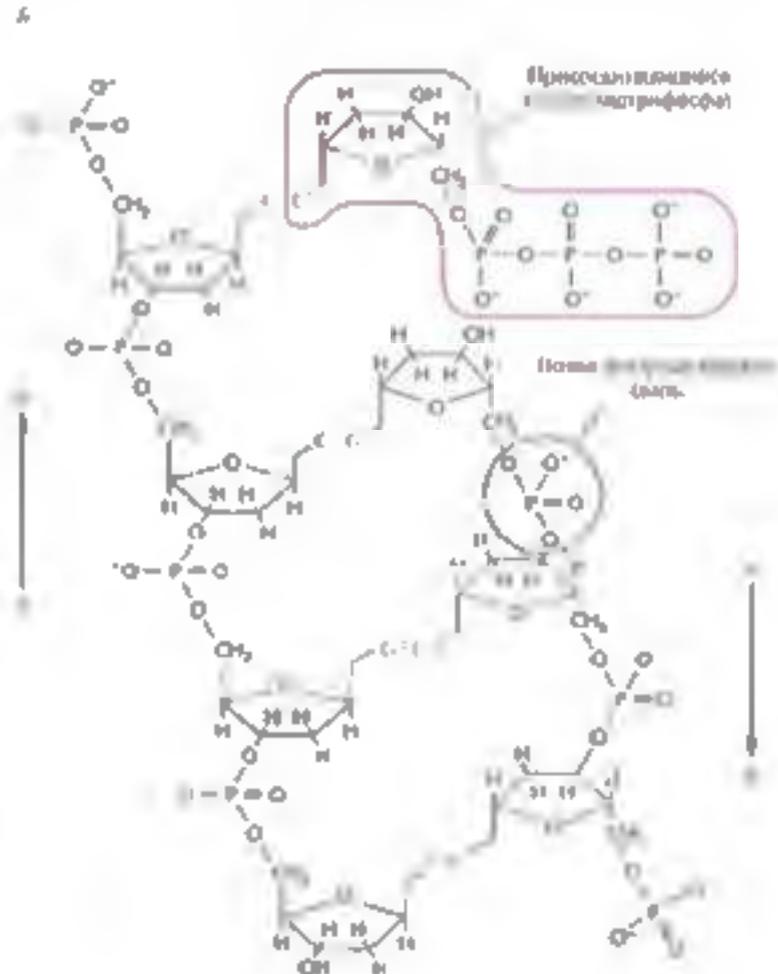


Рис. 3.6. (Продолжение) 6. Молекула α-фосфатной группой присоединяется к 3'-гидроксильной группе растущей цепи и образуется фосфоэфирная связь. К высшей валентности спаривания 10-ой атома углерода дезоксирибозы присоединяется матричный фосфат.

яний, осуществляющих транспорт веществ внутри клеток и между клетками, регулируют проницаемость клеточной мембраны, различают также различные структурные элементы. Белки участвуют в осуществлении двигательных функций, обеспечивают защиту от инфекций и токсиков, регулируют синтез остальных генных продуктов. Основной структурной единицей белков является аминокислота. Все аминокислоты имеют сходное аминокислотное строение. К центральному атому углерода ( $\alpha$ -углерод) присоединены атом водорода (H), аминогруппа ( $\text{NH}_2$ ), карбоксильная группа ( $\text{COO}^-$ ) и R-группа (боковая цепь) (рис. 3.7, А). Существует 20 разных боковых групп и следовательно 20 аминокислот. Например, в аминокислоте валине R-группой является метильная группа ( $\text{CH}_3$ ). 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 свободную аминогруппу (N-конец), а последней – свободную карбоксильную группу (С-конец).

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

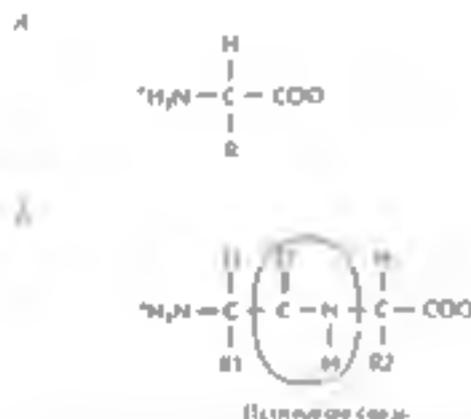


Рис. 3.7. Обобщенная структурная формула аминокислоты и образование пептидной связи. А. Аминокислота R – боковая группа. Б. Образование пептидной связи между двумя аминокислотными остатками с боковыми группами R1 и R2

Таблица 3.1. Аминокислоты и их обозначения

Аминокислота	Трехбуквенное обозначение	Однобуквенное обозначение
Алифан	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагин-сера метион	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Триптофан	Trp	T
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 цепей (субъединиц), как независимых, так и несколько различающихся. Кроме того, многие белки, выполняящие ключевые функции, представляют собой 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 их матрица в соответствии с их нуклеотидной последовательностью. РНК – это линейная полинуклеотидная молекула, отличающаяся от ДНК в двух отношениях. Во-первых, мономерными в РНК являются рибозы, содержащие не штифт, а две гидроксильные группы; они соединены с 2'- и 3- атомами углерода. Во-вторых, одним из четырех оснований в РНК является урацил (U), заменяющий место тимина. Благодаря эти молекулы РНК одностранные, 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.

многочисленные участки, образующие различные структуры «шпильки» (рис. 3.8). Старинные оксиданты прикладывает таким же образом, как и в ДНК, но исключением того, что вместо пары А-Т образуются А-У.

Существуют три основных типа РНК: мРНК (матричная), 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 связана с репликацией. Матрицей при синтезе РНК служат определенные участки 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 происходит образование миксиды РНК (отщепляется от ДНК, и движется справа ДНК восстанавливается). Чтобы обеспечить транскрипцию участка определенных элементов ДНК, должны существовать некие специфические последовательности, указывающие, где начинается (заканчивается) 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'-фланжирующей последовательностью, а расположенный за ним — 3'-фланжирующей.

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 транскрипция. Структурный участок от левого гена.

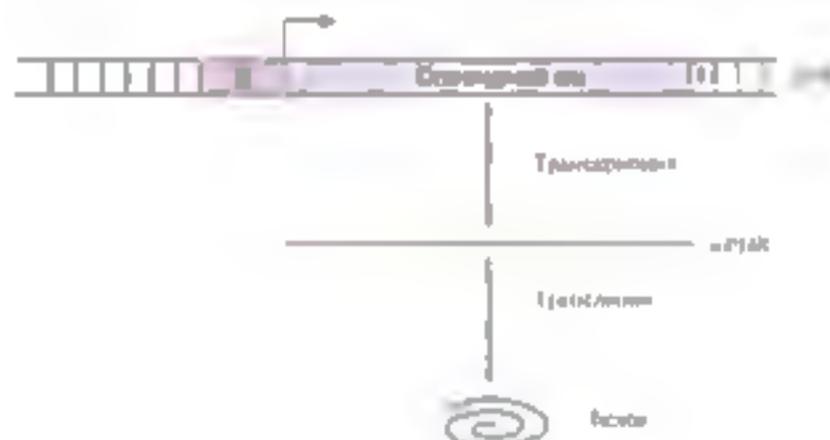


Рис. 3.10. Структурное изображение первичной транскрипции структурного гена. Указаны промотор (p), сайт иницииции транскрипции и ее направление (вертикальная стрелка), область терминации транскрипции, увеличенная РНК-полимеразой (i). Сначала на ДНК она не является специфической мРНК (спри-инция), а затем 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 «торцы в торцы» (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 (сцистиномы) мРНК может образовываться в результате сплайсинга всех экзона (первичный) транскрипта, а в другой какой-то ткани будет интрон вместе с фланкирующими 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).

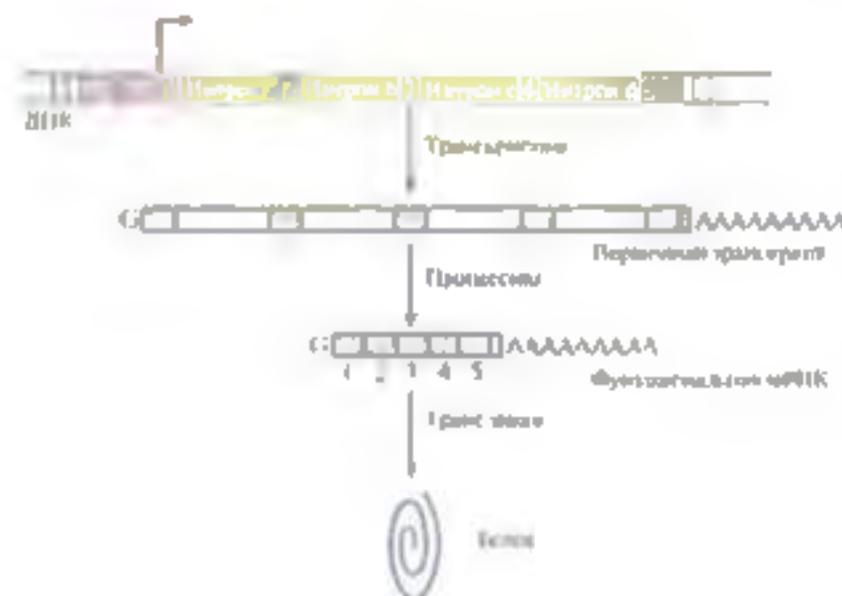


Рис. 3.11. Структурное изображение эукариотического структурного гена. Указаны промотор (p), сайт иницииции транскрипции и ее направление (вертикальная стрелка), область терминации транскрипции, увеличенная РНК-полимеразой (i) 1-3 - экзоны, а-д - интроны. Кривыми транскриптит спериит рНУ(А)-адосит (о Г-адосит и мети-триситиди нуклеотид G (кап) на 5'-конце. После транскрипции интроны на первичного транскрипта вырезаются (процессинг), а их образованная функциональная РНК соединяется белковой молекулой (трансляция)

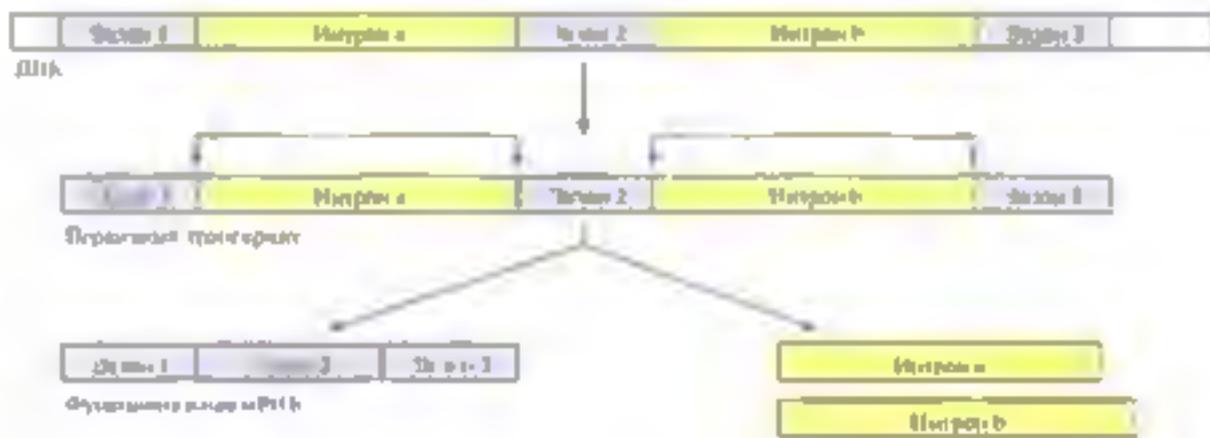


Рис. 3.12. Сплайсинг первичного транскрипта у эукариот. Угловыми стрелками указаны места соединения экзонов 1, 2 и 3 после удаления интронов а и б

В эукариот функционирование клетки (при этом 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, в РНК это типичная (или почти типичная) молекула длиной от 75 до 93 нуклеотидов. И если известны (особенно) значения; каковы формулы учета, сформированы между собой (рис. 1.8), и что молекулы означают в их структуре и образовании структуры, (наконец) буквы I (рис. 1.14). С помощью специфических ферментов (антикод-тРНК-синтез) к 3'-концу тРНК

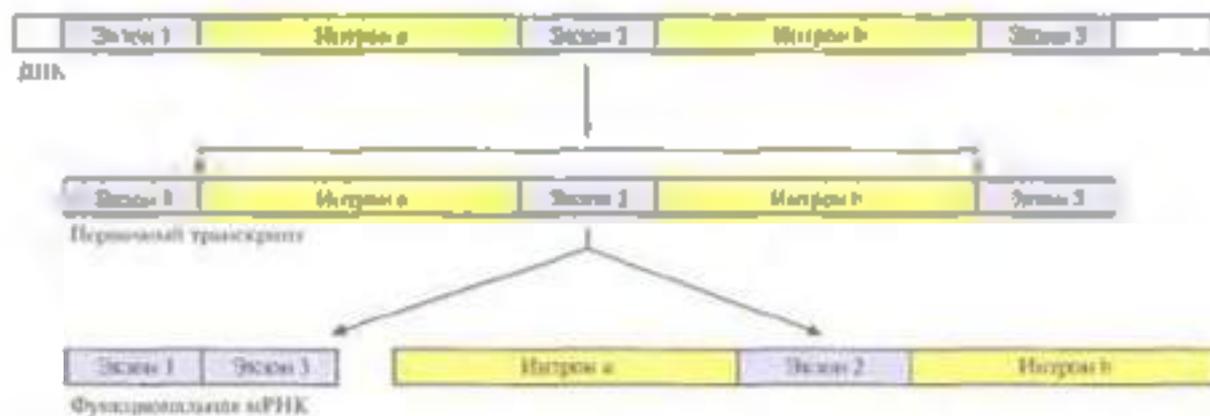


Рис. 3.13. Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта у эукариот. < (средняя угловая стрелка) указывает место соединения экзона 2 с экзонами 1 и 3 после удаления интронов. Экзон 2, функционирующий интроном 1 и 2, исключается из первичного транскрипта, в экзонах 1 и 3 соединяются с образующимся функциональным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



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

У эукариот трансляция начинается с взаимодействия специфической «нагрузочной» инициаторной тРНК (Met-tРНК<sup>Met</sup>) и фактора инициации с малой рибосомной субъединицей. Затем мРНК прикрепляется своим 5'-концом к комплексу тРНК—малая рибосомная субъединица, и комплекс присоединяется по мРНК до стартового кода (AUG). Далее инициаторный UAC инициаторной Met-tРНК<sup>Met</sup> 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 очень сложны. Процесс инициации включает «бродяжничество» инициаторных комплексов между соседними аминокислотами, при этом очередность (предыдущая) аминокислота 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 антикодонным соответствующей тРНК, определяя таким образом, какой из незаряденных тРНК присоединится к рибозиме (незаряденные тРНК не способны к рибозиму). Если вторым кодоном в мРНК оказывается CUG, то следующей в рибосомному комплексу прикрепляется несущая лейцин тРНК с антикодоном 3'-CAG-5'. Когда эта тРНК оказывается на месте, между карбоксильной группой метионина и аминогруппой лейцина с помощью ферментативной активности, присущей белкам субъединицы, образуется пептидная связь, при этом лейцин отделяется от тРНК, и метионин оседеляется от инициаторной тРНК, и последняя отделяется от рибосомы. Комплекс метионин—лейцин—тРНК<sup>Met</sup> «протискивается» через рибосому (рис. выше), так что следующей кодон мРНК может связаться с незаряденной тРНК, несущей соответствующий аминокислоты. Если третьим кодоном мРНК является UUU, то следующей аминокислотой будет фенилаланин с соответствующей рибозиме тРНК с антикодоном AAA. Когда эта тРНК окажется на месте, между карбоксильными группами лейцина и фенил-

аланин фенилаланин образуется пептидной связью. тРНК<sup>Met</sup> отделяется от рибосомы, тРНК<sup>Met</sup> также трансмембрана между тРНК<sup>Met</sup> (тРНК с присоединенной к ней растущей полипептидной цепью), и следующей кодон мРНК может связаться с незаряденным соответствующей незаряденной тРНК.

Эти события — самонастроевание тРНК к мРНК — большая часть инициаторного старта-

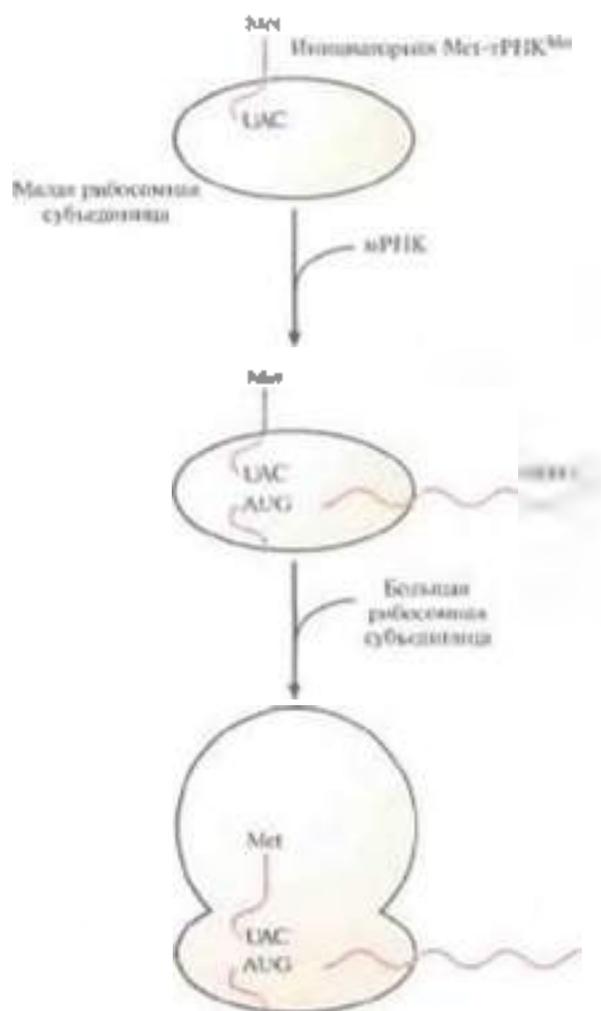


Рис. 3.16 Инициация трансляции в эукариотической клетке. Малая рибосомная субъединица связывается с инициаторной тРНК, «нагруженной» метионином (Met-tРНК<sup>Met</sup>), комплекс прикрепляется по мРНК, кодону инициаторной тРНК не связывается со стартовым кодом AUG мРНК. Далее к комплексу мРНК—тРНК—малая субъединица присоединяется большая субъединица и образуется комплекс инициатора.

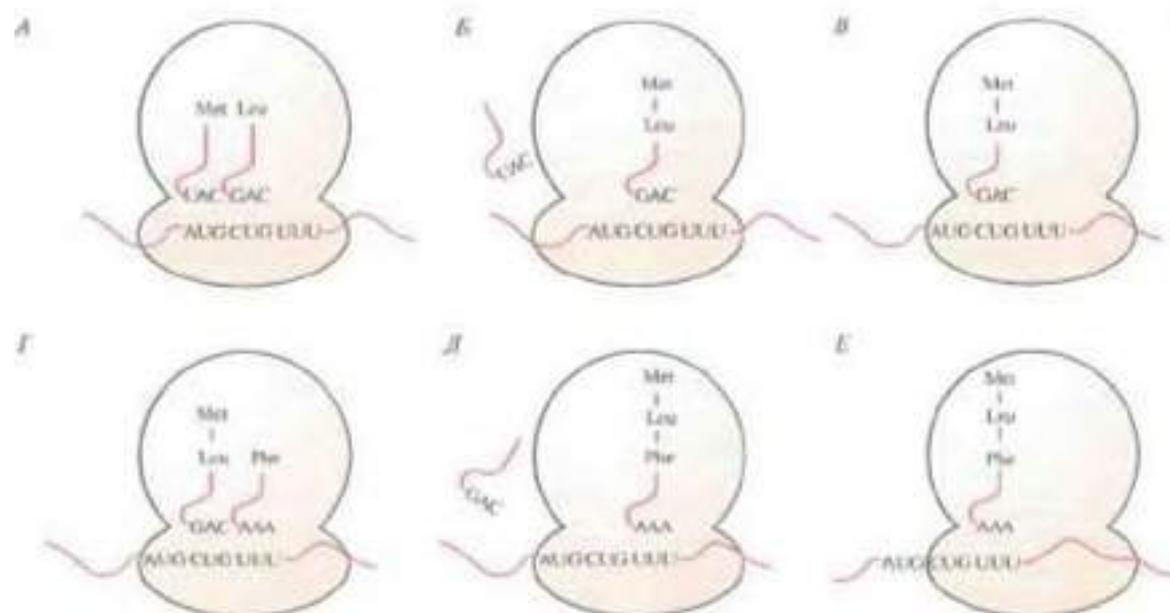


Рис. 2.17. Элонгация аминокислотной цепи. А. Пептид-трансфераза (CUC) в мРНК связывается с антикодином (CAG | Leu) тРНК<sup>Met</sup>. Б. Аминокислоты образуют пептидную связь с действующим, доставленным тРНК<sup>Met</sup>, освобождаясь от аминокислоты и антикодиона (тРНК освобождается). В. Трансляция продолжается: следующая тРНК — мРНК с антикодином связывается с кодоном (AUG). Г. Третий кодон (UUU) связывается с антикодом AAA Phe тРНК<sup>Phe</sup>. Д. Действие образует пептидную связь с фактически новым, доставленным тРНК<sup>Phe</sup>, освобождаясь от тРНК<sup>Met</sup> освобождаясь от метионина. Е. Третий кодон вновь связан с тРНК — мРНК с антикодином связывается с метионом. и т. д.

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 не связывается из-за отсутствия комплекса, он может связаться с другой такой же комплексом, так что одна молекула мРНК может одновременно транслироваться несколькими рибосомами.

Элонгация прекращается до тех пор, пока рибосома не дойдет до кодонов UAA, UAG или UGA (стоп-коды, терминирующие кодон) (рис. 2.18). В клетке отсутствует тРНК с антикодином, комплементарным стоповым термину. Из-за этого белки-факторы (экзобактериальный терминатор). При наличии фактора экзобактериального терминирующей факторы (терминатор) останавливают процесс трансляции. Рибосома диссоциирует на субъединицы, которые 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 (примочья на на животных) происходит некаптация белка, когда интронизация вновь расширяется в определенных сайтах с числом аминокислотных остатков белковых молекул он специфический функциями. В некоторых случаях, особенно в эукариотических клетках, в определенных аминокислотах ферментативным путем присоединяются фосфорные группы, липиды, углеводы или другие низкомолекулярные соединения. В результате этих 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 метионин. Когда какой-либо кодон находится на 5'-конец молекулы мРНК, то он распознается другой тРНК (Met-тРНК<sup>Met</sup>), с которой происходит связыва-

Таблица 3.2. Генетический код и частота использования разных аллинов в генном *E. coli* и мышьяк

Кодон	Алиновое слово	Частота аллинов в аллиновом слове		Кодон	Алиновое слово	Частота аллинов в аллиновом слове	
		<i>E. coli</i>	мышьяк			<i>E. coli</i>	мышьяк
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	UUG	Фенилаланин	0,49	0,37
GAC	Аспарагиновая кислота	0,59	0,44	UCC	Серин	0,17	0,06
GAU	Аспарагиновая кислота	0,38	0,56	UCA	Серин	0,17	0,15
GUG	Валон	0,14	0,40	UCC	Серин	0,19	0,17
GUA	Валон	0,17	0,19	UCU	Серин	0,17	0,21
GUU	Валон	0,29	0,17	AGU	Серин	0,17	0,14
GUC	Валон	0,30	0,25	AUA	Серин	0,27	0,25
GCG	Алион	0,34	0,10	CCG	Аргинин	0,06	0,19
GCA	Алион	0,33	0,22	UCA	Аргинин	0,63	0,10
GCU	Алион	0,10	0,28	CGU	Аргинин	0,43	0,40
GCC	Алион	0,25	0,46	CCU	Аргинин	0,13	0,19
AAG	Лизин	0,24	0,60	AGG	Аргинин	0,03	0,22
AAA	Лизин	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	0,27
AUG	Метионин, старт	1,00	1,00	CAU	Гистидин	0,32	0,40
AUA	Изолейцин	0,07	0,14	CAC	Гистидин	0,44	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	UCC	Пролин	0,35	0,11
UCU	Цистеин	0,13	0,42	UCA	Пролин	0,30	0,27
UCU	Цистеин	0,57	0,58	CCU	Пролин	0,16	0,20
UCA	Стой	0,30	0,61	CCU	Пролин	0,30	0,13

факторизации) метионин. Алиновое слово триптофан кодируется всего одним аллином (UAG), остальные алинокодоны, по которым состоит белок, — по крайней мере двумя. Чаще четырьмя, а иногда и шестью аллионами. Например, для лейцина существует шесть аллинов UUA, UUG, CUU, CUC, CUA и CUG. Специфические кодоны используются различными организмами с разной частотой. Из четырех кодонов для глицина GGA используется в структурных генах человека в 25% случаев, в *Escherichia coli* — в 9%. Такая же ситуация наблюдается и для стоп-аллинов UAG, у человека частота использования кодонов UAA, UAG и UGA составляет 0,22, 0,17 и 0,61 соответственно, а у *E. coli* — 0,02, 0,09 и 0,30. Несмотря на все эти различия, ге-

нетичальное код у всех организмов, и различия в использовании, единичны.

## Регуляция транскрипции у бактерий

Все процессы, происходящие в бактериальной клетке, образование алинокодов, 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-

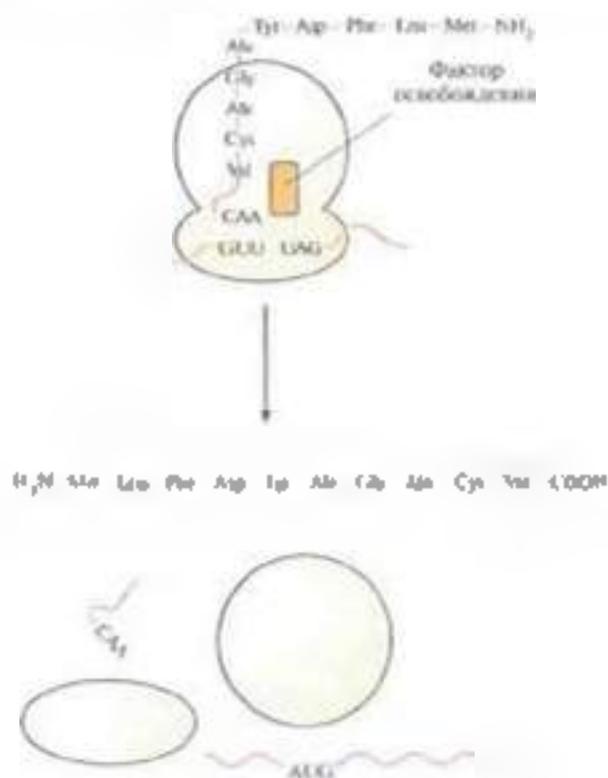


Рис. 3.18. Сравнение трансляции. Со стоп-кодоном (UAG) связывается фактор освобождения, и трансляция останавливается. Хотя метионин сам в начале последовательности мРНК и митохондриальной ДНК не встречается, освобождая мРНК, мРНК и готовый пептид они остаются вместе на рибосоме, и метионин высвобождается субстратом

но не гены, кодирующие адгезивный белок, 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 наследственности, в которой зашифровано более сотни белков, называется опероном. Обычно оперон называется под названием единичного промотора, и при его транскрипции образуются одна длинная молекула мРНК, кодирующая несколько белков. При

присоединении тандем мРНК, а второй стоп-кодон наследовательности, кодирующей один белок, соответствует со стоп-кодом гена следующего белка, также образуется набор дискретных белков.

В большинстве структурных генов  $E. coli$  имеются два сайта связывания для РНК-полимеразы. Один из них обычно представляет собой пугалыплату последовательности:

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 иницииации 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 оператором 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 связывается также индуктор или эффектор, то его конформация изменится таким образом, что его связывание с операторной областью станет невозможным, и транскрипция возобновится. Обычно эффектор (и индуцирует клеточными ферментами. Когда его конформация связывается, репрессор связывается с операторным участком, а транскрипция вновь прекращается. Операторный участок специфичен для каждого оперона, а эффектор взаимодействует только с определенным репрессором.

В качестве наглядной иллюстрации такой пример Предпринимателя, чья клетка способна использовать определенным сахар. Когда сахара 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

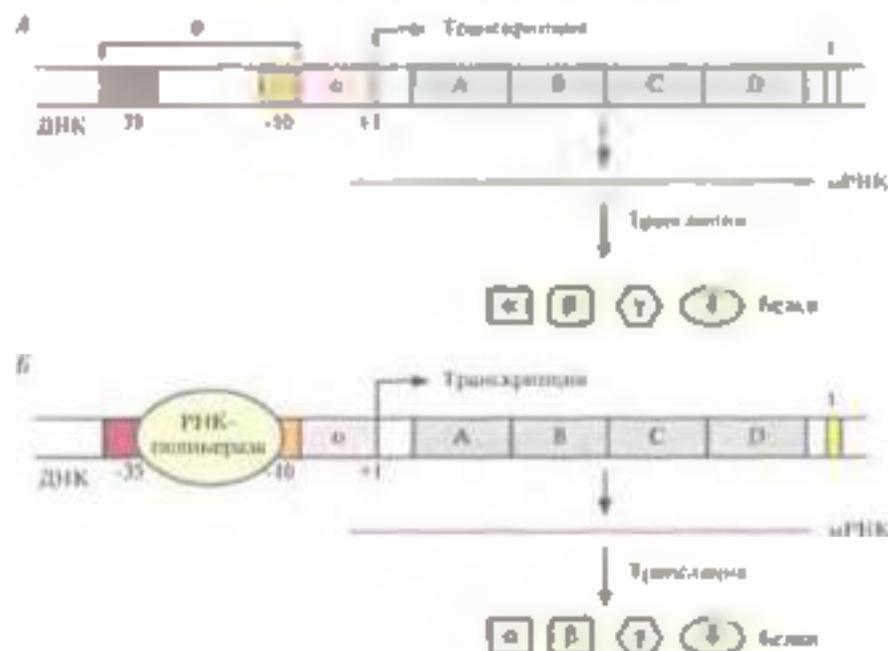


Рис. 3.19. Транскрипция в бактериальном опероне. А Структурные гены (А, В, С и D) оперона являются под транскрипционной единицей оператора (о) и промотора (р). РНК-полимераза связывается с участком, находящимся на расстоянии 10 (-10) и 35 (-35) пар оснований от сайта инициации транскрипции (+1). I – Стоп-сайт, ответственный за окончание транскрипции.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$  – белки, продукты генов А, В, С, D. В То же, что и на рис. А, но здесь уже связавшиеся РНК-полимераза с промоторной единицей

клеткой, становится совершенно необходимым. В этом случае репрессор действует как ингибитор, препятствуя связыванию репрессора с операторным участком и таким образом обеспечивая транскрипцию оперона и синтез ферментов.

При истощении запасов сахара в среде репрессор связывается с операторным участком, и транскрипция оперона прекращается.

Нормальным состоянием других оперонов может быть состояние, при котором ширинка

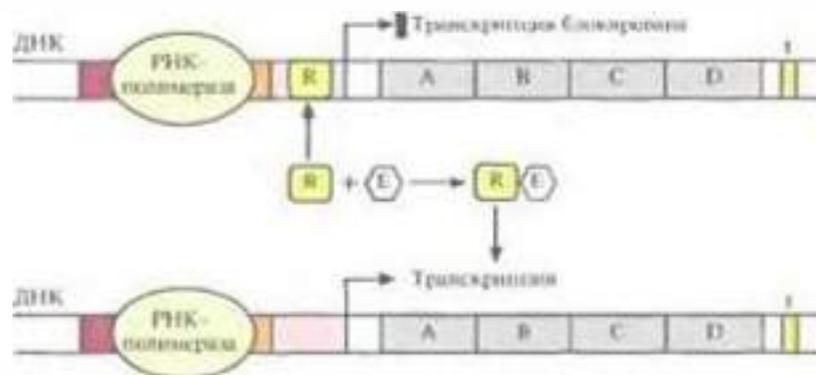


Рис. 3.20. В отсутствие транскрипция функции ферментов. Репрессор (R) связывается с оператором и блокирует транскрипцию. Связывание индуктора (E) с репрессором изменяет его конформацию, и комплекс индуктора и репрессора не связывается с оператором. РНК-полимераза беспрепятственно перемещается вдоль участка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

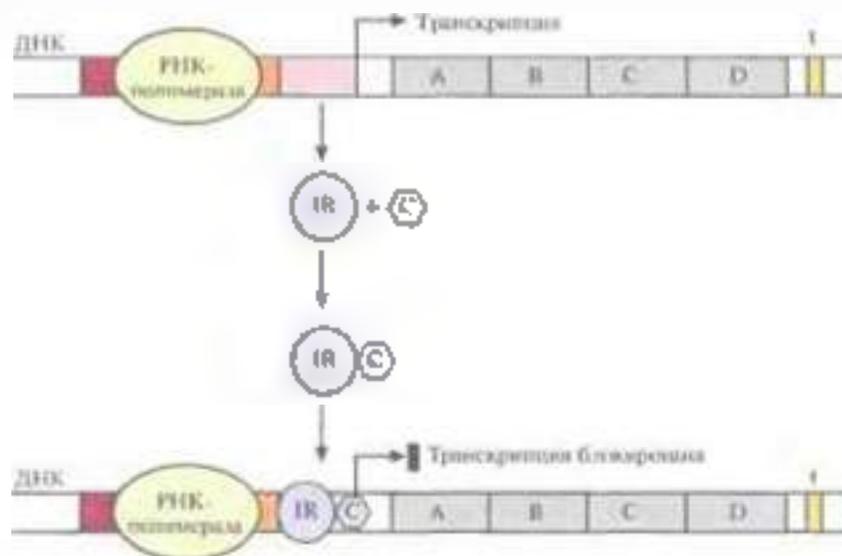


Рис. 3.21. Выключение транскрипции факторальному оператору С с помощью коррессора (С) с неактивным репрессором (IR) изменяет конформацию комплекса. Комплекс коррессор-репрессор (С-IR) связывается с оператором и блокирует транскрипцию

ластен из транскрипции, поскольку репрессорный белок неактивен. В том случае специфичский 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 коррессора транскрипция индуцируется.

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

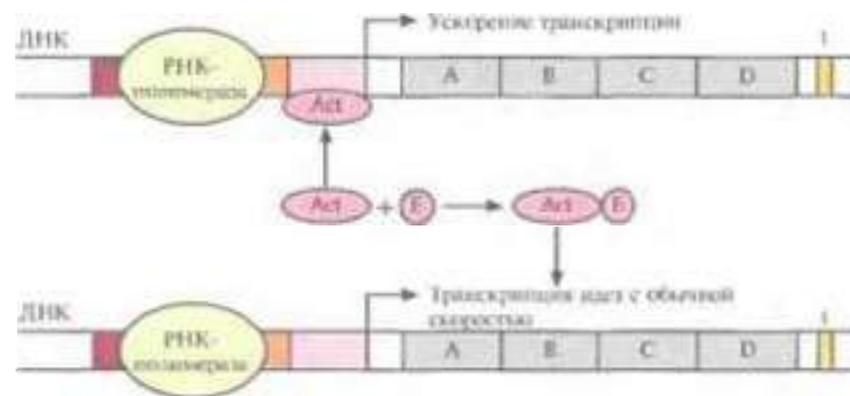


Рис. 3.22. Изменение скорости транскрипции. Активатор (Act) связан с участком между TATA-боксом и сайтом иницииции транскрипции, скорость транскрипции повышается. Индуктор (E) связывается с активатором и ассоциирует его с оператором с ДНК; скорость транскрипции увеличивается

## ВАЖНАЯ ДЕЛА

## Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты

J. D. Watson, F. H. C. Crick

Nature 178, 737-738, 1953

Выяснение молекулярной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) без сомнения стало одним из самых замечательных научных достижений XX в. Уотсон и Крик только в ходе открытия глы «Мы выяснили пространственную структуру одной из основных единиц наследия (ДНК) — ее структуру обильнейшей наследственной единицы — двойственной молекулы, состоящей из двух спирально скрученных цепочек, связанных между собой поперечными связями. Мы обнаружили, что каждая цепочка состоит из сахара, фосфорной кислоты и азотистых оснований, соединенных вместе... Нормальное и изогнутое кольцо оснований образует шпираль, при этом спирали соединены одной цепью сдвигаются относительно друг друга и в спиральной форме соединены с поперечными связями... Если одну из оснований цепи — это аденин... вторым основанием должен

быть тимин, но не с тимин соединяется с гуанином и цитозином. Последовательная комбинация в порядке спирали одной цепи может быть любой. Очень важно, что структура «двойственной молекулы» — двойственной молекулы — неосредственно указывает возможность копирования генетического материала». В заключительной статье, опубликованной несколькими месяцами позже (Science 77, 404, 1953), Уотсон и Крик уточняют: «Самостоятельный «осгон» в нашей модели абсолютно исключен, но эту структуру может заменить любая последовательность пар оснований... В данной модели не предполагается, в чем является наиболее вероятным, что каждая поперечная связь содержит в замкнутом виде генетическую информацию. Наша модель дает объяснение многим фактам». Например, сплитинг

чуть ли не может возникнуть в результате случайного перемещения одной из оснований и результирующей «верной» формы, а образование пар «комплементарных» оснований при репликации может осуществляться с помощью физических взаимодействий оснований.

За время «71» происходили большие изменения в теории двойственной структуры ДНК и принципах ее организации, раскрытия механизмов репликации репликационной ДНК; установились принципы хранения и репликации генетической информации и репликационная система. Однако проблема, о которой мы писали раньше, по которой эти принципы синтезируются в их естественном виде. Сопрежнему мы считаем, что этой проблемой в до сих пор не решены Уотсона и Крика (особенно) не утратило своего значения. В частности, если бы не было четкого представления о структуре ДНК, сейчас не существовало бы теории репликации ДНК.

Таким образом не блокирует переключатель РНК-заторможенные выходы из ядра ДНК, а напротив, ускоряет его, действуя как своего рода «смазка». Активно (и специфично) для определенных сайтов активируются. Понимая с развитием актинотора связывающего фактора, перемещая его в определенную форму, виды скорость приключения уменьшается (рис. 1, 2). В другом случае фактор, например, активирует митохондриальную актинотора. Таким образом, детали репликации трикарбонид у бактерии, митохондриально провела типичными видами мушкет, которые связаны на внешней репликативной системе, и исследовать их (и) различные сайты связывания белков и ДНК.

## Регуляция транскрипции у эукариот

Несколько набор основных структурных генов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки, — генов «домашнего хозяйства» — транскрибиру-

ется в большинстве активно функционирующих эукариотических клеток. В отличие от этого специфические гены, которые специфичны для уникальности без или почти каждой из органов, транскрибируются и транслируются только в определенных клетках. Так, гены, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субединицы гемоглобина взрослого человека, «экспрессируются» исключительно в клетках — предшественниках эритроцитов. Число разных мРНК, специфичных для разных клеток, варьирует от единиц до десятков. Способность клеток «включать» (активировать) или «выключать» (ингибировать) структурные гены критично важна для поддержания клеточной специфичности в «жизненно расходуемых энергетических ресурсах».

Для включения и выключения транскрипции «домашние» эукариотические структурные гены используются в качестве разнообразных «выключе-



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

Некоторые репродуцируемые (некодирующие) гены активируются каждым сайтом, который функционирует как бы своеобразным «некодующим» свитчем, например повышением температуры или синтезом определенной формы, истериии и др. Кроме того, связывается с рецепторами специфически клетки, обеспечивая его проникновение в клетку. Как правило в клетке, формируя гуджет (в активном состоянии с одним из ключей) белков и активирует эту конфигурацию. В таком активном состоянии белок присоединяется к ДНК 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 «левер» (арматура) сайта (+); он обозначается NRSE (от англ. *neuron-responsive element factor*). Во всех клетках, кроме нейрона, синтезируется NRSE-фактор (от англ. *neuron-responsive element factor*), который связывается с NRSE и блокирует транскрипцию соответствующего гена. В нейронах 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 единицей 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 время транскрипции интроны вырезаются, 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 (антикодон), обеспечивающая связывание tРНК с комплементарным участком (п трех нуклеотидов в молекуле мРНК). Существует две основные функции рРНК: малая и большая (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 триплетом 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<sup>Met</sup>), 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, четвёртой, отделяется от tРНК и соединяется с АК2 с помощью пептидной связи. Свободная tРНК<sup>Met</sup> покидает рибосому. Рибосомный комплекс перемещается вдоль молекулы мРНК, и пептид-tРНК, т. е. комплекс Met-AK2-tРНК<sup>Met</sup>, 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-AK2-AK3-tРНК<sup>Met</sup>. Освобожденная от аминокислоты tРНК покидает рибосому. Рибосомный комплекс опять перемещается вдоль молекулы мРНК, и Met-AK2-AK3-tРНК<sup>Met</sup> занимает вакантное место, вытесняемое прежде предыдущей пептид-tРНК. Эти события повторяются до тех пор, пока рибосома не дойдет до стоп-кодона Аггикадона, 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 ПТГАС промоторной области структурного гена или оперона. Взаимодействие этих элементов регуляции (нередко 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

- Baronicki 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. Zannis, 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.
- Schreibner 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.
- Цан К., I. Манник. 1994. Транскриптивная активация: a 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 свойства и различия структурных генов про- и эукариот.
4. Опишите процесс инициации транскрипции.
5. Какие наиболее вероятно нуклеотиды (экзонотетраплеты, координаты) следующего эволюционного последовательности: MAGCTWYQI FPRKMWYIISTI IIPFILPMNVAG.
6. Какой аминокислотной последовательности отвечает следующий эволюционный последовательности: QCCAUCCGACGAUGCUUCLAAAAGL AUCUCAUCQAAAUCAGGCGUICGUAAMAGCCGACCCGCGCGG.
7. Что такое TATA-бокс?
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 (вексториально-нуклеиновой кислоты, ДНК) из одного организма в другой. Накадуть единого, универсального набора меток здесь не существует, но чаще всего экспериментали с рекомбинантной ДНК проводят по стандартной схеме (рис. 4.1).

1. Из организма – донора нужных генов экстрагируют плазмидную ДНК (экзоплазмидная ДНК, плазмидная ДНК, ДНК-минус, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образванием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонированный 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 безклеточный 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 генетики бактериальных вирусов и мезоромосомных 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 произошло 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*

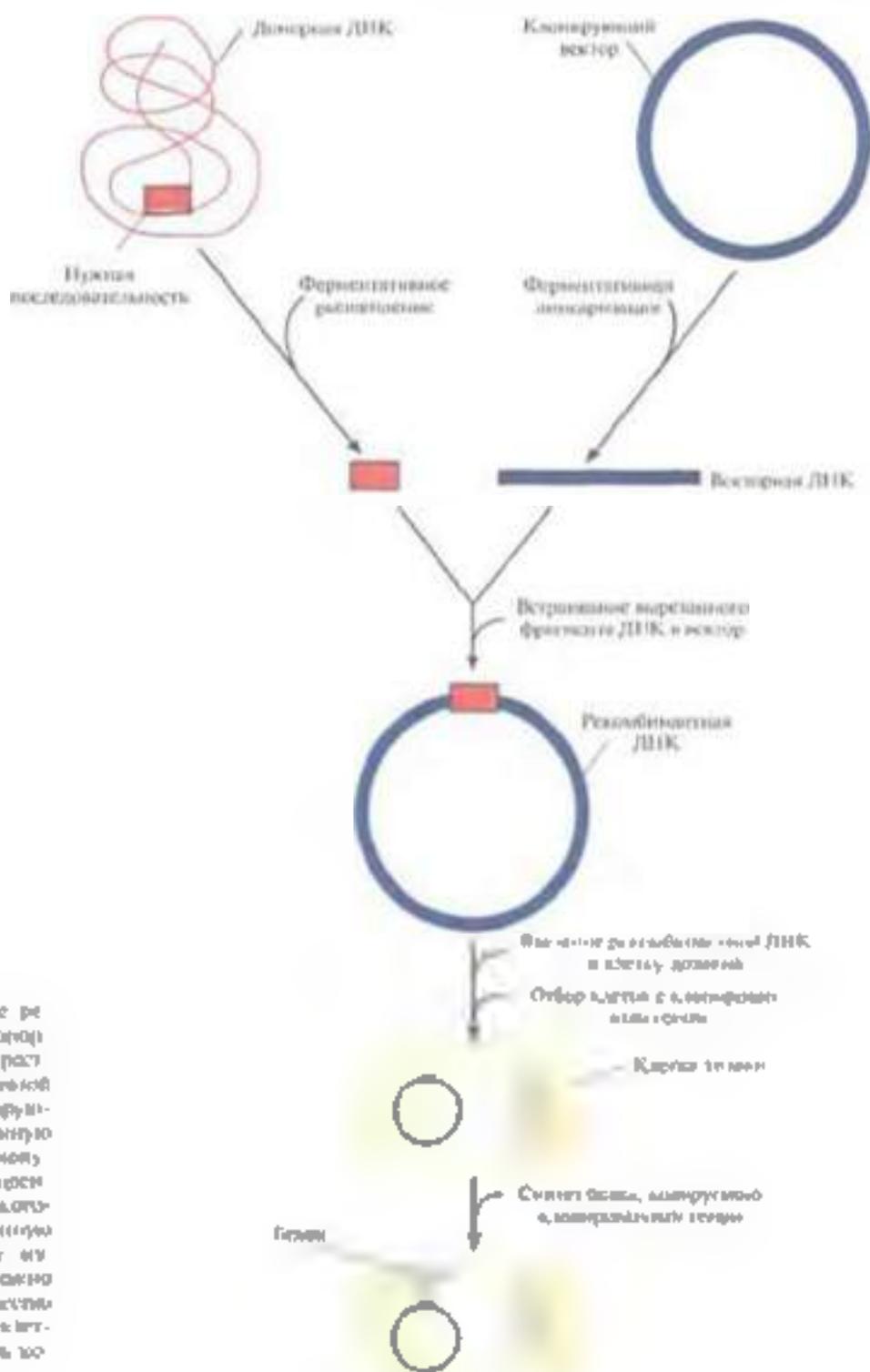


Рис. 4.1. Клонирование рекомбинантной ДНК. Димерная ДНК расщепляется рестриктазами, образуются фрагменты с нужной последовательностью и встраиваются в клонируемый вектор. Полученную конструкцию можно вводить в клетки донора. Клетки-хозяева, которые содержат рекомбинантную ДНК, культивируются *in vitro*. При использовании метода мутационной селекции получают чистую культуру клеток и получают рекомбинантные плазмиды.

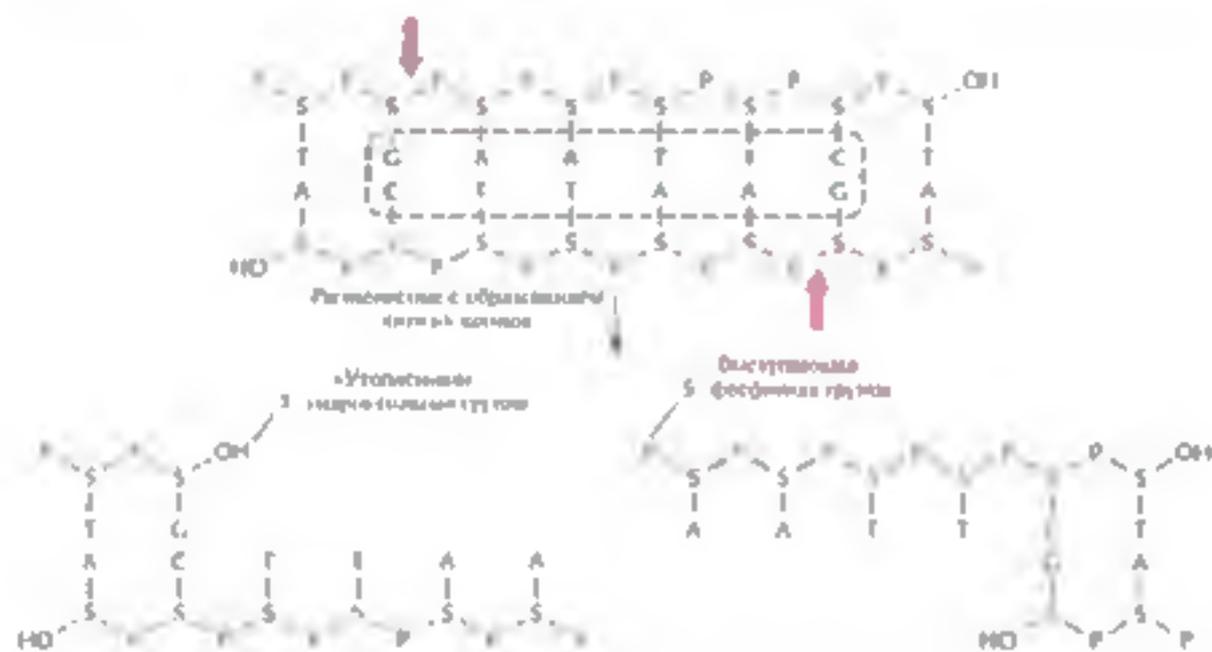


Рис. 4.2. Расщепление участка ДНК рестриктазой типа II *EcoRI* с образованием липких концов. Стрелки – сайты, по которым происходит расщепление в сахарофосфатном остове. S – дезоксирибозы, P – фосфинатная группа, OH – гидроксильная группа. Ниж. часть иллюстрирует расщепление *EcoRI* в области инверсионной повторы.

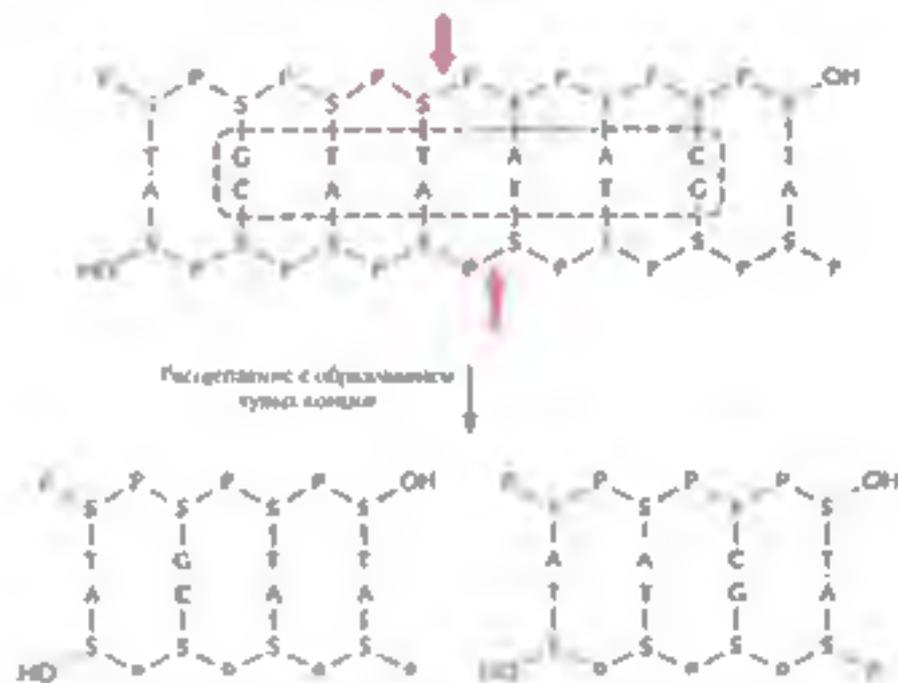


Рис. 4.3. Расщепление участка ДНК рестриктазой типа II *NotI* с образованием двух концов. Стрелки – сайты, по которым происходит расщепление в сахарофосфатном остове. Бузельные обозначения те же, что и на рис. 4.2. Последовательность, расщепляемая рестриктазой *NotI*, выделена инверсионной повторы.

и кодируют название *EcoRI*. Этот фермент узнает участок ДНК, состоящий из специфической по-  
-вторичную последовательность (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 при 3-атоме углерода сахарного остатка одного нуклеотида и фосфатной группой, присоединенной к 5-углеродному атому сахарного остатка соседнего нуклеотида. Разрыв в цепи ДНК выполняется так: каждая из цепей, в результате чего образуются одноцепочечные нуклеотидные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждой (хвосты концы). Каждая одноцепочечная «конец» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-шириковой группа противоположной цепи как бы утолщена.

Полным *EcoRI*, из бактериальных клеток или полученным *in vitro* рестрицирующим эндонуклеазой II. По своим этим эндонуклеазам делятся по своему же принципу, как и *EcoRI* при микроорганизмизм 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*.

Параллельные последовательности, которые распознаются рестрицирующими эндонуклеазами типа II и в которых происходит расщепление молекул ДНК, называются сайтами узнавания. Помимо рестриктаз, гидролизующих (расщепляющих) полинуклеотидную цепь с образованием липких концов, существуют рестриктазы, которые вносят разрывы в цепи строю друг против друга с образованием фрагментов ДНК с «гумми» 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 синтезе клонированных

Таблица 4.1. Узнавание и расщепление ДНК рестрицирующими эндонуклеазами типа II

Фермент	Сайт узнавания	Характер расщепления
<i>EcoRI</i>	GAATTC CTAAGC	Выступают концы с 5'-фосфатной группой
<i>BamHI</i>	GATC CTAGC	Выступают концы с 5'-фосфатной группой
<i>AclI</i>	CTGCAG GACGTC	Выступают концы с 5'-гидроксиловой группой
<i>SmaI</i>	GATC CTAGC	Выступают концы с 3'-фосфатной группой
<i>AclI</i>	CTGCAG GACGTC	Выступают концы
<i>HpaI</i>	GTAAAC CATTTG	Выступают концы
<i>HpaII</i>	GTAAAC CATTTG	Выступают концы
<i>AclI</i>	CTGCAG GACGTC	Выступают концы с 3'-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 вдоль молекулы. 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 п. н., который образуется в результате гидролиза *EcoRI*, не существует



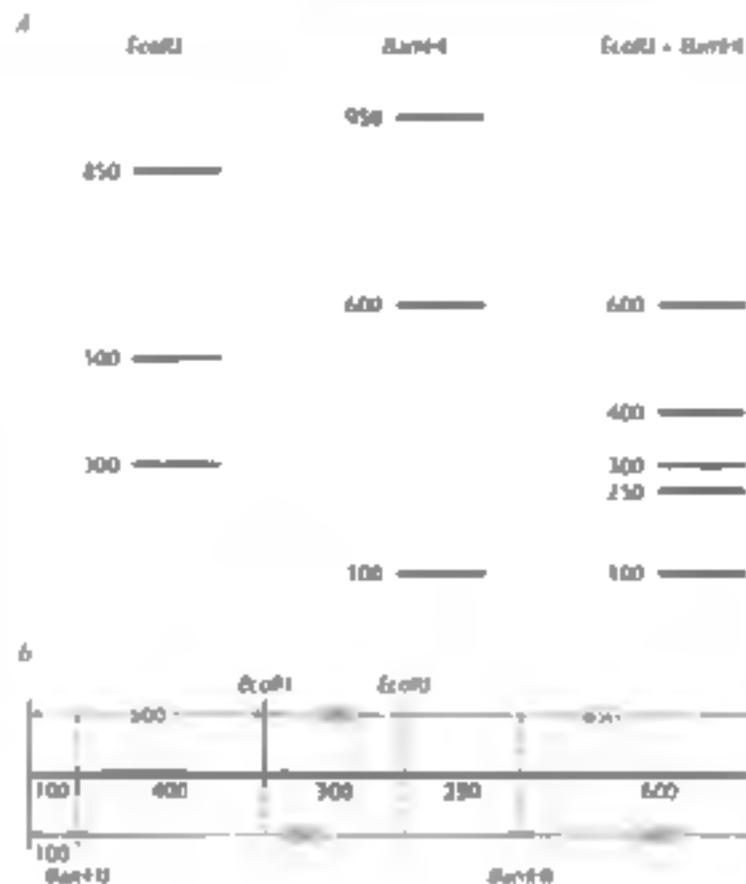


Рис. 4.4. Картирование сайтов рестрикции. А. Результаты *SalI*-защелкивания фрагментов ДНК, полученный из расщепленного указанными ферментами *SalI*-сайта ДНК плазмиды. В. Рестрикционный сайт, построенный на *SalI*-сайтах с помощью *SalI*-фрагментов. Число нуклеотидов (n) указано в скобках. В. Результаты рестрикции сайта, построенного на *SalI*-сайтах с помощью *SalI*-фрагментов. Число нуклеотидов (n) указано в скобках.

должен содержать один из концов исходной молекулы ДНК. Далее, мы видим, что *Bam*HI расщепляет *Eco*RI фрагмент длиной 300 н. н. для фрагмента размером 100 и 400 н. н., и что один из *Eco*RI сайтов отделен от *Bam*HI-сайта 400 н. н.; значит, фрагмент длиной 100 н. 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 шлем 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-

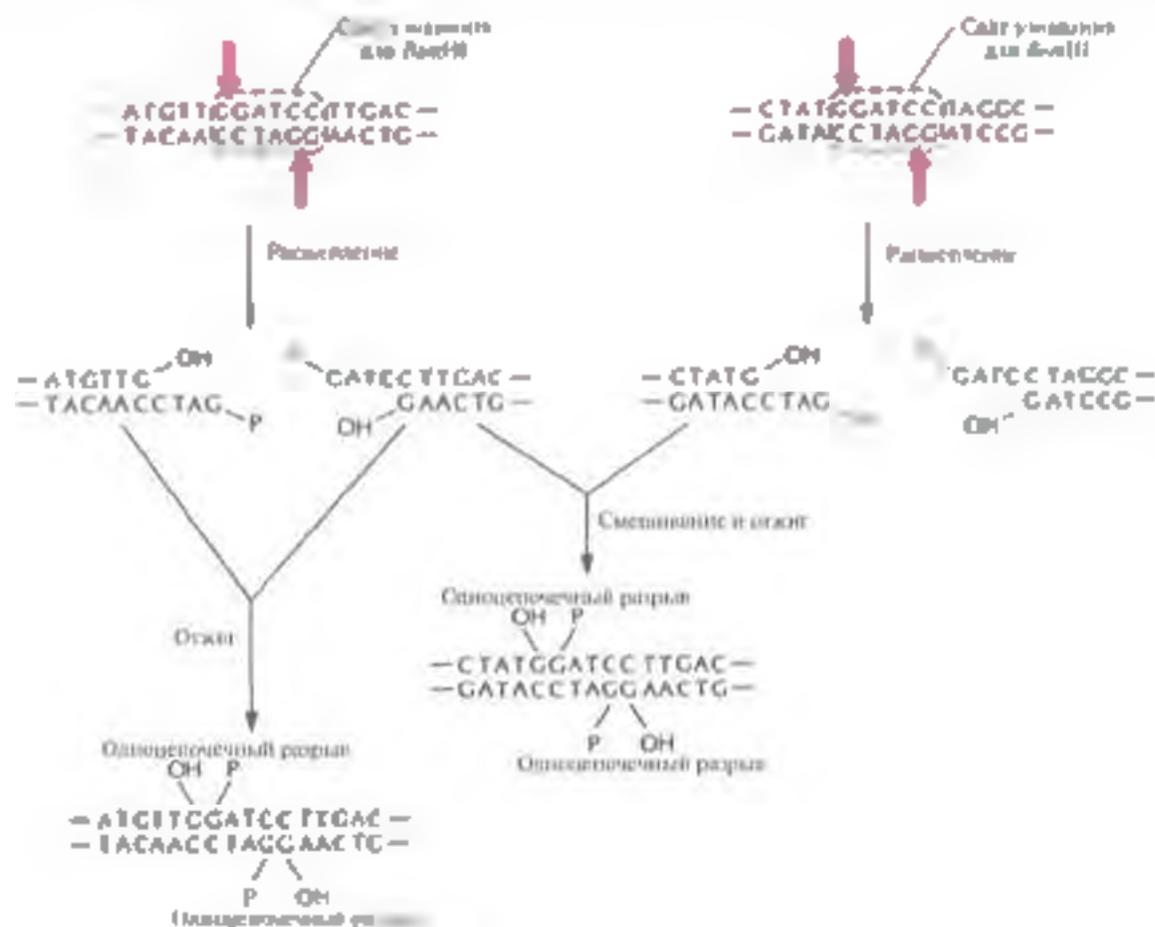


Рис. 4.5. Фрагменты ДНК с липкими концами, образующиеся при рестрикции с помощью ферментов, образующих липкие концы (фрагменты с липкими концами ДНК рестрицирующей энзимом класса III). Четыре фрагмента, представленные на рисунке, могут соединиться друг с другом с образованием шести разных молекул ДНК (но рисунки показывают не все возможные комбинации). Фрагменты удерживаются вместе водородными связями, образующимися между комплементарными базисами в концевых участках, но эти связи неустойчивы. Чтобы молекулы в растворе оставались связанными длительное время.

ненте раны молекулы ДНК само по себе бесполезны, 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. В третьих, при рестрикции ДНК образуется смесь разнообразных фрагментов, и после их лигиро-

вания с векторной ДНК образуется множество различных комбинаций. Несмотря на то, что реципиентные клетки, которые содержат ДНК с нужной нуклеотидной последовательностью. Для того чтобы узнать, какие системы скрининга.

### Плазмидные векторы

Плазмиды — это внехромосомные автономно реплицирующиеся двуцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Плазмиды есть практически у



ских маркеров для идентификации реципиентов 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 несущих букву, 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<sup>r</sup>) и тетрациклину (Tet<sup>r</sup>), а также уникальные сайты для *Bam*HI, *Hind*III и *Sal*I в гене Tet<sup>r</sup>, один сайт для *Pst*I в гене Amp<sup>r</sup>, 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, а другие бактериальные клетки переносятся с трудом.

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



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

обработать рестриктазой расщепляющей ее по единственному сайту, расположенному 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 вместе с образованием гибридных молекул. Далее смесь обрабатывают ДНК-лигазой фига T4 в присутствии 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 клонированную ДНК щелочной фосфатазой, отщепляющей от первичной молекулы 5 фосфатные группы. ДНК-лигаза не может сшить концы дефосфорилированной дивалентной плазмидной ДНК (рис. 4.8). Что касается собственно рекомбинантных молекул ДНК, то хотя они и входят вна односторонних разрывах, ее фрагменты удерживаются вместе двумя фосфодиэфирными связями, образовавшимися с помощью ДНК-лигазы между дефосфорилированными плазмидной ДНК и рестрицированной донорной ДНК (рис. 4.8). После репликации в трансформированной клетке односторонние разрывы устраняются системой репарации 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 (CaCl<sub>2</sub>). 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. И некоторых из них появляется бесосадиивавшаяся кольцевая плазмидная ДНК, избежавшая дефосфорилирования щелочной фосфатазой, в других — неспаз-

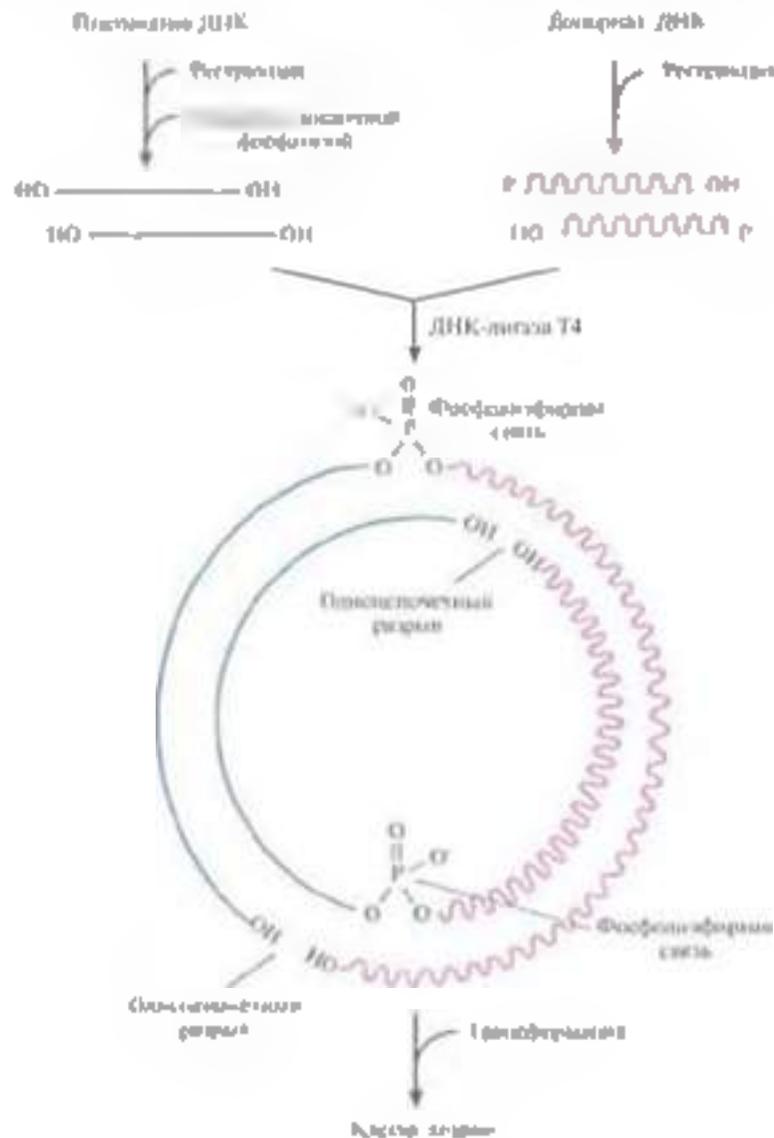


Рис. 4.8. Встраивание чужеродной ДНК в плазмидный вектор. Плазмидный ДНК «обрабатывают» в реакционной и фосфорилируют (фосфорилируют) липкие концы с рестрицированными донорной ДНК, соединяющей лизисной тем, и вводят ее ДНК-лигазу. Два из четырех одноцепочечных рядов при этом удаляются, и конструкция оказывается стабильной благодаря образовавшимся фосфодиэфирным связям. После введения гибридной ДНК в клетку-хозяина происходит ее репликация и образуются новые кольцевые молекулы уже без разрывов.

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

Как мы уже говорили, внеклеточность 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 «нажиться» 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 *RecA<sup>-</sup>* (такие клетки неспособны в области рекомбинации, так что хромосомы ДНК не будут идентифицироваться в результате гомологичной рекомбинации).

Этот способ наиболее 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<sup>r</sup>* — или в составе интактной плазмиды *pBR322*, или в составе гибридной плазмиды; не трансформированные клетки чувствительны к ампициллину. Сайт *Bam*III должен в гене *Tet<sup>r</sup>* 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<sup>r</sup>* 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 вырастающие на чашках с тетрациклином, чувствительны к этому антибиотику, 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<sup>r</sup>* и сайты *Pst*I и *Sal*I *Amp<sup>r</sup>* 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 среде 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 приходится 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  $\beta$ -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 торцовые регуляторные плазмиды *pBR322* (рис. 4.9).

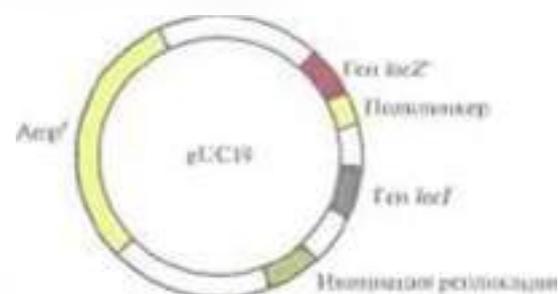


Рис. 4.9. Генетическая карта единичного вектора *pUC19*. Плазмиды состоят из 2686 пар нуклеотидов и содержат следующие сайты узнавания для *Eco*RI, *Sma*I, *Apa*I, *Xba*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Acl*I, *Sal*I, *Hind*III, *Acl*I, *Pst*I, *Bsp*RI, *Sph*I и *Hind*III (каждый из них в отдельности, ген устойчивости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



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

Следующий после создания библиотеки этап — это поиск клонов (клеток), несущего искомого последовательности 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 темом-мишенью.

### Скрининг с помощью гибридизации

Нулевую нуклеотидную последовательность в образце ДНК можно обнаружить с помощью ДНК-зонда, сформированного зондом с искомого 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

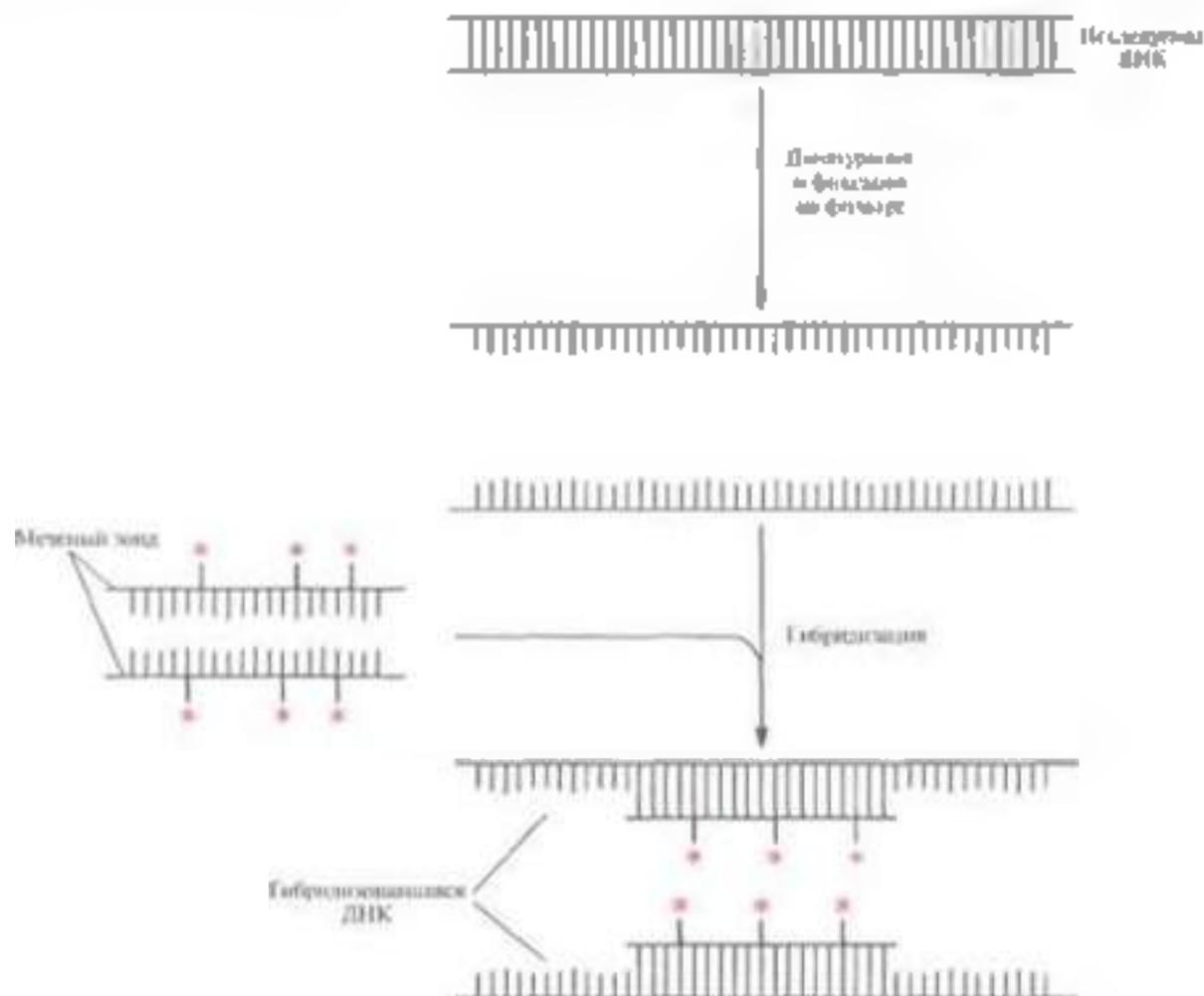


Рис. 4.11. ДНК-гибридизация (Исходный ДНК подвергается денатурации и фиксируется на твердой подложке, например на нитратной целлюлозе или нитроцеллюлозном фильтре. Меченый ДНК-зонд (обычно длиной от 100 до 1000 п. н.) затем денатурирует, адсорбируется на фильтр с исследуемой ДНК и вступает во взаимодействие с ДНК-зондом фильтра, привязываясь к нему. Если гибридизация между зондом и исследуемой ДНК не происходит, то меченый зонд на фильтре не обнаруживается. Метком на рисунке обозначена меченая эндонуклеаза.)

## ДОПОЛНЕНИЕ 4.2

## Радиоавтография

Этот метод широко применяется для поиска зон радиочувствительности в клетке. Через 24 часа на пластинке желатин электродиффузия смеси марганцосульфата. Для регистрации радиоавтографов (то есть засвеченный образ) на «чувствительную пластинку», в которую под действием радиоактивного излучения образуются металлические зеркала, соответствующие радиоавтографическим зонам, выявляются визуально после проявления пленки. Однако из вариантов радиоавтографии является флюорография. В этом случае в качестве экрана образки и экран-излучатель становится пленка радиоактивной пленки. Метод основан на том, что иньозитеррестрические вещества образуются при попадании ионизирующей радиации, взаимодействуя с фосфорными соединениями.

Этот метод радиоавтографии основан на регистрации радиоактивных зон, которые и регистрируются радиоавтографической пленкой, чувствительной к радиоактивной области клетки. Все изображения при радиоавтографии необходимо проявить в темноте, чтобы не засветить пленку.

С целью выявления зон радиочувствительности радиоавтография осуществляется с помощью радиоактивного ДНК-зонда после его гибридизации с матричной ДНК, нанесенной на электрофоретическую мембрану. К мембране, известной гибридной зонды в случае пленки иньозитеррестрические вещества не попадают в пленку. Поэтому ДНК-зонды маркируются по возможности иньозитеррестрическими изотопными флуорофорами (например, Саузерин-флуорофор) или с помощью люминесцентных веществ. Радиоавтографическая ДНК-зонда фиксируется в мембране с помощью специального раствора и после проявления на флуорофор ДНК-зонда

осуществляется флуорофором, а также иньозитеррестрическими с радиоактивными ДНК-зондами. Выбор иньозитеррестрических веществ осуществляется радиоавтографическим методом.

Перенос ДНК из зоны на флуорофор осуществляется Саузерин-блоттингом. Этот метод Саузерин-блоттинга основан на том, что ДНК-зонды, нанесенные на мембрану, переносятся на флуорофор с помощью РНК-зонда. Этот метод основан на переносе «переносимой» и «принимающей» — иньозитеррестрических зондов с одной стороны мембраны на другую сторону мембраны для зонда Саузерин (Southern blotting). Тем самым зонд как бы «переносится» на флуорофор (то есть мембрану переноса марганцосульфата, а также часть иньозитеррестрических веществ. Кроме того, как известно, что зонды имеют не только флуорофор, но и иньозитеррестрические вещества).

Если теперь медленно снизить температуру, то происходит иньозитеррестрическая (реассортация). При этом, если в растворе присутствует иньозитеррестрический ДНК-зонд, он будет реагировать с ДНК, специфически связываясь с комплементарными участками. В результате образуются гибридные ДНК, т. е. двуцепочечная молекула, цепи которой принадлежат двум разным ДНК.

Принцип ДНК-гибридизации состоит в следующем. ДНК-зонды (содержащие десатурацию и одноцепочечные молекулы) необратимо «привязываются» к мембране подложки (нитроцеллюлозной или поливинилхлоридной пленке). Это происходит обычно при высокой температуре. Затем флуорофор иньозитеррестрически с одноцепочечными ДНК-зондами, мечеными радиоактивными или другими метками. Если радиоактивные зонды взаимодействуют с ДНК-зондами на мембране, то происходит иньозитеррестрическая (т. е. гибридная) реакция (рис. 4.11). Гибридные молекулы можно

использовать для радиоавтографического (дополнение 4.2) или другим методом, позволяющим выявить метки. Если количественность зонда между зондом и ДНК-зондами отсутствует, то иньозитеррестрическая реакция не происходит, и мы получаем отрицательный результат. Обычно размер зонда варьирует от 100 до 1000 п. н. и более, хотя можно использовать как более крупные зонды, так и «малые» зонды меньшего размера. Для иньозитеррестрической реакции, т. е. для образования гибридных молекул, необходимо, чтобы их участки длиной 50 нуклеотидов совпадали более 80% по нуклеотидному составу от участка реакции.

Методы ДНК-зонды можно применять различными способами. Один из них, так называемый метод случайных примеров, основан на применении смеси синтетических олигонуклеотидов (случайных), содержащих все возможные комбинации из шести нуклеотидов. Невозможно из них комбинаций олигонуклеотидов выявить все возможные комбинации последовательностей ДНК-зонды.

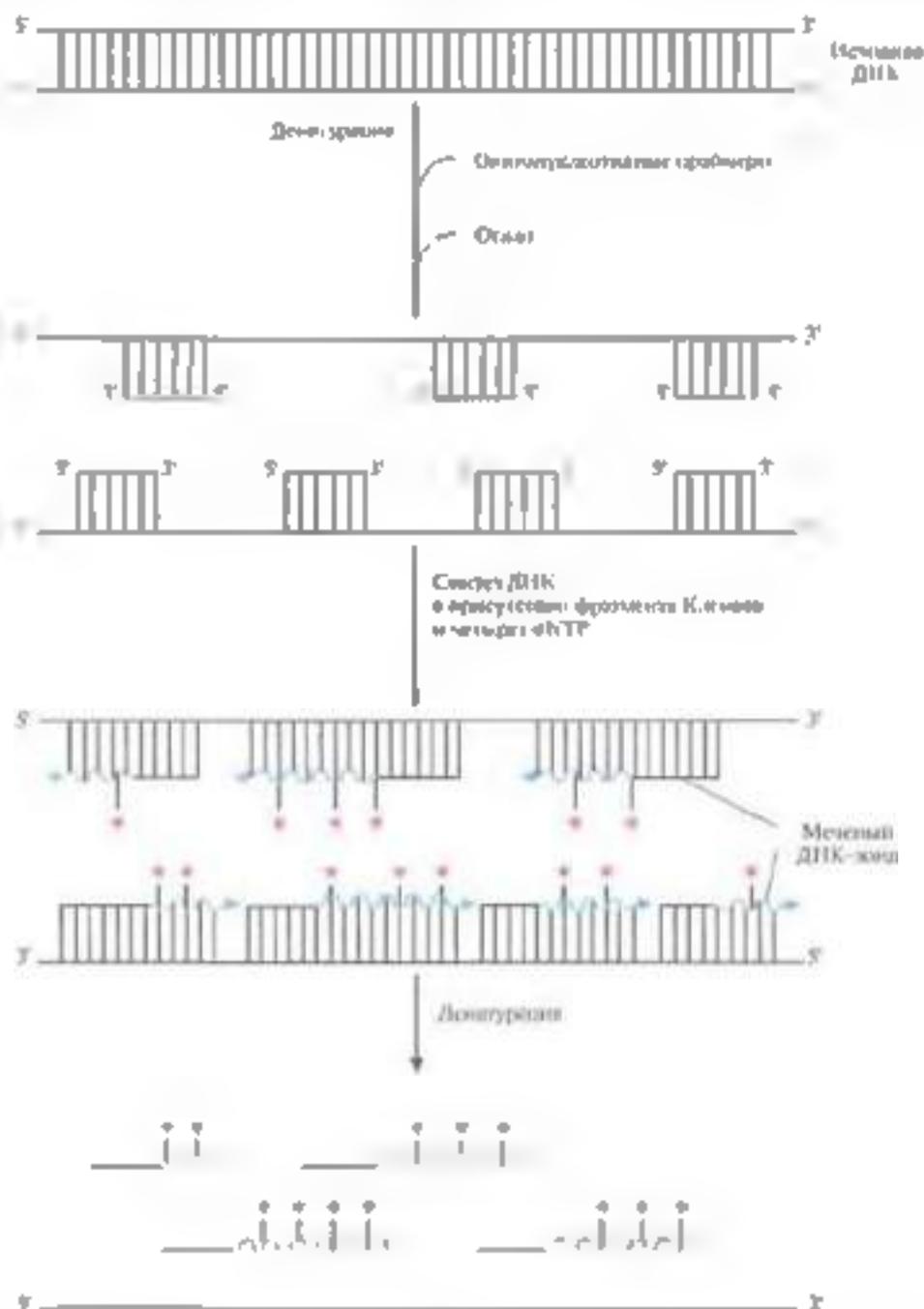


Рис. 4.12. Получение меченого ДНК-зонда методом случайных праймеров в активированной выщелоченной ДНК, содержащей глицерофосфатную расщепляемость, которую применяется в качестве зонда для выявления гексануклеотиды (смесь всех возможных комбинаций из шести нуклеотидов) и отщепляет часть. Некоторые из олигонуклеотидов гибридизуются 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 декарбонильные азотистые азиды (карбонильные азиды трифосфаты; 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 нерасшифрованные участки ДНК. Связанные цепи ДНК-азида служат матрицей для синтеза новых участков ДНК, а связанные с ними случайным образом слитую цепочку экстрагируют (рис. 4.12). При скрининге искомой метки цепи из dNTP содержат  $\alpha$ - $^{32}$ P, так что  $^{32}$ P-метки она выделится и сам хвост. Радиодетектируемую метку выявляют с помощью радиоавтографии.

Известно, что радиоактивные 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 центрированную 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 искомого 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 депрессинируют и денатурируют ДНК, фиксируют ДНК на подложке. Наносят на фильтр меченый зонд и проводят ожог, а затем радиоавтографию. Колонии на нижней чашке, которые содержат гибриды выделенной ДНК, выделены и культивируют (рис. 4.13). Поскольку большинство библиотек создается в результате численного гидрида, незначительный гибридационный сигнал может быть получен для нескольких колоний (клеток). Если необходимо определить, какой именно клон (если таковой имеется) кодирует искомым 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 вставил в плазмиду или в клонировать вставку велика и плазмид может содержать весь ген, провести ее секвенирование и убедиться в наличии старта- и стоп-кодона и полинуклеотидной нуклеотидной последовательности, кодирующей искомым белок.

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 искомого 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 прокаротинового гена (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-

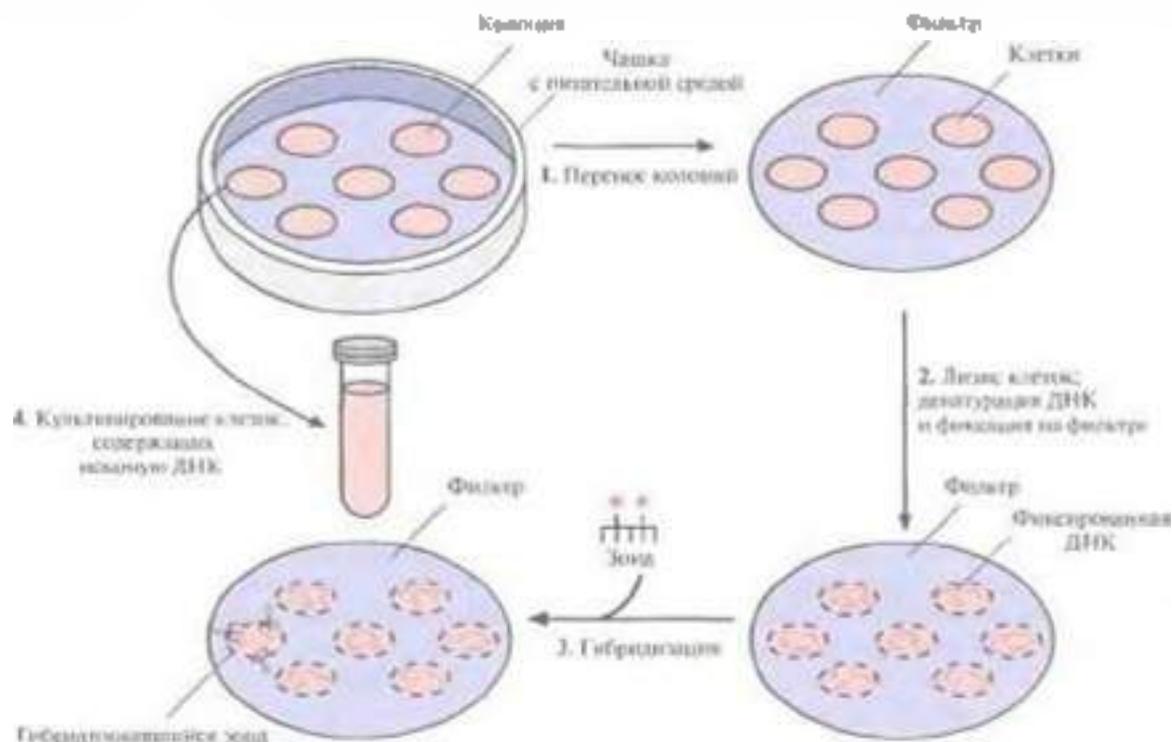


Рис. 4.13. Скрининг библиотек с помощью ДНК с применением меченой зонды. Клетки после трансформации высевают на твердую питательную среду, обеспечивающую рост только трансформированных клеток. После роста клеток из каждой выросшей колонии на твердую среду (агар) (используют, например, питательную среду или твердую среду) так, чтобы на рас подвелись соответствующую зондному ДНК чашку. 2. Клетки лизируют, высвобождают ДНК под действием денатурирующих и диспергирующих и фиксируют на фильтре. 3. На фильтр наносится меченый ДНК-зонд и проводится гибридизация. Смыслит с фильтра гибридные ДНК-зонды и проводят реакцию с зондом, чтобы определить, какие клетки содержат меченый ДНК-зонд. 4. Идентифицируют по чашке «зондом», содержащим меченый ДНК (показана реакция гибридизации зонда), гибриды и зонд зондом и суммируют.

с таким методом. Технически эта процедура имеет много общего с гибридизацией. Все клеточные ядра (клетки) библиотек высевают на чашку 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 соответствующего зонда, специфичного к антигену зонда. Во многих тест-системах используют конъюгаты зонда с ферментом, например с щелочной фосфатазой. После отмытия

фильтра добавляют бесцветный субстрат. Если зонды-антитела связываются с белками, то после 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 белковой продукта, указанного зондом. По окраске можно визуализировать скрининг зондовой библиотеки и библиотек определить, какой именно из отобранных клонов содержит полиморфный белок.

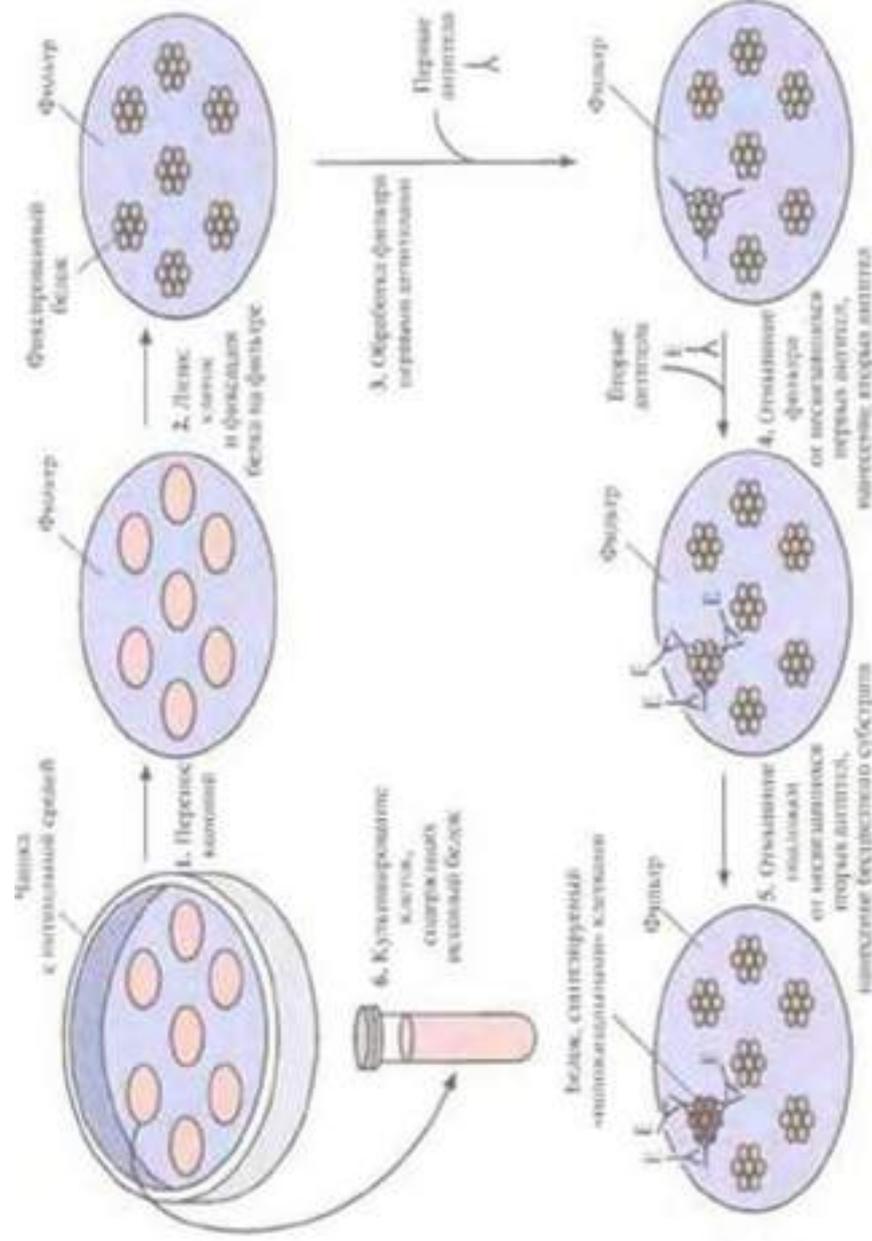


Рис. 4.14. Иммунохимический скрининг геномной библиотеки (иммунохимическое тестирование колоний). Клетки после трансформации высевают на твердую питательную среду, обеспечивающую рост только трансформированных клеток. 1. Переносит клетки из каждой выросшей колонии на твердую подложку (например, нитроцеллюлозный или нитробилый фильтр) так, чтобы на ростовом месте в точности соответствовало таковому на чашке. 2. Клетки подвергают лизису, белки фракционируют на фильтре. 3. Наносит на фильтр первые антитела, которые связываются только с искомым белком. 4. Несвязавшиеся первые антитела удаляют, наносит на фильтр вторые антитела, специфичные в отношении первых антител, связанные с ферментом (например, щелочной фосфатазой). 5. Связавшиеся с фильтром все несвязавшиеся вторые антитела и наносит на него бесцветный субстрат, при гидролизе которого образуется окрашенный продукт. Гидролиз может произойти только в присутствии вторых антител. 6. Обработкой колонии на чашке, соответствующим окрашенным пятнам на фильтре, и культивируют их. В них может содержаться рекомбинантная ДНК, кодирующая белок, гомологичный первым антителам.

**Скрининг по активности белка**

Метод гибридизации ДНК и иммуноцитохимические методы позволяют идентифицировать мутации гены и их продукты. Если при этом использовать коордирует фермент, не синтезируемый клеткой-хозяином, то для обнаружения клонов, содержащих искомый ген, можно использовать метод идентификации на чашках. Так были идентифици-

рованы гены, кодирующие ферменты, участвующие в синтезе пенициллина. Для этого использовали штамм *Penicillium chrysogenum*, в котором отсутствовал ген *penA*, кодирующий фермент, участвующий в синтезе пенициллина. После культивирования культуры на чашке с питательной средой, содержащей субстрат для синтеза пенициллина, штамм *penA* был идентифицирован по способности продуцировать пеницилин.

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, мутации в ответственных генах можно субстрат на минимальной среде, если ш-телазмы содержат функциональный искомым ген, инципий в клетку в составе плазмидного вектора. В разных вариантах этот подход используют для выделения мутантов вытанных генов, в частности исков, ответственных за синтез антибиотиков и образование аллеликсидирующей субстанции на корнях некоторых растений.

### Клонирование структурных генов эукариот

Для клонирования эукариотических структурных генов необходимы специальные методики. Прямичемы не способны удалять интроны на границах РНК-транскриптов, поэтому при ивннии транскрипции эукариотического мРНК в бактериальной клетке невозможно. Кроме того, матричная эукариотическая ДНК может существовать только при наличии прокариотической синциальной исследователюющей, регулирующая транскрипцию и трансляцию. Конечные участки эукариотических мРНК способны образовать модификации: из 5'-конца эукариотическая (содержит «кап» из остатка 5', часто метилированной), а 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 продуцируют через клетку, эволюционно приспособленную к стороне «принимать» короткие аденозинуклеотидные цепочки из полиаденилированных остатков длиной примерно 15 азотцев, oligo(dT). Poly(A) хвосты клеток мРНК спариваются с oligo(dT) и эукариотируются в комплексе, в котором мРНК и рРНК свободно протидят через нее. Затем комплекс протидают через буферный, в котором происходит разрыв полимерных связей между А и Т, и мРНК высвобождается.

Сразу мРНК цепочка встроится в ДНК-вектор, сцепляясь на ней необходимыми синтезируемая дупликационную ДНК. Для этого последовательно

используют для разных полимеризации: обратную транскрипцию и фрагмент Кленово ДНК полимеразы I (рис. 4.15). Вымате в реакционную смесь с «мешинной» мРНК добавляют короткие 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 Т, С, С или А, комплементарные А, Г, С или Т мРНК. In vivo синтез ДНК идет не до конца, при этом обратная транскриптаза перестает работать обычно «информационно» и протидает несколько нуклеотидов в обратном направлении (рис. 4.15), так что в результате образуется «гопильная».

В реакционную смесь добавляют фрагмент Кленово ДНК-полимеразы I (cob), который встроивается вторую цепь ДНК, используя первую цепь как матрицу. Он присоединяет дезоксирибонуклеотиды к растущей цепи, начиная с 3'-ОН-конца (облицы). Во вымачивании синтез протидает обрабатывают ферментом РНК год II, который разрушает молекулы мРНК, и нуклеотидом 5', отщепляя их от аденилированных концов ДНК. Полученный протидат представляет собой смесь частично и полностью дупликационную комплементарных ДНК-копии (кДНК) мРНК, протидатичерей в основном объеме.

Разные кДНК можно встроить в плазмидный вектор и выделить кДНК-библиотеку. Для скрининга кДНК-библиотеки с целью идентификации клонов, несущих специфические ивбридные гены, можно использовать метод гибризации или иммунологические методы. 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 встроении кДНК сохранится правильная рамка считывания и синтезируется правильная полипептидная цепь. Тем не менее все выделительные клоны, выделенные тем или иным методом, необходимо проверить дальнейшей протидой и идентифицировать те из них, ко-

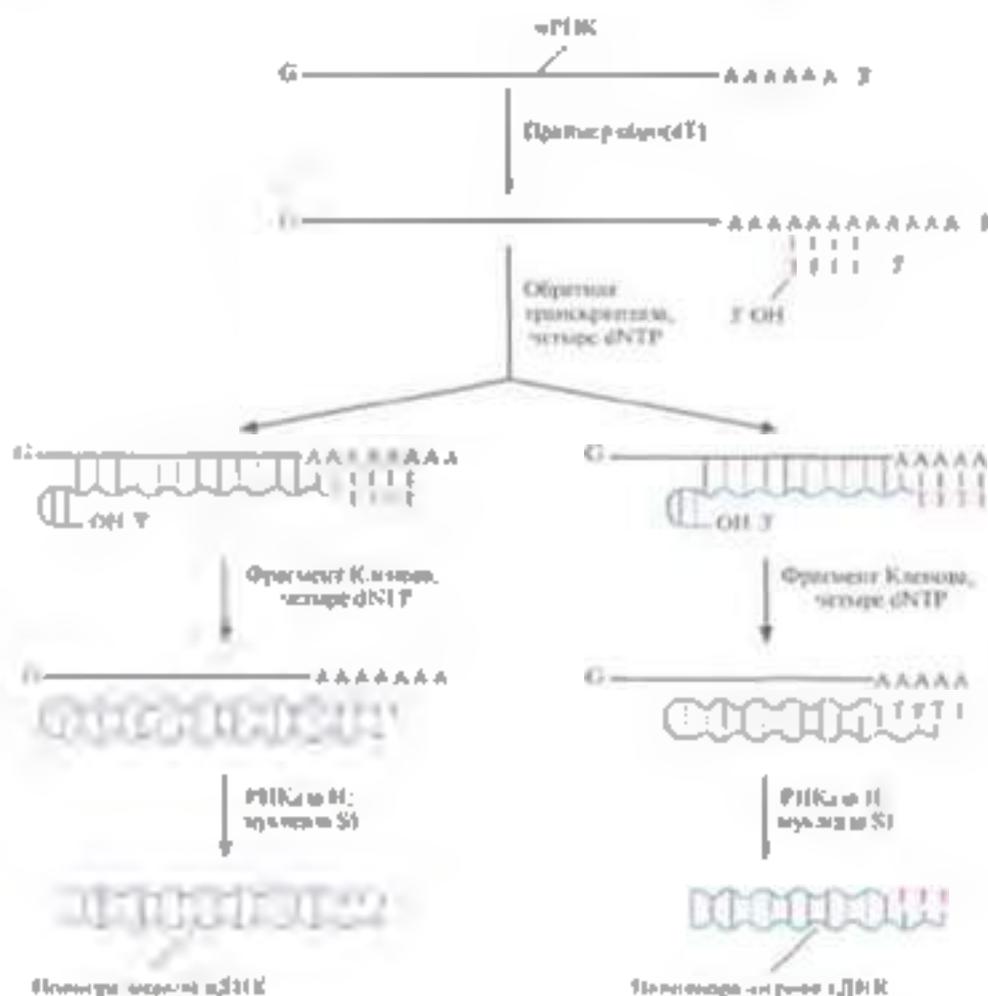


Рис. 4.15. Синтез cДНК. К препарату очищенной мРНК добавляем фермент обратн. транскриптазы. Для синтеза ДНК на РНК мы можем использовать фермент обратную транскриптазу и четыре dNTP. In vitro обратная транскрипция и так обеспечивает синтез полноразмерных cДНК, но они не все содержат и образуют не очень частые пары оснований со свободной 3'-ОН-группой. Эта группа инициирует синтез второй цепи ДНК при участии фермента Кнзев. После завершения синтеза молекулы мРНК гидролизует РНКазой H, cДНК образуются куцезломи S1 в результате чего образуются линейные молекулы ДНК с тупыми концами без штифта.

терие могут полиморфизму и нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-мишень.

### Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК

#### Векторы на основе бактериофага $\lambda$

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  $\lambda$   $\phi$ 104.

После провозникновения фага  $\lambda$  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 фаговым

ДНК включается в хромосому *E. coli* как профет и реиницируется в клетке вместе с хроматидными бактериальными генами (состояние лизогенности). Однако при недостатке питательных веществ или иных неблагоприятных обстоятельствах интегрированный фagosом ДНК высвобождается, и запускается личиночный цикл развития. Размер ДНК фaга  $\lambda$  составляет примерно 50 т. п. н., причем значительная ее часть (около 30 т. п. н.) недоступна для реинициации фaга и отвечает за его взаимодействие с хостовской ДНК. В связи с этим можно сказать, что ее можно считать фрагментом (пути) ДНК «хозяинского» генома. Образуясь в результате рекомбинации вирусная будет реиницироваться в клетке как ДНК «рекомбинантного» фaга  $\lambda$ , «вставленного» на личиночный путь развития.

Чтобы понять, как функционирует пекторная система на основе фaга  $\lambda$ , необходимо рассмотреть молекулярные аспекты лизогенного цикла развития. Инфекционная фagosомная часть имеет структуру, в которой заключена линейно упакованная ДНК длиной примерно 50 т. п. н., и отросток с отходящими от него (такими же белковыми цепями (фибриллами). Связка головки и отростка и упаковка ДНК четко сфокусированы. ДНК фaга  $\lambda$  — это линейная двуцепочечная молекула длиной 50 т. п. н. с адипеточными 5'-концами — из 12 нуклеотидов. Их взаимодействие (связка) взаимно комплементарны и могут скручиваться друг с другом. После того как фagosомная ДНК проходит через отросток и попадает в *E. coli*, ее концы соединяются с образующимся кольцевой молекулой. На раннем этапе лизогенного цикла в результате разрывания 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 белковую головку, а последним присоединяется уже сформированный отросток и образуется новая фagosомная частица (рис. 4.16, Б). При упаковке молекулы ДНК длиной менее 18 т. п. н. образуется неинфекционная фagosомная частица, а фрагменты длиной более 32 т. п. н. ее увеличивают и головку. Сегменты длиной 50 т. п. н. в линейной молекуле ДНК разделяются сдвигами, и именно во этих сдвигах располагается молекула, когда очередной сегмент упаковывается в головку. Разрешение осуществляет фермент, называемый у южков в головку.

В результате исследований по изучению сборки фaга  $\lambda$  были разработаны системы упаковки молекул ДНК *in vitro* с образующимся инфекционной фagosомной частью. Сметав в пробирке очищенные пустые головки, фagosомную ДНК и сформированные отростки, можно получить инфекционные фagosомные частицы.

Один из множества  $\lambda$ -векторов для клонирования имеет два *Bam*HI-сайты, фланжирующие участок длиной 20 т. п. н. При гидролизе очищенной фagosомной ДНК рестриктазой *Bam*HI образует-

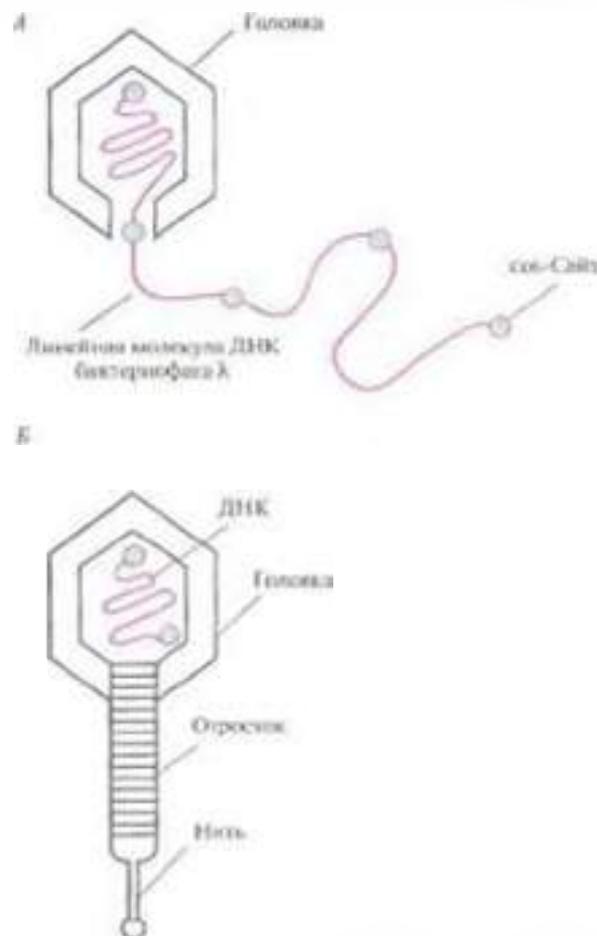


Рис. 4.16. Лизогенный путь развития бактериофaга  $\lambda$ . А) При репликации кольцевой ДНК бактериофaга  $\lambda$  образуется линейная молекула, состоящая из нескольких сегментов длиной примерно 50 т. п. н. Каждый из этих сегментов представляет собой упакованную фagosомную ДНК. Б) Фagosомная головка увеличивает один из сегментов, и тем самым присоединяется уже сформированный отросток.

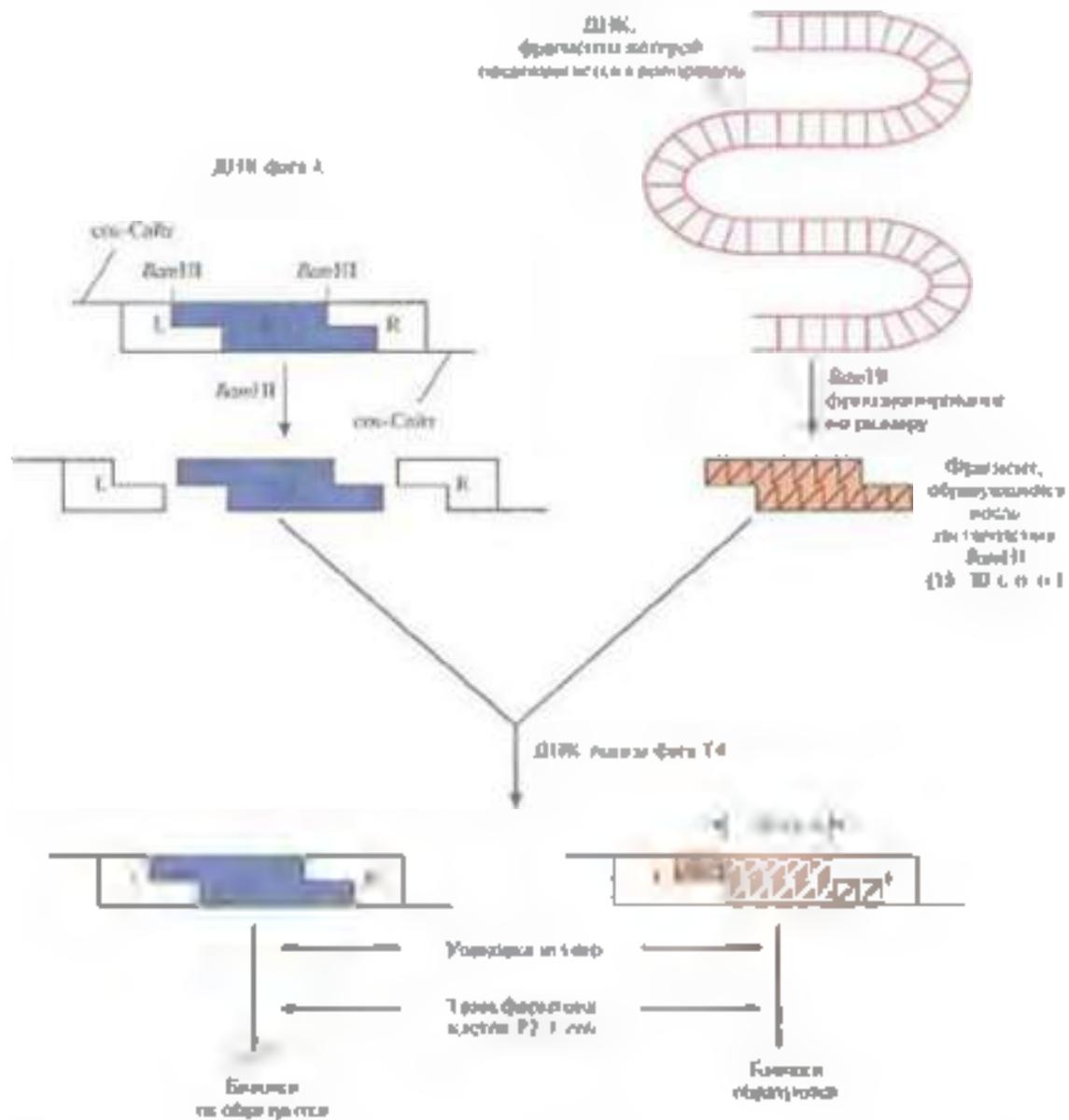


Рис. 4.17. Клонированная система на основе вектора-фрагмента *Bam*HI-сайта. Фрагмент ДНК имеет два *Bam*HI-сайта. Фрагменты *Not*I/В-сайта. Клонированная ДНК расщепляется с помощью *Bam*HI, фрагменты могут быть получены по размеру и выделены из них, которые имеют размер от 15 до 20 г, и в Фрагмент ДНК обрабатывают теми же ферментами. Оба фрагмента ДНК смешивают и обрабатывают ДНК той же фазы T4. Ламинарная смесь содержит самые разные комбинации ДНК, в том числе 1) носительной ДНК фазы  $\lambda$  и 2) рекомбинантные молекулы, содержащие R- и I-область фрагмента ДНК вставки клонированной ДНК размером 20 г, и. выделены из этой области I/G-фрагмента. Рекомбинантные молекулы укладываются в колонии *E. coli* (рис. 4.18), и после добавления стрептомицина получают трансформированные клетки. В инфицированных рекомбинантных фагах клеток *E. coli*, в процессе которого интегрируются ДНК бактериофага T2, могут быть получены и обработаны инфекционными частями только молекулы ДНК, состоящие из R- и I-областей фрагмента ДНК и клонированной вставки размером 20 г и.

ся три фрагмента. Левый извлеченный левое плечо (область I) содержит (энергетическую) информацию о головке и отростке флага, правое плечо (область II) несет репликационную ДНК и доминирующую систему инициации, ответственные за процессы инициации и репликации (система I/E, от лат. *initiation/replication*). Задача исследователя состоит в том, чтобы выделить этот центральный участок нуклеотидной последовательности для (или примерно 20 к. п. н. (рис. 4.17) нулевой ДНК. ДНК, предельно пригодная для амплификации, также взаимодействует с полимеразой *DamIII* и выделяются фрагменты размером от 15 до 20 к. п. н. Обычные свертывающиеся чужеродные ДНК объединяются 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 фagosомы. Фрагменты большего (>52 к. п. н.) или меньшего (<38 к. п. н.) диаметра упаковываются не могут. Реконструкция флага  $\lambda$  может выполняться только в тех случаях *E. coli*, которые обеспечивают равновесие флага  $\lambda$  с интактной областью I/E. Для создания реконструктивной флага  $\lambda$  его первоначально пересекают на стадии культуры *E. coli*.

Для скрининга библиотек на основе флага  $\lambda$  можно использовать ДНК-зонды или иммунологические методы. Зонды делятся (блишки) переносит на фильтр и соответствующим образом тестируют. Если используется ДНК-библиотека, то выщелачивают фagosомы, затем ДНК денатурируют и фиксируют на фильтре. При тестировании иммунологическими методами белки, кодируемые клонированными генами

переносит и фиксируют на фильтре вместе с блишкой. Соответственно зонды на фильтре, зонды (неподвижные) реакции с блишкой на исходной чашке, отбирают положительные блишки и проводят субкультивирование. Субкультуры служат источником реконструктивных бактериофагов, которые можно по отдельности культивировать в *E. coli*.

### Космиды

Векторы, называемые космидами, могут вмещать 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  $\lambda$ . Например, широко применяемая космида *phi105* (приблизительно 6 к. п. н.) имеет два суб-сайта флага  $\lambda$ , инделетная ленточная рестриктаза для *NotI*, полимераз с высокой специфичностью сайтам рестрикции (*HindIII*, *PstI*, *SalI*, *BamIII*, *XbaI* и *EcoRI*), точку начала репликации ДНК (*ori*) и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet<sup>r</sup>*). 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 сдвиги от продуктов частичного гидролиза донорной ДНК рестриктазой *BamIII* (рис. 4.18), а *phi105* с помощью полимеразы 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  $\lambda$ . Реконструированные комплексы *phi105*,

Рис. 4.18. Клонирование с помощью космидного вектора. Космида имеет точку начала репликации (*ori*), специфичный ее существующие в *E. coli* в виде плазмиды; две интактные коп. (неделенные) уникальные сайты для *NotI*. *BamIII* сайт вблизки одного из суб-сайтов и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet<sup>r</sup>*) ДНК, которую хотят в клонировать, рестриктазой *BamIII* и фракционируют по размеру, чтобы выделить молекулы длиной примерно 40 к. п. н. Пригодную ДНК рестриктазой *NotI* и *BamIII*. Если прелазная ДНК смешивают и амплицируют ДНК ленточку флага T4. Небольшие не гибридные молекулы, образующиеся при амплификации, 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 бактериофага  $\lambda$ , затем в головку прикрепляется отросток, и образуются инфекционные частицы. При инфицировании латентный флага  $\lambda$  в бактериофагической клетке способность лигировать молекулы ДНК с суб-сайтами, которые сворачиваются при с другими ДНК ленточку флага  $\lambda$  в головку формирует одноцепочечное рибонуклеопротеидное комплекс молекула ДНК сворачивается в головку, формируя рибонуклеопротеидный комплекс. Трансформированные клетки можно идентифицировать по 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 pLTR-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  $\lambda$ .

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  $\lambda$ -клонов и потребуются меньше времени 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 ограничений, 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 pUC. Эта конструкция

для возможности бактериальной искусственной дрожью (FAS, от англ. *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  $\text{CaCl}_2$ , а затем выдерживают при 42 °C в течение 1,5 мин. По-видимому, в результате такой обработки происходит локальное нарушение клеточной стенки. Этот метод дает максимальную частоту трансформации, примерно  $10^7$ , т. е. на микрограмм (100) ДНК приходится один трансформированный. Инфекциозность трансформации, которая определяется как число трансформантов на 1 мкг добавленной ДНК, составляет примерно  $10^7$ – $10^8$ . 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. Хотя 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 электропорацией. 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 вставки 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 электропорации 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 общих 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 немобилизационную 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 непрерывно длительное 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 избежать, 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 имеется 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-

для анализа удается выделить (клонировать) фрагменты ДНК, содержащие специфические гены. Успех клонирования зависит от уникальности векторной системы (размера молекулы ДНК на фрагменты определенной длины). Для точного расщепления ДНК используют рестрицирующие нуклеазы типа II. Эти ферменты имеют специфические нуклеотидные последовательности и симметрично разрезают фосфолипидные связи в кластерной цепи.

Типичный эксперимент по клонированию генов включает следующие этапы: 1) Рестриктазное расщепление ДНК, выделенной из организма, который содержит искомого гена. 2) Обработка вектора для клонирования (обычно плазмидного), который может ретрансформироваться в клетке-хозяина, теми же рестриктазами, которыми использовались для расщепления донорной ДНК. 3) Соединение 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 нидрированную 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-генетическую резистентность; 2) иммунологические тесты или выявление специфического белка — продукта клонированного гена; 3) гибридизацию с зондами, комплементарными какому-либо участку искомого гена.

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

Для получения фрагментов ДНК, интегрированных нуклеотидически в хромосому, используют как на матрице синтетическую комплементарную цепь

ДНК с помощью обратной транскриптазы, так цепь и свою очередь получают 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 предельно простой питательный структурный ген.

## 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. Brunell (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. *Adv. Genet.* 6: 84-89.
- Kim U.-J., B. W. Peterson, I. Niyagal, Y. Minamoto, C. Boyer, H.-L. Kang, M. T. Shih, 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. Ober, 1993 Construction of  $\lambda$  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 нуклеозиды рестрикции типа II и почему они так важны для создания рекомбинантных ДНК?
2. При обработке кольцевой двуцепочечной плазмиды pCEC1 различными рестриктазами в заданных количествах получатся следующие фрагменты (примеры указаны в зарекультивации): *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 pCEC1.
3. Опишите применение плазмиды pNH22 в качестве вектора. Какими особенностями она обладает?
4. Опишите основные свойства системы клонирования pUC.
5. Объясните, как клон создан интегрированным плазмидным вектором, подвергнутому исчерпывающему гидролизу с помощью *BamHI*, с хромосомной ДНК, частично гидролизованной рестриктазой *Sau3AI*.
  - 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 часто обрабатывают щелочной 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 возможно 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, позволяющей 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 линкеров, облегчающих 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 осуществляются последовательные в одной реакционной камере, 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-гидроксильной группы, в другой группе дезоксирибозы – гидроксильной. Таким образом, отсутствует аминогруппа, 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 дитерминационную группу, присоединенную к 3'-фосфитной группе, которая в

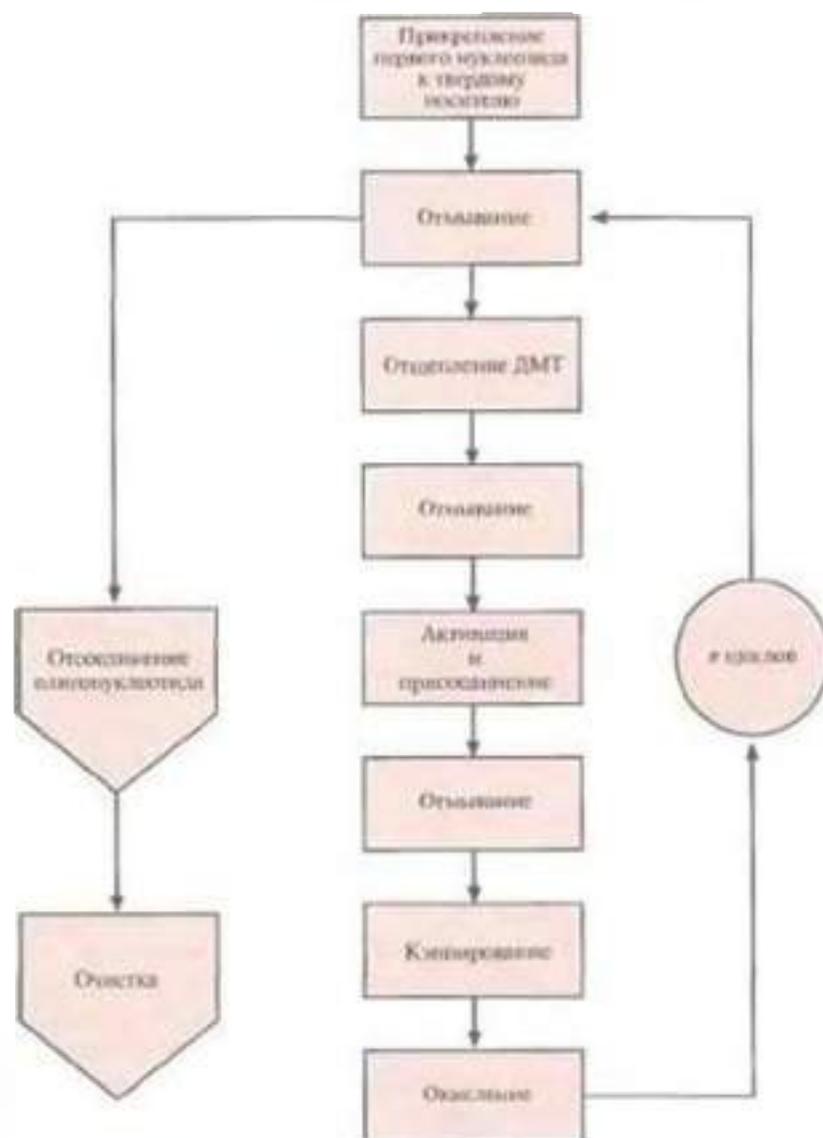


Рис. 5.1. Химический синтез олигонуклеотида. После каждого этапа образуется олигонуклеотидный фрагмент ДНК на  $n + 1$  нуклеотиде.

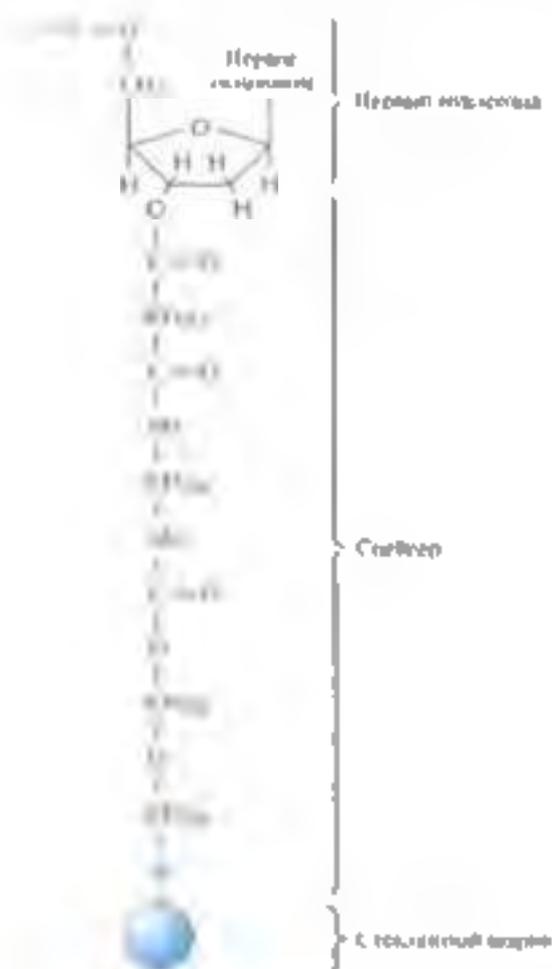


Рис. 5.2. Комплекс, в котором находится активный центр цепи ДНК в 5'-гидроксильной группе. Взаимодействие нуклеотида присоединяется динуклеотидом (ДНТ) (рис. 5.3) в гидроксильной группе — сахарная молекула. Последняя в свою очередь связана с первым нуклеотидом (нуклеотидным шариком)

своей очередь защищена метильным остатком (рис. 5.3). Такая молекулярная конфигурация и называется фосфорамидит.

Цепь начинается после присоединения первого нуклеотида в стебельному шару. Для ее концы обычно формируют как минимум безвредным разделителем (например, ацетиламин), чтобы удалить воду и другие нуклеофильные вещества, и производят через нес арсен для вытеснения динуклеотида. Затем с помощью трифос-

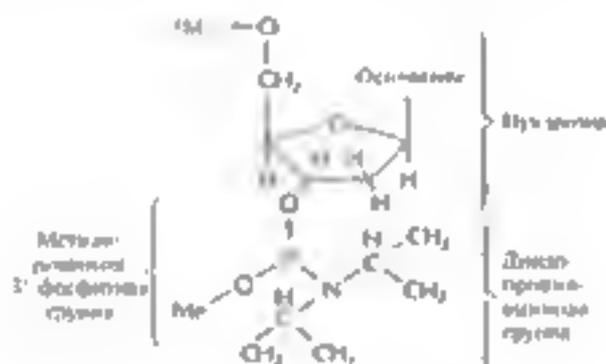


Рис. 5.3. Структурная формула фосфорамидита. Такие производные всех четырех оснований - А, Т, С и Г - используются для синтеза цепи ДНК. ДНТ динуклеотидом. Me метильная группа

фосфорной кислоты (ТФУ) специфично 5'-ДНТ (ацетиламинирование) и присоединяемого 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 динуклеотидов таким образом, чтобы на первом этапе в концы одновременно взаимодействуют нуклеотида (в виде функции) и тетрафос (активация и присоединение). Тетрафос активирует фосфорамидит, так что 3'-фосфинат группа образует комплексную связь с 5'-гидроксильной группой первого нуклеотида (рис. 5.5). Непосредственно фосфорамидит и тетрафос удаляют производимых арсени.

После того как окончили первый этап не все фосфорамидиты на нуклеотиды образуются связанными с фосфорамидитом, необходимо преобразовать их в нуклеотиды, добавленным на втором этапе. Для этого перереагировать 5'-гидроксильную группу активируют с помощью искусственной динуклеотида и динуклеотидом (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.

Фосфинаттрифосфатная 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)

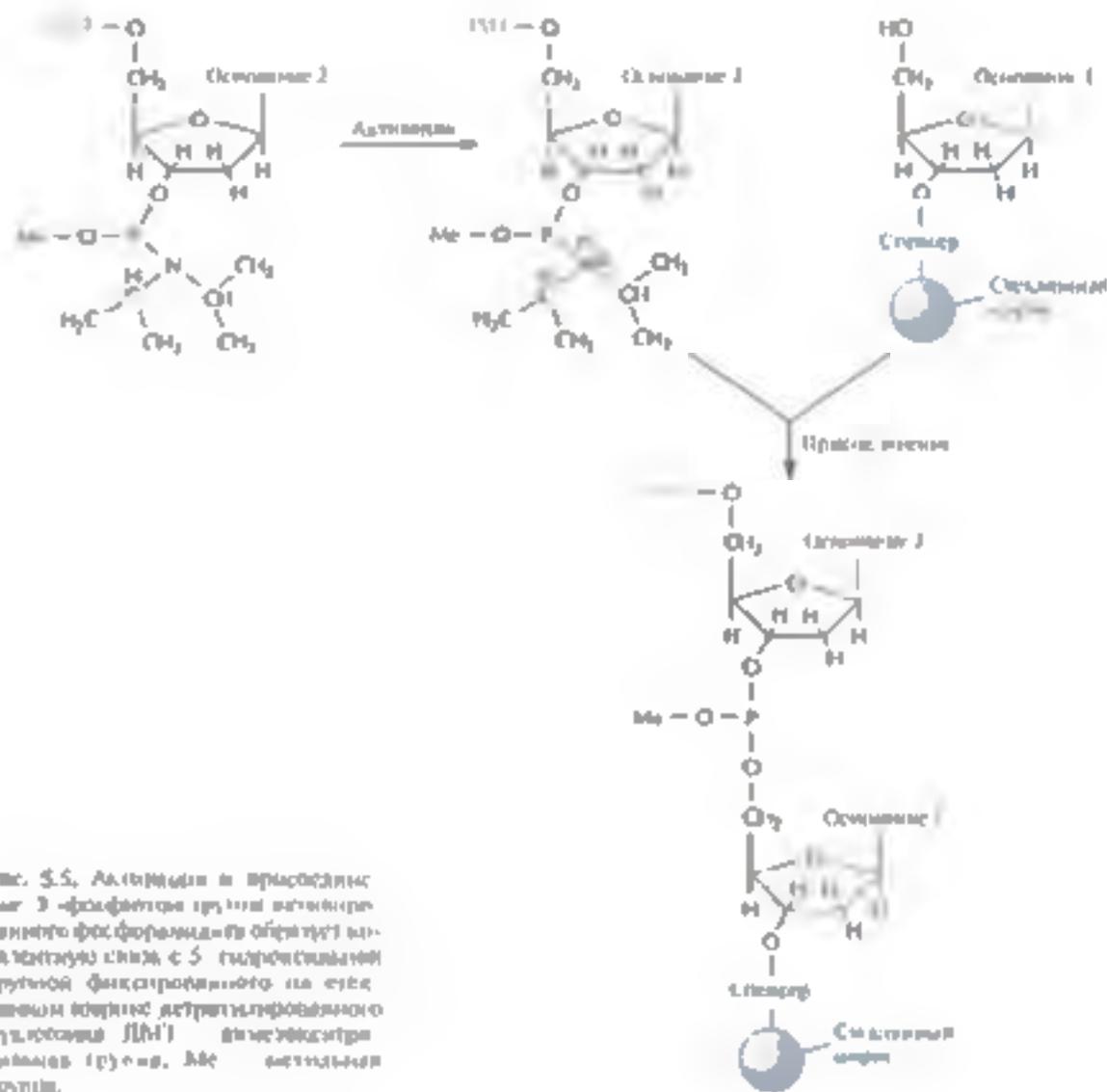
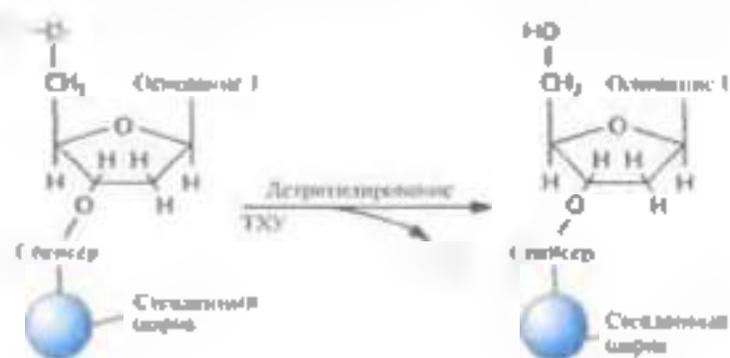


Рис. 9.5 Активация и встраивание 3'-фосфатной группы нуклеотидом фосфоридифосфатом (ДФФ) в цепь ДНК с 5'-трифосфорильной группой фиксированного на еще одном скелете дестритилированного нуклеотида (ДН) амплитифицируемых (р)ДНК метильных групп.

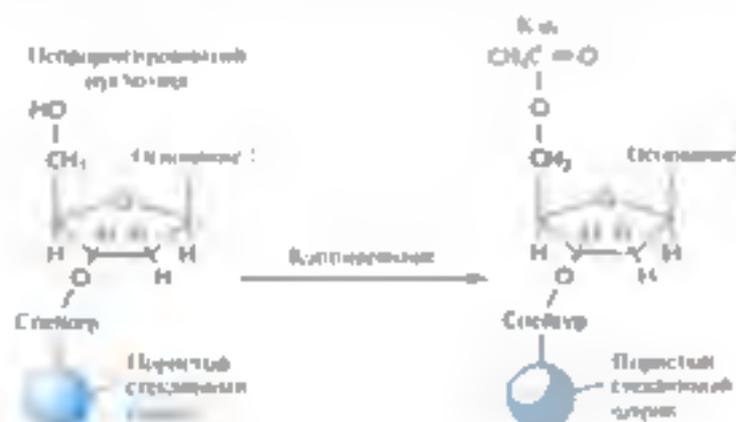


Рис. 5.6 Кэпирование. Свободные 5-гидроксильные группы нуклеотировавших в стрептомицине ацетилируемых нуклеотидов ацетилюют, чтобы предотвратить их участие в следующем цикле.

лочи или щелочи. Поэтому фосфаттриэфир окисляют с помощью иодной смеси во более стабильного пятивалентного фосфаттриэфира (рис. 5.7). Этим приемом исключают и предотвращают весь цикл (детриптеринация, активация и приосаждение, 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 олигонуклеотидные цепи на стеклянном шарике; каждый фосфаттриэфир несет метильную группу, метильная группа,

напротив, в цепи содержится 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 фермициллиновым (пшениц)карбициллином (Т4+АТТ) или химиче-

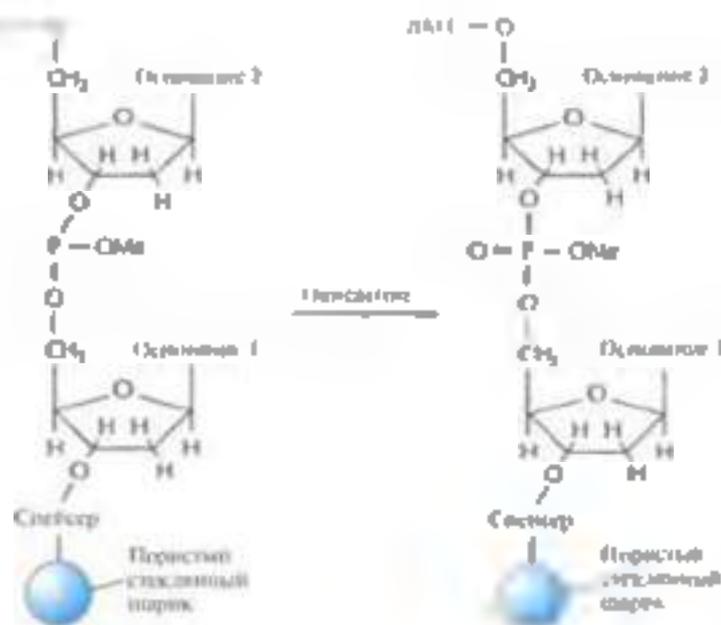


Рис. 5.7 Окисление. Фосфаттриэфир окисляется во пятивалентного фосфаттриэфира. Это предотвращает спейсеризацию фосфорилирующей цепи и делает ее более устойчивой к действию кислот и щелочей. ДМТ - ацетиловосстановительная группа, Me - метильная группа.

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

Чтобы выход продукта был достаточно высоким, эффективность присоединения нуклеотида под каждым шагом должна быть не ниже 98%. Эффективности контролируют спектрофотометрическими методами, измеряя количество удаляемых трифосфатных групп. Если, например, при синтезе 20-мерного олигонуклеотида эффективность каждого шага равна 99%, то 82% (т. е.  $0,99^{20} \cdot 100$ ) олигонуклеотидов будут иметь именно такую длину. Если же синтезируются 60-мерный олигонуклеотид, то при той же эффективности только 45% олигонуклеотидов будут содержать по 60 нуклеотидов. А если средняя эффективность шагов 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 методики очень высокой степени чистоты, что не всегда удается реализовать. 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 нежелательные 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 шагов

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

*При целенаправленном синтезе олигонуклеотидов*

Олигонуклеотиды, синтезированные различными методами, находят широкое применение в молекулярной биотехнологии. Их используют в качестве зондов при ДНК-гибридизации, лигиерно, соединивших разные молекулы ДНК в экспериментах по клонированию, например при секвенировании ДНК или осуществления сайта-специфической мутагенеза клонированных генов-мишеней.

1. Нуклеотидную последовательность специфически олигонуклеотидных зондов (длиной 20-40 нуклеотидов) используют для зондирования последовательности сайтов-мишеней белков.
2. Для получения лигированных олигомеров, которые представляют собой различные олионуклеотидные последовательности, старинной методикой (гибридизация) между собой. Лигиеры содержат сайты узнавания для рестрицирующих эндонуклеаз, что позволяет осуществлять с их помощью клонирование фрагментов 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 одноцепочечными концами (липкими концами), с помощью которых остранивают ДНК-мишень в соответствующий вектор. Прежде чем проводить остранивание, рестрицированную смесь фракционируют для отсеивания ДНК с липкими концами от длинных мономерных молекул. Вектор тоже обработывают рестриктазой, отщипывают его с фрагментами ДНК с липкими 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. Олиго- или полинуклеотидные последовательности, так называемые «адаптеры», час

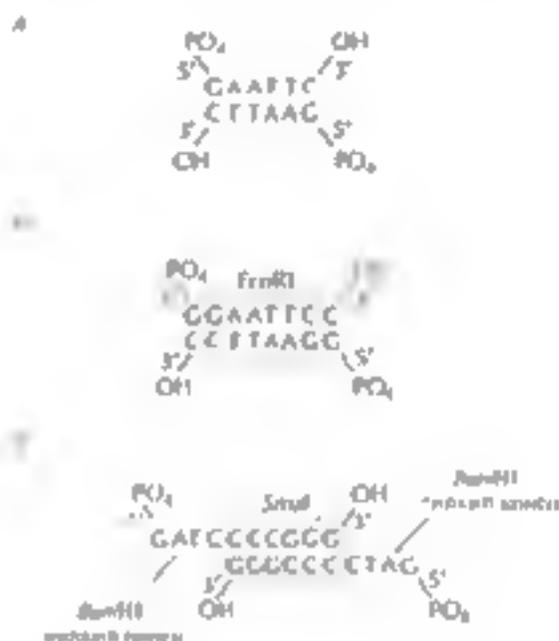


Рис. 5.8. Типовые сайты рестриктаз. *A. EcoRI* сайт рестриктазы на 6 пар нуклеотидов. *B. KpnI* сайт на 6 пар нуклеотидов. *C. BamHI SmaI* сайты с 4 парами выщипов и сайтом ущипывания для *SmaI*.

то содержит сайты для двух и более рестриктаз (рис. 5.9). С их помощью можно встраивать κДНК в вектор выщипываемым на турых концами, а затем пыршить, используя другую рестриктазу. Альтернативой, изображенной на рис. 5.8, *B*, являются сайты *BamHI* и *SmaI* сайта перед выщипыванием ДНК-вставки в *SmaI*-сайт на турых концами. После клонирования κДНК выщипывают 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 олионуклеотиды из 17–24 нуклеотидов используют в качестве примеров при секвенировании ДНК и представлении ПЦР.
2. Одноцепочечные олионуклеотиды 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-хозяевами, 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 копии считаются хозяевами более эффективными.

### Синтез генов

Если химический синтез проводить двухцепочечную ДНК предлагается использовать в качестве гена или субфрагмента, 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.) предпочтительнее 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 олионуклеотидных ДНК 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 олионуклеотидов длиной 20–60 нуклеотидов каждой с трехкратным избытком в кончиках. Нуклеотидные последовательности цепей делают так, чтобы после отщипывания концевых сегментов гена имели турые концы. Каждый искусственный сегмент имеет выступающие 3'- и 5'-концы, комплементарные соседнему сегменту (рис. 5.9). После сборки гена остается только ол-

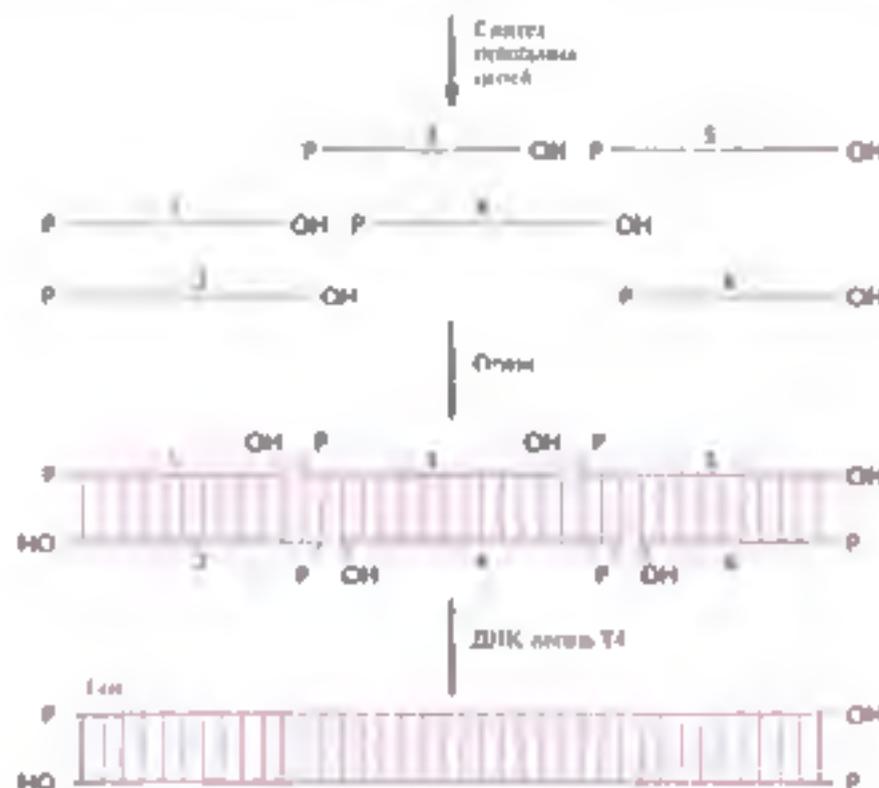


Рис. 5.9. 4 форма синтетически гена из олигонуклеотидов. Синтезируют короткие олигонуклеотиды длиной от 20 до 40 нуклеотидов с известной нуклеотидной последовательностью, чтобы при отщеплении образовалась двуцепочечная молекула. Остаются одноцепочечные разрывы, связывают с помощью ДНК-матрицы T4.

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

Для получения клонированных генов другим способом тоже обычно синтезируют специфический набор перекрывающихся олигонуклеотидов длиной от 40 до 100 нуклеотидов. При их отщеплении происходит спаривание 6' (3'- и 5' концевых концы комплементарных нуклеотидов, а между ними остаются флагины бреши. Протяженность спаренных участков достаточно велика,

чтобы стабилизировать всю структуру. Брешки заполняют ферментативным путем с помощью ДНК-матрицы *Escherichia coli*, используя 3'-нуклеотидные группы для инициации репликации и одноцепочечные участки в качестве матрицы. Остающиеся одноцепочечные разрывы связывают с помощью ДНК-матрицы 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,

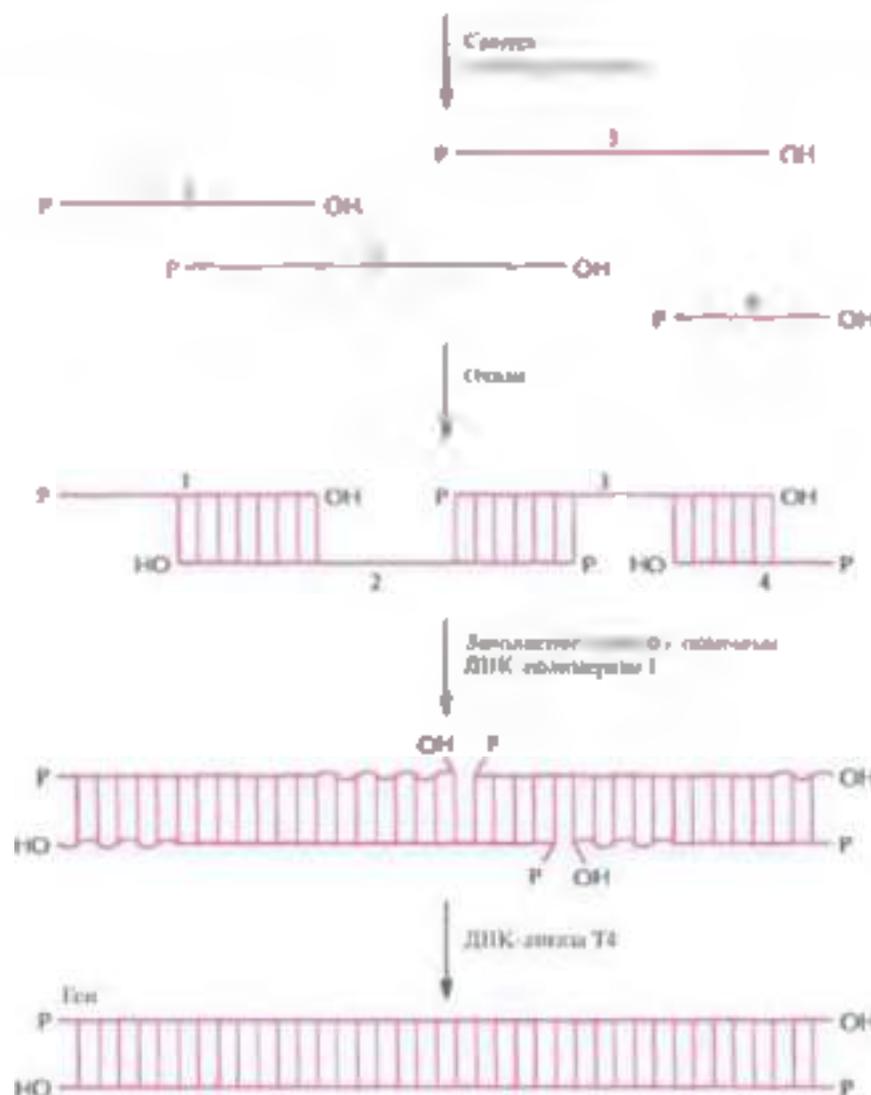


Рис. 5.10. Сборка синтетического гена *in vitro* с участием ферментов. Вначале линейными методами синтезируют отдельные олигонуклеотиды с заданной нуклеотидной последовательностью, чтобы при встрече между ними образовывались спаренные участки длиной 6-10 пар нуклеотидов. Оставшиеся между ними фрагменты олигонуклеотидов с активными ДНК-полимеразы I (3) (об), а олигонуклеотидные фрагменты олигонуклеотидов ДНК-лигазы T4.

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

### Методы секвенирования ДНК

Исторически самым информативным методом получения, вплоть до недавнего времени, 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 генов или иного фрагмента ДНК можно провести либо химическим методом, разработанным А. Максамом и В. Гилбертом, либо ферментативным, предложенным Ф. Сэнгером, но и



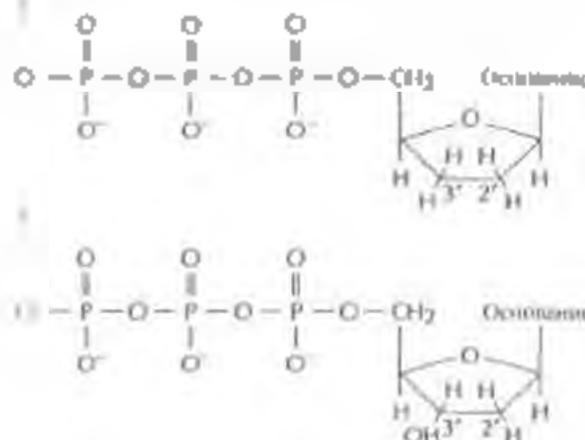


Рис. 3.11. а) Дезоксирибонуклеотид (отсутствуют 2- и 3'-гидроксильные группы в кольце). б) Рибонуклеотид (присутствует только 2-гидроксильная группа)

не посвященного нуклеотида растущей цепи (рис. 3.12). И если таким очередным присоединяемым звеном является диоксирибонуклеотид, 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 диоксирибонуклеотидов (ddATP, ddCTP, ddGTP или ddTTP). Концентрацию каждого диоксирибонуклеотида плавно снижают таким образом, чтобы он оказался включенным во все позиции в обеих растущих цепях, а не только в первой встретившейся ему позиции. (Напомним, что после присоединения диоксирибонуклеотида рост цепи сразу останавливается,

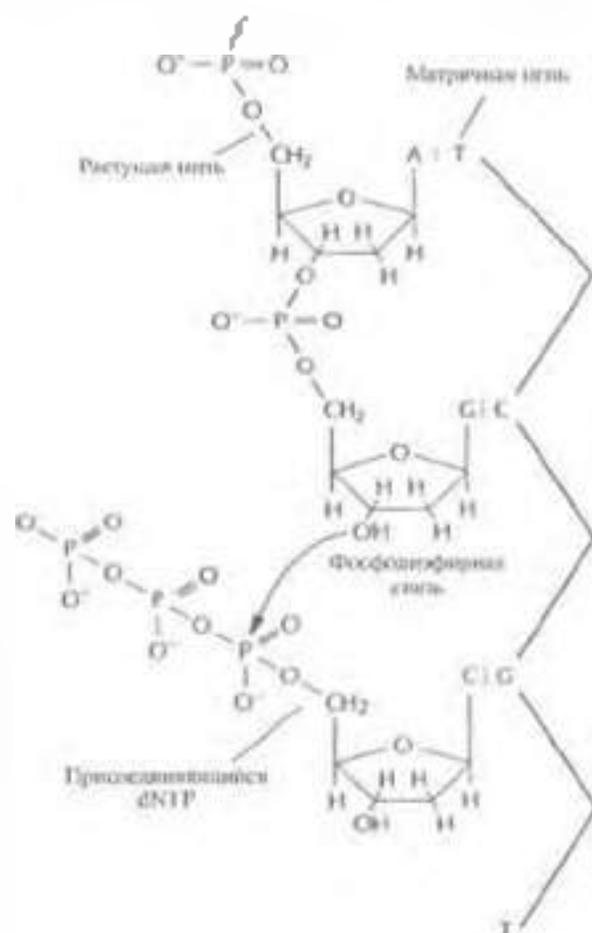


Рис. 3.12. Синтез ДНК в обычных условиях. Очередной дезоксирибонуклеотид (дезоксидрибонуклеосид трифосфат: dNTP) присоединяется к комплементарной нуклеотидной матричной цепи. Между 3'-гидроксильной группой последнего нуклеотида в растущей цепи и 5'-фосфатной группой присоединяемого нуклеотида образуется фосфоэфирная связь.

потому каждая цепь оказывается 3'-дигидроксидеоксирибонуклеотидом.) Но помимо 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 разделение цепей, и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках (по числу пробирок). Это так





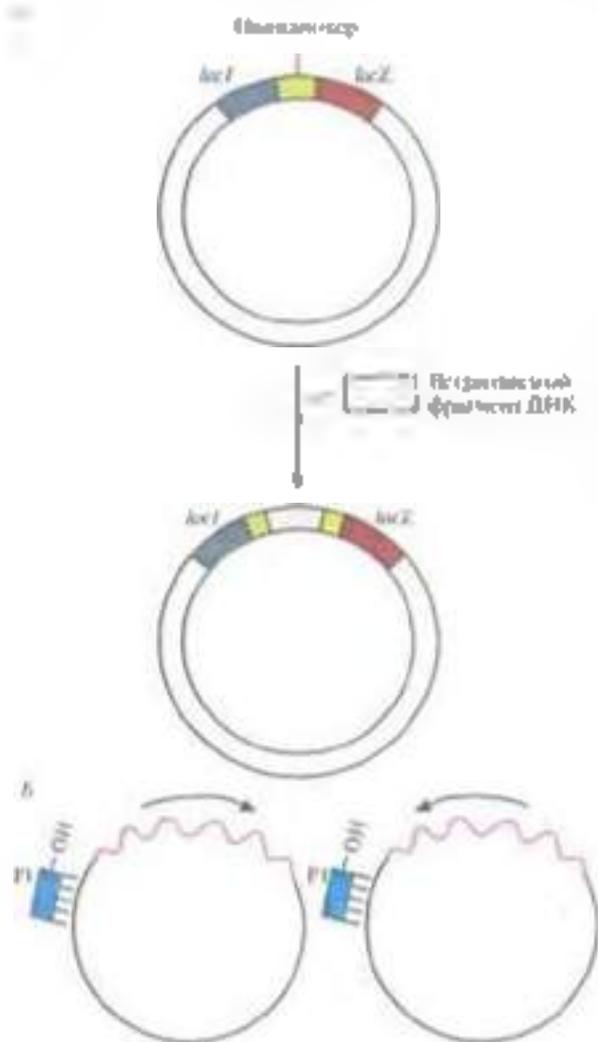


Рис. 9.16. М13-клин для копирования и секвенирования. А Встраивание фрагмента ДНК в двуцепочечную репликационную форму ДНК М13. Б Секвенирование амплифицированных копий амплифицированных фрагментов ДНК с помощью олигонуклеотида (P1) и в реальном времени показывая отрицательные значения в амплификаторе

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

**Праймер-опосредованная амплификация («Блуждающая амплификация»)**

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

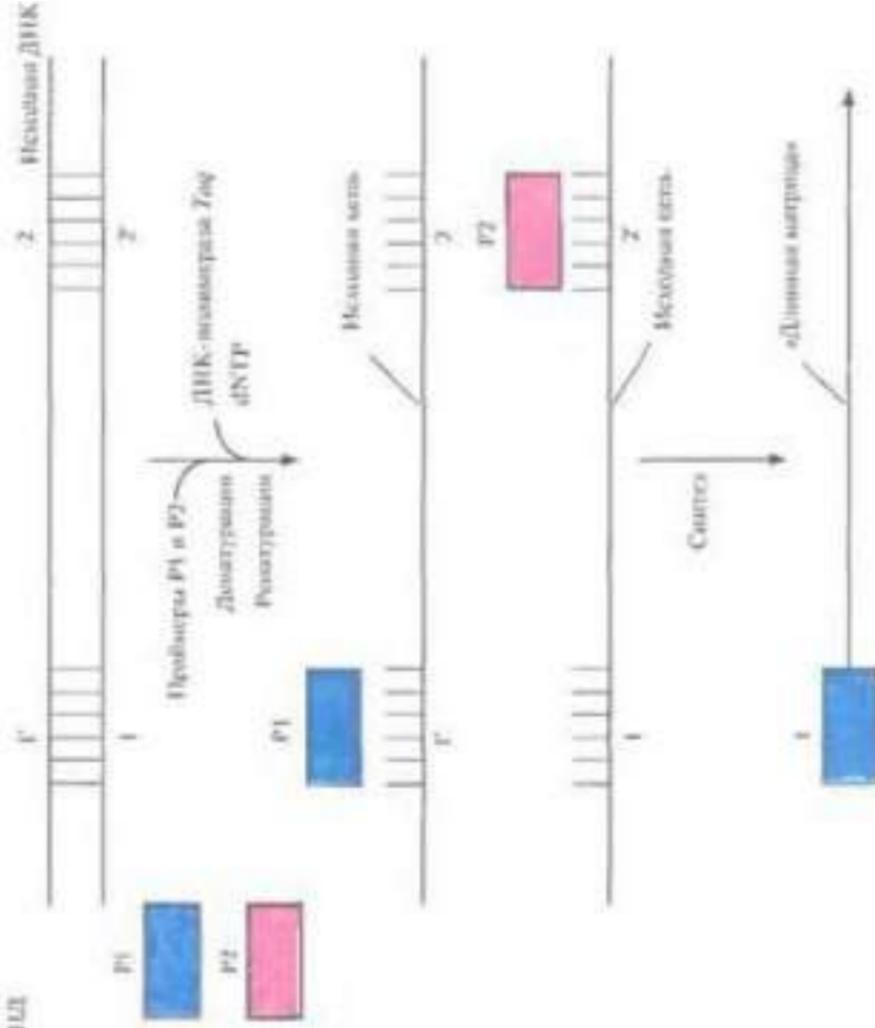
M13-векторов, содержащих перестроившиеся субклонированные последовательности, нечленительно увеличивается. Чтобы решить эту задачу, были разработаны методы секвенирования двухцепочечных плазмидных ДНК, не требующие субклонирования. Плазмидную ДНК, содержащую нулевую вставку, добавляют и отжигают с синтетическим олигонуклеотидным праймером, который гибридизуется с последовательностью в одной из цепей нечетной ДНК, находясь ближе к вставке. Затем осуществляют шаг денатурации-ослабления, позволяющий идентифицировать первые 250–350 нуклеотидов вставки. Непосредственно перед синтезом второй или третьей цепи праймер, комплементарный сегменту вставки, отстояющему примерно на 300 нуклеотидов от места соединения первого праймера, в соединении сдвигающих 250–350 нуклеотидов. Аналогичным образом синтезируют третий праймер и получают нуклеотидную последовательность следующих 250–350 нуклеотидов (рис. 9.17). Эту процедуру, называемую праймер-опосредованной амплификацией, продолжают до тех пор, пока не секвенируют весь фрагмент. Аналогичным образом секвенируют вторую цепь, начиная с праймера, который гибридизуется с этой цепью ближе к вставке.

К сожалению, в результате ошибочного стартового праймера избыточной 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 отжига. Именно таким образом были секвенированы 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 секвенирование фрагментов ДНК длиной несколько десятков тысяч пар нуклеотидов. Во многих случаях праймеры, добавляемые в реакцию, имеют смесь в разных пропорциях, метод различными флуоресцентными красителями с разной длиной волны флуоресценции. Затем соединяют все четыре праймера и проводят электрофорез на одной дорожке. Дорожку сканируют в луче лазера и регистрируют

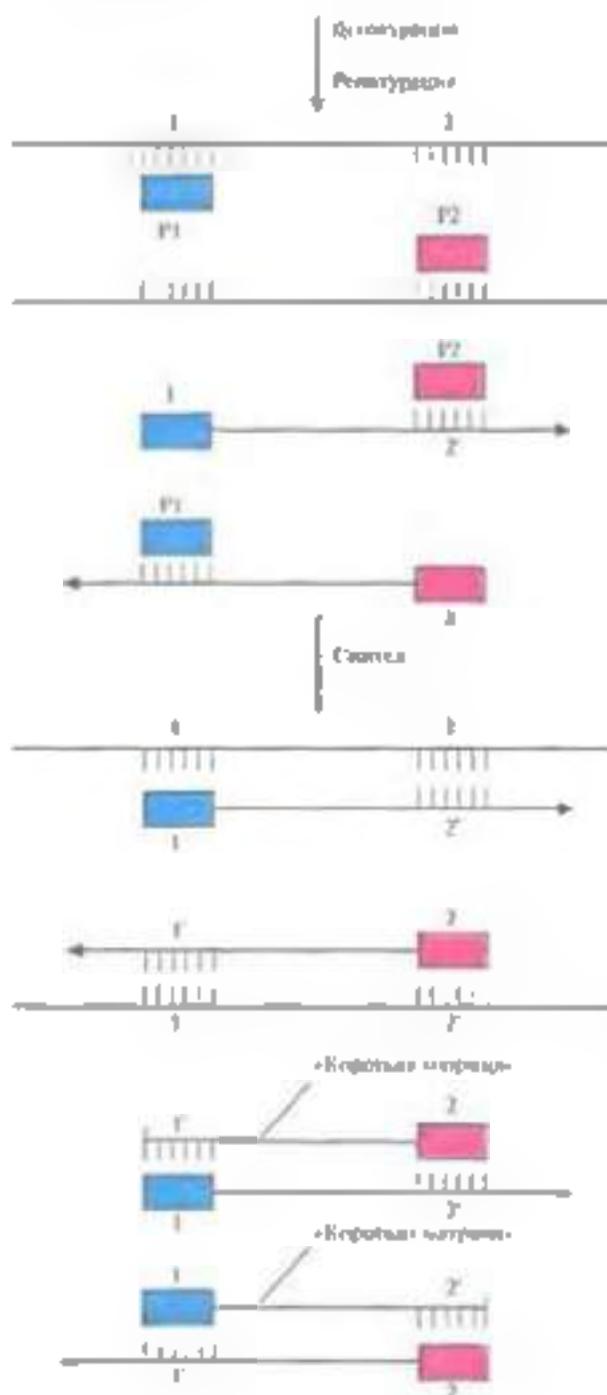


ПЕРВЫЙ ЭТАП





## Второй раунд



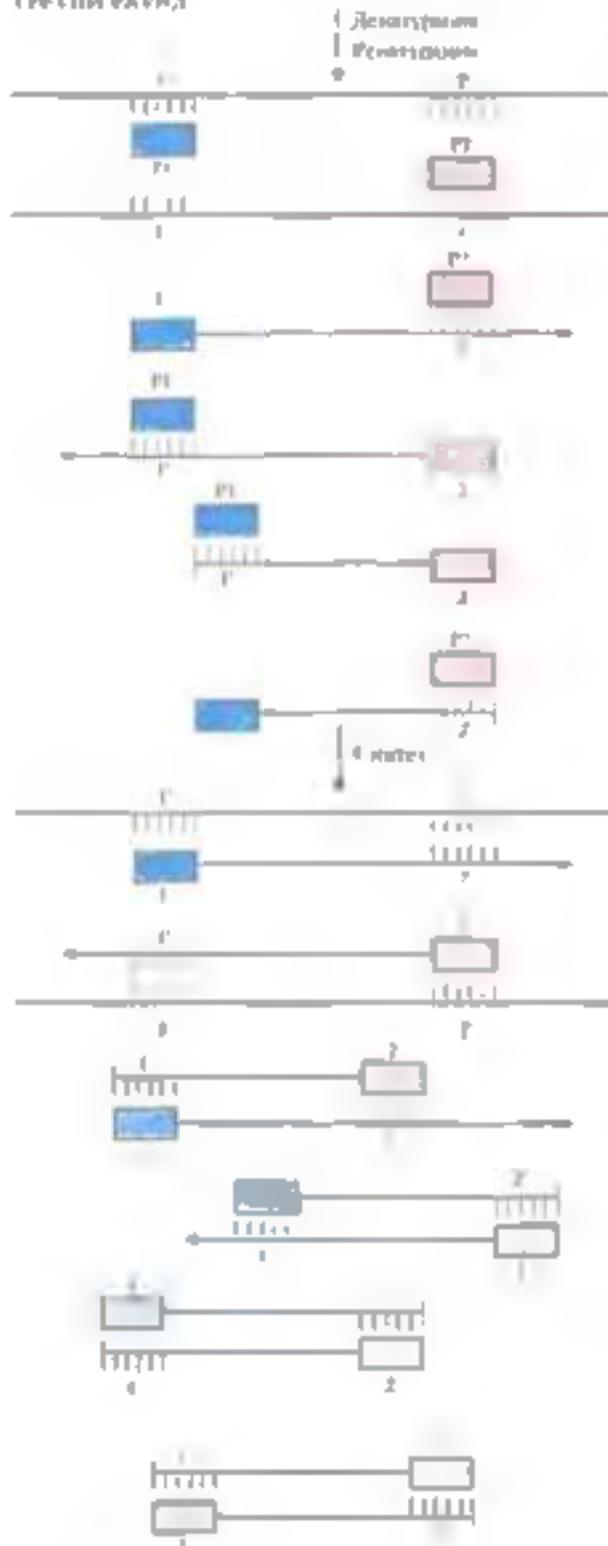
Во втором раунде двухцепочечную ДНК, состоящую из исходной и новосинтезированной («длинной матрицы») цепей, снова подвергают денатурации, а затем отщипывают с праймерами P1 время синтеза в этом раунде вновь синтезируются «короткие матрицы», в таком количестве цепей с праймером на одной цепи и с последовательностью, комплементарной второму праймеру, на другой («короткая матрица») (рис. 5.19). Во время третьего раунда все четвероцепочки, образовавшиеся ранее, одинаково подвержены денатурации и отщипу 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-мишеней; 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 цепей двух праймеров и фрагмента ДНК между ними.

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

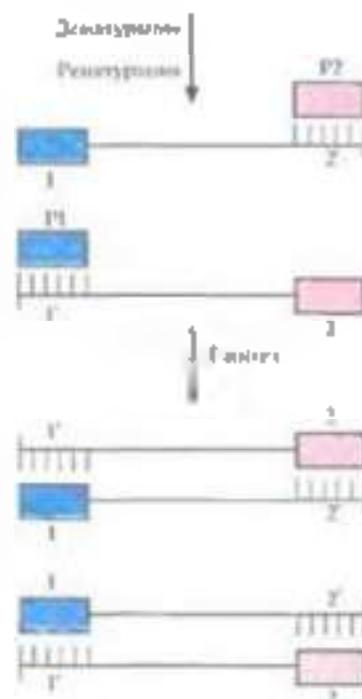
Рис. 5.19. Второй раунд ПЦР. Исходным материалом в этом случае является смесь исходных ДНК, образовавшихся в первом раунде (рис. 5.16). При отщипывании праймеры P1 образуются с комплементарными им участками на исходных цепях, так и «длинных» матриц, синтезированных в первом раунде. В результате ферментативного синтеза на этих же участках вновь синтезируются «длинные матрицы», в том «длинная матрица» «вырастает». Последнее взаимодействует с другим праймером, а тем самым увеличивается количество комплементарной второму праймеру

## ПЕРВЫЙ РАЗВЕТ



При первом разветвлении (PCR) при одинаковых размерах амплифицируются с комплементарными участками матрицы цепей, в то же «длинные» и «короткие» матрицы. При ферментативном синтезе от цепи на основе «длинной» матрицы синтезируются «длинные» матрицы, а на «короткой» матрице - только «короткие» матрицы.

## ВТОРОЙ РАЗВЕТ



При втором разветвлении (PCR) на этот этап в реакционной смеси образуется ориентированная пара «коротких» матриц.

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

Метод ПЦР применяется также для выявления спонтанных мутаций, внесения специфических мутаций (например, сборки плавучих рамок) из синтезируемых олигонуклеотидов, секвенирования ДНК. Во многих случаях не является необходимостью клонирование ПЦР-продукта (например, при клонировании в плазмиды) или амплификация по другим причинам (например, по

схемку праймера *Taq* присоединяет к 3'-концу синтетической цепи внешней цепи нуклеотида, что снижает эффективность аннигиляции. Но если вектор для клонирования обработать рестрицирующей нуклеазой с образующимся на его тугох конце и затем протиснуть с помощью *Taq* и присутствия dNTP, то в обоих 3'-концах фрагменту добавится по одному нуклеотиду нуклеида. В результате комплементарности концевых участков вектора и ПЦР-продукта протиснутость в один единичный нук

леотид оказывается достаточно для сшивания 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

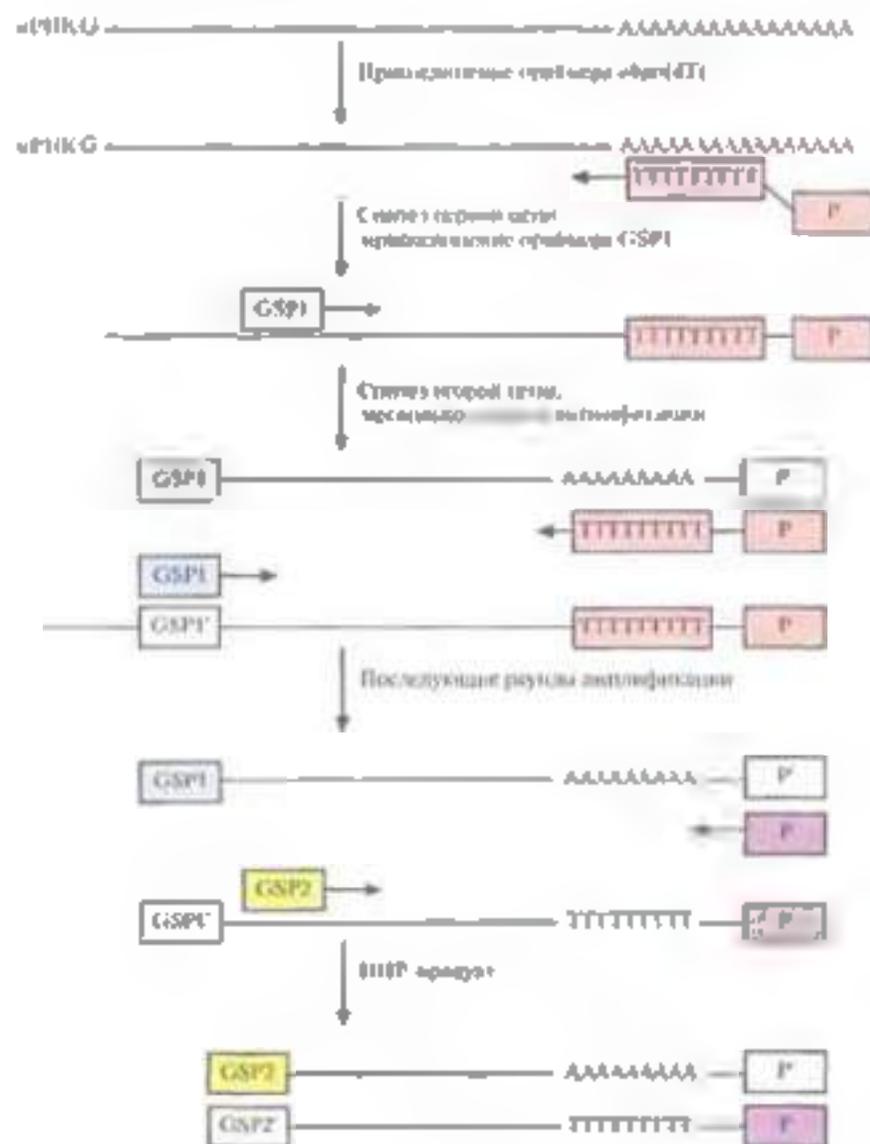


Рис. 5.22. ПЦР-амплификацией кДНК, аннелированной 3'-концевой части мРНК. Первоначальную кДНК образуется в результате обратного транскрипции мРНК при участии *reverse transcriptase* в качестве праймера. Вторую цепь синтезируется на второй цепи как на матрице с помощью нуклеотидов *Taq* в присутствии специфичной праймера (GSP1). В последующих rounds ПЦР используется праймеры 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 торным 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

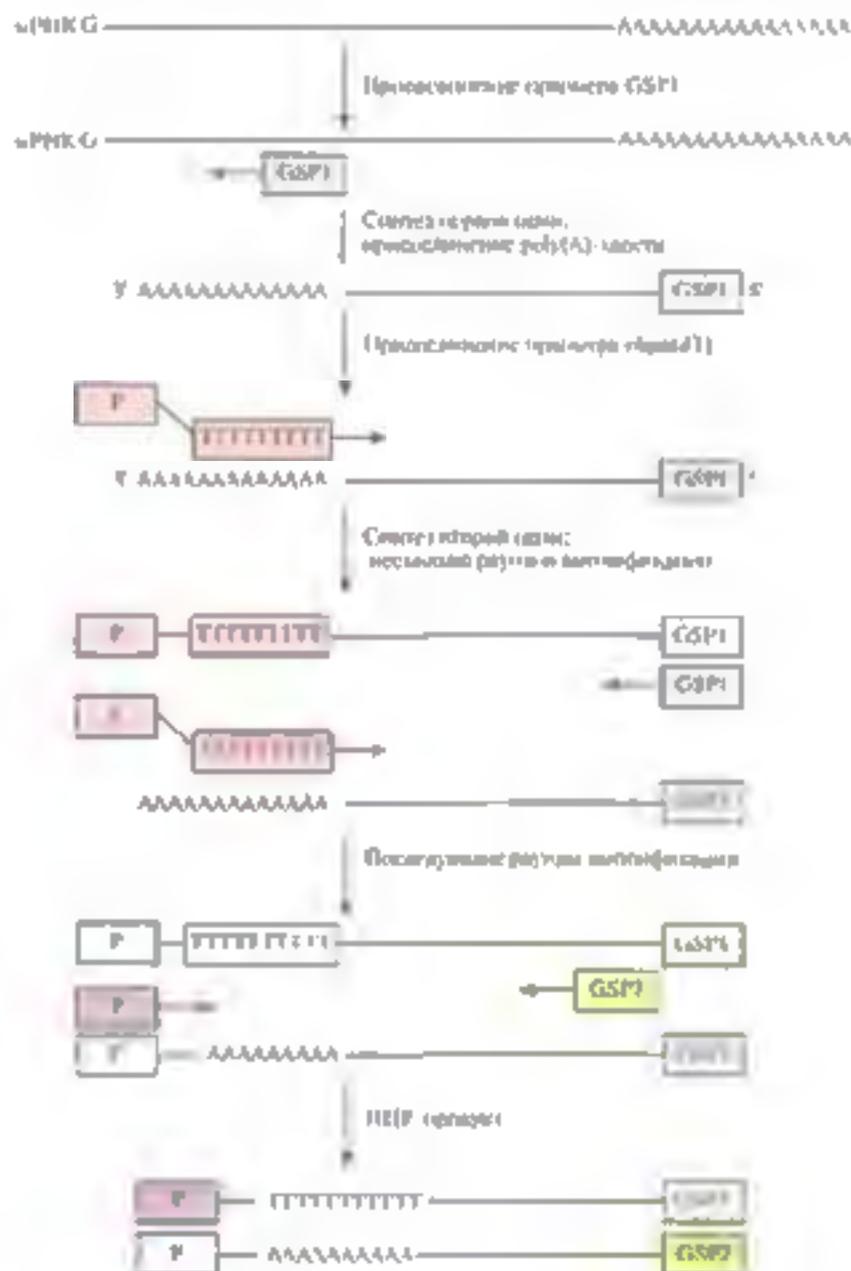


Рис. 5.22. ПЦП амплификация кДНК, комплементарной 5' концевой части мРНК первой цепи, осуществляемая обратной транскриптазой, инициируемая праймером GSP. Затем 4-я цепь с помощью обратной транскриптазы при соединении poly(A)-хвоста. При синтезе второй цепи в качестве праймера используется oligo(dT). Проведен несколько циклов амплификации при участии заданных праймеров, амплифицируются праймеры (GSP2 и P) и получают кДНК, отвечающую 5' концу мРНК

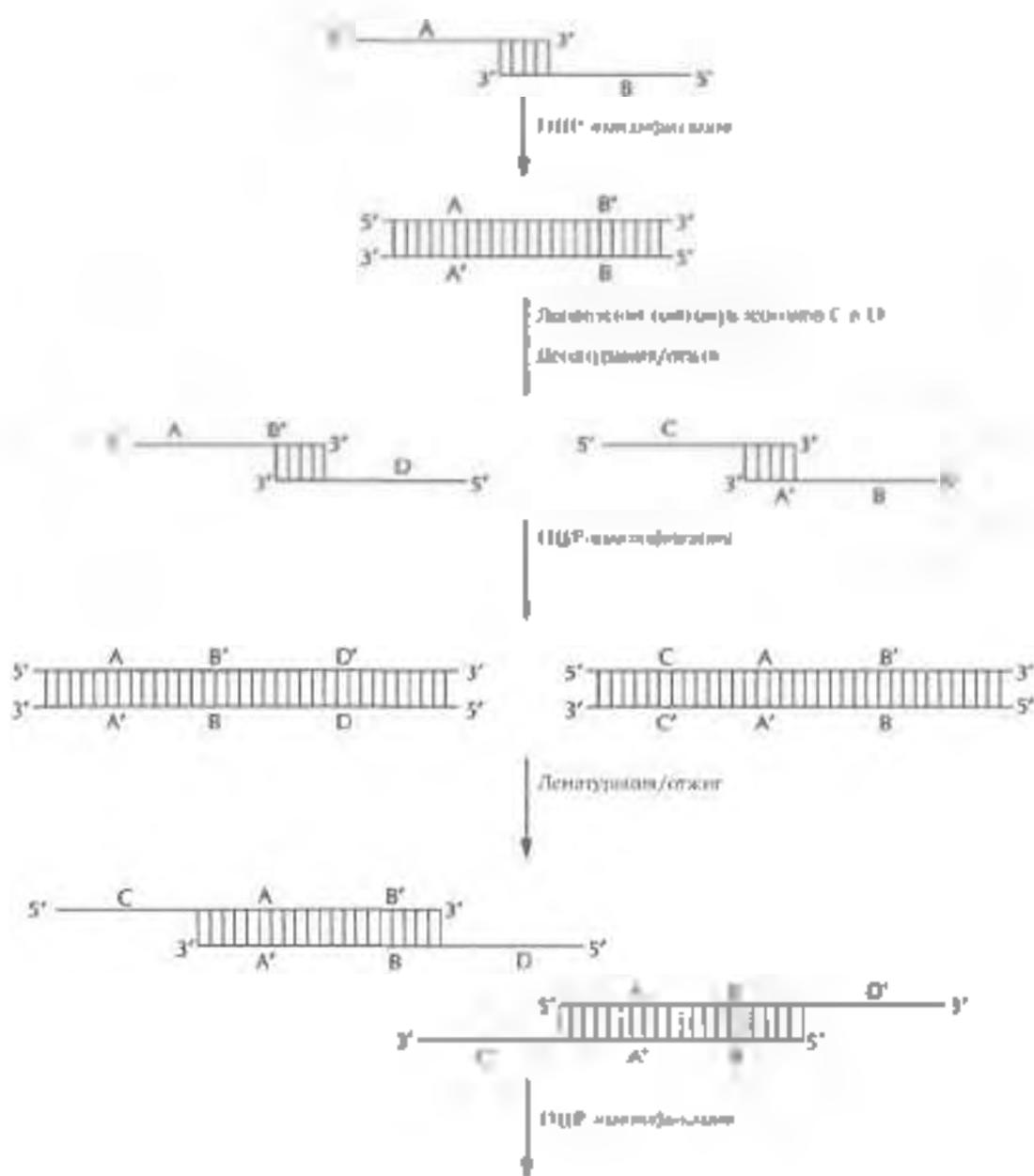


Рис. 9.24 Синтез цепи с помощью ПЦП. Непрерывно синтезируются олигонуклеотиды (A и B) от 5'-конца и достроиваются сформированным ранее «затравочным» 3'-гидроксильным концом. Двухцепочечные молекулы используются в качестве матрицы в реакции синтеза второй цепи олигонуклеотидов (C и D), перекрывающихся с продуктами первой цепи ПЦП и отщипают. Осуществляют второй раз ПЦП, используя вторую цепь олигонуклеотидов (E и F), осуществляя третий раз ПЦП и в результате образуется двуцепочечная ДНК, состоящая из одной цепи (для элонгации) и второй цепи (первоначально синтезированной в первом раунде) и в обоих случаях олигонуклеотидных участков ДНК. Нуклеотидная последовательность 1-ой цепи олигонуклеотидов соответствует той или иной определенной секции ДНК.

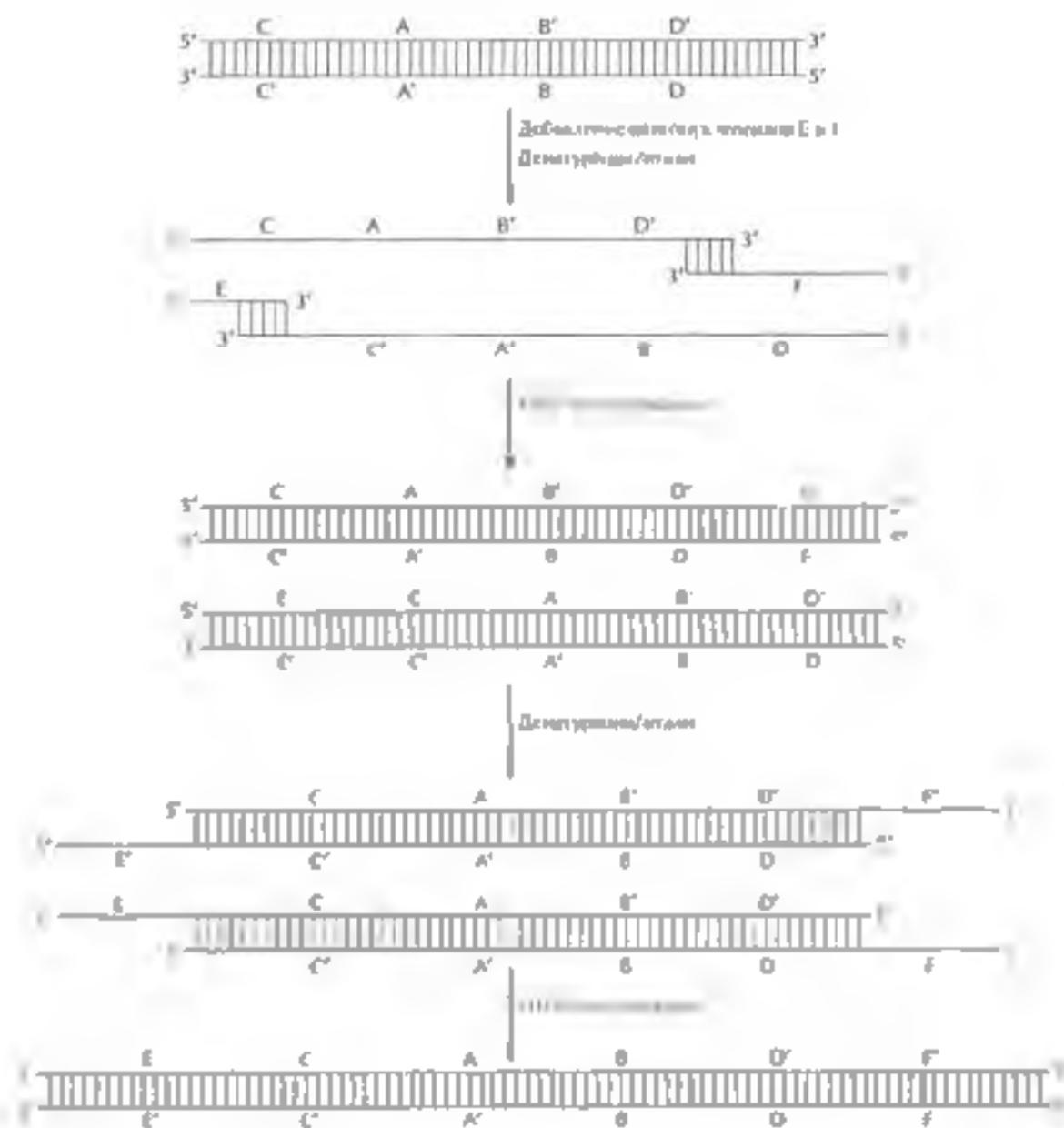


Рис. 5.24. (Продолжение)

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 праймеры только в центре. Вторую пару праймеров необходимо, поскольку без них нельзя амплифи-

цировать 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). Новое специфическое сайт обрабатывается поликла-вальной деструктив/экзонуклеазой и 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 рибозы(A)-конец. С ним связывается праймер Р (primer), пенцилированной 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 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 транскриптеринизация концевых фрагментов кДНК является проблемой для 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 брэндами с помощью ДНК-полимеразы и сшивания фрагментов ДНК-лигазой. В первом из методов конструирование цепи начинается с отапливания перекрывающихся олигонуклеотидов (A и B), 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 C, прикреплен 5'-конец олигонуклеотида A, а сам этот олигонуклеотид отвечает участку конструируемой цепи, непосредственно примыкающему к его центральной части цепи. Аналогично, 3'-конец олигонуклеотида D прикреплен 5'-концу олигонуклеотида B и отвечает участку цепи, примыкающему к его центральной части цепи. После денатурирования смеси и отапливания образуется

дуплекс с протяженными выступившими односторонними сегментами, двусторонними с 3'-концом B. Если последующих разлите ПЦР образуется двукратноцепной продукт, состоящий из указанных выше сегментов, расположенных в порядке CADD. Молекула ДНК с углубленным 5'-концом не ингибируется.

На следующем этапе в реакционную смесь добавляют еще два олигонуклеотида, E и F. 3'-конец олигонуклеотида E прикреплен 5'-концу олигонуклеотида C, а сам он отвечает участку конструируемой цепи, примыкающему к сегменту C. Аналогичными свойствами обладает олигонуклеотид F, если его соединить с олигонуклеотидом D. После денатурирования и реинкубации смеси образующиеся дуплексы с выступившими односторонними участками ингибируются с 3' гидроксильными концами. В итоге последующим разлитием ПЦР образуется двукратноцепной продукт ECADBF.

Следующие пары олигонуклеотидов «двусторонними» тем способом, другим способом – индикаторными добавками в смесь до тех пор, пока не будет синтезирована вся цепь. Длина олигонуклеотидов обычно бывает равна 50 нуклеотидов. Каждый «блок» ПЦР состоит из пяти или 4 минутных разлитий. Для синтеза в цепи длиной 1000 п.н. нужно 10 «блоков», так что тем можно получить в течение одного дня. При этом, как и в случае синтеза цепей прутами методами, исследователи могут использовать (т. е. 3'- и 5'-концы) можно установить двукратноцепными последовательностями, фиксирующими кодирующую область и обеспечивающими последующее встраивание вна в вектор.

## 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 окончании

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 двухцепочечных 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 мутагенеза *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 амплифицированного гена. Для амплификации используют несколько методов, один из них — дидеокси-метил, разработанный Саитером и др. В его основе лежит четковка синтеза цепи после прилипания к ней дидеоксирибонуклеотидов. У каждого нуклеотида существует 3'-гидроксильная группа, и дальнейший рост цепи становится невозможным. Для селективного в разных пробах амплификации проводят четыре реакции смеси ДНК, каждая — в присутствии одного из четырех дидеоксирибонуклеотидов. Продукты реакции разделяют с помощью геля-электрофореза, фиксируют радиационно и сканируют с помощью рафа нуклеотидную последовательность синтезированной фрагмента ДНК.

Для селективного используют также систему на основе фила М13. В ДНК фила встроенные фрагменты 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 двухцепочечные плазмиды, содержащие амплифицированную ДНК.

Для определения нуклеотидной последовательности приложенных амплифицированных систем (от начала амплификационной смеси до конца амплификационной смеси), в качестве матрицы амплифицируют свыше 250–300 нуклеотидов. Затем по результатам селективного синтезируют второй праймер и определяют последовательность следующих 150–350 нуклеоти-

дов амплифицированного участка, и т. д. Этот метод, называемый «стрейпер-определенной проволкой» (или «булавочной стрижкой»), позволяет селективировать приложенные фрагменты ДНК без амплификации, как в случае системы на основе фила М13.

Метод ПЦР (полимеразная реакция) в биотехнологии. Он позволяет в различных фазах амплифицировать *in vitro* нужные сегменты ДНК. Процедура состоит в следующем. Выбирают два праймера, комплементарных с участками ДНК, которые амплифицируют последовательность. Денатурируют ДНК, отщипывают амплификационные молекулы с праймерами, добавляемыми в избытке, и существующий сегмент ДНК *in vitro*. Для облегчения синтеза используют термостабильную ДНК-полимеразу, которая не разрушается при температуре денатурации (95 °C). Затем смесь проводят денатурацию, отаки с праймерами и синтез, и т. д. до примерно 30-го цикла. К этому времени в реакционной смеси преобладают фрагменты, на концах которых находится одна праймерная последовательность, а на другом — последовательность, комплементарная праймеру ПЦР можно использовать для амплификации полимеризованной или в том или ином биотехнологическом материале; получение больших количеств специфических фрагментов ДНК с целью амплификации; амплификации 5'- и 3'-концов специфических мРНК, синтез генов, амплификацию доплемента или отаки, амплификацию и т. д. или для последующего амплификации.

## 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. Garfield, 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. Baschlian, 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.
- Safir R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Hohe, 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. Bachman, A. Baschlian. 1992. A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5'RACE. *Focus* 14: 46-52.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Предполагая, что эти новые ДНК-синтетазы имеют среднюю эффективность приращивания нуклеотидов 98,5%. Каким будет выход

продукта, если вы синтезируете гибридную цепь длиной 50 нуклеотидов?

2. Какое две стратегии химического синтеза верна 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 искусственным ДНК?
6. Как определяют нуклеотидную последовательность клонированной ДНК с помощью векторной системы на основе фого М13?
7. На месте преступления собраны следы единственной копии предполагаемого преступника. В нем содержится 10-20 пиктограмм ( $10^{-11}$  г) ДНК. Чтобы «характеризовать» столь малое количество ДНК и определить, является ли ее нуклеотидная последовательность тойковой ДНК подозреваемого, нужно  $10^8$  или  $10^9$  (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 ПЦР-раундов?
9. Как синтезируют цепи с помощью ПЦР?
10. Как «препаратить» концы фрагменты мРНК в ДНК?

## Оптимизация экспрессии генов, клонированных в прокариотических системах

Основная цель экспериментов по клонированию генов, клонирование предназначено использовать в биотехнологиях, — выбор участка для эффективной экспрессии в ту или другую систему хозяина. К сожалению, сам факт успешного клонирования гена в клонирующую систему 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 минипулинги с целым рядом генетических элементов, контролирующих процессы трансляции и трансляции, стабильности белков, секретии продукта из эукариотической клетки и т. д. Среди эукариотико-биологических систем систем экспрессии наиболее важными являются: 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 регуляторных последовательностей; 5) эффективность транскрипции в организме хозяина; 6) стабильность продукта в эукариотической клетке.

Понимая универсальными стратегиями повышения экспрессии клонированных генов не существует. Экспрессия таких генов имеет уникальные молекулярные свойства, и оптимальные системы экспрессии для каждого из них подбираются эмпирически. Однако для повышения эффективности экспрессии любого репортерного гена широкое применение имеет ряд принципов. Эффективность экспрессии любого репортерного гена зависит также от его ролута с организмом-хозяином. Необходимо не только что многие предшественники как про- так эукариотических организмов способны

к экспрессии репортерных генов, для получения высоких коммерческих показателей продукта 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., как стратегия, так работающие в *in vivo* системах, а принципы применимы и в этих случаях.

### Экспрессия генов при участии сильных регулируемых промоторов

Для эффективной экспрессии любого гена оптимально необходимо наличие сильного регулируемого промотора, расположенного перед инициальным геном. Такой промотор имеет высокие свойства к РНК-полимеразе, поэтому привлечение к нему последовательности эффективной (высокой частотой) транскрибируются. Регулируемость промотора достигается путем (в последующем) осуществлении строгой контроля 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 идентификации перед инициальным 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, белым цветом (ген-репортер) кодируем либо промотор, обуславливающий устойчивость к антибиотикам, либо фермент, который ингибируется с помощью доступных препаратов кинематографических

Может показаться, что наиболее подходящим способом идентификации экспрессии кинематографических

фрагментов (это является основным этапом) является так, чтобы они находились под контролем активации 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, гены, несущие интоксикацию (кислотную) экспрессирующиеся гены, нередко упрощаются после нескольких клеточных делений, поскольку не содержащиеся клетки растут быстрее и со временем становятся

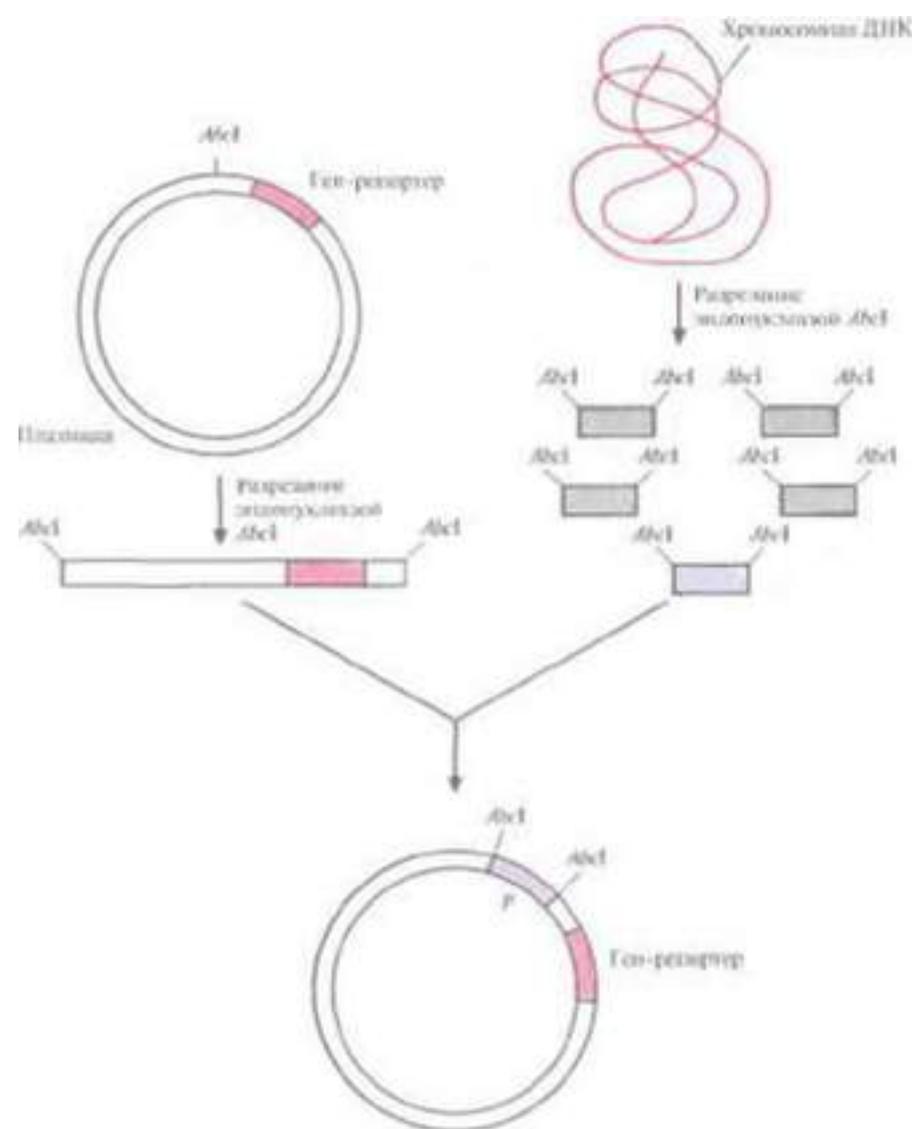


Рис. 6.1. Идентификация сильных регуляторов промоторов. В плазмиду экспрессирующую ген-репортер без промотора Хромосомную ДНК разрезают рестриктазой Acl и встраивают фрагменты с плазмидой. Если ген-репортер эффективно экспрессируется, значит, активированный фрагмент содержит функциональный промотор.

в культуре преобладающими. Нетщепотливостью плазмиды – это основная проблема, мешающая получению продукта фермента. Значительного в плазмиде, в промышленных масштабах. Для ее решения нужно научиться контролировать экспрессию таким образом, чтобы минимизировать ее репрессирование только в определенных фазах клеточного цикла и только в течение определенного времени, а для этого нужно использовать сложные регулируемые промоторы. Плазмиды, сконструированные для этих целей, называются жестко регулирующими 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, находящиеся на расстоянии 10 и 35 п. н. до сайта инициации транскрипции); левый  $\beta$ , промотор бактериофага  $\lambda$ ; промотор гена 10 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 эффективность РНК-полимеразы *E. coli*, в которой полупосредственной регулятор, присутствующий в клетке в значительно больших количествах, чем другие, индуцирует регуляторные белки. Благодаря тому транскрипция не останавливается по причине недостатка соответствующего регулятора.

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 аналог *lac*-индуктор, происходит при добавлении в среду пептида или тетрациклина- $\beta$ -D-галактозилтрансферазы (ГПТТ) либо этик соединения преинтерферируют с белком репрессора с *lac*-оперативным, в транскрипции активизируется.

Транскрипция, индуцируемая *lac*-промотором, регулируется также с помощью белка ингибитора адрилатина (САР) (рис. 6.2). При связывании САР с промотором инициируется синтез (индукция) РНК-полимеразы и усиливается транскрипция промотора. В отсутствие  $\beta$ -D-галактозилтрансферазы (ГПТТ) транскрипция усиливается при его связывании с индукци-



Рис. 6.2. Влияние различных уровней индукции и САР на транскрипцию регулируемого *lac*-промотора *E. coli*. Структура индуктора ингибирует транскрипцию (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 используются один из вариантов *lac*-промотора *lac*- $\lambda$  с плюсовыми 10-миследовательными, более сильный чем *lac*-промотор иного типа. Транскрипция с промотора *lac* также индуцируется *lac*-репрессором и индуцируется при добавлении в среду лактозы или ИИИ.

Промотор *pr* индуцируется под действием выделенных трипсином-*pr*-репрессор, который связывается с *pr*-оператором и предотвращает транскрипцию *pr*-оператора. Активации (включение) *pr* достигается присоединением либо при увеличении из среды триптофана, либо при добавлении 3-индолпропионового кислоты.

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

Для транскрипции с промотора бактериофага T7 нужна соответствующая РНК-полимераза. Чтобы можно было использовать этот промотор для РНК-полимеразы фазы T7 инкубируют и инкубируют *E. coli* (системе *orf101*), помещают его под контроль *lac*-промотора. Затем клетки трансформируют плазмидой, содержащей регуляторную митриксис T7-промотора, и добавляют в среду ИИИ. В этих условиях происходит индукция РНК-полимеразы T7, синтезируется РНК-полимераза и происходит транскрипция и трансляция кодируемого гена. Часто между временем индукции (или РНК-полимеразы T7 в начале транскрипции гена

ишемни проходит более часа. Для транскрипции с связанной T7-полимеразы созданная желтая 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, 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 8–12 копий на клетку. *ten*-репрессоры могут быть локальными и в хромосомной ДНК, находится под в единственном числе, что позволяет поддерживать индекс концентрации репрессора. В настоящее время известны *lac*-примотор, можно получить *lac*-репрессор в значительно большем количестве, если ввести *lacI*-ген его мутантной формой *lacI<sup>o</sup>*, что приводит к уменьшению «протекания» промотора, т. е. к снижению уровня транскрипции кодируемого гена без индуктора.

### Получение больших количеств белковых продуктов

Для получения больших количества рекомбинантного белка с помощью *E. coli* была сконструирована плазмиды pR1 (с283). Она содержит сильный промотор, собственный выделенный из каротиноидов с несколькими регуляторными сайтами для рестрицирующей ферменты (наказатель, служащий непосредственно промотором). Эффективность этой *λ*-репрессорной системы и осуществлении синтеза рекомбинантного белка в *E. coli* можно еще

Таблица 6 / Зависимость массы белка при 100% и 50% экспрессии от температуры

Плазмид	Условие экспрессии		Пример р
	30 °С	34 °С	
pKN402	82	521	100
pPC2833	38	42	50
рСР3	80	213	100

рСР3 от [1] и [2] (см. Таб. 3) [1]

большее количество, однако сайт индукции ретинидами (таблица рР1 с2833) амплитудным сайтом плазмиды рKN402. Это приводит к увеличению числа сайтов индукции (таблица р 5-10 раз) при температуре 42 °С (табл. 6.1). Полученная таким образом плазмиды рСР3 содержит р-промотор и ген β-галактозид (ген устойчивости к ампициллину) из рР1 с2833, а сайт индукции ретинидами из рKN402 (рис. 6.3). Несущие белки стабильно экспрессируются при температуре 28 °С,

а при 42 °С. При минимальной температуре (ген α1 репрессора, интегрированный в ДНК E. coli, не репрессируется, р-промотор не формируется и образуется белок конной антигена (табл. 6.1). При повышенной температуре α1 репрессор инактивируется, р-промотор переключен в активное состояние, и число сайтов индукции увеличивается. Все это и делает плазмиду рСР3 эффективным экспрессионным вектором. Когда ген ДНК-плазмида 14 был встроена в плазмиды рСР3, то масса его продукта составила примерно 20% от общего количества белка, синтезируемого E. coli при 42 °С. При этом масса белков собственных, наиболее активно синтезируемых белков E. coli, ингибитор фактора деградации β-10, увеличивается примерно 2%.  
**Крупномасштабные системы**

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

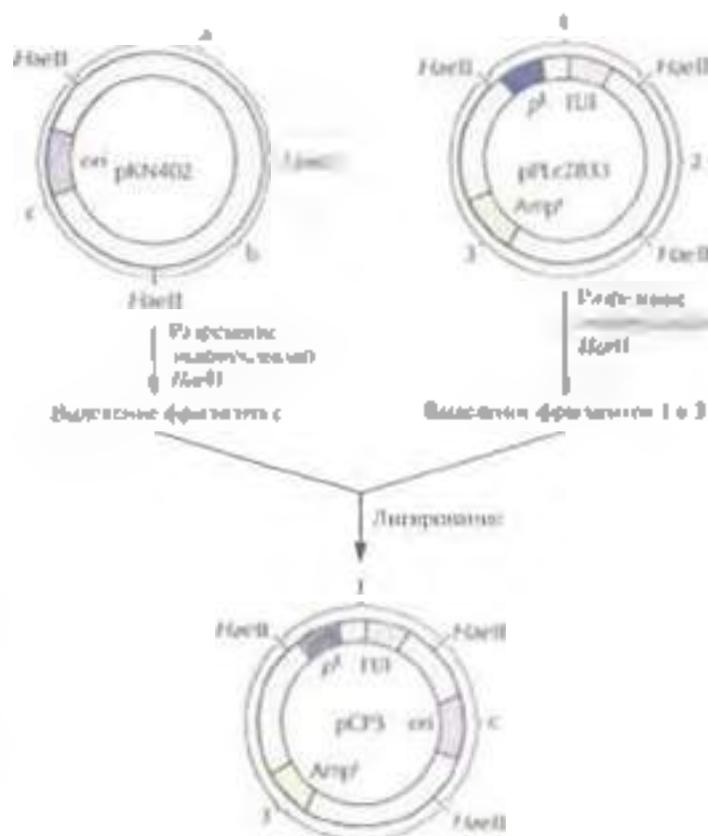


Рис. 6.3. Создание плазмиды рСР3 из плазмиды рKN402 с помощью рестриктазы HindIII. Векторный фрагмент с, содержащий температурно-чувствительный сайт индукции ретинидами (ret), в сочетании со с HindIII фрагментами 1 и 2 плазмиды рР1 с2833. Фрагмент 1 содержит р-промотор и полизомер (PL), а фрагмент 2 содержит сайт индукции (ret) и антибиотик E. coli (AmpR).

там чаще всего в индукторе. Однако в чашечных 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  $\nu r$ -промотора и ввели в млекопитательную плазму (рис. 6.4), что обеспечило невысокий уровень синтеза репрессора. Вторая плазма содержала клонированный ген, находящийся под контро-

лем  $p^b$ -промотора. Как видно из рис. 6.4,  $A$ ,  $B$  и  $C$  — системы триптофан-индукции  $\nu r$ -промотор и синтезируют репрессор  $cI$ , индукцирующий  $p^b$ -промотор. И наоборот, как видно из рис. 6.4,  $B$ ,  $C$ ,  $p^b$ -промотор не синтезируется, а  $p^b$ -промотор активно работает.

Культура с такими двухлампными системами можно выращивать на бедных средах на основе гидролизатов меласса 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  $\beta$ -лактамазы и цитратин-



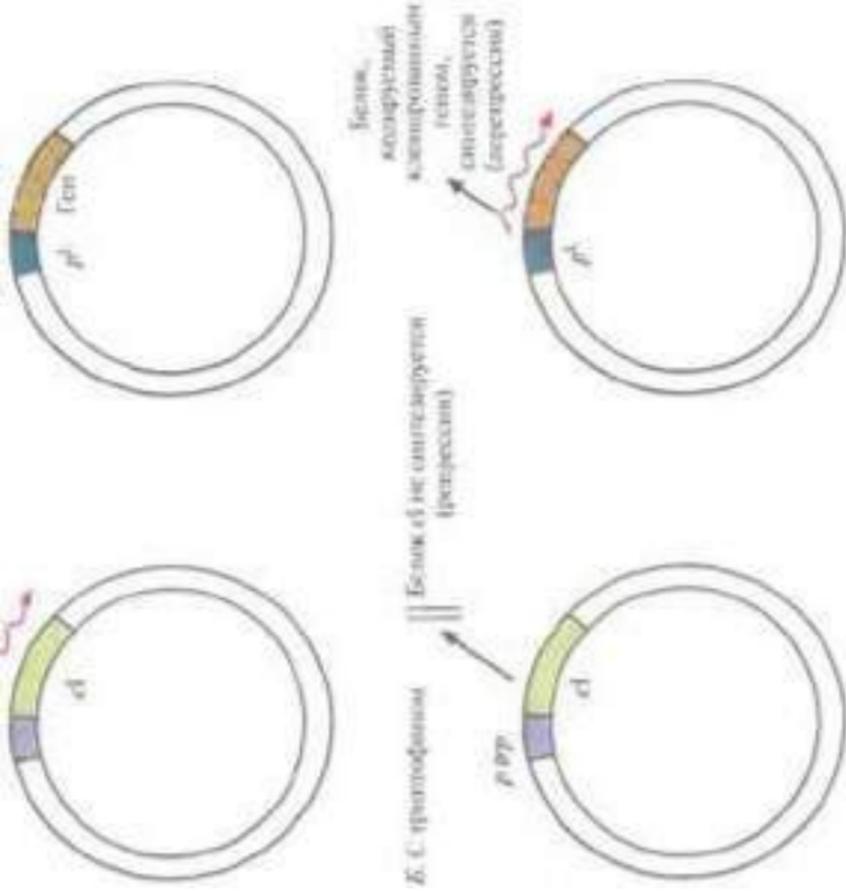


Рис. 6.4. Двухплазмидная система, позволяющая контролировать работу  $p^l$ -промотора факта  $\lambda$  путем регуляции синтеза  $cI$ -репрессора с помощью триптофана. Ген репрессора  $cI$  вместе с триптофановым промотором ( $p^trp$ ) находится в одной плазмиде, а  $p^l$ -промотор и кодируемый им ген — в другой. Стрелками указано направление транскрипции. А. В отсутствие триптофана и транслации репрессор  $cI$  связывается с  $p^l$ -промотором и блокирует транскрипцию клоонированного гена. Б. В присутствии триптофана ген  $cI$  экспрессируется, его продукт не синтезируется, поэтому клоонированный ген транскрибируется

и транслируется.

такой мере индукции транскрипции лобактериальными триптоны принадлежат сподруге к 21 и 24% от общего количества синтезируемого белка. Таким образом, двухлазменные системы позволяют получать большие количества продукции с помощью штаммов микрорганов и прокаррионных систем, а также и оптимальных условий

#### 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 прокаррион-репрессорной системы, которая обеспечивала бы оптимальный уровень экспрессии в клетках всех или хотя бы только граммотрицательных бактерий. К счастью, многие стратегии, разработанные для *E. coli*, пригодны и для введения других микроорганизмов, что позволяет применить различные принципы их усовершенствования, транскрипцию в других прокаррионных бактериях. Так, в первом из последующих был сконструирован набор плазмидных экспрессирующихся векторов, содержащих промоторы *lac*, *trc*, *Nm* (ген устойчивости к тетрациклину) и *S1* (ген рибосомного белка *S1* *Mycobacterium tuberculosis*), и определен уровень экспрессии генов  $\beta$ -галактозиды под контролем каждого из них (табл. 6.2). Обнаружилось, что: 1) указанные промоторы обеспечивают или низкую или высокую индукцию в бактериальных системах; 2) промотор *lac* наиболее активен в *E. coli* и менее активен в других бактериях;

3) *Nm* – отличный прокаррионный промотор в *E. coli* и самый активный в других бактериях. Промоторные участки 3 всех граммотрицательных бактерий имеют сходную структуру и последовательность, однако это не означает, что самым эффективным промотором для того или иного организма будет тот, который наиболее активен в *E. coli*. Тем не менее *E. coli*-промоторы могут оказаться вполне приемлемыми для регулирования экспрессии в прокаррионных системах и в других граммотрицательных бактериях.

Попытки создания «универсальных» экспрессирующихся векторов для граммотрицательных бактерий были весьма многочисленными. В конце концов бы и выбраны следующие стратегии. Фрагменты ДНК размером 70 п. н., близко лежащий от одного из концов интерпретированных промоторов в транскрипции 5' (*Tn5*), встроены вместе с соответствующим промотором в плазмидный вектор нажкопийной плазмиды pRK290 с широким спектром хозяев и получили название pLV10 (рис. 6.3). Клонированный сегмент ДНК от *Tn5* содержит для нежужеродных, но перекрывающихся промоторов, каждый из которых подходит для транскрипции одного из элементов *Tn5*-гена. Поскольку *Tn5* эффективен экспрессируется в разных бактериях, эти промоторы можно использовать для транскрипции ружеродных генов. Чтобы проверить это, в наши опыты сразу же включены следующие промоторы: *Tn5* встроены гены  $\beta$ -галактозиды,  $\beta$ -галактозиды. Их эффективность продемонстрирована в клетках *Mycobacterium sp.*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* и *Serratia marcescens*. Таким образом, есть резуль-

Таблица 6.2 Активность  $\beta$ -галактозиды в прокаррионных бактериях, введенных плазмидный вектор с геном *lacZ* *E. coli* и (стерильными промоторами)<sup>1</sup>

Промотор	Активность $\beta$ -галактозиды, КД			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Отсутствует	16	110	170	130
<i>lac</i>	1400	21000	11900	16000
<i>trc</i>	2000	9000	6200	9000
<i>trp</i>	12000	1800	1100	1900
<i>S1</i>	40	1300	1200	1000

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



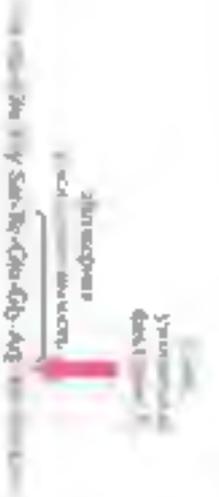


Рис. 6.6. Протранскрипционное регулирование экспрессии гена фактора сепаринина *spoVX*. Фактор  $X_{sp}$  управляет аминотрансферной способностью, позволяя возросшую концентрацию аминокислоты. После расщепления пептидокиназой функциональный белок кодируется соответствующим геном.

используя в качестве гена фактора *spoVX* (рис. 6.6). Этот ген кодирует белок для отщепления от фактора *X<sub>sp</sub>* пептида, который активирует ген *spoVX* и стимулирует экспрессию гена *spoVX*.

### Применение химерных белков

В некоторых случаях конечным продуктом, который производится, является сам химерный белок. Например, передача информации избыточность и полнота информации, уникальные конформации участков белковой цепи. Чтобы решить эту задачу, можно использовать промоторный вектор системы ДНК, кодирующий белковую домену, в которую будут вводиться другие нужные антигены. Образующийся и регулируемый химерный белок и будет служить антигеном. Антигена в стабилизированному этому белковому компоненту, принадлежащему к химерской цепи, можно удалить абсорбцией на чистой стабильно продуцируемом белке, и тогда останутся только антигены, стабилизирующиеся с нужной аминокислотной последовательностью.

Один из кодирующих векторов системы генов, сконструированных для получения специфических антигенов, содержит 5'-концевой сайт ген *ompF* *E. coli*, кодирующего один из порчиных белков *E. coli*, и представляющую в нем часть гена *lacZ* ( $\beta$ -галактозидазы) *E. coli* (рис. 6.7). Этот сайт кодирует информацию, избыточную для информации транскрипции и трансляции код гена, а также для скрепления химерного сайта. Поэтому важно то, что участок гена *lacZ* имеет кодон для терминации трансляции, что позволяет им белок кодирует фрагменты гена *ompF*. В такой

форме  $\beta$ -галактозидаза способна функционировать независимо от того, какие терминалы присоединены к ее N-концу. Ген *lacZ* встроен в вектор таким образом, что он помещает site в точку с высокой стабильностью латеральной пептидогидролизиса *ompF*, поэтому активный  $\beta$ -галактозидаза не образуется. Однако если рамка питания кака-либо кодируемого фрагмента ДНК совпадет с рамкой для генов *ompF* и *LacZ*, то образуется трехкомпонентный химерный белок, состоящий из *OmpF*-фрагмента, белка, кодиру-

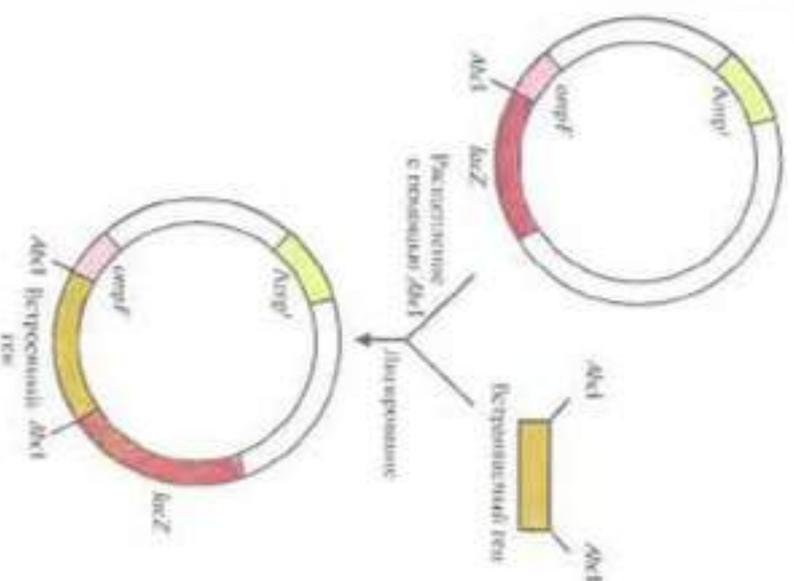


Рис. 6.7. Кодирующий вектор системы генов. Он содержит ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*) в качестве селективного маркера, 5'-концевой сайт гена *ompF*, кодирующий N-конец порочного мембранного белка, сайт для рестрицирующей ядовитой гена *lacZ* и усилительный сайт  $\beta$ -галактозидазы (*lacZ*), ген, который может кодировать, встроенный в *lacZ*-сайт. После трансформации и трансляции сайт генетической конструкции образуется трехкомпонентный химерный белок.

Таблица 6.3. Основные маркерные белки, продуцируемые *E. coli*

Классификация белка, систематическое название <sup>1</sup>	Функция	Антиген	Условия экспрессии <sup>2</sup>
ZZ	14 кДа	Ag	Н-таг рН
Гистонимитный «капсид»	6–10 аминокислот	NS <sup>3</sup>	Н-таг рН
Энтер-таг	10 аминокислот	С-эпитопидион	Н-таг рН/стабилизатор
МФТ <sup>4</sup>	13 кДа	С-эпитопидион	Н-таг рН
МНР	49 кДа	Антиген	Малыш
Р-Лактозаза	27 кДа	Флавоидион	С-таг
ССТ	21 кДа	С-эпитопидион	Восстановительный (таг-ст)
Флг	9 аминокислот	С-эпитопидион и антиген	Н-таг/стабилизатор/капсид

<sup>1</sup> По данным (ссылка) Nardoni et al. 1991. *Genet. Eng. Rev.* 12.

<sup>2</sup> ZZ — таг на А-Зерфенон-11; антиген — таг на С-эпитопидион; NS — таг на С-эпитопидион; С-эпитопидион — таг на С-эпитопидион; Н-таг рН — таг на Н-таг рН; МФТ — таг на МФТ; МНР — таг на МНР; Р-Лактозаза — таг на Р-Лактозаза; ССТ — таг на ССТ; Флг — таг на Флг; Стабилизатор — таг на Стабилизатор.

смысл кодирующей цепи, и функционально активной С-концевой частью  $\beta$ -галактозидазы. Он может использоваться как инициатор для выработки антигена, дающего перекрестную реакцию с белком клинической значимости, или как инструментом для изучения стабильности фрагментов с определенной функцией 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 (1,3х-Asp-Asp-Asp-Asp-1,3х) (он кодируется геном *flgB*), маркирует двойную формулу: обеспечивает стабильность продукта септина интерферона 2 и облегчает его очистку. Интерферон 2 — это биомолекулярный фактор стимуляции роста 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 чтобы избежать этих затрат на маркерный пептид, функционирующий на полирибосомном носителе и продуцируемый через мембрану химерной белок, химерный связывается с этими антигенами (рис. 6.4). Маркерный пептид — белковая молекула, которая собирается вместе с частью клеточных ре-

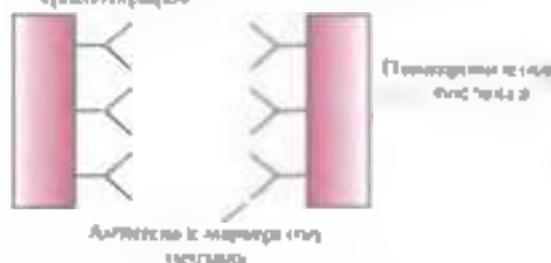
сурсов. Химерный белок обладает такой же биологической активностью, что и нативный интерферон-2. Однако если он полезен только для очистки в лаборатории, то маркерный пептид необходимо удалить. Такую операцию осуществляют с помощью выщелачивающих растворов или фармакологических препаратов. Для этого также можно использовать интерферон.

Мини-белки, продуцируемые *E. coli*, вымываются в клетках в форме перастронных биологически неактивных телесных включений. И если из такой структуры часто удается получить не большие количества биологически активной белок, для этого приходится применять продолжительную селекцию. Проблема растворимости белков *in vivo* часто обуславливается из-за неправильной укладки, и эту проблему пытаются решить различными способами. Так, известно, что химерные белки, синтезированные в культуре являются гомодимерами, белок массой 11,7 кДа, остается в растворе, даже если на его долю приходится 40% суммарного клеточного белка. И если это в виду, тем не менее, варинант описанного сразу после за счетом гомодимера, так чтобы оба гена попали под контроль *p*-промотора и плазмиды векторе *E. coli* (рис. 6.5). В хромосоме дрожжевых клеток *E. coli*, используются в той системе, присутствует генетическая конструкция, детерминирующая образование репрессора *c1* — копии гена *c1* кодирующей под транскрипционным контролем

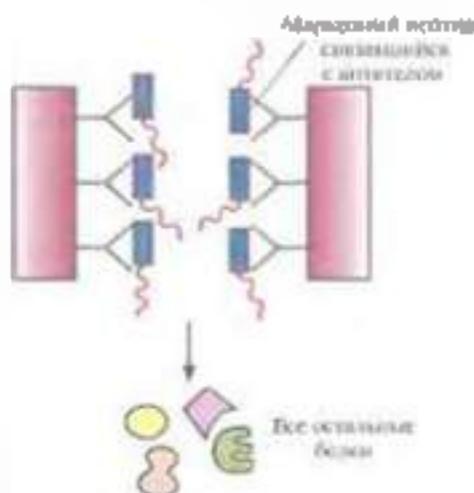
1. Синтез химерного матричного белка



2. Полимеризация вытеснения для мультиэпитопной иммобилизации



3. Иммобилизация матричного белка



4. Иммунизация (химерного белка)

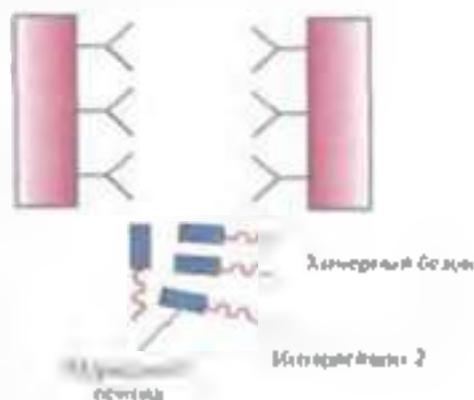


рис. 6.8. Оценка химерного белка с помощью пептида аффинной промоторной Антигена и аффинной кептиду химерного белка фиксирует на твердой носитель и фиксирует частицу химерный белок. Иммунизация (химерный белок) в состав химерного белка, связанного с антигеном, а все остальные белки свободно проходят через колонку. Иммунизация химерный белок фиксирует на носитель.

лем промотора *trp* в отсутствие триптофана (рис. 6.9. А) репрессор образуется в количестве, достаточном для блокирования транскрипции с *P*-примкиры, и химерный белок не синтезируется. Когда в среду добавлен триптофан (рис. 6.9. Б), *trp*-промотор выключается и белок-репрессор не синтезируется, а гены химерного белка транскрибируются с промотора *P*. Синтезируемый химерный белок, состоящий из ферментации и белка-мишеня, концентрируется в основном в особых областях с внутренней поверхностью ультратонкой мембраны *E. coli*, образуя микрочастицы, и высвобождается в клеточном осадочном слое. Далее белки можно очистить от химерного белка с помощью итероконтакт: Химерный белок, содержащий ферментацию, можно очистить с помощью створки (если белок мишень остается стабильным при повышенной температуре), но, поскольку ферментация не разрушается при повышенной температуре до 80 °C, химерный белок можно инкубировать при высокой температуре и ослабить с помощью количества 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, M13) или бактериофагов 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 M13, который связывается с F-пилием *E. coli* и инициирует инфекцию. Для клонирования кДНК и других

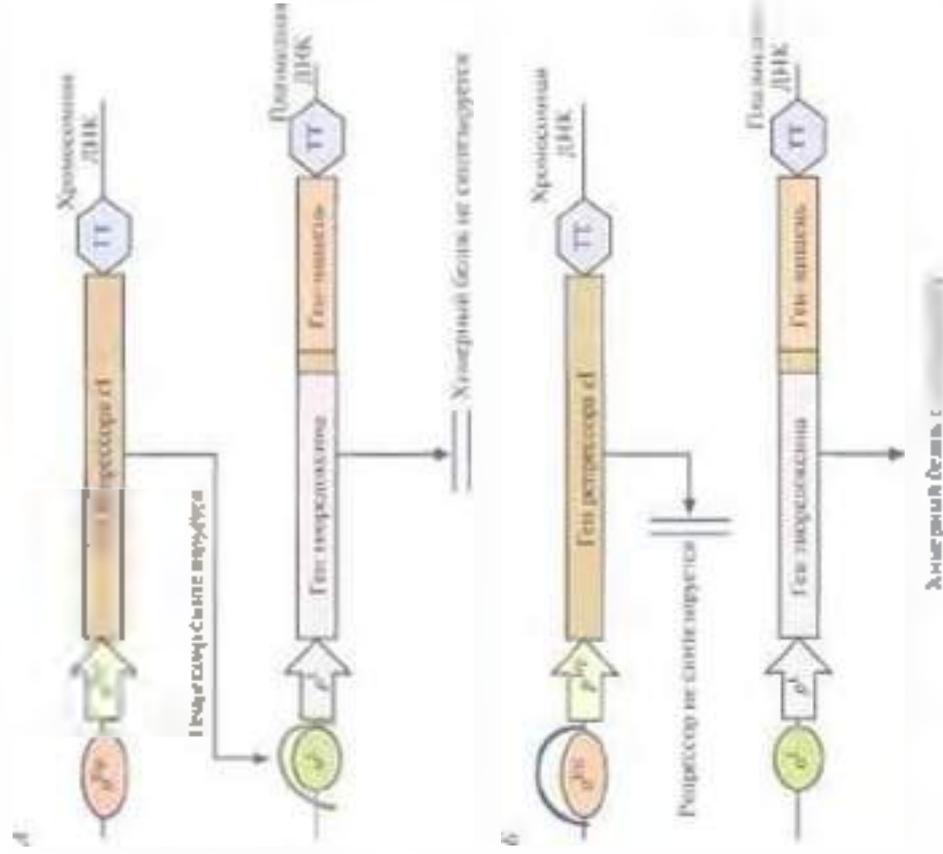


Рис. 9.6. Экспрессия гена в бактериальной клетке. В процессе транскрипции с генами  $\rho^R$  и  $\rho^I$  синтезируются белки-репрессоры  $\rho^R$  и  $\rho^I$ . Репрессор  $\rho^R$  связывается с оператором  $O$ , что приводит к подавлению транскрипции. Между геном  $\rho^I$  и оператором  $O$  находится нулевой участок последовательности, который кодирует петлю, расщепляемую эндонуклеазой. Под воздействием критерия индуктора  $\rho^I$  происходит репрессорно-индукторный комплекс, который связывается с оператором  $O$ , что приводит к подавлению транскрипции. Между геном  $\rho^I$  и оператором  $O$  находится нулевой участок последовательности, который кодирует петлю, расщепляемую эндонуклеазой. Под воздействием критерия индуктора  $\rho^I$  происходит репрессорно-индукторный комплекс, который связывается с оператором  $O$ , что приводит к подавлению транскрипции.

Комплексы репрессора с оператором были описаны в работе Д. Л. Делла (1969), которая показала, что репрессор связывается с оператором, образуя комплекс, который подавляет транскрипцию. В работе Д. Л. Делла (1969) описаны эксперименты, которые показали, что репрессор связывается с оператором, образуя комплекс, который подавляет транскрипцию. В работе Д. Л. Делла (1969) описаны эксперименты, которые показали, что репрессор связывается с оператором, образуя комплекс, который подавляет транскрипцию.

Бактериальные регуляторные гены (операторы) кодируют белки, которые связываются с оператором, образуя комплекс, который подавляет транскрипцию. В работе Д. Л. Делла (1969) описаны эксперименты, которые показали, что репрессор связывается с оператором, образуя комплекс, который подавляет транскрипцию. В работе Д. Л. Делла (1969) описаны эксперименты, которые показали, что репрессор связывается с оператором, образуя комплекс, который подавляет транскрипцию.

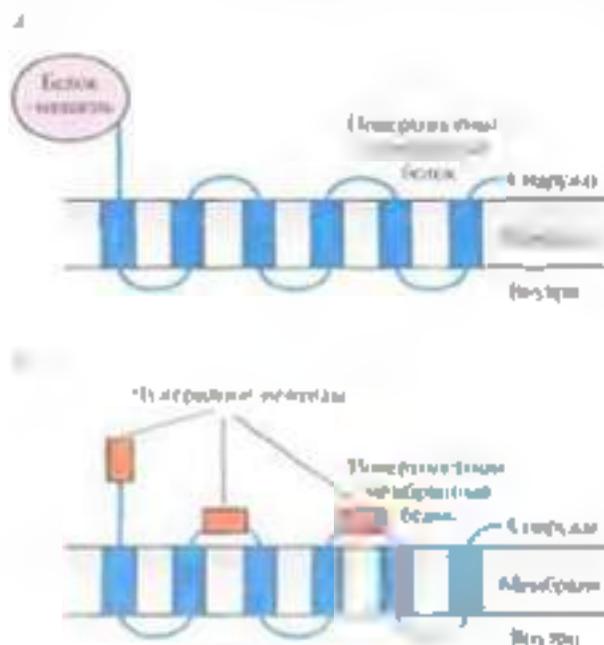


Рис. 6.10. Структурные белки, состоящие из гидрофобных остатков бактериальных белков и гидрофильных белковых остатков. Прозрачные участки N или C концы (А) образуют гидрофильные участки мембраны (Б). В обычных случаях гидрофильные участки или белки встраиваются на поверхности бактериальной клетки

Системы слияния с плазмидными белками и на поверхности бактериальных клеток можно использовать также для суперпродукции некоторых белков и пептидов. Так, в связи с работ в этом направлении, кодирующей основной белок внешней мембраны *Agrobacterium actinomycetivorum* (Ox26), был открыт ген внешнего детерминанта побудителя малярии *Plasmodium falciparum* бактериальных клеток, синтезирующие соответствующий змеиный белок, давая положительную реакцию с антителами к *P. falciparum*. Следовательно, поперечностью змеиные белки можно использовать в качестве вакцины (та. 11).

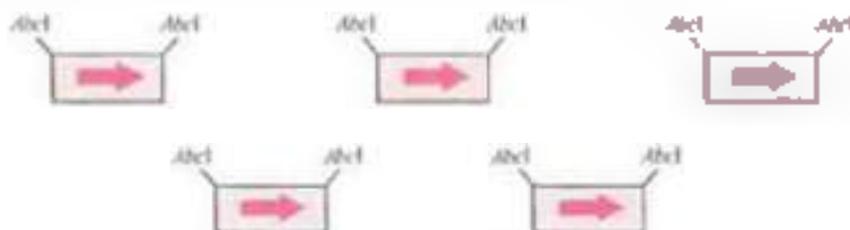
### Однонаправленное гомологичное расщепление генов

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

чением числа копий плазмиды можно увеличить产量 и количество продуцируемых в эту плазмиду генов. Однако при этом к числу генов в гена плазмиды добавляются и другие транскрибируемые последовательности, например гены устойчивости к антибиотикам, и по мере увеличения их количества истощаются ресурсы клетки будут все большее количество генов не на образование белков, кодируемых этими генами, и метаболическая активность такой клетки упадет. Выходом из этой ситуации могли бы стать векторы, встраивающиеся в плазмиду несколькими копиями интересующего исследователя гена. Однако при этом возникает одна техническая проблема: расположение генов в такой ориентации, чтобы все они могли правильно транскрибироваться и транслироваться. Простое сшивание концов «конец-конец» приводит к случайной ориентации генов, так что одни из них экспрессируются, а другие, наоборот, в противоположной ориентации, не работают (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, разрезают с помощью *AclI* и, используя «ДНК-полимеразу», диспершируют линейные концы. Затем в наборе с другим концом прищипывают *EcoRI* линкер (GAATTC), вновь замыкая кольцо. 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'-CTCCGGAATTCCTCCGGAATTC-3' (здесь штриховые обозначены сайты узнавания для *AclI*). Нужный ген вставляется с транскрипционным стартом с помощью рестриктазы *EcoRI*-сайт и затем встраивают из плазмиды с помощью *AclI* (рис. 6.12. В). Такие фрагменты имеют открытые концы, и поэтому при последующем сшивании соединяются в одной ориентации. Подобный набор однонаправленных фрагментов можно ген может быть встраивать в вектор. При этом значительно увеличивается эффективность формирования генов, так как их экспрессия будет происходить только в *MP+* случаях

## А. Векторы с геном



## Б. Тетрамерные векторы образуются при димеризации

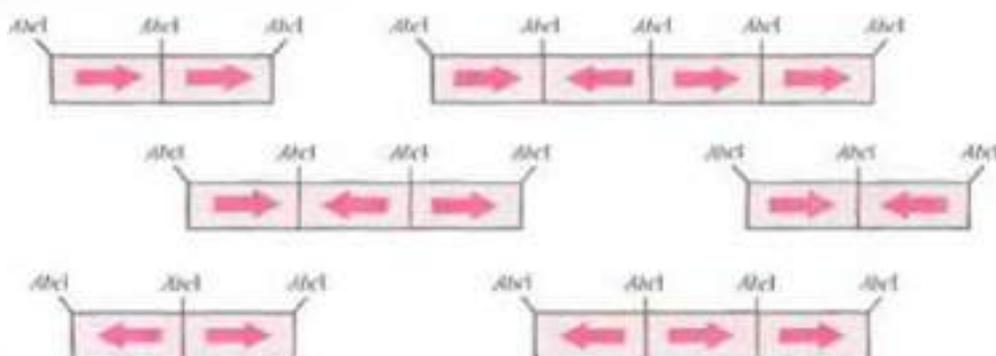


Рис. 6.11. Образование случайно ориентированных тетрамерных векторов. а. Клонирование генов вращением во вращающемся векторе с помощью рестриктазы *AclI* и вставка их векторной ДНК. б. Стадия димеризации, при которой происходит соединение линейных генов. Поскольку нулевые последовательности образуются в обоих направлениях, последние могут соединиться в любой ориентации. В результате образуются тетрамеры 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 эндонуклеаза *AclI*; кроме того она не требует, чтобы в гене-мишене отсутствовали *AclI* и *EcoRI* сайты.

Уже только лишь экспериментально, что уровень экспрессии генов интерферона *h*сегмента телячьего увеличивается пропорционально числу tandemных копий гена, но крайней мере до четырех копий на плазмиду. Однако tandemные копии никогда оказываются стабильными и со временем векторы или сами или даже все утрачиваются клетками.

## 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 *ori*), в результате в клетке будут присутствовать сотни или даже тысячи копий одной молекулы и лишь несколько копий другой.

Различия в транскрипции сайтов — во крайней мере частично — из-за существующей в транскрибирующей РНК структуры инициального триплекса, называемого сайтом связывания рибосомы. Сайт связывания рибосомы — это

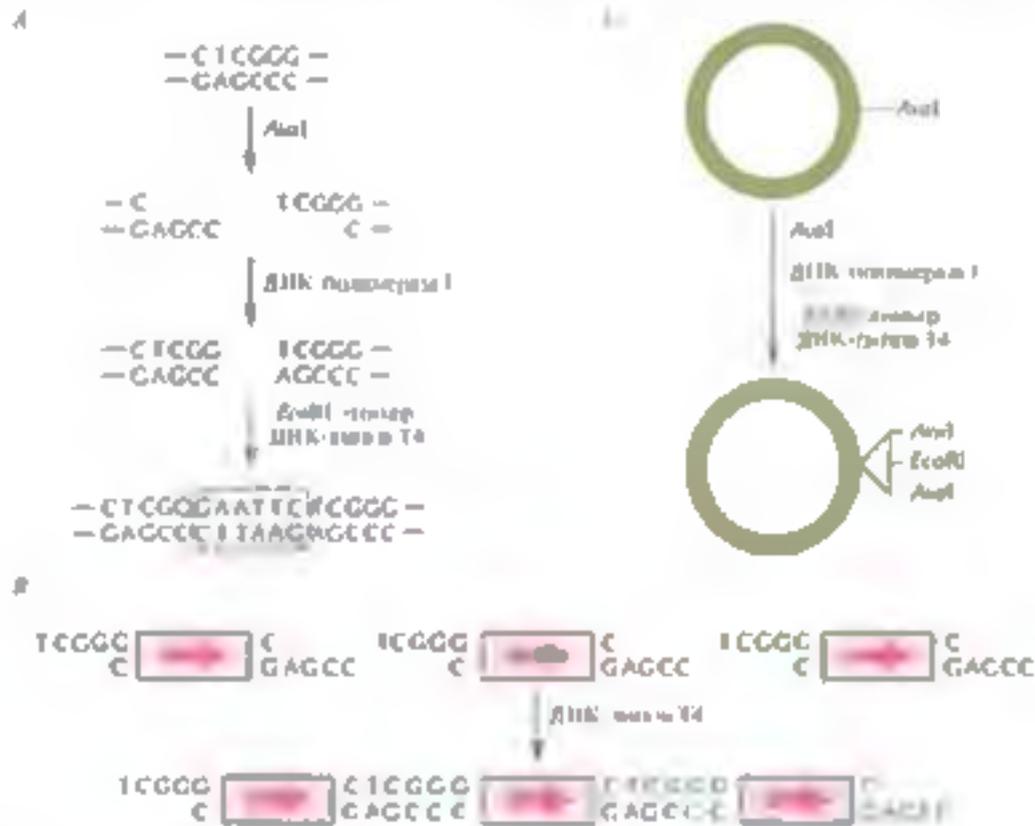


Рис. 6.12. Конструирование несимметричной вилки (ска) в одной плоскости. **A** Соединение вектора Плазмиды ретровируса (с AclI-сайтом) и образование вилки (ска) с помощью ДНК-полимеразы I и EcoRI. К туловищу вилки присоединяется EcoRI-линкер, который лигируется с вектором. **B** Обработка вектора AclI-лигазой (ска) и получение вилки



Рис. 6.13. Внутримолекулярное спаривание в молекуле мРНК, при этом туловище вилки (ска) (ска) транскрипции, GGGGG сайт связывания рибосомы, AUG (красные буквы) – инициирующий шаблон, CAG-CAU-CAU-UUA UUU – несколько первых кодонов. Обратите внимание, что в отличие от мРНК у мРНК мРНК A U и C-G могут образовывать пары G-C:

## ВАЖНАЯ ВЕЩА

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

H. A. OsVest, J. J. Cantowick, M. Yimov  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66: 71-75, 1969

Присутствие в конструируемом *lacZ*-промоторе, не влияя на его активность, не способно создать новое или изменить уже существующий регуляторный промоторов еще более сильного промотора, способного обеспечить высокий уровень экспрессии мутантала белка. Когда они изучали свои исследования, функциональные последовательности белочности (сигнальные последовательности промоторов, а именно) впервые *E. coli*, были уже установлены, однако конкретные механизмы, обеспечивающие их эффективность, остаются неизвестными. Было отмечено, что почти все мутации, влияющие на силу промотора, локализованы в 10 или в 35 областях (названных по расположению 10 и в соответствии с 35 и в том же направлении транскрипции). Бл

же 2010 сайт промотора унаследован (или не мутации, в результате которых последовательности последовательности участка общей приблизительной (комбинированной 5'-TATAAT') для 10 и 35 TTTGACA') для 35-областей. Эти две последовательности были получены путем сравнения последовательностей регуляторных последовательностей промоторов и идентификации наиболее часто встречающихся нуклеотидов. Не было известно, что у промотора *lacZ* 35, более сильное паритета *lac* промотора, - 10-область имеет высокую нуклеотидную идентичность, а 35-область - нет, а у *trp*-промотора, в норме контролирующего транскрипцию *trp*оперона, наоборот, ситуация

как раз обратная. Эти результаты были приняты как конструируемый функциональный промотор, у которого 10 областей (последовательности) от *lac*-промотора, и 35 от промотора *trp*. Эти сайты, как регуляторный *lac*-промотор был проверен на способность контролировать синтез фермента галактозидазы *E. coli* (в сравнении с *lac* и *trp* промоторами и теми же участками). Как и ожидалось, *lac*-промотор оказался гораздо более сильным - примерно в 5 раз по сравнению 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 M101 фактом образом, т.е. *lacZ*-промотор был не только более сильным, но и регулируемым

последовательность из шести-восьми нуклеотидов (например, UAA(G)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 иницииции 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 кода 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 клонированных рекурсивных генов в *E. coli*. Одной из таких систем

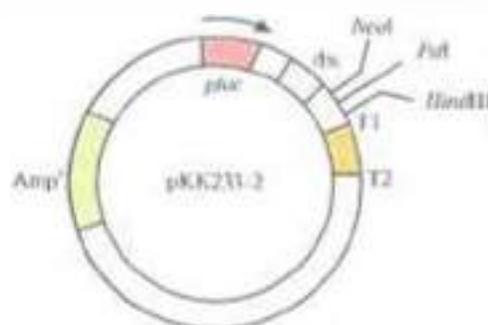


Рис. 6.14. Экспрессирующий вектор на основе плазмиды pKK233-2 (без субкладной массы) (С) со жгучим или устойчивым к ампициллину ( $Amp^r$ ), индукцибельным белком-маркером  $lacZ$  (примечание:  $lacZ$ -участок связывается рибосомы ( $rib$ ), три сайта для рестрицирующих нуклеотидов ( $Acl$ ,  $PstI$  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-колон ATC, расположенный на расстоянии восьми нуклеотидов от сайта связывания рибосомы;
- сайты терминации транскрипции T1 и T2 (на 12).

Клонированный ген встраивают в  $Acl$ -,  $PstI$  или  $HindIII$  сайт, расположенный между сайтом связывания рибосомы и сайтом терминации транскрипции. Если сайт ранка синтеза не попадает «в ногу» с кодоном ATC, то целесообразно 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, исключительный ориентационное соответствие с РНК при любых обстоятельствах. По тому же опыту на области инициации трансляции как бы она ни была оптимальна, не может за-

рантировать эффективность трансляции всех клонированных генов. Таким образом, опытные ученые чаще экспрессирующие векторы — это только основа для создания оптимальной системы трансляции.

Эффективность трансляции может зависеть во многом и «несовместимости» клеток, используемых для того, что в клонированном гене имеется 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 приложенного гена. Как решить эту проблему? Несмотря на то, если продукт клонированного гена очень ценен, можно попытаться осуществить синтез белка этой партией клонированного гена, хотя бы в составе из колоний, обычно используемых количеством организмов (состоянии) колоний.

## С табелизация белков

События кризиса популяции белков происходят на нескольких минут для нескольких часов. Такая нестабильность обуславливается разницей в числе дисульфидных связей в белковых молекулах и наличием или отсутствием на 5-конце сайта распределения аминокислот. Например, если к N-концу  $\beta$ -галактозидазы присоединить разные аминокислоты, то время жизни моноклинированной 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 аминокислот<sup>1)</sup>

Присоединенная аминокислота	Время жизни белка
Met, Ser, Ala	>30 ч
Phe, Val, Gly	>30 ч
Leu, Ile	>30 мин
Ileu, Gly	10 мин
Phe	7 мин
Met, Phe, Arg, I le	3 мин
—	2 мин

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

овая аминокислотный остаток. Долголетние белки накапливаются и клетка, что увеличивает количество выходов продукта. Это характерно для для *gus+*, так и для протенина.

Одним из стабилизирующих белков может не только накапливаться. Так, включение некоторых аминокислотных последовательностей во внутреннюю часть белковой молекулы делает ее более чувствительной к протеслитическому расщеплению. Такие последовательности обозначены остатками пролина (P), глутаминовой кислоты (G), серина (S) и треонина (T), отсюда и их название P[GST]-последовательности. Они часто бывают флюктуирующими: тастером или плавильными ингибиторы аминокислот и, возможно, служат маркерами для протекта. Стабильность белков, содержащих такие последовательности, можно было бы повысить путем изменения в соответствующие темы. При этом, однако, необходимо полагаться о том, 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. Кроме того, поскольку кислород растворяется очень медленно, трудно достичь простым продуванием через среду воздуха или кислорода даже при интенсивном перемешивании. При уменьшении концентрации кислорода экспоненциальный рост замедляется и культура медленно переходит в стационарную фазу, характеризующуюся другим метаболическим статусом. Одним из последствий этого является образование в клетках протенина, которые могут расщеплять белок-мишень. Проблему выращивания культуральной среды пытались решить разными способами: и снижением концентрации кислорода, и увеличением интенсивности продувания воздуха и перемешивания, добавлением в среду веществ, увеличивающих растворимость кислорода. Все это, однако, не привело ни к каким существенным результатам.

### Применение латискал шиммюв с дефицитом протенина

Одним из возможных подходов стабилизации чужеродных белков, синтезируемых *E. coli*, состоит в использовании эукариотических штаммов с дефицитом протеслитических ферментов. Однако здесь есть свои трудности. В клетках *E. coli* синтезируется по крайней мере 25 разных протенинов, а только некоторые из них изучены на генетическом уровне. Кроме того, протенины различны в клетке они не выполняют функцию, различия чувствительные или дефектные белки и естественные темпы или неэффективность клеток. И если бы и различия были сконструированы штаммы, несущие мутации в одном или даже нескольких протениновых генах, и чем более выражен был структурный дефицит по протенинам, тем хуже росли клетки. Таким образом, снижение протенинакой жизнеспособности приводит к истощению клеточных ресурсов. И все же удалось создать штаммы *E. coli*, несущие мутации в теме сайта-функции РНК-полимеразы, ответственной за синтез белков тем нового гена (*prfB*), и в теме протенина, несоблюдимой для роста клеток при высоких температурах (*obgP*), у которых увеличена активность секретурных белков была в 36 раз выше, чем у штаммов дикого типа. Это кажущееся увеличение было обусловлено снижением ингибиционности протеслитического расщепления белков.

### Бактериальный «гемоглобин»

Местомобитанием микробов (штаммов) трихостригательными облигатными аэробными бактериями *Citrobacter* является галлы объединенные кислородом непротеслитические штаммы. Чтобы получить нужное количество кислорода для роста и метаболизма, они синтезируют гемоглобиноподобное вещество, так как еще кислород через жидкую среду и увеличивается концентрация доступного кислорода в клетке. Когда ген, кодирующий этот белок, был введен в клетки *E. coli*, в клетках сразу появились серьезные и повешение повысилась уровень синтеза и точности и резидентивиты белков, возросла эффективность протенина насосов, увеличилась количество образующегося АТФ и его концентрация, особенно при низком содержании кислорода в среде. Чтобы скрыть стретегии можно было не-

использовать применительно к другим млекопитающим клеткам, необходимо, чтобы эти клетки не только эффективно «адресировали «гемоглобиноподобный» ген *β-globin*, но и синтезировали гем составляющий гемоглобиновый молекулы. 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 синтезу белков, 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 своего «плазмида» обычно растут быстрее тех, в которых они сохранились, и в конечном счете оказываются в культуре преобладающими. По истечении нескольких генераций эта ситуация приводит к количеству синтезируемой продукта клонированного гена. Работоспособно и работает мерц для перехода к решению этой проблемы. В лабораториях условия для сохранения плазмиды клетки выживающих и преимущественно инкубировать или стабилизировать, обеспечивая лишь рост тех клеток, в которых есть плазмиды. Однако дополнительные инкубации и введение других веществ в культуру, выживающиеся в больших объемах, или в промышленные ферментеры приводит 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 без плазмид 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 процесс интеграции состоит в следующем:

1. Идентификация подходящего сайта интеграции в 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 под регулируемый промотор 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 инкрементально и митозом, несущей кинетическими генами в середине клонированного фрагмента с хромосомным сайтом интеграции, то может произойти сдвигание между гомологичными нуклеотидными последовательностями плазмиды и хромосомной ДНК (рис. 6.15, А) и в результате интеграции в результате двойного кроссинговера, осуществляемого ферментами клетки-хозяина. Альтернативный вариант интеграции 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

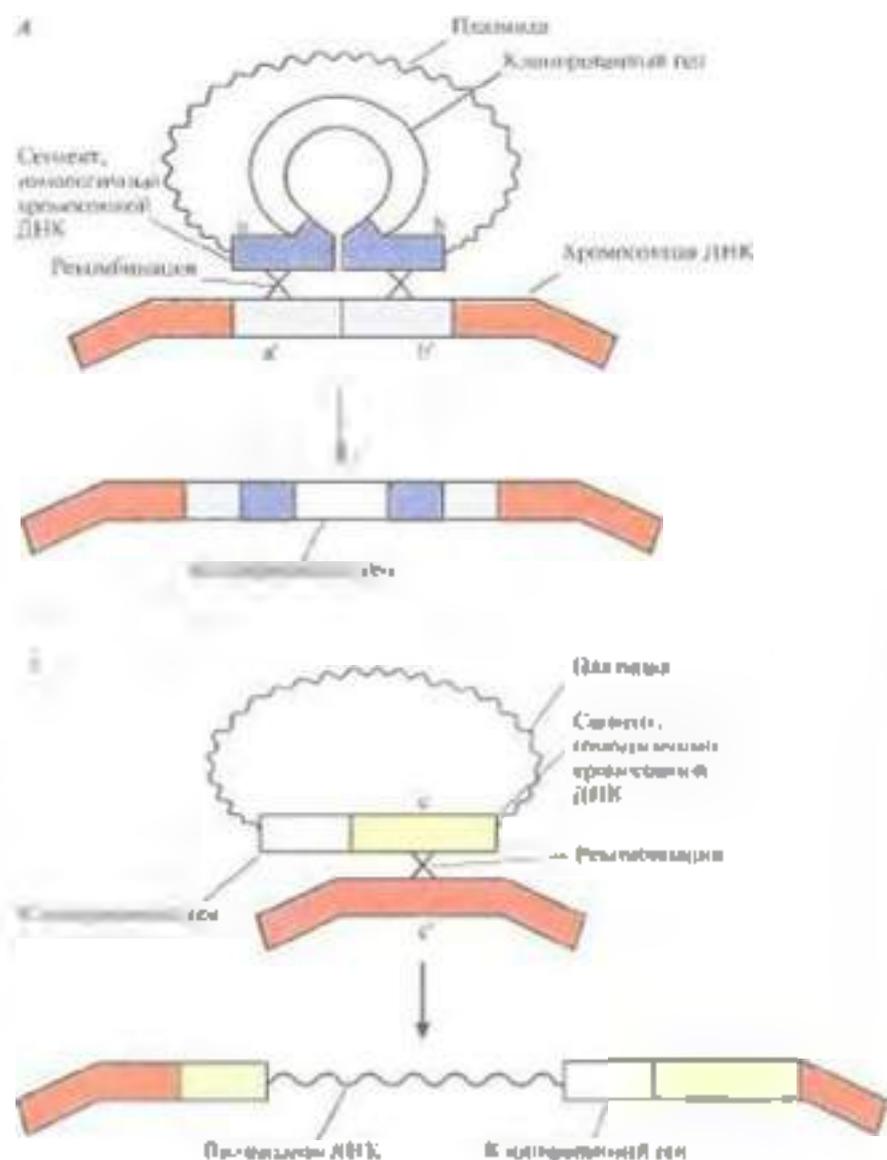


Рис. 6.15. Два способа интеграции генов хромосомально и плазмидный ген в хромосому. А Ген встроен в хромосому хомологичными рекомбинациями в том месте сегмента *ah*, гомологичного сегменту *ah* в хромосомной ДНК. В результате дупликации хромосомы (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) клонированный ген оказывается в составе хромосомы *h*. Ген встроен в хромосому хомологичными рекомбинациями в том месте сегмента *ε*, гомологичного сегменту *ε* в хромосомной ДНК. В результате дупликации хромосомы (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) интегрированный в хромосому ген вместе с участками *h* и *ah* встраивается.

ген встроен вблизи клонированного хромосомного сайта интеграции.

Для проверки эффективности интеграции клонированного гена использовали в качестве базы сконструированную лямбда-фага *E. coli*, содержащую ген *lacZ* (фрагмент участка *lacZ* в плазмиде *λ*) *Bardella aerobidyspharata*, встраиваемый в середину фрагмента ДНК *h* *E. coli*. Она была неспособна реплицироваться в этом микроорганизме, но ей можно было трансформировать культуру *E. coli*. Обнаруженные трансформанты

синтезировали  $\alpha$ -галактозу, что свидетельствует об интеграции гена, кодирующего данный фермент, в хромосому *E. coli*, и о его функционировании. Отобранные с соответствующими были устойчивы к антибиотикам и хлорамфениколу. Поскольку оба гена устойчивости выявились в штамме, было очевидно, что произошла односторонняя рекомбинация, в результате которой носитель плазмиды вошел в хромосомную ДНК *E. coli*.

Чтобы увеличить число копий гена  $\alpha$ -галактозы, появились штаммы в хромосоме *E. coli*, не-

важные транскрипционные элементы и присутствие элазы/фенилаланина в высшей концентрации. В таких условиях выживали только те клетки, в которых происходила спонтанная дупликация интратрифицированных штамма Клетка, отбираемые по признаку жизнеспособности и элазы/фенилаланина, проверяли на активность α-амилазы (табл. 6.5). Целевые гены транскрипции были направлены к секрету, содержащему до 9 единиц гена α-амилазы. Уродами ферментативной активности в клетках, содержащих α-амилазные гены в составе хромосомы, было отмечено, что в том случае, когда эти гены кодируются в митохондриальной ДНК (от 20 до 40 копий на клетку) *S. cerevisiae*.

В одном из исследований несколько копий чужеродного гена были встроены в разные ориентации выбранные сайты в хромосоме *S. cerevisiae*, при этом для каждой из копий использовалась своя специфическая 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*<sup>1</sup>

Число копий на клетку	Активность, E I на культуру, выходящую в течение 24 часов после инкубации, выходы
2	300
5	1500
7	1100
8	1400
9	400
Митохондриальная ДНК	100

<sup>1</sup> На основании данных работы [10].

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

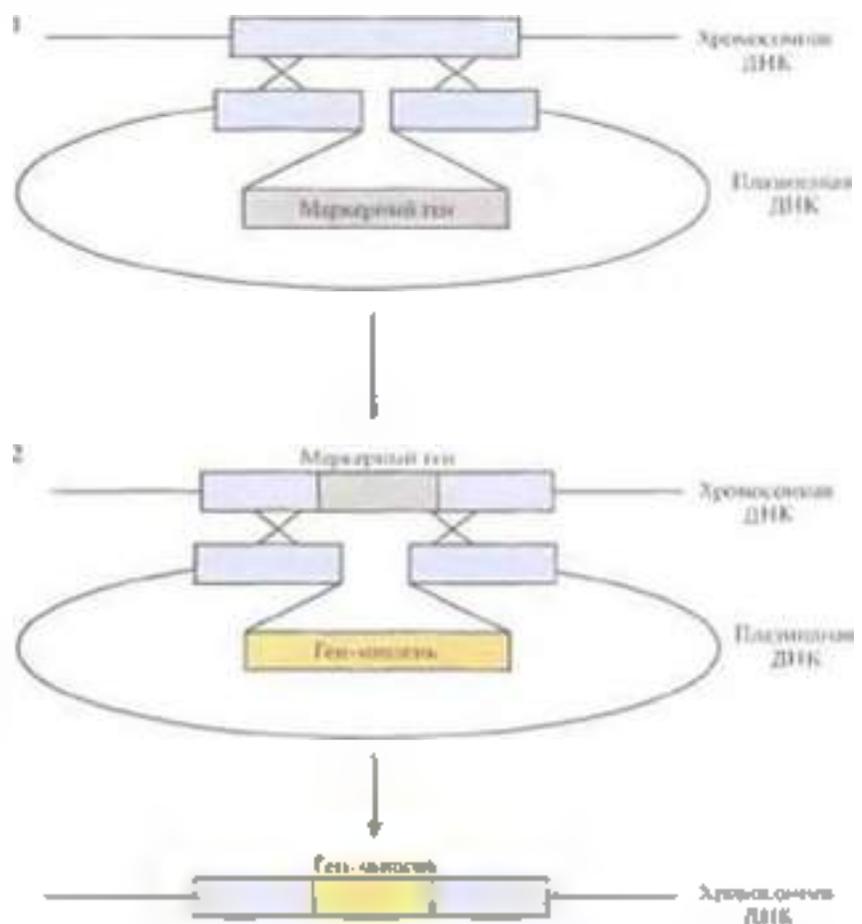


Рис. 6.16. Интеграция чужеродного гена в выходы избранных сайтов в хромосоме *S. cerevisiae*. На этапе 1 маркерный ген в ДНК хромосомы клонирован в плазмиду, содержащую селективный антибиотический маркерный ген. На этапе 2 маркерный ген встраивается в хромосому, а целевую экспрессию нового гена для других сайтов.

иной вектора, не способного к репликации в этих микроразмерах. Выбирали клетки, экспрессирующие маркерный ген, т. е. клетки, у которых этот ген встроился в хромосому ДНК. На втором этапе ген-маркер с соответствующими сигналами инципиции трансляции и транскрипции, введенный в середину того же, как и выше, несущего фрагмента хромосомы ДНК *E. coli* в составе плазмиды, включили в хромосому ДНК с помощью рекомбинации, заменив им маркерный ген. Выбирали клетки, которые уже не экспрессировали маркерный ген т. е. перешли вместе с тем геном, интегрированным в хромосому ДНК. Для интереса другие клетки ген-маркера в хромосому ДНК хламидий клетки повторяли эту процедуру, используя другие несущие фрагменты 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, секретируемые в периплазму или в среду, легче очистить.

Обычно транспорт белков через клеточную мембрану обеспечивается  $N$ -мембрные аминокислотные последовательности, называемые сигнальными пептидами (сигнальными последовательностями, лидерными пептидами). Иногда удается сделать белок секреторным, присоединив к кодирующему его гену нуклеотидную последовательность, ответственную за синтез сигнального пептида. Однако простое наличие сигнала *in vivo* 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. Первый — использовать грамположительных или эти дукарיות, лишенных наружной мембраны, которые способны секретировать белки в среду. С помощью второй стратегии

Если сливние ген-маркера с фрагментом ДНК, кодирующим сигнальный пептид, не привели к эффективной секреции белкового продукта, приходится использовать другие стратегические оремы. Один из таких приемов, с успехом примененный в отношении интерлейкина-2, основывается на сливании гена, кодирующего интерлейкин-2, с геном, кодирующим полиоразмерный предшественник мультисвязывающего белка, а не только его сигнальную последовательность, и разделении этих генов с помощью 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 непрерывно секретировался, то можно попытаться уменьшить активность соответствующего гена.

Некоторые грамположительные бактерии секретируют в среду белок, называемый бактерицином. Он активирует фосфолипазу А, фосфолипазу (лизу) во внутренней мембране бактериальной клетки, в результате чего в наружной мембране становится проницаемой, и не только шти- и периплазматические белки высвобождаются в культуральную среду. Таким образом, можно ввести ген бактерицина в плазмиду так, чтобы он находился под контролем стабильно регулируемого промотора, трансформировать клетки *E. coli* той плазмидой и сделать их проницаемыми. Если же *E. coli* уже несут ген бактерицина, 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 климатрипанного тела будет сел-се-репарирован в среду.

Когда секреторные чужеродные белки образуются в *E. coli* в слишком большом количестве, очень часто процесс их экспорта не все белки-рецепторы: например половина секреторных белков сохраняет пшериру-выявляемость, а другая половина пшериру-принесается с образованием зрелой формы. Это может быть связано с недостатком каких-то белков, участвующих в секрете. В такой ситуации, чтобы увеличить долю экспортируемых белков, можно попытаться повысить уровень экспорта белка, ответственного за синтез митохондриальных компонентов секреторной системы. Для проверки этой предположения были поставлены следующие эксперименты. Плазмид, кодирующую гены *ptd* и *secE*, которые кодируют основные компоненты молекулярного механизма, ответственного за фактическое перемещение белков через мембрану, внедрили в клетки *E. coli*. После такого изменения секреторного аппарата штином в тест для рекомбинантного белка (штином интерлейкин б), секреторность в отношении зрелой формы увеличилась 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 гемагглютинаина, ответственного за секреторность, совместно со структурой под контролем промотора грибов *Aspergillus nidulans*, индуцируемого арабином. После добавления гемагглютинаина в среду с транскрипционными клетками *Aspergillus nidulans* выход секреторного членического интерферона достиг 1 мг на 1 л, что значительно превышает 5% выход секреторного клеточного белка. Эта работа показала, что секреторные механизмы зрелой молекулы, выделенные для *E. coli*, можно использовать и применительно к другим биотехнологическим системам.

### 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 и/или размера гомологии и связанное с этим увеличение количества жертвы, необязательно 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 и/или энергетических ресурсов (в виде АТФ и GTP).
- Перегрузка системы экспорта и нарушение правильной локализации или ингибирования белков хозяинской клетки в процессе «перепроизводства» чужеродного белка, экспортируемого из цитоплазмы в клеточную мембрану или в периплазматическое пространство.
- Наличие у организмов-хозяев необычных метаболических свойств (например, высокая выделительная активность у *Aspergillus niger*), что делает его более чувствительным к различным токсинам, чем обычные клетки.
- Непосредственное влияние чужеродных белков на функционирование хозяинской клетки (например, взаимодействие с их рецепторами или с мембранными, а иногда и токсичные соединения).

Метаболическая перегрузка может приводить к различным изменениям в физиологии и функционировании хозяинской клетки. Одно из наиболее типичных снижение скорости репликации после введения чужеродной ДНК. Так, клетки, содержащие плазмиду, расщепляющуюся, чем метрициллиномицин, не содержащим пшериру (pCB, б б), что часто сопровождается утратой рекомбинантного продукта. 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 клеток<sup>11</sup>

Плотность опресованных клеток $\times 10^6$ (OD <sub>600</sub> ) <sup>2</sup>	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

<sup>1</sup> Измерено с помощью метода OD<sub>600</sub>. Данные взяты из работы [11].

<sup>2</sup> Плотность OD<sub>600</sub> измеряется с помощью A, B, C, D и E, соответственно, в течение 0, 1, 2, 4 и 8 часов роста в среде YEA.

Поскольку у клеток, растущих в условиях метаболической перегрузки, не хватает времени для производства факторов роста, затрачиваются ресурсы не только на метаболические процессы, как факторы роста или синтез белков. Могут уменьшиться также размер и форма клеток, образуются спящие формы (экскистозы) или оптимизация, с которыми клетки справляются с нагрузкой и адаптируются к микрофитотоксину.

Как следствие метаболической перегрузки, обусловленной избыточными питательными веществами и повышенной плотностью клеток или стрессовыми факторами, может возникнуть запуск стрессовых механизмов, в частности инициироваться синтез клеточных протекторов, под действием которых происходит быстрая реорганизация рекомбинантного белка. Неиспользуемые гены или гены могут стать результатом дифференциальной экспрессии не только в кодируемых геноминых, но и генов самих векторов, кодирующих маркеры устойчивости к антибиотикам.

Вероятность транскрипционных ошибок для *1 cod* составляет  $2 \cdot 10^{-4}$ – $2 \cdot 10^{-5}$  на клетку за генерацию. Однако в условиях высокой опресовки можно обнаружить ГРНК, что часто случается при сверхпродукции чужеродных белков, вероятно, вследствие и белковой молекулы непосредственно взаимодействуют вместо недостающего сигнала увеличиваются. Кроме того, точность транскрипции еще больше снижается из-за деградации GTP, который является необходимым компонентом корректирующего аппарата. В одной из работ было показано, что в условиях гиперпродукции фактора роста ингибируются митоз в клетках *1 cod* вследствие ошибочных включений аминокислот в рекомбинантный белок за счет

активации *1 cod*. 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 столбчатую экспрессию, можно минимизировать влияние метаболической перегрузки, ингибируя часть рекомбинантного белка и повысить стабильность трансформированных дрожжевых клеток. На пример, нагрузку можно снизить, если использовать малокопийные плазмидные векторы. А еще лучше избежать отдаления от вектора и отчасти чужеродную ДНК в хромосомную ДНК, ограничивая длину. В том случае не нужно беспокоиться об обеспечении стабильности плазмиды. Кроме того, клетке не придется расходуя свои ресурсы на синтез ненужных продуктов, конкурируя с другими генами за устойчивость к антибиотикам. Синтез привнесшихся генов, входящих в состав плазмидных векторов (маркеры с геноми-миметическими, 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 промотор в две стадии. В первой из них, во время роста, промотор, контролирующей трансскрипцию сам-копии, выключается, а во второй, во время продуции, включается.

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 парадоксально, но одним из способов увеличения количества чужеродного белка, синтезируемого рекомбинантными микроорганизмами, состоит в увеличении уровня экспрессии гена на среднем уровне (так, чтобы на долю продукта приходилось примерно 5% суммарной клеточной биомассы), но при максимальной увеличении плотности 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), пока являются более

эффективными, 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 димол, метил-α-глюкозид. Альтернативным методом состоит в использовании клеток *E. coli*, lacking мутантно 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 результаты достигают примерно двукратной величины.

Достичь максимального 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*

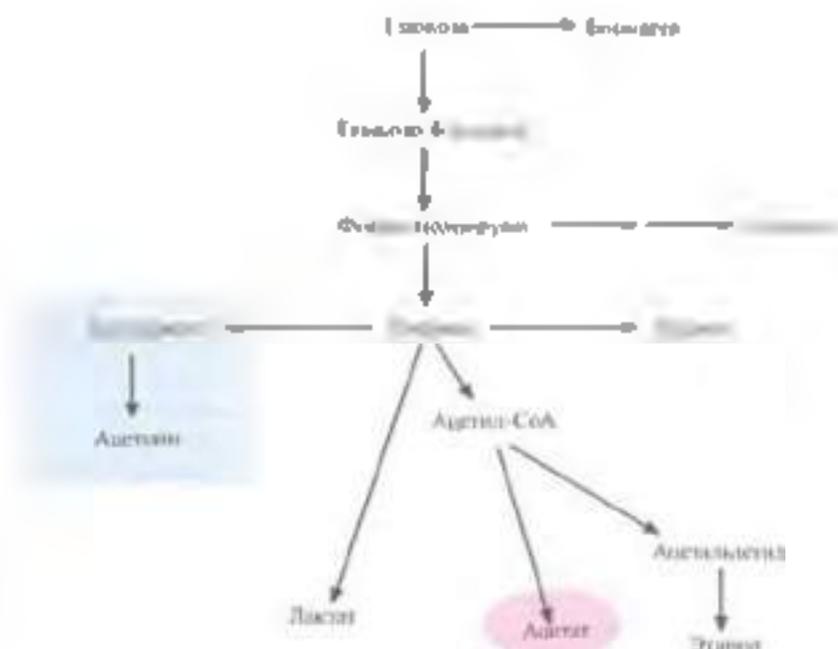


Рис. 6.17. Синтетические про- ставленные метаболиты на примере *E. coli* при ферментации на глюкозе, продуцирующей метаболиты, продуцирующей метаболиты

тимо, кодирующей митохондриальной ДНК формирует эти мРНК образующиеся протеокиназы и полиуриты, что приводит к уменьшению количества образующихся митог (рис. 6.17). Гены митохондриальной ДНК в клетках в составе одной популяции, в том числе и в составе другой, из другой группы несовместимо сги. Трансформированные клетки синтезируют гораздо меньше митог, чем нетрансформированные; вместо митог образуется митогин, особенные примеры в 30 раз меньше глицерола, чем митог.

## 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 — терминаторная зона. Кодирующая ген часто бывает длиннее (как сигнальная последовательность), и для его экспрессии в прокариотической клетке-хозяине нужно обеспечить и то, и другое. Кроме того, поскольку для решения биологических задач белок должен образовываться в больших количествах, необходимо использовать промотор, который позволял бы получить высокий уровень транскрипции (сильный промотор) и стабилизация мРНК-полимераза хозяинской клетки. Настоящая транскрипционная контрольная зона включает 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 разрывные белковые продукты или обеспечить его секретацию, кодирующие гены, которые кодируют этот белок, подвергают инверсии и метаболитам. Это может быть присоединение сайта связывания рибосомы перед сайтом инициации транскрипции (который в свою очередь, тоже бывает инверсированным) или ло-

бирование к концу кодирующей гена терминирующей зоны, который обеспечивает быстрое транскрипцию. Если нужно, чтобы белок секретировался, во перед кодирующей геном необходимо встроить сигнальную последовательность, рибосомы которой будут связываться с такой терминирующей.

Еще одна проблема заключается в стабильности белков, кодируемых кодирующей геном. Рекомбинантный белок может расщепляться протеиназами хозяинской клетки. Чтобы избежать этого, можно использовать кодирующей геном обратном, чтобы на N конце белковой молекулы оставался один или несколько аминокислотных остатков. В такой форме рекомбинантный белок уже не подвергается атаке белковой деградации. Кроме того, «инициатор» аминокислоты иногда инвертирует в последующей части аминокислотного белка, инверсия с помощью инвертирования аминокислотной цепи. При этом место соединения аминокислотных остатков так, чтобы по нему можно было связать молекулу (или несколько) ферментов (или других) и использовать их активность в чистом виде.

Большинство микроорганизмов, в том числе и многих насекомых, производят белковые продукты, растут только в присутствии кислорода. Последствия этого видны в том, что при инверсии генов гисте его часть быстро окисляется. Чтобы избежать этого, использовать для инверсии (или инверсии) штаммы, неспособные синтезировать некоторые протеолитические ферменты (?) исключают в геном хозяинской клетки гены, кодирующие геном *Proteasome* sp., который связывает кислород окружающей среды и повышает его концентрацию в клетке.

С увеличением числа копий кодирующей гена увеличивается количество синтезируемого продукта. Однако при перекресте к крупномасштабному производству конструкции «плазмид/кодирующей ДНК» часто утрачиваются. Чтобы избежать этого, разработаны способы интеграции кодирующей 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

перезагрузке. Работают 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.
- Arribas 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. Finley, 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 Modeno, 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. Ribosome 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). *Biochemistry 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-Julian, C. Lazdinski, D. Rutz. 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  $\lambda$  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. Cimak. 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-

- can 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.* 78: 5543-5548.
- Jaspers L. S., J. H. Meesters, A. De Ketzer, 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  $\alpha$ -amylase production by integrating and amplifying the  $\alpha$ -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 RSF1010-derived expression and lac-tet<sup>r</sup> 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: 6797-6812.
- Leemans R., E. Hermant, W. Fiers. 1987. Broad host range expression vector based on the  $p^L$  promoter of coliphage  $\lambda$  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. Lammstaphaug, 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. Möller-Hill. 1985. F-coded, temperature sensitive  $\lambda$  cI<sub>857</sub> repressor gene for each construction and regulation of  $\lambda$  promoter dependent expression systems. *J. Bacteriol* 164: 1366-1369.
- Mieschendahl M., T. Peters, U. Haggli. 1986. A novel prophage independent  $\lambda$  regulated  $\lambda^p$  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  $\beta$ -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* 11: 178-180.
- Krotzki E., H. Tsao, W. Flers, 1983. Improved plasmid vector with thermi-inducible 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. Fountall, 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.
- Sinmons I. C., D. G. Yatsuna, 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 proteinkin synthesized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 93: 561-565.
- Talavage 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  $\beta$ -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 chromosome 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 Opr1 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  $\lambda$  и как его используют?
3. Почему плазмидный вектор с максимальным размером промотором не всегда является наилучшим экспрессирующим вектором?
4. Что такое лос промотор и как осуществляется его регуляция?
5. Промотор  $\rho$  факта  $\lambda$ , способный инфицировать только *E. coli*, тем не менее иногда используется как составную часть экспрессирующего вектора с тиреком кругом клетки. Как «приспособить»  $\rho$ -промотор для иного типа транскрипции и других организмов?
6. Почему стратегия синтеза белка микробной клеткой исключает получение чистых белков и системы измерения продукта. В чем преимущество такой стратегии? Как создают измеритель белка?
7. Что такое чистый белок и как добиться на образований?
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 гена?

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 интеграция плазмидного вектора в хромосому ДНК?
12. Что такое метаболические перегрузки и их основные 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 прокариот синтезировать эукариотические варианты белков обусловлена в основном отсутствием у них эукариотических механизмов экспонирования специфических посттрансляционных модификаций.

Белки в клетках эукариот претерпевают следующие посттрансляционные изменения:

- Образование дисульфидных связей. Это решение катализирует фермент пептилдисульфидизомераза. 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 прокариотические хозяинские 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.





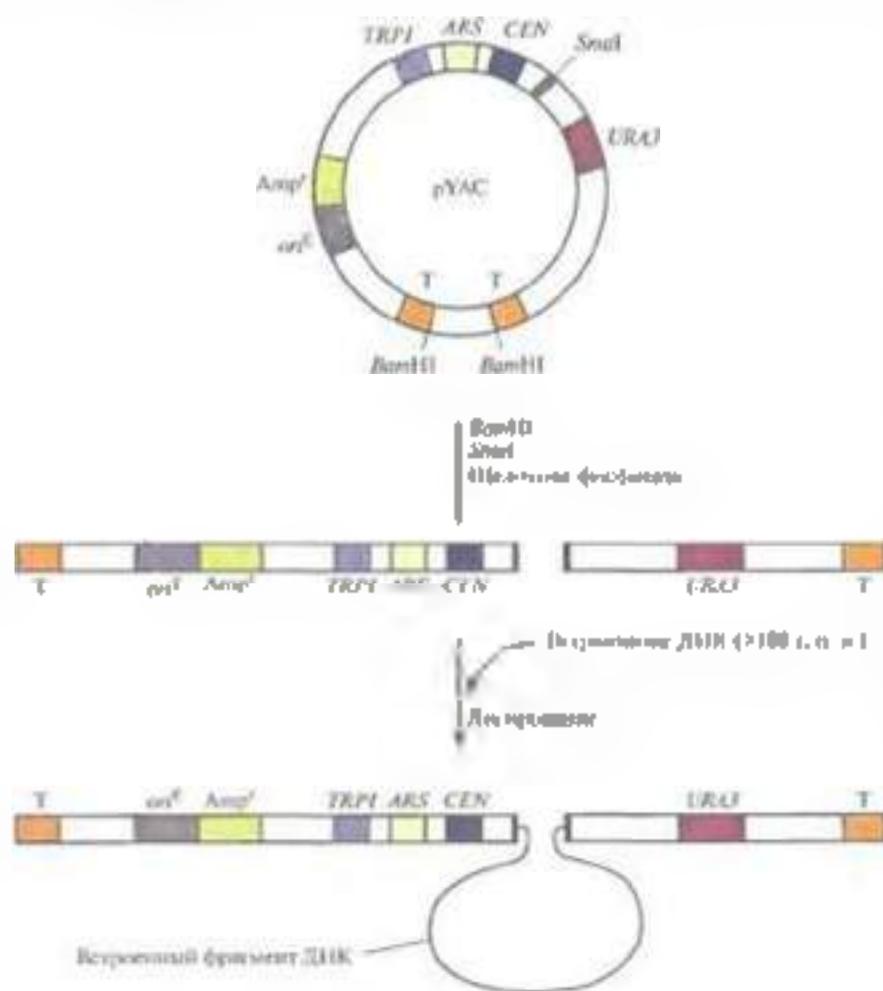


Рис. 7.3. YAC-система в дрожжах. YAC-плазмид (pYAC) содержит следующие маркерные гены: *col* (*Amp<sup>r</sup>*); сайт интеграции репликации, функционирующий в *E. coli* (*ori*); сегмент дрожжевой ДНК, состоящий из участка *URA3*, *CEN*, *TRP1* и *ARS* (*CEN* — центромерность, выполняет роль центромерной функции, *ARS* — выполняет функцию репликации на дрожжевых клетках, *URA3* — один из генов биомаркера дрожжей, *TRP1* — один из генов биомаркера дрожжей) *T* — две тандемные области дрожжевой ДНК. *Smal* — сайт рестрикции; осуществляется кинтирование pYAC с помощью фермента *Smal*. *Bam*HI — рестриктивный фермент, который связывается с фрагментом ДНК длиной 100 т. н. и концами генетической конструкции, образует линейную ДНК и имеет стабильно функционирующие в дрожжах сайты *Leu<sup>+</sup>Trp*

рутся в инфузильные дрожжевые клетки. Несмотря на трудности исследования 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 фермента супероксид-дисмутазы человека.

Супероксид-анион — это побочный продукт утилизации кислорода аэробными организмами. У человека он участвует в стимуляции иммунного ответа фотоситов и задерживании лейкоцитов в месте инфекции. Ошибка при синтезе данного соединения и его проглатывание может вызывать повреждение клеток. У млекопитающих окислительного стрессового воздействия

тех веществ и принимает участие цитоплазматический фермент (Cu/Zn-супероксид-дисмутаза или (Cu/Zn-SOD); он катализирует связывание супероксид-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, кровоснабжение которого было прекращено перед хирургическим вмешательством. Чтобы избежать повреждения клеток супероксид-анионом, исследователи предложили перфузию повторной перфузией антител к ферменту Cu/Zn-SOD. Cu/Zn-SOD может использоваться также для лечения пивной интоксикации жаболовской, или остеоартрита, ревматоидный артрит, склероза и болезни Бехтерева. При этом в

обных 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. Попробуя для получения функционального фермента кДНК *Cu/Zn-SOD* человека была встроена 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 биогенеза железа (*LEU2*), 2) систему закрытыхых с сигналом инициации репликации ЭНК дрожжей, что обеспечивает репликацию плазмиды в дрожжевых клетках; 3) селективный маркер *E. coli*-ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*) 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 сигналы терминации транскрипции и активации транскрипта (*GAPD*).

Этим вектором трансформировали штамм дрожжей, не способный к синтезу лейцина (*LEU2<sup>-</sup>*), и высевали их на среду без лейцина. 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 накапливались большие количества *Cu/Zn-SOD*, в частности, подобно активному

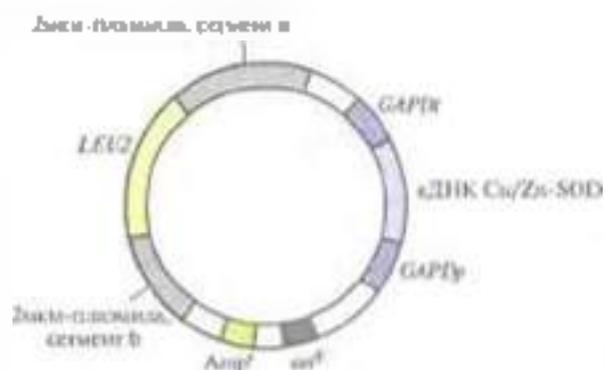


Рис. 7.4. Экспрессируемый вектор *S. cerevisiae* *Med* для примитивной (*GAPD*) и терминации транскрипции (*GAPD*) гена человека *Cu/Zn-SOD* человека. Ген *LEU2*, встроенный в систему экспонирования дрожжей, кодирует генетический функционал железа (*Leu*), устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*) и сайт инициации репликации *E. coli* (*ori*) (рекомбинированный из плазмиды pBR322)

белку из клеток человека, минимальный N-концевой сегмент активен (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 секретиции. Для того чтобы кДНК, которая кодирует интересующий исследователя белок, нужно разместить так называемый пре-про-α-фактор — ядерный (сигнальный) последовательность гена α, фактора секреции дрожжей. 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. Лазерный пептид обеспечивает правильное встраивание белка через липидную мембрану и секреторию, при этом сам он отщепляется дрожжевой эндопептидазой, удаляющей пептид *Leu-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  $\alpha$ -фактора, удалив которую можно образовать модифицированный, биологически инертный биоконструкт: он синтезируется и секретруется штаммом *S. cerevisiae*. Этот штамм был выделен из клеток бескультуривного гриба *Hypho-tychomyces*. Этот белок является важным питательным компонентом 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 клиническими исследованиями [2-14] (см. также [4, 13]) из которых вытекало, что сердечные сосудистые заболевания, главным образом ишемические, преимущественно рекомбинантного фактора перед инфарктом. Эти преимущества могут компенсировать высокую стоимость рекомбинантного фактора, так что его применение в клинических исследованиях может быть рентабельным.

Чтобы повысить эффективность секретной рекомбинантной белковой системы штамма *S. cerevisiae*, были предприняты дальнейшие усовершенствования. Так, исключение выщелачивания способствует повышению выхода рекомбинантного фактора с использованием такого природного фермента системы секреции, как дисульфидизомераза, которая обеспечивает правильную укладку белковой молекулы в процессе секреции. Для этого в штамму *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 штамм - суперрепродуктив дисульфидизомеразы ввели тандемную экспрессирующую вектор, несущий ген фактора роста тромбоцитов В человека. Количество секретированного этим штаммом тромбоцитарного фактора

расти В штамме превысило в 10 раз количество фактора, секретироваемого штаммом с нормальным уровнем синтеза дисульфидизомеразы. Суперпродукция дисульфидизомеразы повышает секретную ёмкость штамма с дисульфидными сигналами. Именно такие белки дрожжевой системы секреции может синтезировать количество секреторных рекомбинантных белков 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, обнаружались и другие проблемы:

- При увеличении масштаба системы часто прекращают синтез плазмы, 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 натуральном белке их содержится только от 8 до 13 на остаток. Наличие лишней аминокислотной цепи может влиять биологически активной функции или его иммуногенность.
- Во многих сверхэкспрессируемых белках, которые должны были секретироваться, не самым делом 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 организмов 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 трансформантов колоний. В качестве альтернативы *S. cerevisiae* можно использовать *Aspergillus niger*, 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 в качестве единственного источника углерода и азота.

Схема построения плазмидно-ячеичного вектора *genotype B*

Метанофильные дрожжи *P. doanii* можно использовать в качестве широт выработки в промышленных биореакторах. Из малоизученных в настоящее время штаммов дрожжей можно было бы увеличить выход метанола при помощи гиперэкспрессии белков. Такой подход можно сделать, рассмотрев в качестве примера получение поверхностной пептиды вируса гепатита В (НВсА<sub>g</sub>) с помощью специально разработанных систем с использованием интегрирующей вектора. Сначала ген *HBsAg* встроили между промотором (гена аденовирусной I (*AOX1p*) и сигналы ускорения транскрипции/трансляции (*AOX1p*) того же гена (рис. 7.5). Регуляция активности гена *AOX1* *P. doanii* осуществляется с помощью метанола. В

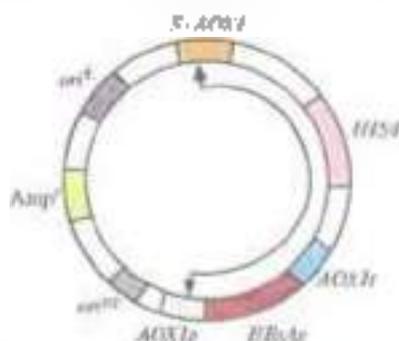


рис. 7.5. Интегрируемый экспрессирующий вектор для *P. doanii*. Между промотором (*AOX1p*) и сигналом терминации трансляции (*AOX1p*) ген аденовирусной I *P. doanii* встроили ген *HBsAg* гена координатной цепи из фрагмента вирусной оболочки, который кодирует белок оболочки. Кроме того, вектор содержит сайт ампициллиновой резистентности *P. doanii* (*Amp<sup>r</sup>*), ген устойчивости к ампициллину (*Amp<sup>r</sup>*) и сайт терминации репликации, включенный в *ori* (*ori<sup>+</sup>*). I *AOX1* — это фрагмент 3' конца гена аденовирусной I *P. doanii* (предложен указанным сегмент, который интегрируется в геном *P.*

еги присутствует на дрожжевых хромосомах (такая же может присутствовать до 30% всех белков клетки, и в отсутствие метанола в клетках дрожжей 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. doanii*; 3) фрагмент ДНК, содержащий сайт терминации репликации плазмиды pBK322 и селективный маркер *Leu<sup>+</sup>* гена; 4) фрагмент 3' *AOX1*, соответствующий интеграции координатной ДНК в определенную сайт терминации 5) активный ген (аденовирусной I (*HIS4*), кодирующий фермент, который участвует в синтезе аминокислоты гистидина. Наличие в этой конструкции последовательностей pBK322 позволяет использовать для работы с ней *Leu<sup>+</sup>* сайт, 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. doanii*. Для этого штамм *P. doanii* *HIS4* с дефектным геном гистидина координатной цепи трансформировали фрагментом вектора, содержащим элементы *AOX1p-HBsAg-AOX1p*, *HIS4* и 3' *AOX1* (рис. 7.5). В результате двойного кроссинговера между *AOX1p* и 3' *AOX1* в клеточной ДНК, с одной стороны, и аденовирусной последовательности хромосомной ДНК, с другой, произошла интеграция последовательностей *AOX1p-HBsAg-AOX1p* в геном, сопровождающаяся утратой хромосомной цепи *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 соответствующий белок *HBsAg* (шкаливающийся в прооплазме. Белкомной протухи образуются такой

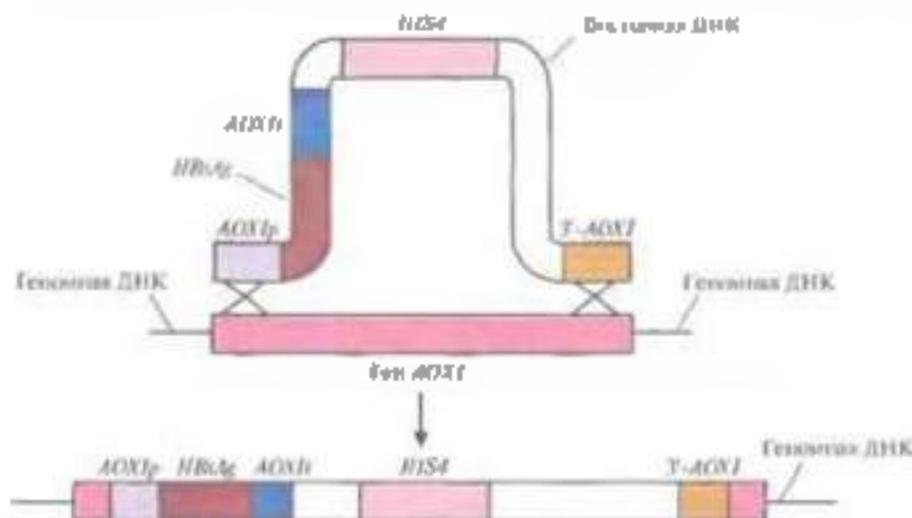


Рис. 7.6. Интеграция части экспрессирующего вектора в ген *альфа-амилазы* на 1 *P. roizotii*. В результате двойной кросс-интеграции между участком *AOX1r* и участками *AOX1r* и *3-AOX1* (неактивная часть рисунка) образовались две генерации вектора в геномную ДНК и участка *альфа-амилазы* (часть гена *HIS4*) хостовской геномной ДНК (нижняя часть рисунка). 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 нуклеиновым ядром вируса. При вирусной инфекции печени кошки в 240-литровой ферментере незначительного количества синтезируемого белка хватило бы примерно на 10<sup>7</sup> животных. При этой генетической конструкции оставалась неизменной в течение 200 часов культивирования в присутствии метанола.

### Синтез бычьего лактогена С2

Способность *P. roizotii* секретировать гетерологичный белок исследовали в системе с использованием  $\lambda$ ДНК бычьего лактогена С2, кодирующей полипептидный белок и его собственный ядерный 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-AOX1r*,

описанному выше, за исключением того, что вместо мультиплицирующей способности *NBVAc* в него была встроена  $\lambda$ ДНК индуктора. Все как и прежде было интегрировано в дефектную копию гена *HIS4* штамма *P. roizotii*. Результате интеграции ген бычьего лактогена оказался фланкирован одним активным (*HIS4*) и одним дефектным (*HIS4'*) генами стрептомидазотетрациклиновой (рис. 7.7). Преимущественно бычий лактоген продуцировался в *P. roizotii* 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,  $\lambda$ ДНК  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина А человека были встроены между промотором (*AOX1r*) и сигналами терминирования транскрипции (*AOX1*) геномной ДНК *Haemophilus reuteri* и во многом друг за другом в экспрессирующий вектор. Через 40 генераций был взят экстракт со случайно интегриро-

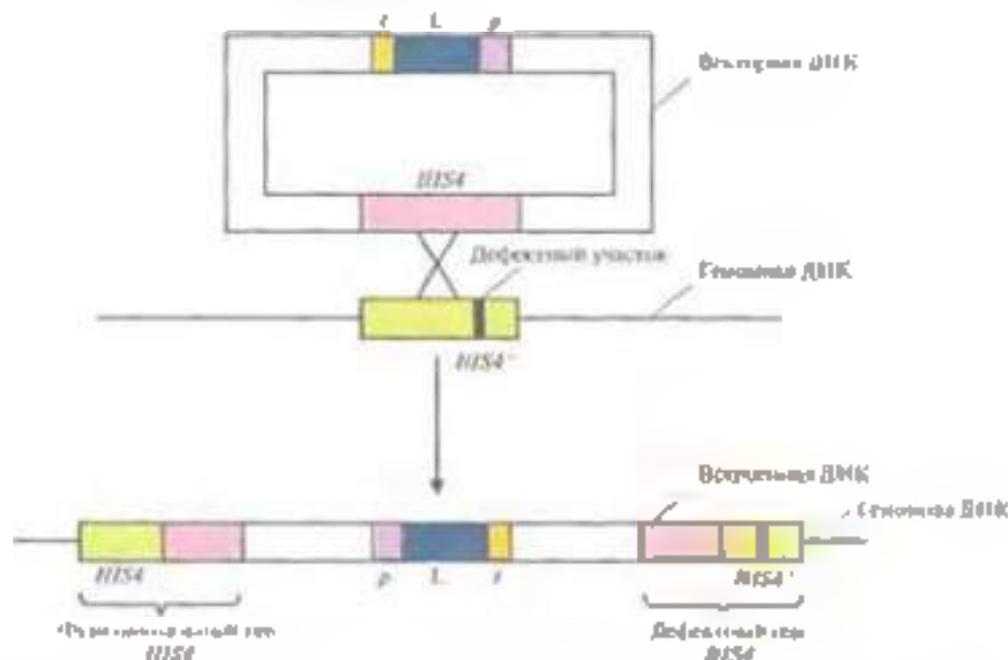


Рис. 3.7. Замена гена экспрессирующего (в данном случае вектора) дефектного участка гена *HIS4*. Р играет в результате кроссинговера между плазмидными генами *HIS4* и геном *HIS4+* клетки-хозяина функцию интерграции в геном при помощи тирамина, который кодируется функциональным функциональным и дефектным генами *HIS4*.  $\rho$ ,  $L$  и  $S$  – промотор *AOX1*, кДНК белково-кодирующая С2 и сайты терминации транскрипции плазмиды марширования симпатетасина. Черная линия – дефектный участок в *HIS4+* гене

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

Долгое время системы экспрессии считали играть важную роль в получении гетерологичных белков для изучения, промышленного и медицинского целей. Однако, как показала инселивания, 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

Инактивируемые инфицируемые 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 полициприном, а сама структура – интипринком. Сшитый полициприн интипринк 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 интипринк белковой

матрицы. Если воспринятый матрицей ориентир прилагивает такую часть, то полиэфирная сольбелка вступает и высвобождается ирионин, способные инфицировать новый инфекционный объект.

Промотор гена полиэфиринг чрезвычайно силен, а лишь в равном вирус не живит и инициати генома гена. Следовательно, имеет последствие (генно чужеродной) белка с последующей инкубацией полученным рекомбинантным бацилловирусом культуры клеток млекопитающего может привести к синтезу большого количества гетерологичного белка, который благодаря существованию системы выскенной выскенной матрицы (или у насекомых и млекопитающих) будет били шок (я во млеко, в клеточной и пятинной форме того белка, который интересует исследователя). Неодна из этого на основе бацилловирусной били (я факультативной) для млекопитающих генов, кодирующих белки млекопитающих и вирусов животного.

Наиболее широко используется вирус млекопитающих ядерного полиэфиринг *Autographa californica* (AcMNPV). Этот бацилловирус инфицирует бабочку *B. mori* (или млекопитающих, в также млекопитающих в культуре многих клеточных линий). Линии клеток, обычно используемые для работы с рекомбинантным AcMNPV, получают в присутствии *Xenopus laevis*. Промотор полиэфиринг в этих клетках чрезвычайно силен, и при их заражении бацилловирусом легко типично вырабатывают большие количества белка.

#### Система экспрессии генов в клетках на основе бацилловируса

Первым шагом в конструировании рекомбинантного бацилловируса AcMNPV состоит в создании трансгенного вектора. Трансгенный вектор — это фрагмент ДНК, содержащий фрагмент ДНК AcMNPV (рис. 7.8), который включает: 1) промоторную область и регуляторную (через неё обеспечивается ДНК AcMNPV, необходима для комплементарной рекомбинации с AcMNPV); 2) сайт для клонирования; 3) сайт терминации полиэфиринг (ген полиэфиринг и присоединяется к нему последовательность ДНК AcMNPV — амфитерминация, обеспечивающая гомологичную рекомбинацию с AcMNPV (рис. 7.8)). Клонирование обеспечивает ген полиэфиринг.



Рис. 7.8. 4-местные предвекторы являются на основе трансгенного вектора на основе бацилловируса (AcMNPV). Ген полиэфиринг встраивается в сайт рекомбинации (R) между промотором (P) и сайтом терминации (R). Перед терминацией (с сайта терминации) транскрипция направляет фрагменты ДНК AcMNPV (5' AcMNPV ДНК и 3' AcMNPV ДНК) с помощью (с сайта терминации) обеспечивающие инициацию синтеза выскенной ДНК AcMNPV (с сайта терминации) рекомбинантной ДНК (с сайта терминации).

значительного фрагмента удалена. Интересующий исследователя ген встраивается между промотором и сайтом терминации геном полиэфиринг и может клонироваться в *E. coli*.

Культуры клеток млекопитающих, трансфицирующую ДНК AcMNPV, трансфицируют трансгенным вектором, содержащим клонированный ген. В некоторых случаях трансфицируемые клетки трансформируют двойной комплексный, в результате которого клонированный ген вместе с промотором и сайтом терминации трансформируется в ДНК AcMNPV (рис. 7.9) с помощью геном полиэфиринг. Вирсоны, не содержащие этого геном, образуют в клеточном лизате, из которых можно выделить рекомбинантный бацилловирус.

Нагрозная и специфичная амплификация — эффективная и субстанционная процедура. Вместе же для амплификации рекомбинантного бацилловируса можно использовать ДНК-матрицу (или матрицу млекопитающих) и использовать матрицу (МТР). Кроме того, если под контролем промотора бацилловируса, в частности в равном и для лизата геном полиэфиринг цикла, поместить ген *lacZ* / *l. coli*, кодирующий β-галактозидазу, и такую конструкцию встроить в фрагмент ДНК, встраивающийся в геном AcMNPV, то в присутствии соответствующего субстрата β-галактозидазы в клетках с рекомбинантным вирусом окрашиваются в синий цвет.

Гетерологичный белок, синтезируемый в культуре клеток млекопитающих, животных, растений

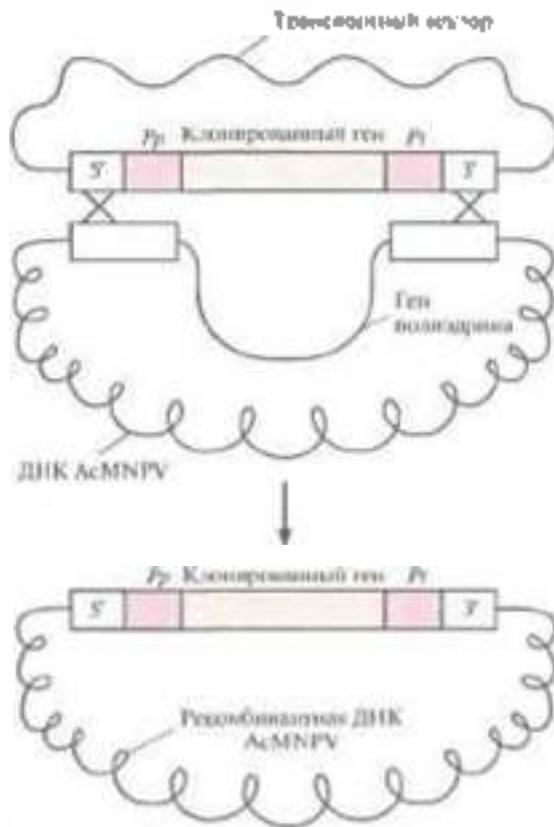


Рис. 1.9. Замена гена полидраины AcMNPV единичной экспрессией транскрипционной единицы в результате не направленного кроссинг-овера в 5' и 3' участках

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 конфигурации (рис. 7.10).

**Получение рекомбинантных бациловирусов**

Исходная методика получения рекомбинантных бациловирусов в дальнейшем была изменена по ряду причин. Во-первых, применение промотора гена полидраины имеет ограничения: белки, синтезирующиеся на поздней стадии литического цикла, часто оказываются модифицированными не до конца. Для решения этой проблемы промотор гена полидраины заменили одним из сильных промоторов AcMNPV, активно функционирующим с самого начала и до конца литического цикла. Во-вторых, дивергенция генов AcMNPV перед трансфекцией клеток искусственно увеличивает долю живых личинок с рекомбинантными вирусами. Расселение 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 трансформационным вектором образуется замкнутая кольцевая молекула, которая обладает инфицирующей способностью. Чтобы обеспечить стабильную дивергенцию в каждом эксперименте, в геном AcMNPV ввели еще один промотор нестроити уникальной сайт для рестриктазы *Bam*HI. В результате доля зон личинок с рекомбинантными бациловирусами увеличилась с <1% (если использовались неспецифические концевые молекулы AcMNPV) до примерно 30%.

Антигены	Ферменты	Белки вируса
Антиген чумы	G-белок чумной инфекции	Множественные полипептиды антигена
Антиген вируса сыпной оспы	Белок оболочки (НВ-1)	Белок – переносчик лекарственного вещества
Противостолбнячной анатоксин	Гематин вируса HSV	Белок оболочки вируса
Иммунотоксин	Иммунотоксин человека	1 конспиративный вирус герпеса человека
Белок родостан	ДНК-полимераза и матрица	1 конспиративный вирус бешености
Антиген вируса свиньи чумы	Витамин D-зависимый белок человека	Антиген герпесвирусной инфекции человека
Регулятор проницаемости мембран	Гемоглобин человека	Антиген вируса гепатита B человека
Антиген вируса кори	Интерферон 2	Антиген вируса гриппа человека
	Белок вируса Лейша	

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



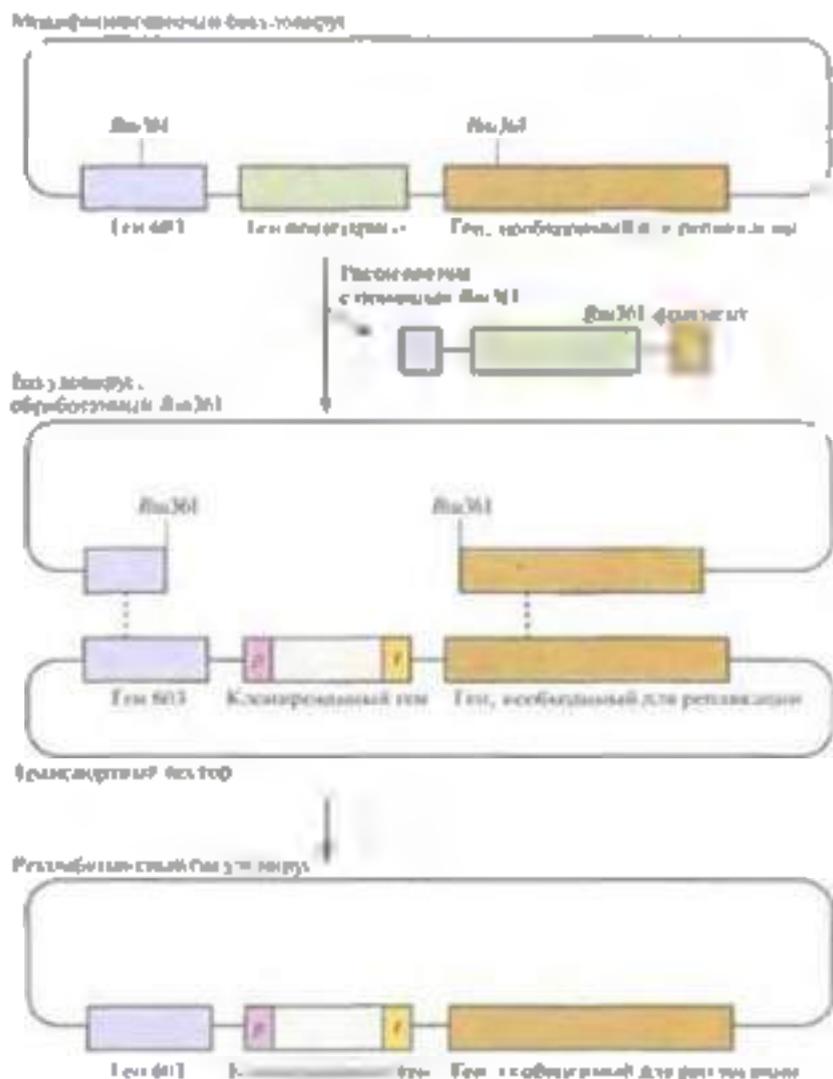


Рис. 7.11. Получение рекомбинантных бакуловирусов *Bombus terrestris* AcMNPV, в частности в гене *F* (F) и гене ORF162, необходимый для репликации бакуловируса в клетках насекомых, инструментом по аналогии *Bm161* сайту. Эти сайты (интегрируют ген полиэдрина AcMNPV) индуцируют рекомбинантный бакуловирус с *Bm161*, в результате чего выделяется фрагмент, необходимый между *Bm161*-сайтами. Трансформируют клетку насекомого, вирусом бакуловирус, который был обработан *Bm161*, трансформирующим вектором с клоном целевого гена, флаксмированной промотором (*P*) в клеточном терминирующем (транскрипции) (и ген полиэдрина, а также с полноразмерным геном *F*) и геном, необходимым для репликации. В результате формируются рекомбинантные бакуловирусы с функционирующей геном, необходимым для репликации. Выпуск рекомбинантных бакуловирусов в чужой системе (система *Bm161*).

клетки *B. terrestris* как плазмиды и ответственная за образование и трансформированный участок насекомого бакуловируса. Челюстной векторы (в основе бакуловирусов для *B. terrestris* клеток насекомого) являются бакуловирусами.

Система на основе бакувирирования клетки насекомого плазмиды *B. terrestris*, который между промотором и сайтом терминирующего полиэдрина (структурный ген-мишень (плазмид-донор). И донорный вектор (или устойчивость к тетрациклину и другие экспрессии ген-мишень) функционирующими нужными последовательностями, которые

совместимы с сайтом интегрирования баквируса, в ген устойчивости к тетрациклину (таблица 7.12, б). Реконструкция между соответствующими сайтами в донорной плазмиде и баквирусе может происходить только в присутствии модифицированных белков (белков транскрипции), которые в этой системе кодируются (вырабатываются) *B. terrestris* (клеточной-инфекцией), несущей сайт и ген устойчивости к тетрациклину (рис. 7.12, б).

Бактериальные клетки, несущие баквирусы, трансформируют одновременно плазмидой-до-

мощности и донорной плазмидой. В некоторых двойных трансформантах фрагмент ДНК, ограниченный двумя сайтами интеграции, встраивается в сайт интеграции фажины (рис. 7.12, б и в). Встраивание фрагмента донорной плазмиды с единичной копией гена и геном устойчивости к

тетрациклину и сайт интеграции вызывают нарушение рамки считывания гена *lacZ'*. В результате бактерии, несущие рекомбинантные (со встроеной) бакциды, образуют белые колонии в присутствии индуктора β-D-галактопирозина (ИГГТ) и 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галак-

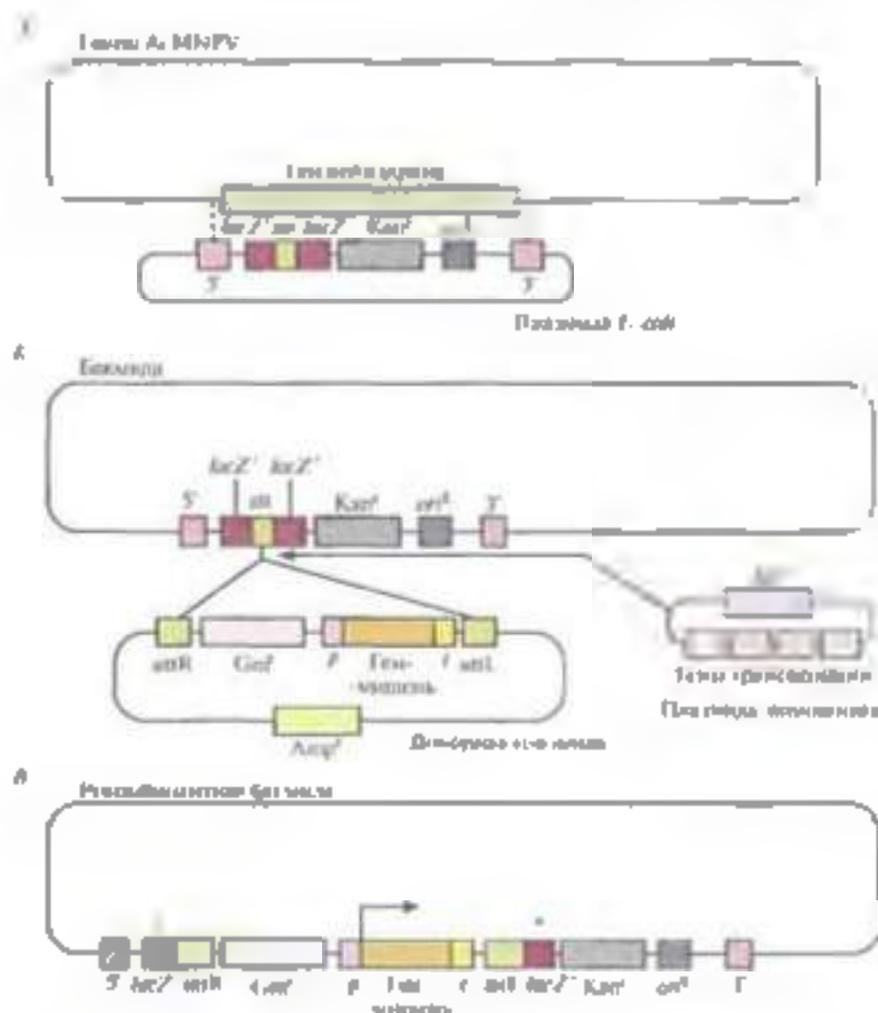


Рис. 7.12. Получение рекомбинантных бакцидов. А. Плазмиду *E. coli* встраивают в геном  $\lambda$ СМNPV с помощью двойного кроссинговера (инвертированные линии) между ориентными ДНК (5' и 3'). Фрагментуемого гена подлинно удаляют, с образованием частично вектора, содержащего 2 репликационные кода в *l* *col*, *kan<sup>r</sup>* и в *l* *col* (два инвертированных) встроиваемых плазмидных ДНК обеспечивают ген устойчивости к канмицину (*kan<sup>r</sup>*), сайт интеграции (*attR*), инвертированный без нарушения рамки считывания в последовательности *lacZ'*, и сайт инцизиции репликацией *E. coli* (*ori*). Б. Фрагмент донорной плазмиды, ограниченный двумя сайтами интеграции (*attR* и *attL*) и несущий ген устойчивости к тетрациклину (*kan<sup>r</sup>*) и ген репликации под контролем промотора (*p<sub>l</sub>*) и сайт терминации транскрипции (*t<sub>l</sub>*) встраивается в сайт интеграции (*attR*) бакциды с типичными белками трансформации, образуя плазмидно-комбинанты. Плазмиды-помощницы и векторы плазмиды несут гены устойчивости к тетрациклину (*kan<sup>r</sup>*) и антибиотик (*amp<sup>r</sup>*) соответственно. В. Рекомбинантная бакцида содержит дефектный ген *lacZ'* (4'). Условий герцельных обозначений сайт инцизиции транскрипции канмицинового гена (красная стрелочка) и гена репликации (красная стрелочка).

тепличной (X-Gal) Tc<sup>r</sup> из инт., которые устойчивы к канамичину и чувствительны к митомицину и тетрациклину, несут только рекомбинантную бакцинду, или же донорную (сызунду и плазмиду-мичоничину). В наличии остатка клоноингибирующего гена после всех этих манипуляций можно убедиться при помощи ПЦР. Далее рекомбинантной бакциндой можно трансформировать клетку насекомого, в которой происходит транскрипция эукариотического гена и синтез рекомбинантного белка.

Для создания экспрессирующей векторы на основе бакцилофусов используются и другие подходы. Один из них предполагает проведение жкт-клеточногенеральной миксупуляции с вирусом AcMNPV в дрожжевых клетках с целью введения в последующий этап клетку рекомбинантно бакцилофуса в клетку насекомого. В другом — кодирующая конструкция «клоноингибирующий-геном AcMNPV» включается систему рекомбинации *in vitro*, основанную на матрично-встраивании ДНК бакцилофуса P1, включая такую конструкцию (напрямую) трансформируют клетку насекомого.

#### *Выделение рекомбинантного белка из клеток насекомых с помощью аффинного связывания*

Для выделения специфически тетраалогичных белков из клеточных экстрактов и их смесей секретируемых белков можно использовать разные подходы. Один из них основывается на приращивании к клоноингибирующему 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 клоноингибирующим геном был встроено — без нарушения рамки считывания — сегмент ДНК, кодирующий шесть остатков гистидина (His<sub>6</sub>), специфичный участок кодирующей цепи аминокислот, и сайт

расщепления протеиназой из группы аминокислот; полученный рекомбинантный белок выделяли триацетатрафией на колонке с ионообменной Последовательность из шести остатков гистидина (гексагистидин) считали здесь важным пикетом, и рекомбинантный белок выделялся в колонке. Для клоноингибирующего конкурентного соединения (например, канамидин), который взаимодействует с гистидин пикетом, был использован рН буфер для аффинности между отщепления с помощью протеолитического фермента (трипсин или) и очищения рекомбинантного белка от нее и от протеиназы триацетатрафией. Если рекомбинантный белок не предполагается использовать в мембранных целях, можно не отщеплять гексагистидиновую последовательность, поскольку обычно она не влияет на структуру и функцию белка.

Было разработано несколько вариантов метки. Среди них — глутаминирансформация, белок, специфичный метки, и короткая аминокислотная последовательность — аминокислоты аспарагин, которые связываются специфически с глутамином, метки и специфически ингибируют. Используются и другие сайты расщепления, специфичные для трипсина, трипсинолит 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**

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

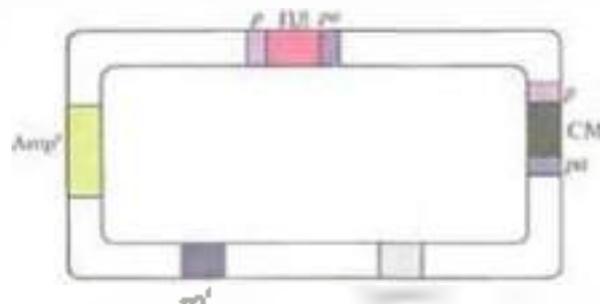


Рис. 7.13. Схематическая схема экспрессирующего вектора для репликации. Пуши инкер (PI) и селективный маркер (CM) кодируется под контролем эукариотического промотора ( $P$ ) и сигнала полипецирования ( $\text{pol}$ ). Репликация вектора в  $E. coli$  в клетках млекопитающих осуществляется с помощью инициации репликации  $\text{ori}^1$  и  $\text{ori}^2$  соответственно. Для отбора трансфицированных клеток  $E. coli$  используется тем устойчивости к ампициллину ( $\text{Amp}^r$ )

Вектор, представленный на рис. 7.13, содержит эукариотический сайт инициации репликации вируса дикотилы (например, обертывающего вируса 40 [SV40]). Промоторы клонированного в селективного маркерного генов, а также ик-сигналы терминатора транскрипции (сигналы полиадактирования) должны происходить из клеток эукариот; обычно используют регуляторные последовательности ДНК вирусов дикотилы (например, пикомоголовируса человека, SV40 или HSV) или генов млекопитающих (например, гены  $\beta$  гистона, металопротеиназа, тимицидиназы или бычьего тормоза роста). При этом более предпочтительны сильные промоторы и эффективные сигналы полиадактирования. Последовательности, необходимые для отбора и амплификации экспрессирующего вектора млекопитающих в  $E. coli$ , приспосабливают стандартно клонирующего вектора  $E. coli$  (на пример, плазмиды pUC332)

#### Селективные маркерные гены

Для отбора трансфицированных клеток млекопитающих часто используют бычьего гистона гена Neo<sup>r</sup>, кодирующий неомизинфосфотрансферазу. В этой системе применяется токсичное соединение генетинин (G 418), блокирующее транскрипцию в трансфицированных клетках млекопитающих. При этом в трансфицирован-

ных клетках G 418 фосфорилируется неомизинфосфотрансферазой и инактивируется. Следовательно, выживают и пролиферируют только клетки, синтезирующие продукт гена Neo<sup>r</sup>.

Другая система отбора трансфицированных клеток млекопитающих основана на неомизинфосфотрансферазе фермент дигидрофилат релуктазы (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 среду добавляють метотрексат. Не трансфицированные клетки не растут в его присутствии, а клетки, синтезирующие дигидрофилат релуктазу, 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 рибонуклеиновые белки.

Разработаны и другие схемы отбора с дополнительными маркерами, например с использованием фермента глутаминсинтетазы (GS), обеспечивающей устойчивость к цитотоксическому действию метионилсульфоксимина. 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 метионилсульфоксимина в среде. При этом в культурных клетках также должна присутствовать GS, поскольку только множественные копии GS-гена могут обеспечить устойчивость к метионилсульфоксимину. Такая схема обладает определенными преимуществами перед описанной выше.

В экспрессирующие векторы млекопитающих уже встроены гены сильных рибонуклеиновых осуществлены их экспрессия в культуре клеток. 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* встраивали 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 транскрибировался с первичного транскрипта и сразу проиницирован мРНК 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

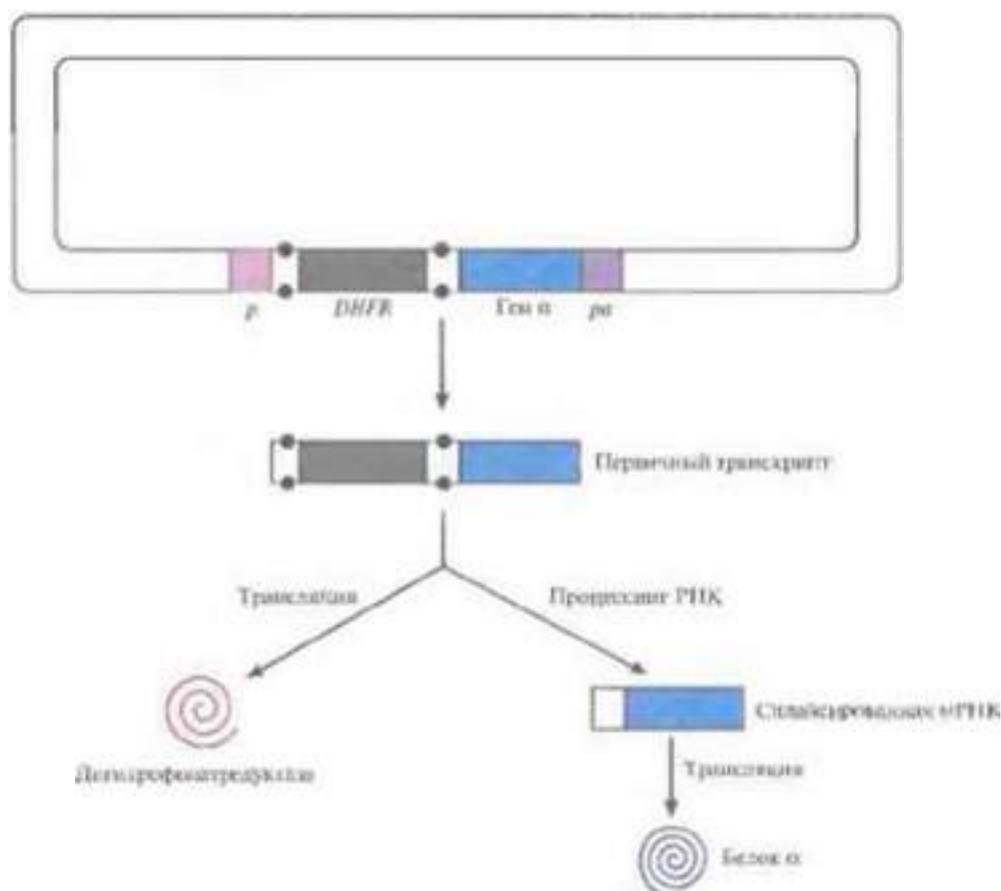


Рис. 7.14. Клонирование и экспрессия генов антидифолатредуктазы (*DHFR*) и рекомбинантного белка. Ген *DHFR* встроил между ливерным и интронными сайтами связывания интронов (*I*HFR), через которые инициал (*ori*) и ген *DHFR*, и клонированный ген находится под контролем одного эукариотического промотора (*P*) и имеет общий сигнал инициации-инициации (*ori*). *DHFR* транскрибируется с мультисубъединичного (первичного) транскрипта, а гетеродимерный белок (белок  $\alpha$ ) – 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 трансформируют двумя экспрессирующими векторами млекопитающих, каждый из кото-

рых нес ген или cДНК одной из субъединиц и разных типов селективных маркеров (рис. 7.15). Трансформированные клетки подвергают двойному отбору, соответственно и выживающие клетки несут оба вектора. Системы с двумя векторами успешно использовались для синтезов аутентичных димерных и тетрамерных рекомбинантных белков. К сожалению, дважды трансформированные клетки часто утрачивают один из двух векторов. Кроме того, число копий каждого из векторов не всегда одинаково, так что одна субъединица может синтезиро-

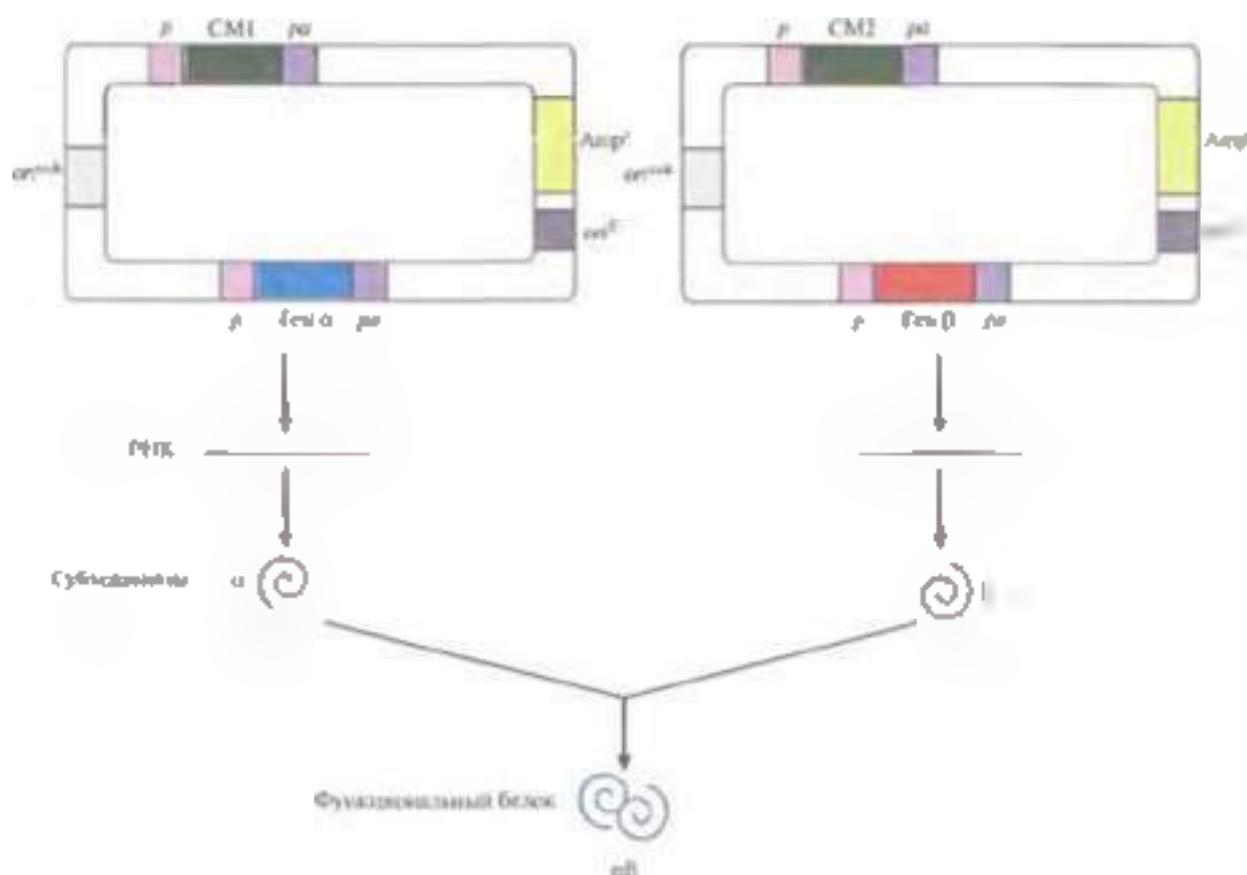


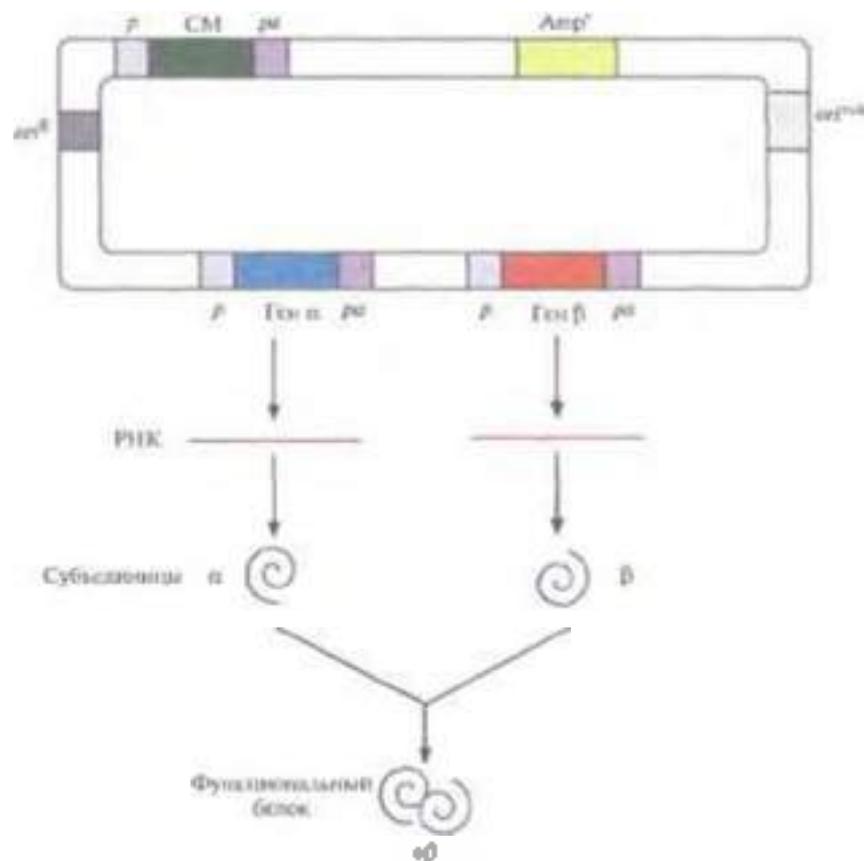
Рис. 7.15. Двухвекторная система экспрессии. Клонированные гены ( $\alpha$  и  $\beta$ ) кодируют субъединицы димерного белка ( $\alpha\beta$ ). После олимеризации трансфекции клетки двумя плазмидами в *in vivo* синтезе образуются обе субъединицы ( $\alpha$  и  $\beta$ ) и собираются функциональный димерный белок. Оба вектора несут сайты минимального регулятора, функции которого в *E. coli* ( $\text{ori}^E$ ) и в клетках млекопитающих ( $\text{ori}^M$ ); маркерный ген ( $\text{Amp}^R$ ) для отбора трансформированных клеток; *ori* эукариотический промотор ( $\text{P}$ ) и cДНК полноразмерной ( $\text{CM}$ ), которая регулирует экспрессию селективного маркерного гена ( $\text{CM}2$ ) в эукариотических клетках.

ются 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 разделились 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 полиденцилирования. Синтезируются один транскрипт с двумя генами, трансляция начинается с 5'-конца мРНК и с внутреннего сайта, в результате синтезируются субъединицы димерного белка  $\alpha$  и  $\beta$  (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 генами. Клонированные гены ( $\alpha$  и  $\beta$ ) 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 полиденцилирования ( $polyA$ ). Каждая субъединица транскрипции со своим  $5'$ UTR, объединяясь, субъединицы образуют функциональный димерный белок ( $\alpha\beta$ ). Векторы содержат сайты или сигналы ретикуляции эндоцитоза в  $5'$  сайт ( $5'ORF$ ) и в частях млекопитающей ( $5'ORF$ ), маркерный ген ( $Amp^r$ ) для отбора трансформированных клеток  $I$  сайт, азидный маркерный ген ( $CMV$ ), называемый (или синонимично) эукариотический промотор ( $P$ ) и сигнал терминации транскрипции ( $polyA$ ).



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

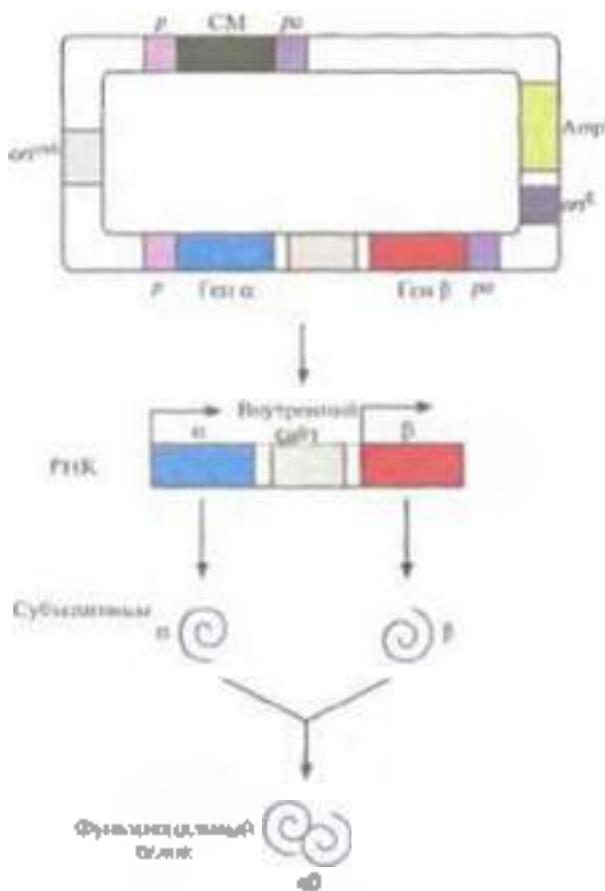


Рис. 7.17. Двухвекторный экспрессирующий вектор. Два кодирующих гена ( $\alpha$  и  $\beta$ ) кодируют субединицы димерной белка ( $\alpha\beta$ ). Они размещены сегментами ДНК, который после транскрипции, на уровне мРНК, имеет лишь внутренний сайт связывания рибосом. Каждый ген находится под контролем индуцибельного промотора ( $\rho$ ) и сигнала полиаденилирования ( $\rho$ А). Транскрипт мРНК начинается с 5' конца и с внутреннего сайта (угловые стрелки). С индуцируемые субединицы объединяются с образующимся функциональным димером белка. Котор содержит сайты индукции димеризации (функционирующие в  $\beta$  код  $\beta\alpha\beta$ ) и в клетках млекопитающих ( $\alpha\beta$ ); селективный маркерный ген ( $Amp^r$ ) для выбора трансформированных клеток; ген селективный маркерный ген (CM), кодирующая под контролем индуцибельного промотора ( $\rho$ ) и синтез индукцируемыми ( $\rho$ А).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прокариотические системы экспрессии успешно используются для синтеза многих белков. Однако некоторые белки для превращения в активную форму должны претерпеть специфические посттрансляционные модификации – гликозилирование, фосфорилирование или шестипролинное, 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 бакуловирусов, в частности бакуловируса *AcMNPV*, инфицирующего клетки насекомых насекомых. Наиболее строгая предположение трансфекцию клеток насекомых, инфицированных *AcMNPV*, трансгенным вектором, который содержит клонированный ген, флуоресцентный *AcMNPV*-специфичный инкубационный В результате двойного скрещивания между вектором и геном *AcMNPV* клонированный ген встраивается в последний и попадает под контроль сильного промотора, функционирующего на последних стадиях литического цикла. Клетки насекомых, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом, синтезируют гетеродимерный белок.

Частоту появления рекомбинантных бакулловирусов удалось повысить с менее чем 1% до 99%. Для этого ДНК AcMNPV обрабатывали энзимуклеазной рестрикцией, которая расширяла ДНК в двух специфичных сайтах с выделением фрагмента, несущего часть генов, необходимого для осуществления янтарического шикла. Клетки насекомого трансфицировали этим фрагментом, а затем трансформировали вектором. В результате довольно эффективно в некоторых клетках появлялись кольцевой геном AcMNPV, который содержал копированный ген и функциональный ген, необходимый для осуществления янтарического шикла. 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 бакулловидом только 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 сильной инициацией репликации вируса дельтаиды в *E. coli* (скаллы). Результатом элементарной транскрипции обычно происходит интегрирование вируса дельтаиды или интегрирование вектора. Для отбора трансфицированных клеток используют рекомбинантные селективные маркерные гены. Некоторые системы отбора основаны на токсичности в среде выращиваемого 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 хо-

мические клетки трансфицировали сразу двумя векторами, каждый из которых нес ген одной из субединиц. Альтернативный подход состоял в использовании одного вектора, который нес два для гена и виде «вспомогательных» транскрипционных и/или виде «инициатор» транскрипции, кодирующих оба эти гена.

## ЛИТЕРАТУРА

- Cockett M. L., C. R. Beedington, 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. Lauwere, C. Kelton, K. Chappel, B. Weinstein, H. Ferrara, P. Petermann, R. Hernandez, T. Edmunds, S. Richards, L. McKee, 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. Kellar, G. R. Davis, B. L. Smiley, J. Crave, H. Tomiyama, G. Velletich, 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. Dierley, R. S. Siegel, M. E. Williams, S. B. Ellis, P. A. Kellar, S. A. Probst, W. S. Craig, G. Velletich, 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. Harsner. 1993. Dicotyloid 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.
- Giga-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) II 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 J. 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 Y., 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. Giese, R. A. DeMaico, A. Shio, Y. Chiba. *Cell* 79: 109-115, 1994. 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 coli*. *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: 423-445.
- Vizza 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 entotoxigenase 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 бакзавирус? Опишите исходную систему экспрессии на основе бакзавируса 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 микросомально экспрессирующего вектора млекопитающих.
8. Опишите как минимум две селективные системы, используемые в случае экспрессирующих векторов млекопитающих.
9. Сравните разные  $\lambda$ -векторы в создании систем синтеза двух рекомбинантных белков в одной клетке млекопитающего.
10. Какими критериями руководствуются при выборе системы экспрессии генов неструктурных белков (дрожжи, 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 ко-зельском 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 со-ответствующего гена используют организмы, растущие в необычных, зачастую экстремальных условиях. Например, в их среде обитания, не утрачивающие своей активности при повышенной температуре, выделяют ее ген из *Вибриона членистоногого* — бактерии, естественной средой обитания которой является горячие источники с температурой воды 90 °С. Полученным таким образом геном удалось оставаться активной при температуре, при которой осуществляют промышленное брожение пива 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 подбором редких генов дает к существенному улучшению свойства источника белка, поскольку большинство аминокислотных замещений сопровождается снижением активности фермента.

Для создания белков со специфическими свойствами можно использовать другой подход, основанный на введении и изменении в кодирующие их клонированные 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 модифицировав скорость ( $V_{max}$ ) преобразования субстрата в продукт при определенных условиях, можно повысить общую каталитическую эффективность ( $V_{max}/K_m$ ) реакции.  $V_{max}$  зависит от количества фермента ( $E_0$ ), 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 аллелотермическую устойчивость фермента, можно уменьшать степень его инактивации высоким содержанием ионизированной соли и увеличить выход продукта.

### Направленный мутагенез: методика

Получить новый белок с другими свойствами можно разными способами. Однако наиболее реально изменить свойства уже существующего белка. Изменение можно внести в сам белок или в его

ген (линия эмбриональной миомы) белки резко быдет строго специфичны и не способны существовать внало для каждого белковой продукта, поэтому лучше вносить мутации в его кодирующий ген. К сожалению, не всегда бывает известно, какую именно аминокислоту и в какой последовательности необходимо изменить, чтобы получить белок с новыми функциями, кинетическими или физическими свойствами. Может случиться, что изменения должны затрагивать не только аминокислотный состав, равнодействительны даже от друга в неспецифичной цепи. Но специально в результате удалось белковой молекулы. Есть надежда, что уже в недалеком будущем с помощью компьютерных расчетов удастся выявить участки или даже участки белков, изменение которых приводит к определенным последовательностям. Это значительно упрощает процедуру отыскания мутаций белков. Введение 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.

Изменение специфических изменений в кодирующей последовательности 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 физикохимических 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 кодирующей цепи можно использовать различные методы. В одних случаях можно использовать специфические сайты клонирования генов, в других случайным образом измененный короткий фрагмент кодирующего гена и среди образующихся мутантных белков выбрать 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 кодирующий 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-кодирующую форму вектора (или цепь M13) и смешивают ее с синтетическим олигонуклеотидом, в частности комплементарным — и идентифицируют одного нуклеотида (нужному сегменту кодирующей цепи). Этот отщепившийся (с несвязывающейся) нуклеотид соответствует тому нуклеотиду колона мРНК, который необходимо изменить. В случае, представленном на рис. 3.1, трицепт АТТ, соответствующий кодон аминокислоты кодону АУТ, нужно изменить на трицепт СТУ. Олигонуклеотид будет (гибридизация с комплементарным участком кодирующей цепи в том случае, если: 1) он выделен в количестве, во много раз превышающем количество ДНК M13; 2) нестарифицированный нуклеотид находится примерно посередине олигонуклеотида; 3) смесь 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 Klenow ДНК-полимераза (*Klenow* polymerase) при наличии в среде четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, а присоединение последнего нуклеотида к 3'-концу осуществляется за счет активности 5'-конца шпильки, обеспечивая ДНК-лигаза фен 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, однако, несколько элементарных нуклеотидов, трансформируют клетки *E. coli*. В последних образуются фаговые

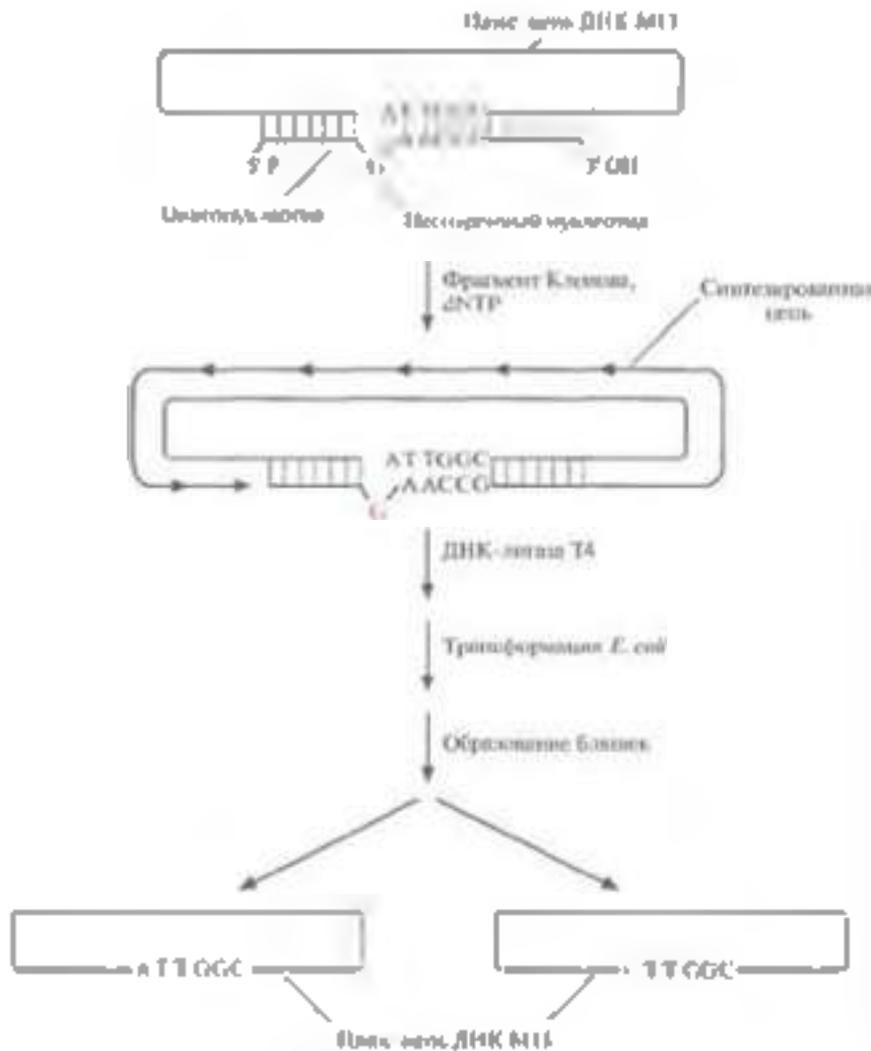
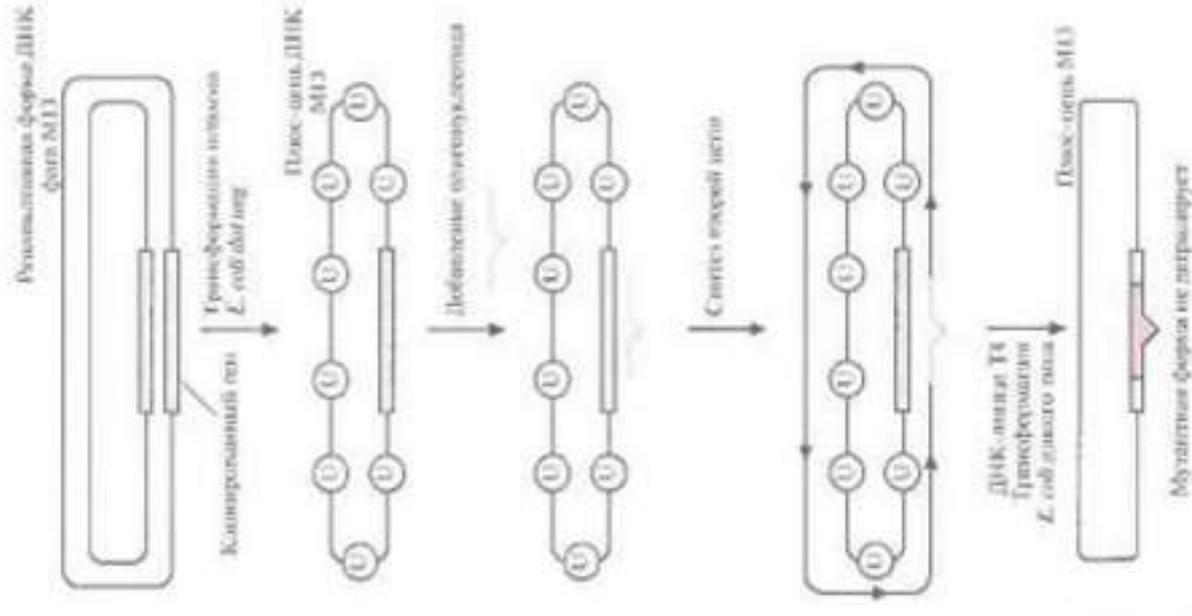


Рис. 9.1. Олигонуклеотидная направленная мутация фазы M13 (циан-зеленый), несущую ген-мишень, инициирует с помощью мутационным синтетическим олигонуклеотидом, содержащим фазу основания, не имеет комплементарные соответствующие основания исходной ДНК. Олигонуклеотид служит матрицей для синтеза ДНК, в M13-вектор с встроенным геном — матрицей. Репликация катализирует фермент Кляйша ДНК-полимеразы I *E. coli*. Синтезированную олигонуклеотидную цепь замыкает в кольцо ДНК-лигаза T4. Образованные двуцепочечные молекулы трансформируют *E. coli*. Часть филаментов частицы содержит ДНК дикого типа, часть — мутантный ДНК.

частично, что в конечном счете приводит к явлению клеток и обратному бою. Поскольку различия в частоте мутационных изменений, инициированных при взаимодействии фазы с частицей, могут содержать ДНК дикого типа, а исключена — 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 *lac*-вектор. Мутантный белок синтезируют в *E. coli* и анализируют.

На самом деле число фазовых частиц, несущих мутантную ДНК, оказывается гораздо меньше ожидаемых 50%: лишь 1/59 белков содержит фазу с мутантным геном. Чтобы повысить число мутантных фаз, метод олигонуклеотидно-направленной мутации модифицировали. Один из вариантов состоит во введении M13-вектора, несущего ген, в который необходимо внести мутацию, в штамм *E. coli*, deficientный по двум ферментам метаболизма ДНК (рис. 9.2). Один фермент — это мутантная форма dI (рибофосфатазы (*dyf*)). Клетки с неактивной dUTP-рибофосфатазой характеризуются повышенным содержанием dUTP, что приводит к

встраиванию в ДНК при репликации нескольких остатков dUTP вместо dTTP. Второй фермент — это дефектная уридил-N-гликозилтрансфераза. В отсутствие функциональной уридил-N-гликозилтрансферазы остатки dUTP случайно встраиваются в ДНК, не могут быть удалены. В олигонуклеотидной ДНК М13, синтезированной в клетках хозяина *E. coli*, прикреплено 15 тимидиновых остатков, оказывающихся замечательными уридилтрансферазами. Олигонуклеотид с несколькими метками основательно отжигают с уридилсодержащей ДНК М13 и *in vitro* достраивают вторую



цепь. Двухцепочечной ДНК трансформируют штамм *E. coli*, содержащий функциональный ген *uid*. Активная уридил-N-гликозилтрансфераза клеток удалит остаток уридила из ДНК М13 (рис. 8.2), исходная матричная цепь М13 дегридирует 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 М13 — большое число пропусков. Чтобы выделить мутантную форму нужного гена, приходится затрачивать много времени. В качестве альтернативной системы с использованием флага М13 было разработано множество других подходов, основанных на приращении плазмидной ДНК. Это позволяет обойти 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 в неактивный ген устойчивости к ампициллину; в середине последнего встраивают гуркозил (рис. 8.3). Клетки *E. coli* трансформируют вектором, несущим ДНК-матрицу, и двухцепочечную плазмидную ДНК дегуридируют щелочью с тем, чтобы получить одноцепочечные копииные молекулы. Денатурированную ДНК отжигают с тремя расплавленными олигонуклеоти-

Рис. 8.2. Повышение выхода мутантного флага М13 путем трансформации штамма *E. coli* dUTP. Ген *uid* встраивают в двухцепочечную репликационную форму ДНК флага М13 и искусственно молекулярно трансформируют штамм *E. coli* dUTP. Мутация *uid* исключает incorporation остатков dUTP в клетке, что приводит к включению в ДНК нескольких остатков dUTP (U), а мутация *uid* блокирует их удаление. Двухцепочечной ДНК М13, содержащей ген *uid*, трансформируют клетки *E. coli* дикого типа. Продукт гена *uid* дикого типа (уридил-N-гликозилтрансфераза) удаляет все остатки уридила из исходной цепи, и она дегридируется. Мутантная цепь остается интактной, поскольку она не содержит остатков уридила. 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-мишень, 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 деоксирибонуклеотидтрифосфата и ДНК-полимеразу T4. Функционирование ампициллинофрагмента Клеточная ДНК-полимеразы (*E. coli*) Гибридоплазмиды служат матрицей для синтеза ДНК, а нитратная кислота в молекуле

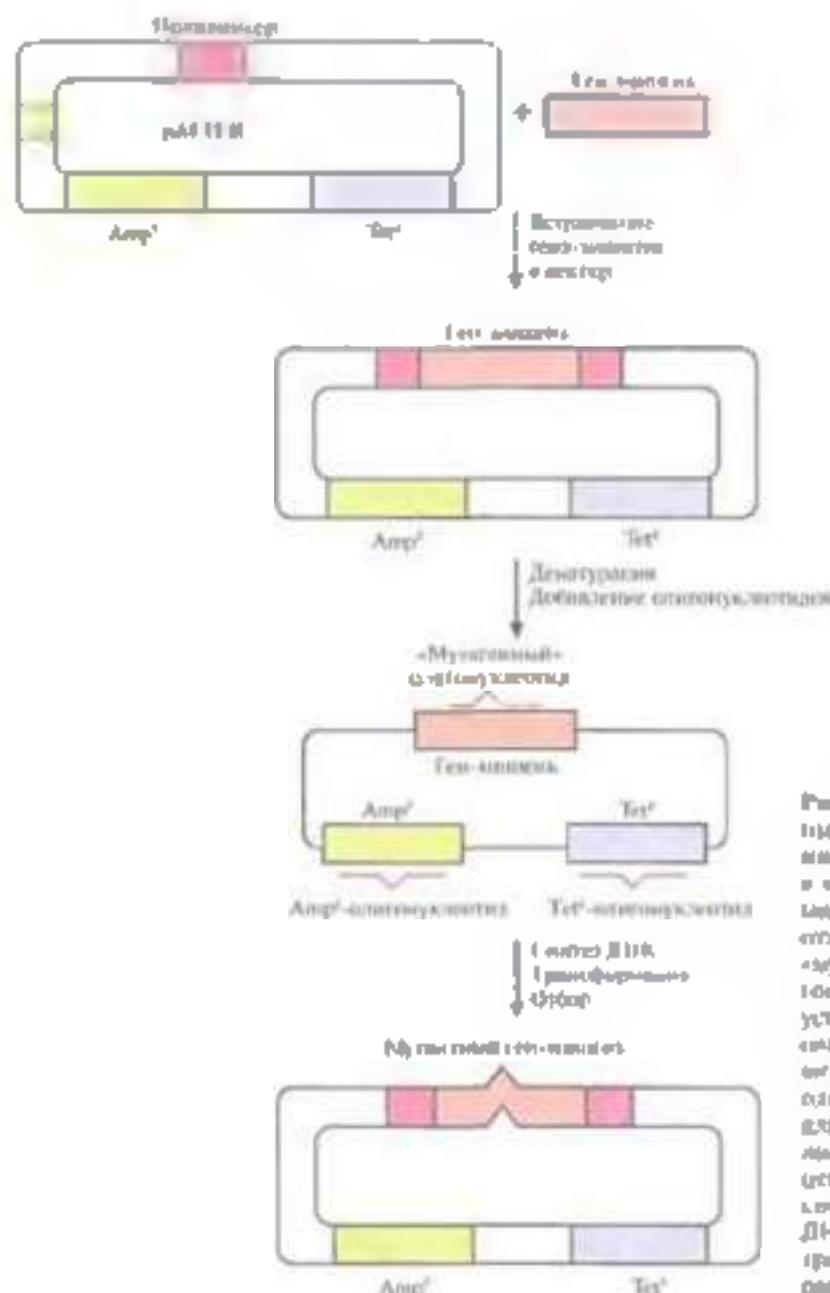


Рис. 1.3. Олигонуклеотид-индуцированная мутация с использованием плазмидной ДНК *E. coli*-мишени ассоциированной с ампициллин-резистентностью. Плазмидная ДНК денатурирует и ассоциирует с трибо-олигонуклеотидным «мутационным» олигонуклеотидом, как матрицей, ассоциированным с устойчивостью к ампициллину ( $Amp^r$ ), и олигонуклеотидом, ингибирующим чувствительность к тетрациклину ( $Tet^r$ ). Эти олигонуклеотиды служат матрицей для синтеза ДНК с помощью ДНК-полимеразы T4, в результате чего мутаций (однонуклеотидных разрывов) и новых синтезированных или введенных ДНК. Мутация T4 (продуктом реакции трансформации клеток *E. coli* и отбора трансформантов  $Amp^r$  и  $Tet^r$ )

ДНК — матрицей. Одноцепочечные гарины в полимеризуемой цепи замещаются с помощью ДНК-фрагмента. По окончании синтеза и дигеренции предуктами реакции трансформированной клетки *E. coli* Трансформантов отбирают по принципу устойчивости к ампициллину и чувствительности к тетрациклину. Примерно 90% из них содержат экспрессируемую мутированную клоноированную ген. У остальных трансформантов клоноированный ген не был изменен либо потому, что опитонуклеотид не интегрировался с ним, либо потому, что он вытеснился в ходе синтеза ДНК. Клетки, несущие мутированный клоноированный ген, идентифицируют с помощью гибридомации. Все плазмиды, отаковы, ферменты, опитонуклеотиды (кроме того, который предшественник для изменения клоноированного гена), а также буферы проходятся в наборе, что облегчает работу.

#### *Одноклеточная-матричная мутировка с использованием ПЦР-амплификации*

Более простой и быстрый метод получения больших количеств мутированных генов, дигеренциальной системе с использованием факта М13, — сайт-специфический мутагенез в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Одним из вариантов этого подхода является использование Гет-аптечек, которые могут в индивидуальном порядке (рис. 8.4) и помещают препараты в две пробирки. В каждую из них добавляют по два специфических праймера для ПЦР: 1 и 2 в одну пробирку, 3 и 4 — в другую. Праймеры 2 и 3 полностью комплементарны одному из участков клоноированного гена или прилегающей к нему последовательности, а 1 и 3 комплементарны другому участку, но содержат один некодирующий нуклеотид мутагенности и гибридируются с генами цепями, так что в результате происходит замена обоих нуклеотидов данной пары. Показанные сайты гибридомации праймеров 1 и 2 в одной пробирке и 3 и 4 — в другой таковы, что ПЦР-продукты в разных пробирках имеют разные концы. По окончании ПЦР содержимое пробирок объединяют и продолжают дигестировать, а затем рестриктируют. Последнюю концы дигестифицированные фрагменты ДНК из двух пробирок неограниченно, ориентационные ДНК из разных пробирок дигестифицируют с образованными комплементарными

фрагментами одноцепочечными гаринами. Эти гарины рестриктируются in vivo после трансформации *E. coli*. При рестрикции одиночных генов из одной пробирки образуются дивергентные молекулы. В клетках *E. coli* стабилизируются молекулы, а не плазмиды и наследуются только копией, а не дивергентные молекулы, при этом все они несут сайт-специфическую мутацию. Таким образом, с помощью описанного метода можно повысить точность мутации и клоноированный 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 мутагенез с использованием*

*высокочастотного одноклеточных праймеров*

К сожалению, обычно бывает неизвестно, какую нуклеотидную замену в клоноированном гене нужно произвести, чтобы получить белок с нужными свойствами. Поэтому часто предпочитают изменить один определенный нуклеотидный сайт всеми возможными способами. Например, можно синтетировать одноклеточные праймеры, в опнок из сайтов которых найдутся все возможные нуклеотиды. Такие «высокочастотные» одноклеточные обычно получают, добавляя в амплификационный синтешор ДНК на опитонной этапе, когда в цепи должен происходить сайт специфической мутагенности, небольшое количество (до нескольких процентов) трех других нуклеотидов (рис. 8.5). В результате получается гетерогенный по одному сайту набор одноклеточных праймеров, с помощью которых можно получить соответствующий набор мутированных генов-мишеней с дуклетными мутациями 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 разными функциями 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.

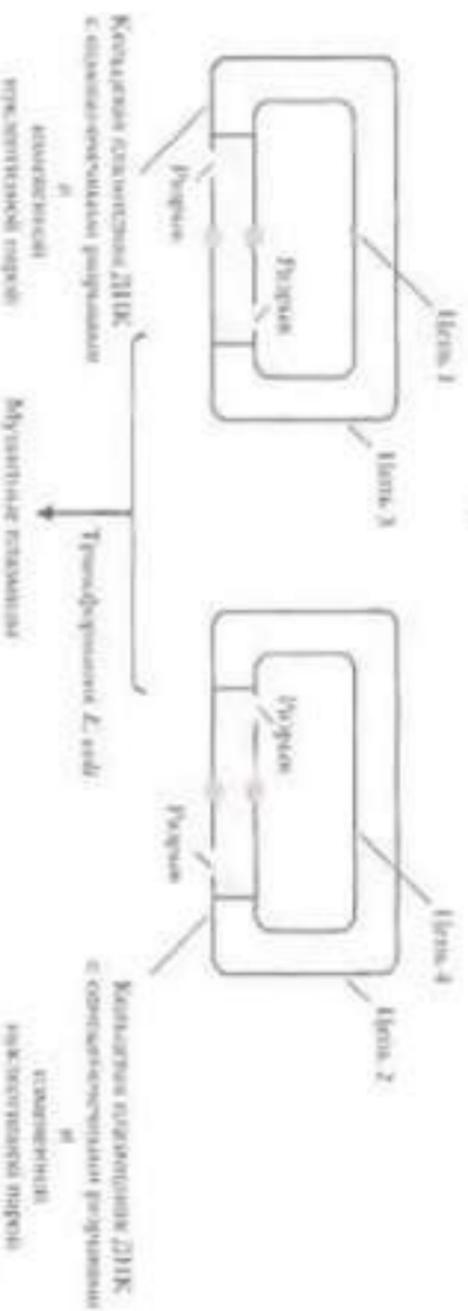


Рис. 84. Охитозооцитоз: интрукторный агутатив с нематоидом *М.Т.Р.* Реагируя типично в двух спектрах, в зависимости от соотношения омега-реповых репродуктивных плазмидов ДНК, но при этом только при условии. Препараты 1 и 2 содержат один репродуктивный спектр и в основном репродуктивные плазмиды ДНК, препараты 3 и 4 содержат комплексированные участки плазмидов ДНК и только репродукторы с репродуктивной. Присутствие таких репродуктивных для репродукции клеток паразитов, но их клетки структуры. В результате ДНК-интерференция происходит множественно. Но окончательный процесс контролируется репродукцией клеточной и репродукцией репродуктивных. В результате репродукция репродуктивных репродуктивных репродуктивных. После трансформации клеточной структуры *E. coli* репродукция репродуктивных репродуктивных клеток. Однако, в зависимости от репродуктивных репродуктивных. Значительная репродукция ДНК и *E. coli* не контролируется.





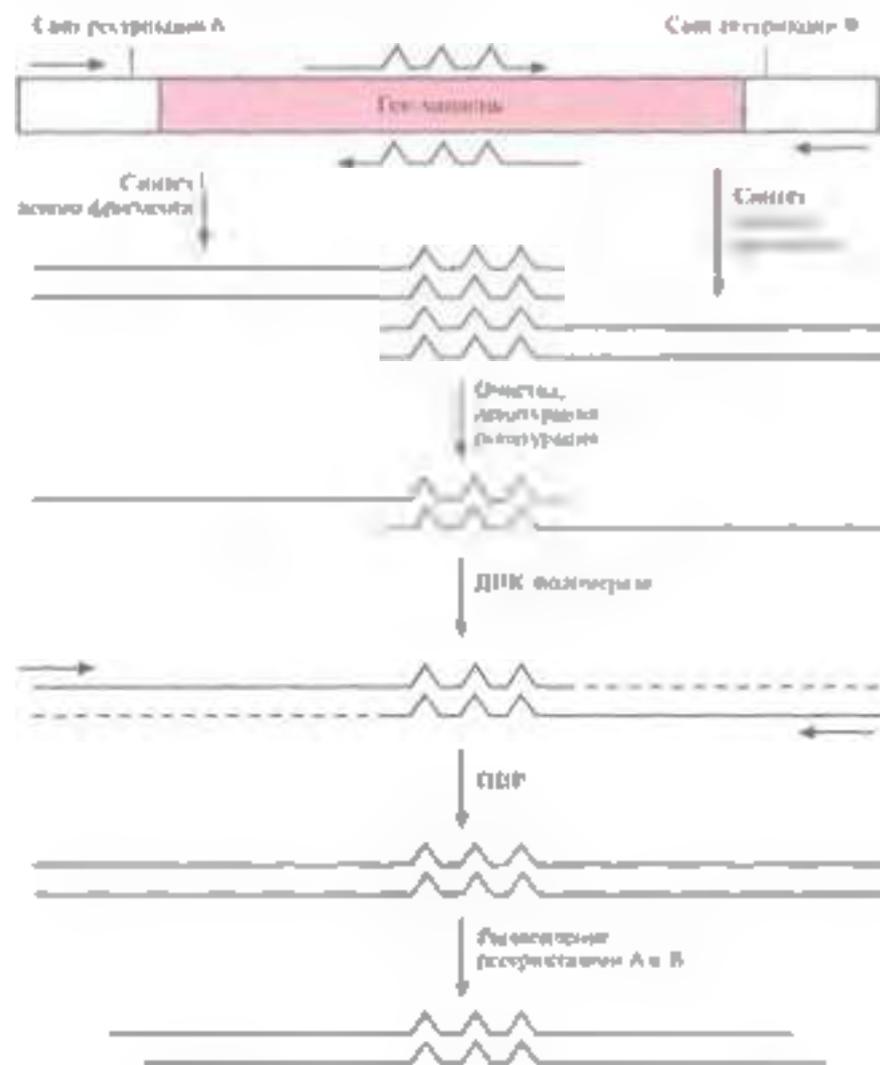


Рис. 10. Случайный мутагенез с использованием «ферментативной» олигонуклеотидной ПЦР. Слева и справа части ген-интереса трансформируются по отдельности с помощью ПЦР с соответствующими праймерами, показаны стрелки-направления стрелки. «Вторая очередь» олигонуклеотидов набуравлены стрелками с тремя зубчиками, каждая из которых является «хвостиком». Их последовательность кодирует информацию о длине-длине-длине фрагментов олигонуклеотидов. В результате образуются частицы олигонуклеотидов: олимеры ДНК, сгруппированные в области ген-интереса. На противоположных концах ДНК-олигонуклеотидов и (проблема ПЦР) олигонуклеотидов ПЦР-праймеры расщепляются ферментативными рестриктазами А и В и образуются «хвосты», образующий тем же образом

находящим концом молекула. Амплифицированные молекулы обрабатывают двумя эндонуклеазными рестрикциями уникальные сайты которых находятся на концах фрагмента, и встраивают в соответствующий плазмидный вектор. Этот метод позволяет получать измененные гены со случайными мутациями.

#### Случайный мутагенез с использованием олигодеоксинуклеотидов

Новыми методами искусственного мутагена в кодирующей цепи, 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 набуравляют так, чтобы после расщепления двумя рестриктазами образовывались укороченные 3'- и 5'- концы, в частности, чтобы 3' конец сайта расщепления, расположенного рядом с кодирующей цепью, был укорочен, а 3'-конец с другой стороны плазмиды выступил.

Экзонуклеаза III (ExnIII) E, соев расщепляет молекулу ДНК только с укороченных 3'-конец,

ни не с выступающим 3'- или любым 5'- концом. Ее добавляют в реакцию смесь после инкубирования ДНК с двумя рестриктазами, и она осуществляет от усеченного 3'-конца цепи по одному нуклеотид. Через определенное время реакции останавливают и используют пробел с помощью фермента Кляйны 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 или несколько нуклеотидов. Они трансформируют клетки *E. coli*. Плазмиды реплицируются, а в клонированный ген включают 6 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-физы M13. В этом случае опранкой для синтеза ДНК служит смесь олигонуклеотидов, содержащих случайные амевы. В результате получают библиотеку клонов, несущих множество мутаций в различных сайтах. Недостаток подхода, при котором в клонированном гене образуется большое число случайных мутаций, состоит в необходимости тестирования большого числа клонов для идентификации того, который детерминировал бы синтез нужного белка. Это весьма неприятно

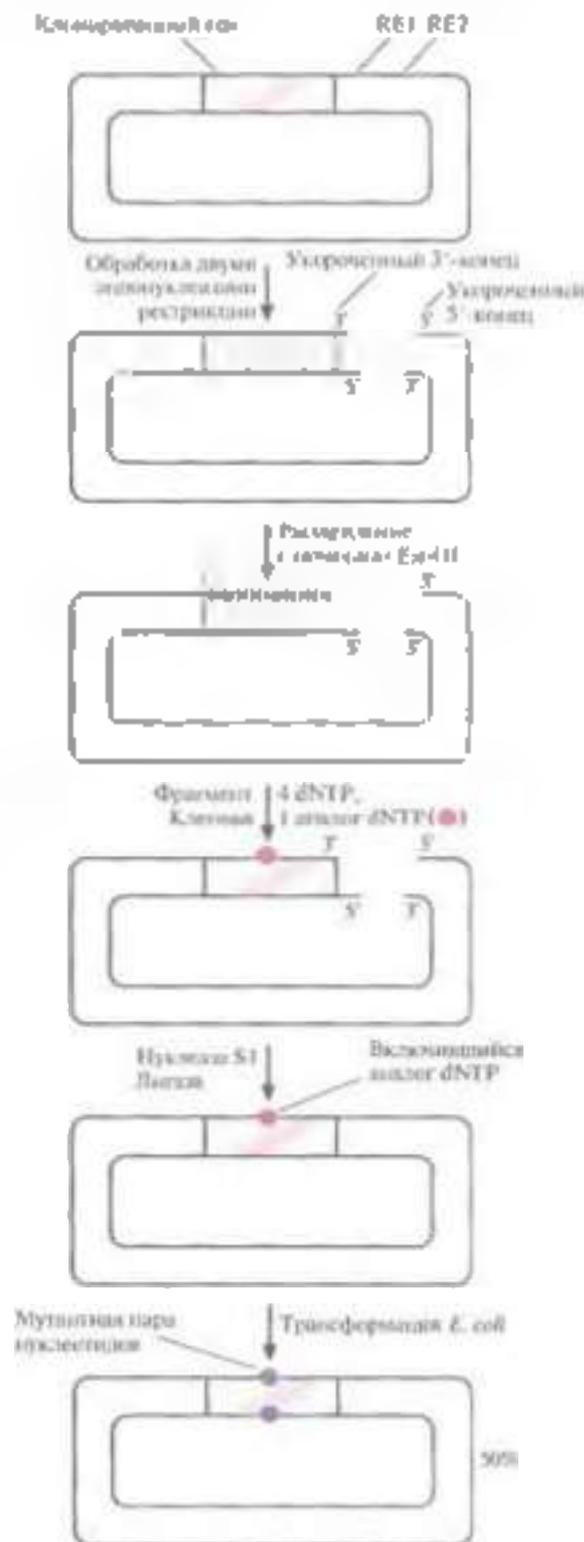


Рис. 8.7. Выявление случайных мутаций в клонированном гене Кляйны, несущим клонированный ген, с помощью рестриктаз RE1 и RE2, в результате чего образуются сайты 3' и сайты 5'-усеченные концы (по соответствию один 3' и один 5' нуклеотиды соответственно). Затем его обрабатывают ферментом Кляйны, который расширяет ДНК только с усеченного 3'-конца, удаляя по одному нуклеотиду. Через определенное время реакцию останавливают и используют ее для заполнения пробела с помощью фермента Кляйны ДНК-полимераза I *E. coli*. При этом в реакцию добавляют азидат одного из четырех дезоксирибонуклеотидов (dNTP) и в небольшой количестве смеси обычных четырех дезоксирибонуклеотидов (dNTP) для образования гетеродуплекса с мутацией ДНК-мишени. Мутация ДНК-мишени трансформируют клетки *E. coli*. При последующей репликации векторной ДНК в клонированную клетку 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, определяют нужную типную последовательность соответствующего клонированного гена и идентифицируют соответствующий сайт(сайты).

### Углубление белков

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 теми или другими ферментами, которые и в настоящее время можно приобрести в количествах, необходимых для биотехнологии.

### Образование допептидных дисульфидных связей

Термостабильность белковых молекул можно повысить, внося в них изменения, благодаря которым они дольше не разворачиваются при повышенных температурах. 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 онтогенетически направленного мутагенеза были созданы шесть вариантов лизозима 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, расположились в активном ферменте близко друг к другу, так что при образовании новых дисульфидных связей общая конформация молекулы существенно не изменилась. Кроме того, они оказались 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-Амалаза	Пивоварение, производство спирта
Амилопилаза	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
Глюкоамилаза	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, глазированных сладостей
Липаза	Сыростроение, паучуцие препараты
Папаин	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производство спирта
Протеаза	Денатурация, производство спирта
Ренин	Сыростроение



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 глутаминобутироксидазы (содержащиеся, 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-

оксидазы — аспарагина. Фермент, полученный при замене остатков аспарагина на остаток глутаминовой кислоты, оказался нечувствительным даже при повышенной температуре и обладал такими же ферментативными свойствами (в табл. 8.3 не представлено).

Следует отметить, что исследованием белков в кристаллическом состоянии показала, 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

Цианобактериальный и цианобактериальный белок, иногда складывается менее активным, чем предполагалось, и чтобы повысить его активность, можно использовать методы денатурации. Например, при денатурации в *E. coli* кодирующей комплексированной ДНК (кДНК) β-интерферона человека (β-ИФ) белковый продукт обладал в 10 раз меньшей активностью, чем нативный галактилозилированный фермент. При этом β-ИФ синтезировался в довольно большом количестве, однако почти все его молекулы образовывали димеры и более высокомолекулярные неактивные комплексы.

Как показал анализ аминокислотной последовательности гена β-ИФ, в нем присутствуют при денатурации остатки цистеина. В отличие от них или исключительно, исключены, участвуют в образовании дисульфидных связей, приводящих к образованию димеров и олигомеров в клетках *E. coli*. Но не в клетках человека. Было высказано предположение, что замена цистеина или нескольких цистеиновых колоний на сериновые приводит к снижению активности, но обратного отношения. Серины был выбран потому, что его структура сильно со структурой цистеина и исключением того, что вместо серина содержится кислород (и поэтому не может образовывать дисульфидные связи).

Приступив к этим экспериментам, исследователи не рассчитывали детально изучить, насколько стабильной молекулярной структуры β-интерферона и были вынуждены справиться со сложностями

Таблица 8.3 Термостабильность при pH 4 трифосфат-киназы трифосфат-киназы из *Saccharomyces cerevisiae*

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	Asp	11

<sup>1</sup> По материалам работы Albert et al. Proc. Acad. Sci. USA 73: 673 (1976).

<sup>2</sup> Термостабильность β-ИФ зависит от температуры и pH. При pH 7,0 и 8,0 и температуре 37°C β-ИФ был более активен, чем при pH 6,0 и 7,0.

выше для растворимых белков. Иными словами, они не были, какой из трех остатков цистеина был ответствен за формирование межмолекулярных дисульфидных связей. Как следует из названия остатков цистеина, участвующих в образовании дисульфидных связей между молекулами НФФ с аналогичной структурой, было известно, что делало возможным сравнение аминокислотных последовательностей этих двух молекул (рис. 8X). Как показали результаты анализа, остатки Cys-31 и Cys-141 в НФФ совпадают с теми же позициями, 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 данселевом 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 экспериментов по изменению специфичности связывания субстрата прироста рНК синтетический из *B. subtilis* *tyrosinase*. Этот фермент катализирует аминоксилирование рНК, который специфически связывает иризон ( $r\text{PHK}^{12}$ ), в ходе двухступенчатой реакции

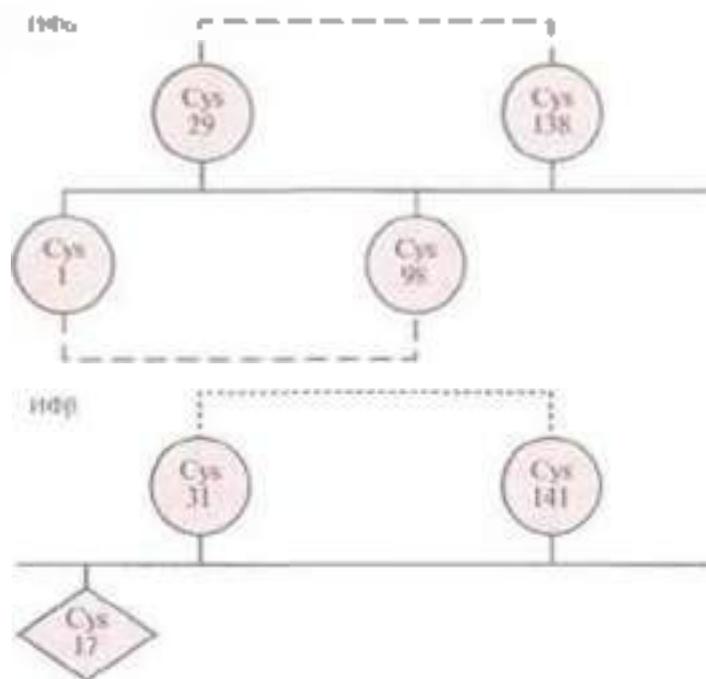


Рис. 8.3. Показатели остатков цистеина в аминокислотах НФФ и НФФ, между которыми образуются дисульфидные связи. Выделенные интрамолекулярные дисульфидные связи в НФФ образуются (нативными аминокислотами), а предположенными связями в НФФ — генетически

На стадии 1 АТР каталитирует тирозин (Tyr), в результате чего образуется комплекс с ферментом тирозиладенилат (Tyr-A) и пирофосфат (PP<sub>i</sub>). На стадии 2 тирозиладенилат гидролизуетея при участии свободной 3' гидроксильной группы молекулы rРНК, тем-по тирозин присоединяется к rРНК с выделением АМР. В ходе обмена реакцией субстрата остается связанным с тирозином rРНК-синтетазой.

Во времени постановки кинетики была определена пространственная структура тирозил rРНК-синтетазы *R. ruber* [10] и допущено ее в цитиной цепочке, так что при помощи компьютерного моделирования можно было предсказать точные значения и их зависимость от температуры взаимодействия субстратами. Чтобы проверить правильность предположения, с помощью лазерного метода гидролизного катализа в темноте rРНК-синтазы были внесены специфические мутации. Остаток тирозина в положении 51 (Tyr-51) был заменен на аргинин или пролин. В мутации фермент гидролизует группу Tyr-51 образуя гидрофильную связь с атомом кислорода рибозидной цепи нуклеотидов, и предполагалось, что такой обмен слабой связи увеличит скорость фермента к АТР.

Чтобы определить влияние (или отсутствие) фермента, определить на кинетические константы. В некоторых случаях изменение оказалось более существенным, чем ожидалось (табл. 8.4). Так, если для Ala-51 фермента константа связывания ( $K_{d1}$ ) к АТР 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 аминирования увеличилась в одиннадцать раз. Результат, полученный для Phe-51 фермента, был неожиданным, поскольку замена тирозина на аргинин должна была привести к нарушению (но крайней мере локальному) структуры в сайтах и левой области, что предположительно должно было отрицательно сказаться на связывании субстрата.

Эти данные показывают, что точность позиционной специфичности результатов специфических мутационных данных, с которыми специфично связаны все же можно идентифицировать боковые группы, значения которых приводят к увеличению кинетических свойств фермента. Кроме того, стало очевидно, что структура ливиния фермента к субстрату, в таком мутационном случае эффективнее реагирует только с тем, что не так и соответствующим образом в амплифицированном.

#### Измененные потребности ферментов в металлических кофакторах

Субтилынымы – строгие протеиназы, секретируемые в культурах дрожжей трийносомителыными бактериями, широко используются в качестве биокатализаторов в ферментации (в частности для сыроварения или изготовления чеддера). В последние годы субтилынымы основываются в таких промышленных процессах, где участвуют в больших количествах соединения, действующие металлы, в том числе кальций, и в таких условиях субтилынымы быстро теряют свою активность. Чтобы решить эту проблему, попытались сначала выявить субтилынымы способности связывать кальций, а затем увеличить стабильность молекул промышленного фермента.

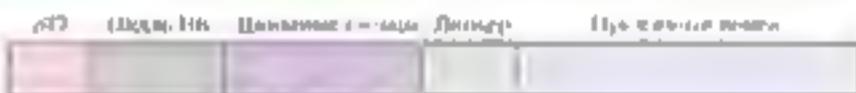
Исследование молекулярного субтилынымы было начато с идентификации гена КРД *Rorillus orbifungiculus*. Прежде всего, по большому количеству структурных данных мутации разрешены были определены структура белка, в связи с использованием олигонуклеотид-микроанализом мутационных сайтов мутационных сел с желтопроявляющимися нуклеотидами, кодирующими участки белковой молекулы от 75

Таблица 8.4. Эффективность аминирования, обусловленного тирозином (Tyr-51) и модифицированными (Ala-51 и Phe-51) тирозил rРНК-синтазами<sup>1)</sup>

Фермент	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_{d1}$ , 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

<sup>1)</sup> Данные взяты из работы [10] [10]. © 1997, 1998





Фиг. 8.9. Геномная структура рестриктазы *EcoRI*, кодирующей рестриктазу *EcoRI* (ссылка на сайт <http://www.rcsb.org/pdb>).

ментом, узнающим сайты длиной 2 и 3 н.п.и больше, так что для получения лончей рестриктазы 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 цинк-содержащим участком в близкую бороздку двойной спирали. Так, белок Zfp268 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 (например *NotI*) бактерии *Flotobacterium obscurum*. Чтобы проверить реальность этого предположения, был создан гибридный ген, кодирующий участок из гена остатков рестриктазы на  $\Delta$ -конец большого белка, три цинковых пальца, анкер (*Anchor*) для придания гибкости рекомбинантной молекуле, а также сигнальную часть гена рестриктазы *NotI* (рис. 8.9). После очистки рекомбинантного белка N-концевые остатки нуклеотида были удалены обработкой трипсином.

Бактерии, синтезирующие гибридную рестриктазу, взаимодействуют с собственной ДНК при расщеплении с помощью ферментов, метилируемых же участки молекулы, с которыми связывается соответствующий эндонуклеаз рестриктазы. Однако в своем клеточном состоянии не защищен от рекомбинантной рестриктазы *NotI* и чтобы предотвратить гибель растущих клеток, синтез гибридной фермента подавляют, используя ее ген под контролем системы экспрессии бактериофага  $\lambda$ ?

В результате этих экспериментов были получены две рекомбинантные эндонуклеазы рестриктазы *NotI*. 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 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

Факторы, вызывающие активацию тканевого плазминогена (tPA), – это сериновая протеиназа, состоящая из нескольких доменов, ее нуклеотид и каталитическая рестриктаза. К активации tPA быстро приводят из системы криккбрания, поэтому его применяют в качестве пути инфузии. Чтобы добиться желаемого терапевтического эффекта, необходимо использовать высокие концентрации фермента, а это может приводить к неспецифическому внутрисосудному кровотечения. Таким образом, было бы весьма желательно получить плазминузный фермент tPA, обладающий высокой специфичностью к фибрину и триплексах и не вызывающий кровотечения. Белок с такими свойствами можно получить, используя 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, повлияв существенно понижению скорости фермента к фибрину. Заметно Asp-117 на Glu, получили фермент с такой же фибринолитической активностью, как у нативного фермента. Вместе эти три мутации в один белок, получили фермент, обладающий всеми тремя свойствами (табл. 8.6). Чтобы повысить, можно использовать его вместе нативного tPA, нужно провести доклинические исследования.

Таблица 2.6. Стабильность и активность различных мутантов фермента ФР<sup>1</sup> в

Вариант	Матрица-матрица (n)	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(84)Arg(296-299)→Ala(84)Ala)	0,25	0,03	0,11	1,01
1	His(83) →Asp, (Val(84)Arg(296-299)→Ala(84)Ala)	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(84)Arg(296-299) →Ala(84)Ala Asp(117) →Ile)	1,2	1,33	0,16	1,48
6	His(83) →Asp, (Val(84)Arg(296-299) →Ala(84)Ala, Asp(117) →Ile)	8,1	0,87	0,18	0,51

<sup>1</sup>His(83) →Asp, (Val(84)Arg(296-299) →Ala(84)Ala) Asp(117) →Ile

Важнейшим свойством уникальных ферментов является их стабильность в отношении температуры. Стабильность ферментов в отношении температуры является одним из критериев, по которым оценивают эффективность направленной мутации. Стабильность ферментов в отношении температуры является одним из критериев, по которым оценивают эффективность направленной мутации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свойства стабильности белка зависят от его аминокислотной цепи, которая в свою очередь определяется аминокислотной последовательностью. Неотрицательные аминокислоты в полипептидной цепи 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 при этом системе строганности таков образом, чтобы в ген-мишень был встроена определенная нуклеотид. Затем трансформировав двучепочечными ДНК М13 клетки *E. coli*. Часть образующихся в клетках фазных частиц несет ген, содержащий требуемую мутацию. Такие частицы идентифицируют, встраивают мутантный ген в экспрессирующий вектор, синтезируют белок и определяют его активность. Вносить изменения в кодирующие гены можно также с помощью плазмид или ПЦР (обычно раньше не известно, какую

аминокислоту (аминокислоты) необходимо заменить для того, чтобы улучшить то или иное свойство белка-мишени. Поэтому предельно полезными являются случаи, когда, а не наоборот, а замена аминокислотной мутации.

Выбор аминокислоты, подлежащей замене, для того, чтобы привести к изменению роли в функционировании белка. Данные об этом получают в виде гетерогенных мембранных или мембранных рибосомных рибосомных транскриптов структуры белка. Именно специфические сайты или целые участки белковой молекулы, можно повысить термостабильность белка, и изменить его чувствительность к рН, специфичности, аллостерическую регуляцию, подверженность к фактору и другим свойства. Так, термостабильности триофидефитиномеры и удалось повысить, изменив аминокислоты в двух позициях. Этот подход можно использовать как для придания новых свойств уже существующим белкам, так и для создания уникальных ферментов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Abern T. J., J. I. Casal, G. A. Petala, A. M. Kibbeno, 1987. Control of oligomeric enzymethersymmetry by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 675-679.
- Krange J., U. Ribel, J. F. Hansen, G. Dodson, M. T. Hansen, S. Hayward, S. G. Melberg, F. Norris, K. Norris, L. Suel, A. B. Sorenson, H. O. Volgi. 1988. Monomeric insulin 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. Pandal, 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. Grammt, 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. Lu, 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.
- Matsushima M., G. Nigam, B. W. Mathews. 1989. Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds. *Nature* 342: 291-293.
- Nomoi 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 immunological screen. *Bio/Technology* 9: 731-737.
- Williamson A. J., A. R. Fersht, D. M. Blow, P. Carter, G. Winter. 1994. A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering. *Nature* 370: 187-189.
- 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: 6487-6500.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие функциональные 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 содержать 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 OLI?
5. Опишите стратегию олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использованием плазмидной ДНК.
6. Как, используя «вырожденные» примеры, можно выявить 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-

Таблица 9.1. Сравнение некоторых методов диагностики инфекционных заболеваний, вызванных паразитарными микроорганизмами<sup>1)</sup>

Метод	Преимущества	Недостатки
Микроскопическое исследование	Простота Прямое выявление паразитических микроорганизмов Возможность паразитологии микробиологическим методами	Трудоемкость, длительность Низкая чувствительность Невозможность рассмотреть сходных микроорганизмов Несоблюдение высокой квалификации для interpretations результатов
Культивирование <i>In vitro</i> и <i>In situ</i> на средах	Обнаружение только жизнеспособных паразитических микроорганизмов Возможность определить вирулентности и инфертилитности	Длительность процесса, высокая стоимость Работа в поразах животных, часто рваные швы Потеря жизнеспособности в средах животного происхождения животных
Определение антител и сыгровые	Простота, простота выполнения Возможность автоматизации Возможность тестирования большого числа образцов	Не всегда специфичен Невозможность различения острой и хронической формы инфекции
Биопсия	Выявление паразитических элементов	Высокая стоимость Сложная техника Сложная интерпретация результатов
Прямое обнаружение паразитических микроорганизмов	Высокая чувствительность Высокая специфичность Высокая скорость	Высокая стоимость Сложная техника Сложная интерпретация результатов
Рентгенологическое исследование	Высокая чувствительность Высокая специфичность Высокая скорость	Высокая стоимость Сложная техника Сложная интерпретация результатов
Исследование паразитических микроорганизмов	Высокая чувствительность Высокая специфичность Высокая скорость	Высокая стоимость Сложная техника Сложная интерпретация результатов

мо растут в культуре либо вообще не видны в культуре человека. В качестве примера можно привести облигатных внутриклеточных паразитов *Stentorlia trophozoitis*, которые вызывают хроническую, перелюющуюся волнообразными рецидивами и рецидивостративную в Северном Америке и Европе. Хотя давно трудно диагностировать, инфекция для этого необычайно переносимая культура клеток. При этом часто получают ложноположительные результаты (т.е. ошибочно 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 призрачное явление оптимальнее, были разработаны методы молекулярной диагностики, в основе которых лежит иммунологические тесты 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 обеспечили приток некоторых 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, ингибиторов и модификаторов различных ферментативных реакций, определении специфических метаболитов, идентификации и контроля патогенных микроорганизмов, но имеют в свои ограничения. Если человеческой мишенью является белок, то необходимо обеспечить высвобождение детектирующей системы и создать условия, в которых не происходит маскирование или блокирование сайта связывания с антигеном.

Традиционные процедуры диагностики возбудителей инфекции опираются либо на набор характерных патогенного микроорганизма, либо, что предпочтительнее, на одну уникальную, легко выявляемую особенность. Классические микробиологические плакаты имеют тот уникальный набор биохимических характеристик, при помощи которых можно будет типифицировать обнаруживаемый и идентифицировать патогенные микроорганизмы. Например, некоторые штаммы диплоиды 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 каталитического центра.

### 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 микроцентрифужной планке, 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. Присодит качественное или количественное определение 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 образи

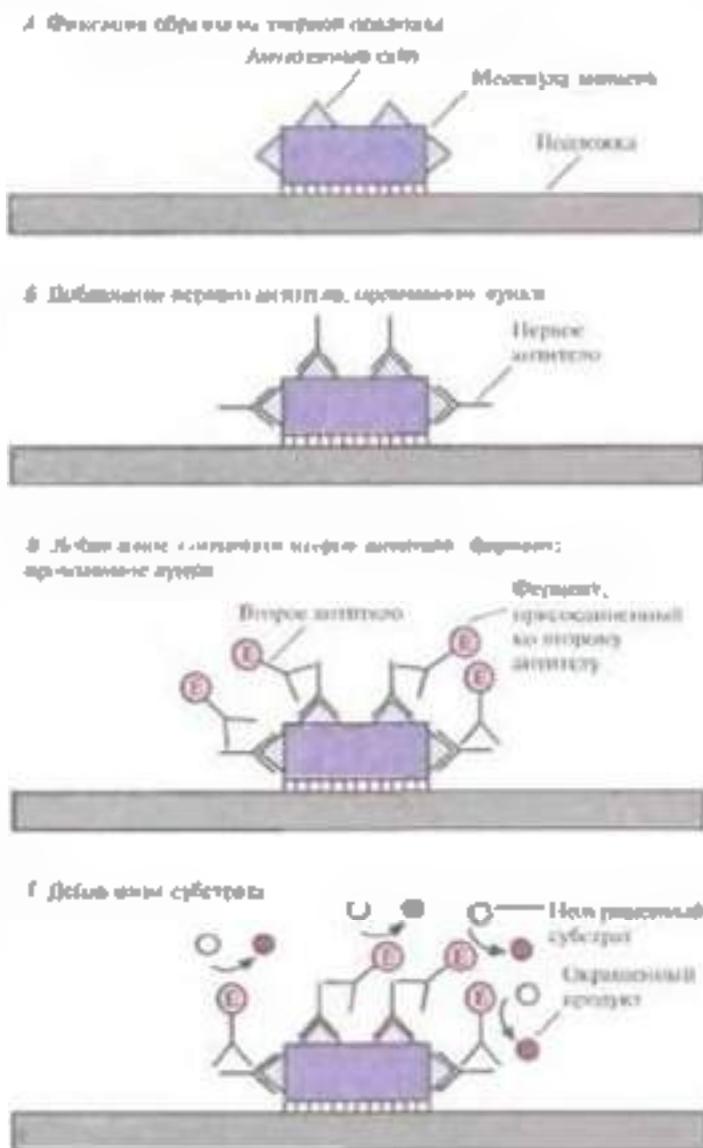


Рис. 9.1. Обнаружение антигена-маркера в принципе ELISA. E фермент присоединенный ко второму антителу.

остается неубрашенным. Если связывание с мишенью происходит, то второе анти тело при соединении с тирозилом и компьютеризированным ферментом каталазирует 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 называли 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) полноклеточные антитела 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 моноклональные антитела*

У млекопитающих в теле непрерывно вырабатываются сложные набор клеточных систем, обеспечивающих защиту от токсичных веществ и инфекционных агентов. К их числу относят иммунную реакцию, являющуюся индуцированной выработкой кистами антигенными системами специфических белков (антител), которые взаимодействуют с чужеродными веществами (антигенами) и взаимодействуют с белками иммунной системы, включая клетки иммунной системы, нейтрализуя их действие. В ответ на иммунологический стимул каждая антигенпродуцирующая клетка синтезирует и выделяет специфический вариант белка, который с помощью средств распознавания определяет участок (эпитоп, антигенную детерминанту) 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 данным антигеном, называемое поликлональным.

Уже в начале шестидесятих годов, 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 сыворотке при проведении иммунизации антителопродуцирующие 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 широким спектром в специфическом антиген-мишенном, – моноклональные антитела. Подобная клеточная линия могла бы дать неограниченный источник идентичных молекул 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 производить 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 имееют развитой антигенной структуры, являются клономатными или близкими к антигенпродуцирующим В-клетками В-серии 20 к 1. Они или стали редкими

### Обработка и отбор гибридных клеток

Первый шаг в процессе получения гибридной клеточной линии, продуцирующей антитела одноклонального состава во клеточной культуре является Постав ряда иммунизаций, проведенных в течение нескольких недель, проверкой, применяемой на протяжении жизни животного источника. Если ответ различается, то животных умерщвляют, и исследуют селезенку, промывая ее, и исследуют и исследуют экстракцию для высвобождения единичных клеток, среди которых находится и антигенпродуцирующая В-клетка. Внесение клеток селезенки смешивают со взвесью человеческих клеток, дефектных по гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазе (HGPRT). Комбинированную взвесь в течение нескольких минут инкубируют в 35% -ном поливинилпирролидоне, а затем оседают в среду, содержащую гипоксантин, тимидин и тимидин (среда GAT).

Обработка поливинилпирролидонем обеспечивает выживание клеток, так же менее чувствительны к воздействию среды. Важным событием в смеси присутствия клеток миелоиды, селезенки, а также смешивание клеток миелоиды-селезенки, миелоиды миелоиды, селезенки-селезенки. Только в среде GAT растут только гибридные клетки миелоиды-селезенки, все остальные типы клеток не могут в ней пролиферировать. Клетки селезенки и смешивание клеток селезенки-селезенки вообще не растут в культуре, а миелоидные клетки HGPRT и смешивание 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 дигидрофолата, поэтому в составе среды и наличие антибиотиков, ингибирующих активность этого фермента. Таким образом, миелоидные клетки

HGPRT и смешивание клеток миелоиды-миелоиды не могут синтезировать пурины в среде GAT и погибают.

Смешивание клеток селезенки, миелоиды растут в среде GAT (посильно: 1) клетки селезенки производят функциональную HGPRT, которая может успешно прожить в плотной культуре в среде, несмотря на блокирование синтеза пуринов с участием дигидрофолата (антибиотиком, 2) клетки миелоиды способны активно делиться. Таким образом, необходим для устранения блокирования в синтезе пуринов, обусловленного ингибированием дигидрофолата. На 10-14 сутки после смешивания клеток в среде GAT остаются и растут только смешивание клеток селезенки миелоиды. Их в том числе в лунке и в лунке микролитровых планшетов и инкубируют на постоянной культуральной среде без GAT.

### Идентификация гибридных клеточных линий, секретирующих 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, собирают и переносят в лунку другой микролитровой планшета, предварительно очищенной сменой медиума антителами ингибитора. Если в культуральной среде находится антитело (первое антитело), оно находится там же, где находится антитело, то они смешиваются с другим и остаются в лунке после из промывания. Затем в лунке добавляется второе антитело, специфичное к миелоидным 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 можно увидеть в лунке говорит о том, что в культуральной среде собрано антитело, специфичное к данному антителу (рис. 9.7). Если же такое антитело в среде отсутствует, то второму антителу не с чем будет

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

Лунки пестрой микроплазмовидной пихашки, среда (в лунках) даст положительный им-

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

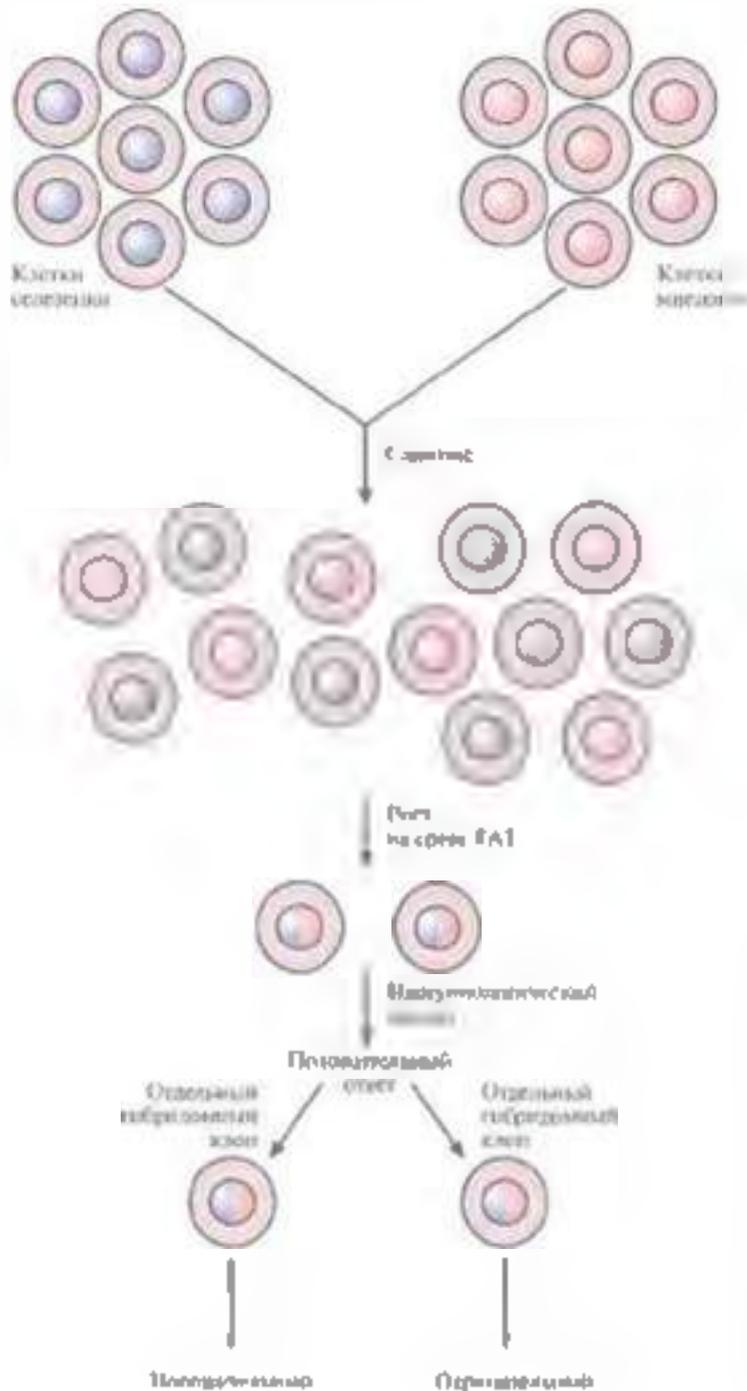


Рис. 9.2. Слияние клеток, вырабатывающих моноклональные антитела. Выделены клетки репродукции мышья, микроплазмовидной специфичности, и кровяные их сливаются с клетками миеломы, не вырабатывающими антитела. Слиявшиеся клетки отбирают по способности к росту на среде F1 (гипоосмотическая, микроаэробная, трипановая). Клетки, вырабатывающие специфические антитела в культурах размножаются субкультивируются, чтобы получить отдельные клоны. Из гибридомы, растущей в культуре и секретирующей специфические ТИД, получают моноклональные антитела.

**ИСОАНТИГЕННЫЕ СУБУНИТЫ**

Универсальный специфитет  
 Гормон роста  
 Антиангиогенные агенты  
 Функционально-активный вирус  
 Токсогенный препарат  
 Протеин

**МАРКЕРЫ ОПУХОДЕЙ**

Канцеро-эмбриональный антиген  
 (цифровой вариант предстательной железы  
 — простатический)

Регулятор факторы роста и т.д.

**ИНТОКСИНЫ**

Интерфероны I-II  
 Колонизирующий фактор

**ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТОВ**

Терапевты  
 Гематологи  
 Цитопатологи

**РАЗЛИЧНЫЕ СЕРТИФИКАТЫ**

Тирозин  
 Инсулин B<sub>12</sub>  
 Ферменты  
 Препараты для лечения  
 Гипертензия

**ИФТ (ИЗМЕНЕНА) ДАЖИ) ВАНИИ**

Химический  
 Гормон  
 Кристаллы  
 Гемитин B  
 Лиганды  
 Сигнал

Рис. 9.1. Примеры использования моноклональных антител для маркировки различных соединений в диагностике и терапии.

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, направлена 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 ан-

тигеном, строго определенным эпитопом сайтом К настоящего времени получены тысячи моноклональных антител, которые можно использовать для обнаружения различных соединений в иммунологических микроанализах (рис. 9.1). Альтернативой получению моноклональных антител из культуры гибридомных клеток может быть отбор и размножение моноклональных антител в их частях (Fv-фрагментов), например против антигена-мишени, с помощью *in vitro* (табл. 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 чего генетическое заболевание возникает в результате повреждения определенного гена. Сегмент ДНК, детерминирующий данный биологический признак, имеет строго определенную нуклеотидную последовательность и может служить двойственным маркером.

В последние годы быстрым и надежным способом идентификации меченой гибридомной нуклеиновой кислоты — сравнение двух копий меченой сегмента разных молекул ДНК. Процедура в общих чертах состоит в следующем.

1. Фиксация двуцепочечной 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 гибридной нуклеиновой кислоте, 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 гибриды из живого материала) или ложноположительных (отсутствие сигнала при наличии высококачественной мишени) результатов, то целесообразность применения теста заметно снижается. Специфичность зонда может проявиться на разных уровнях: они могут «растворять» два и более нуклеотидов, послышавшиеся в превращении одного нуклеотида в другой. 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 из фрагмента.

Зонды получают разными способами. Одним из них является и следующий: ДНК патогенного микроорганизма расщепляют с помощью рестриктазы эндонуклеазы и амплируют в полимеразном усилителе. Затем проводят скрининг рекомбинантных плазмид с использованием генной ДНК в качестве зонда, так и метода генного зондирования. Те плазмиды, которые содержат последовательности, гибридирующие только с ДНК патогенного штамма, составляют основу высококачественных зондов. После этого проводят ряд дополнительных гибридных с ДНК, выделенными из различных организмов, чтобы удостовериться, что потенциальные зонды не реагируют с ними перекрестной гибридизацией. 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 выделения нуклеиновой кислоты, особенно в тех случаях, когда тестируются клинические образцы. Исследованиями с успехом проводят гибриды

зонды с ДНК мишенями, присутствующими в образцах мочи, мочи, слюны, смывая из зелья и в тканях без предварительной их очистки. Если специфичность последовательности мишени не исследуемым образом смываем, 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, заболевание, угрожающее примерами третью часть населения Земли. Он инфицирует триллионы и разрушает их, что приводит к различным туберкулемам, в том числе к легочной и церебральной туберкулемам, а также другим органам. Чтобы выявить источник инфекции, оценить эффективность лечения и обеспечить раннюю диагностику и лечение, необходимы достаточно чувствительные, простые и недорогие методы. В настоящее время зонды диагностируют с помощью метода радиоизотопной последовательности зонда. Кроме дифференциации, 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 зонда и *Mycobacterium tuberculosis*.

Для излучающей ДНК зонды могут быть мечены, т. е. для выявления ДНК на объекте, в качестве зонда можно использовать радиоизотопную последовательность ДНК *P. fluorescens* Стюарта с помощью ДНК зонда (проводится скрининг библиотек генов ДНК паразита). Затем отбирается зонд, дающий наиболее интенсивный гибридный сигнал, поскольку именно он предположительно содержит высококачественные последовательности ДНК, способные к гибридам при с ДНК зонда *Mycobacterium tuberculosis*. В качестве специфического зонда можно использовать последовательность, гибридирующую с ДНК *P. fluorescens*, но не с ДНК *P. solis*, *P. stuartii* или с 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 правило можно использовать для обнаружения ширинки спектра бактерий, вирусов и паразитов.

#### *Нерадиоактивные методы детекции*

В биохимическом лаборатории для амплификации используют меченые меченные коарми либо радиоактивным изотопом, чаще всего  $^{32}\text{P}$ . Такие коарми обладают высокой удельной радиоактивностью и обеспечивают хорошие характеристики сигнала. Радиоактивно меченный коарми соединяется с фиксированной на нем ДНК-матрицей, иницирует амплификацию, отыскивая несвязанную ДНК-матрицу и детектирует метку с помощью радиоавтографии.

Синиль  $^{32}\text{P}$  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 амплификационного сигнала в этом случае используется ферментативное преобразование хромогенного или люциферинесцентного субстрата: первый из них под действием фермента изменяет окраску, а второй испускает свет. В большинстве подобных систем применяются ДНК-зонды, содержащие биотинилированные 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 avidин (белок зуринного яйца) или стрептавидин (бактериальный выделитель avidина) (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 люциферинесцентный субстрат и регистрируют изменение окраски либо люциферинесценции, сопровождающую преобразование субстрата в продукт (рис. 9.4. Г).

В качестве альтернативы после амплификации 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 зонд, 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 нецветящийся краситель, а в люциферинесцентных системах — продукт, который испускает свет.

Нерадиоактивные системы детекции обладают и другими преимуществами: биотинилированная ДНК остается стабильной при комнатной температуре как минимум год; методы регистрации люциферинесценции обладают такой же чувствительностью, как и методы регистрации радиоактивного сигнала; детекция испускаемого света при помощи рентгеновской пленки или люциметра, как и регистрация изменения цвета, занимают несколько часов. По-прежнему, люциферинесцентные системы регистрации сигнала, все же более чувствительные, чем хромогенные, и менее инертные все остальные, используемые при ДНК-диагностике. Если при этом применяется ПЦР, то амплифицируемый продукт можно пометить флуоресцентным красителем, присоединив его

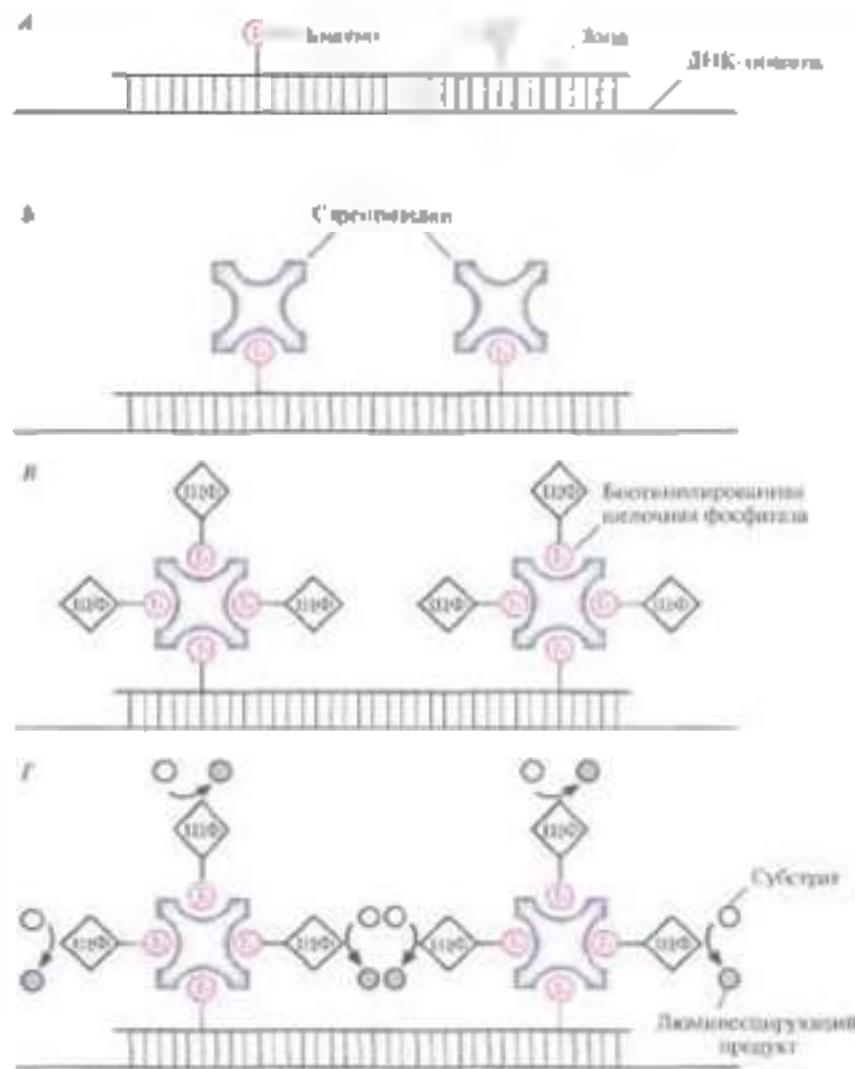


Рис. 9.4 Хемиколическая метод обнаружения ДНК-мишеней. Б – биотин. ЦФ – таковая фосфорилаза. А – Связывание биотинилированной кода с ДНК-мишенем. Б – Связывание стреловидного с биотином. В – Связывание биотинилированной шестонной фосфорилазы со стреловидным. Г – Образование люминесцентного триплекса под действием щелочной фосфорилазы

в 5'-концу выдвинутой пробы. В качестве термостабильной части используются флуоресцентные и кварцевые, которые нечувствительны к высокой температуре. После ПЦР-амплификации ДНК-мишеней проводят разделение флуоресцентно-меченного продукта и продукта амплификации, после чего регистрируют наличие метки (рис. 9.5). Если ДНК-мишень в образце отсутствует, то не будет образовываться и флуоресцирующий продукт.

Один из наиболее разработанных неразделительных методов детекции основан на использовании «молекулярных маяков» (рис. 9.6). Такой маяк состоит из 25 нуклеотидов. Средние 15 (10

или 14 нуклеотидов ДНК-мишеней не связываются друг с другом, а 5 нуклеотидов в основном взаимодействуют и образуют стабильную 3'-концевую провисающую флуоресцентную хромофор (флуорофор), и к 3'-концу – термостабильный хромофор (туинер), на котором передается энергия возбуждения флуорофора. В этот момент при комнатной температуре «маяк» имеет такую конфигурацию, при которой флуорофор и туинер находятся в тесном контакте, и флуоресцентная флуорофора туинера. Когда же 15 средних нуклеотидов жестко взаимодействуют с комплементарными последовательностями ДНК или РНК-мишеней, происходит пространственное разделение

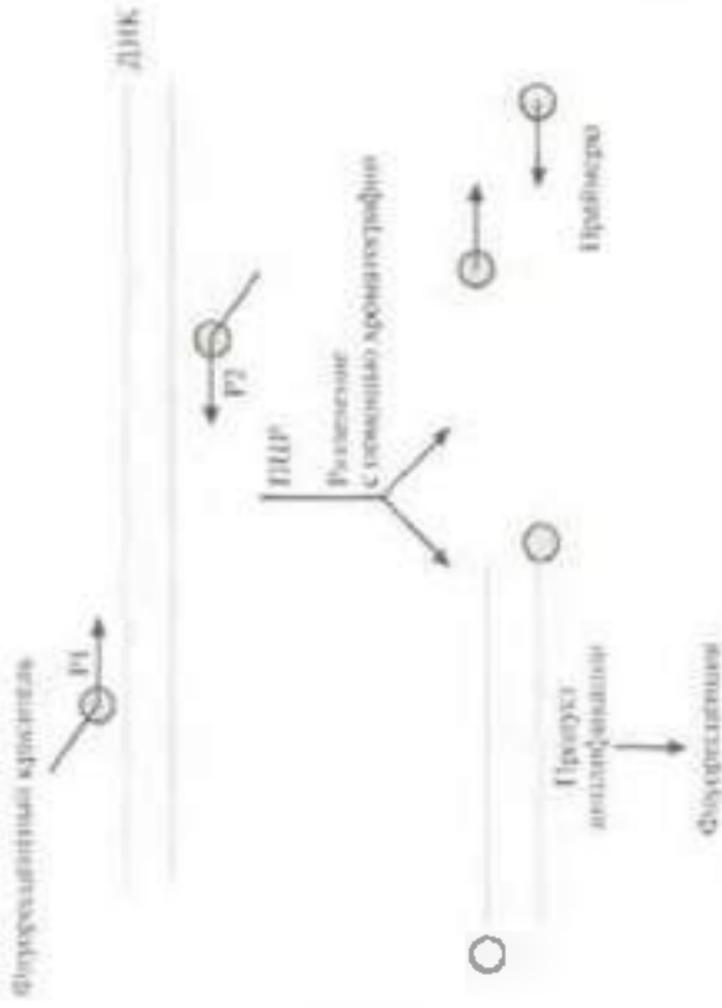


Рис. 9.5. Детекция ПЦР-продуктов с помощью флуоресцентного красителя, присоединенного к праймерам (P1 и P2).



ния ДНК: трипировидини синцити берут часть биоматериала (соскоб с кожи, слюну, кровь, волосы) и определяют, достаточно ли в нем интактный 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 видами, каждый из которых распознает определенную последовательность ДНК (при этом перед гибридизацией со следующим зондом предшествует полностью удаление с мембраны). После каждой гибридизации с помощью радиоактивных зондов маркируют полосы меченых продуктов гибридизации зондов с рестрицированной ДНК, и строят «лестницу 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 митохондриальные ДНК многократки встречающиеся в геноме человека и состоящие из tandemно интродуцированных участков. Длина митриона варьирует от 9 до 40 п. н., а их число — от 10 до 30; при этом один и те же митохондриальные последовательности у разных индивидов могут иметь разную длину. Эти различия возникают в результате увеличения или уменьшения числа tandemных повторов, во-первых, в ходе репликации ДНК. Никаких биологических последствий такие вариации не имеют. Несколько митохондриальных ДНК маркируют белым. Ребенок наследует одну митохондриальную последовательность от одного родителя, а другую — от другого.

«ДНК-отпечатки» данного человека представляет собой набор различающихся по длине фрагментов, количество которых митохондриальным последовательностям его генома. Понять большинство различий можно благодаря тому, что в популяции встречается два человека с идентичными «ДНК-отпечатками», равно  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ . Другими словами, характер расположения число митохондриальных ДНК почти столь же индивидуален, как и отпечатки пальцев. Генетическую родственность определяют также при установлении отцовства. Часть полос

«ДНК-отпечатки» ребенка должны соответствовать поясам митохондриальным «отпечаткам», а часть отцовского.

Если ДНК в исследуемом образце недостаточно, то она не очень сильно загрязнена, можно амплифицировать небольшие участки митохондриальной ДНК с помощью ПЦР, а затем провести на седенитрование; этот метод более



Рис. 9.7. Использование Southern-гибридизации для изучения рестриктной ДНК, маркированной и в крови и слюне одного и того же человека. На фото крови (из слюны) и слюны (из крови) была обнаружена одна и та же рестрицированная эндонуклеазой «лестничная» фрагментов для ДНК, также полученная в слюне крови из слюны. Идентичная эволюция для ДНК (идентичность и сходство) в ее «лестничной фрагментации» для ДНК подтверждена.

частытелем, 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 являются 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-соотношение 50–60%, и добавляют их на этапе денатурации к преваритам 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 окрасив реакцией. 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 окислителя праймеров, можно сравнить 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-

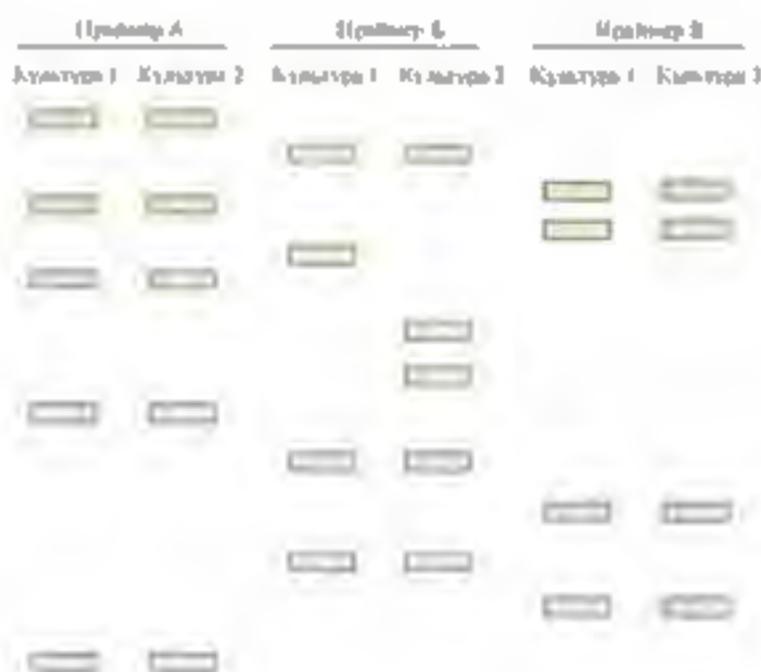


Рис. 9.8. Электрофорез ПЦР-амплифицированных фрагментов растительной ДНК в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидилом. Для амплификации фрагментов ДНК из двух культур использованы три разных произвольных праймера. В случае праймера А и В характер гетерозисного полиса в полиакриламидном геле для культур 1 и 2 совпадает, если же используется праймер Б, то различие полиса фиксируется. Таким образом, с помощью праймера Б можно выявить различия между культурами 1 и 2.

нотенды, использовать радиоактивные нуклеотиды (сферидиантин), т. е. можно легко и быстро характеризовать быстрое количество сферидиантин; 3) процесс можно автоматизировать. Кроме того, для проведения обычной ПЦР не обязательно иметь пикоскопическую последовательность, исключено использование фрагментов матрицы для амплификации. В случае же RFLP амплифицируется только участок генома, содержащий две комплементарные примечания 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 сферидиантин представляют собой сочетание ПЦР-продуктов родственности инбридных единиц. RFLP-маркеры используются также для скрининга рибосомальных *rDNA*. Сферидиантин анализируют объективно «сервоанализ» у древних растений. Было установлено различие между индийскими (не привезенными к району) (индийскими) и европейскими (не привезенными европейцами) растениями.

### 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.

#### Скрининг мутантной аллели

Серповидноклеточная анемия – генетическое заболевание, обусловленное заменой одного нуклеотида в кодоне, который соответствует шест-

ому аминокислоте в  $\beta$ -цепи гемоглобина (Hb). У индивидов, гомозиготных по мутантному гену (A/A), эритроциты имеют необычную серповидную форму; по сравнению с нормальной конформацией молекулы гемоглобина последствие замены в кодоне на гуанинотимин кислоту Мутантный гемоглобин не может с достаточной эффективностью агрегировать в склероз, и у таких больных развивается тяжелая анемия с прогрессирующим поражением сердца, легких, мозга, суставов и других органов. У индивидов, гетерозиготных по данному гену (A/S) (носителей генетического заболевания), эритроциты имеют нормальную форму, в некоторых случаях они проявляются лишь в тяжелых условиях (на большой высоте над уровнем моря либо при сильных физических или других нагрузках, 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 в меньшей степени среди европейцев. В США проводят скрининг для выявления носителей гена серповидной клеточной анемии, которые могут передать этот ген своим потомкам. Рисками для их детей не только являются для этого тестов.

Алели одного нуклеотида в  $\beta$ -глобиновом гене, приводящие к серповидноклеточной анемии, сопровождаются амплификацией сайта для рестрикции (*NotI*) в домену *SinI*. Этот фермент узнает последовательность CCTAACG и рестрицирует молекулу ДНК между основаниями C и T (N – любой из четырех нуклеотидов). В нормальном гене эта последовательность имеет вид CCTGAGG, а в гене серповидноклеточной анемии – CCTCTCT. На этом участке обозначается ДНК-диагностика данного заболевания (рис. 99).

Используя примеры, фланкирующие сайт *NotI*, амплифицируют с помощью ПЦР небольшое количество тестируемой ДНК (рис. 99, А). Амплифицированный фрагмент обрабатывают *SinI*, продукты рестрикции разделяют с помощью гель-электрофореза и окрашивают на бромистом литмем. При наличии *SinI*-сайта на электрофорезном геле выявляется специфический набор полос (рис. 99, Б), отличный от таковой

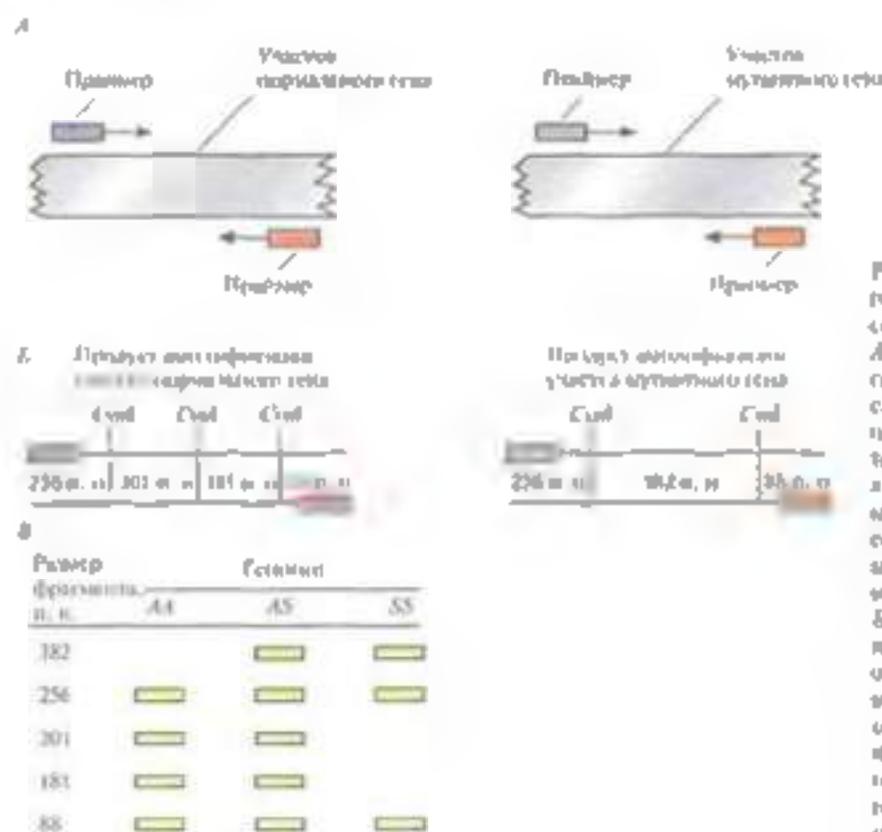


Рис. 9.4. Выделение муляжного тела, ответственного за развитие серповидноклеточной анемии. А. ПЦР-амплификация участка β-глобинового гена, содержащего сайты для рестрикции ClnI, один из которых отсутствует в муляжном теле. Б. Рестрикция полученных ПЦР-продуктов с помощью ClnI. Муляжное тело содержит три ClnI сайты в сегменте ДНК, флансированном праймерами, а муляжный – два. В. Электрофоретические разделения фрагментов, полученных при обработке ПЦР-амплифицированного β-глобинового ДНК с помощью ClnI. АА – гомозиготность по нормальному β-глобиновому гену, АБ – гетерозиготность, ББ – гомозиготность по гену серповидноклеточной анемии.

и отсутствие ClnI-сайты. Описанным способом можно без труда и достаточно быстро установить генетический статус обследуемого, не проводя при этом процедуру гибридизации.

### Метод ПЦР/ЛОЗ

Не все генетические нарушения, приводящие к гемолитическим дефектам гемоглобина, связаны с наличием или отсутствием сайтов рестрикции, пригодных для обнаружения с помощью олигонуклеотидных зондов с помощью 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, флансирующие 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 незакрытую основанную, выходящую 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 последовательностью ДНК муляжное (амплифицированное методом ПЦР) происходит их полная гибридизация, и при добавлении в реакцию смеси ДНК-лигазы концы X и Y ковалентно свяжутся. 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 связать концы X и Y.



Можно считать нормальными и другие олигонуклеотидные мишени, полностью соответствующие последовательности с мутированным ЮФ и мутационным ПРФ. При таком выборе зонда конкурентное будет происходить в случае их отжига с мутантной ДНК-мишенью и не будет в случае отжига с нормальным мишенью. Таким образом, метод ПЦР/ДЮГ различает две ситуации: ингибирование зонды в отсутствие деструкции.

Чтобы определить, произошло ли ингибирование, 5' конец зонда X имеет биотиниловый, а 3' конец имеет Y-детектируемую, ингибирующую способность, если взаимодействует с конкурентной мишенью. После гибридизации и деструкции проводят денатурацию ДНК для освобождения гибрида. Зонды X и перекрест смеси в используемую систему, покрытую стрептавидином. Другая причина, чтобы увидеть весь материал, кроме взаимодействия с стрептавидином биотинилированной зонды. Затем добавляют в смесь ингибитор к детекции смеси, представляющей соединения со щелочной фосфатазой. После промывания, в месте которой произошло взаимодействие, ингибитор, добавляя бесцветный хромогенный субстрат. Образующиеся продукты в результате действия фермента ингибитора к детекции смеси с жидким, меченым детектированием, т.е. с тем, что может быть легко связано с зондом, меченым биотином. Если же ингибитор не взаимодействует, значит ингибирование не было.

Различия между двумя видами мишеней, можно установить количественно статус любого человека. Например, ДНК гетерозиготных носителей дает положительный ответ с обоими парами зондов, ДНК мид, обладающих двумя копиями нормального гена, — только с тем набором зондов, который содержит мутацию. Комплементарная нормальная сайт, и, наоборот, ДНК мид, носитель 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 зонной реакции. Тестируемую ДНК смешивают с избытком двух индикаторных зондов, отличающихся цветом, в присутствии термостабильной ДНК-лигазы. Проводят полимеризацию при 65 °С, затем повышают температуру до 94 °С, чтобы произошло денатурация образующихся гибридов зонд-ДНК-мишень, и вновь понижают температуру до 65 °С для гибридизации свободных индикаторных индикаторных ДЮГ-зондов с ДНК-мишенью. Этот шаг повторяют 20 раз. Если индикаторные ДЮГ-зонды полностью комплементарны ДНК-мишени, то деструкция будет происходить в малом объеме, и после 20 циклов останется достаточно продуктов ингибирования (меченых зондов X и Y) для того, чтобы их можно было обнаружить с помощью электрофореза или ELISA. Если зонды не комплементарны, то деструкция не происходит и индикаторный продукт обнаруживается в большом количестве.

#### *Генотипирование с использованием физически меченых ПЦР-примеров*

Классическим методом генотипирования основано на применении ПЦР-примеров, меченных различными физически мечеными красителями. Чтобы различить мутантную ДНК и ДНК дикого типа, проводят ПЦР двумя разными примерами. Один из них (Р1) комплементарен ДНК-мишени типа W на 3'-конце помечен красителем (красный цвет), другой (Р2) комплементарен мутантной ДНК и на 3'-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 световая волна. 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 к любому гену с известными нуклеотидной последовательностью.

### Мутации в рамках сайта одного гена

Целью не всегенетического обследования обуславливается наличие специфического к тапсисуема в гене. В большинстве случаев мутации происходят

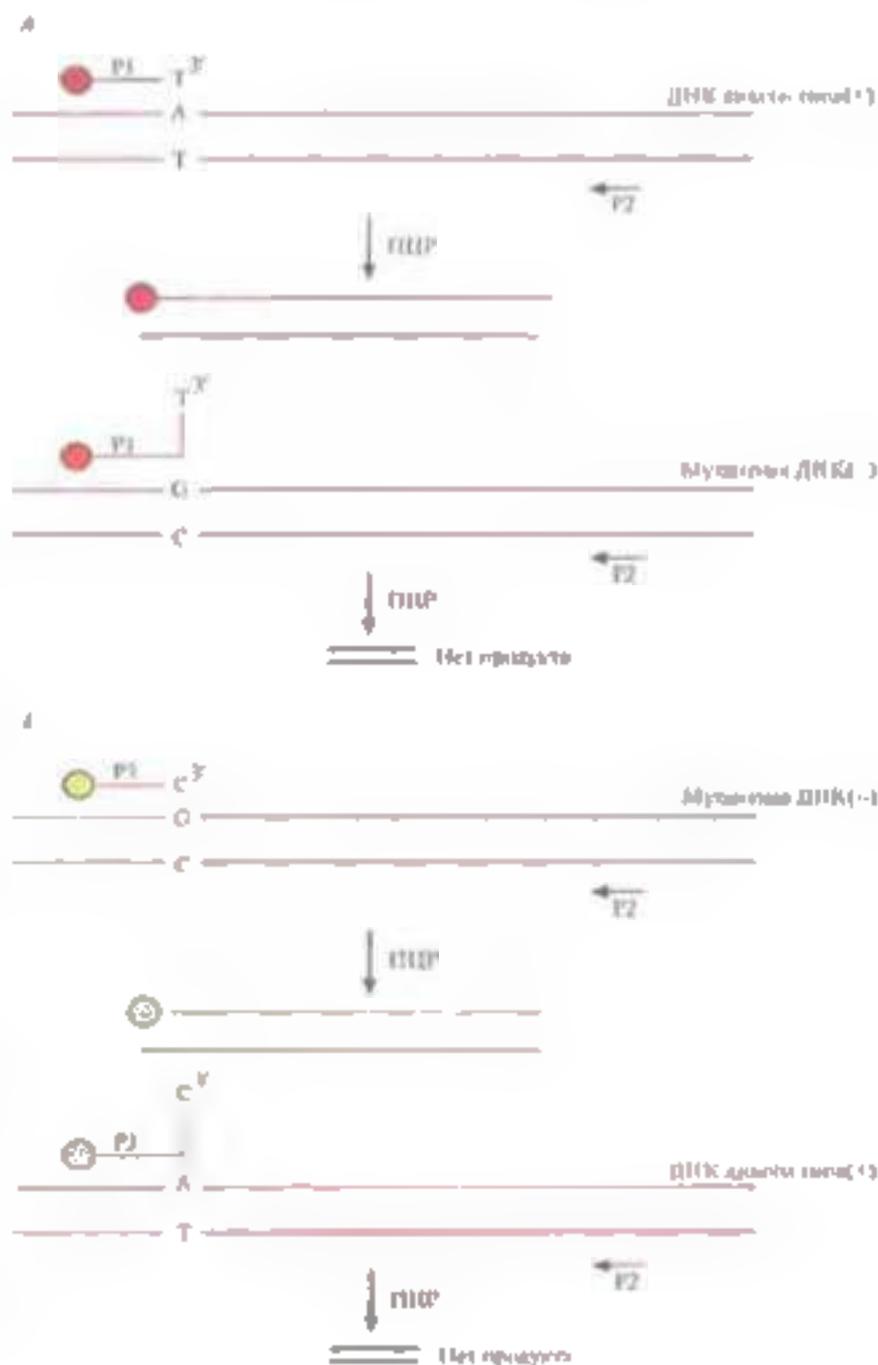


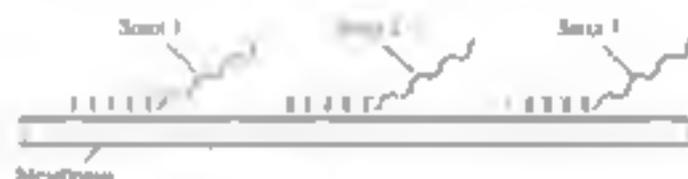
Рис. 9.10. Обнаружение точечных мутаций с помощью флуоресцентно меченных ПЦР-примеров. А. Используя праймеры P1 и P2, амплифицируем ДНК дикого типа. Мутантный ДНК при амплификации праймером не амплифицируется и в место амплификации с праймером P1 5'-концы праймера P1 помечены флуоресценцией, праймер P2 меченный B. Используя праймеры P1 и P2, амплифицируем мутантный ДНК. ПНК дикого типа и этого случая не амплифицируется 5'-концы праймера P1 помечены флуоресценцией, праймер P2 меченный B. В случае дикого типа и мутантного сайта В случае дикого типа +/+ (++) = ++ (++) образуется ПЦР-продукты, содержащие пары разнородных и флуоресцентных сайтов флуоресценции, и светит светом смешивается красным, желтым и зеленым флуоресценции.

дны в разных сайтах и прелетая одного гена, но приводят в одному генетическому дублированию). В качестве примера можно привести  $\beta$  та-гемоглобин-последовательные дублирование, связанное с утратой активности  $\beta$ -глобина У-астрономических носителей при этом обычно наблюдается увеличение числа. Индивиды же, homozygous по одному или нескольким носителям во многих мутантных сайтах, для поддержания жизни нуждается в регулярном наследии крови и другим исцелении. Поскольку мутации в живом (в основном специфическим сайтам  $\beta$ -глобина) гена имеют тенден-

цию в  $\beta$ -глобине, необходимо провести по крайней мере несколько разных тестов. Такие возможности возможны, хотя и весьма дорогостоящие.

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, используемой мутации. К 3'-концу каждого зонда присоединяется флуорофор (FUT) для ин-

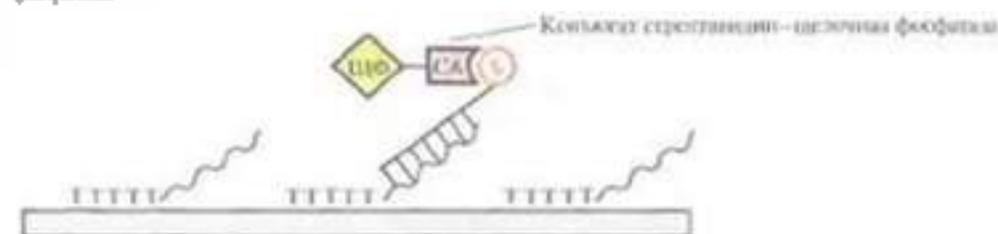
А. Связывание специфических зондов с мутацией



Б. Связывание зонда с ПЦР-амплификацией. Понимание мутации и формирование гетеродуплекса



В. Дифференциальная протекция-цементная фосфатаза



Г. Дифференцирование субстрата

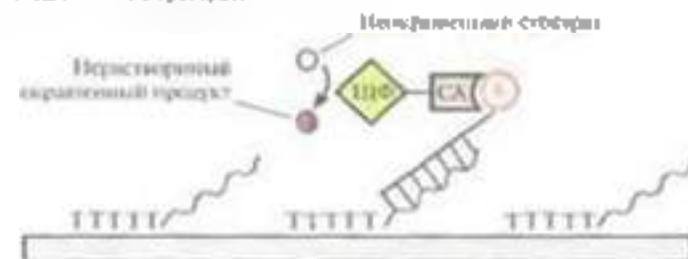


Рис. 9.12. Выявление мутаций в разных сайтах одного гена в присутствии СА-стратигиона: ЦФ — цемента фосфатаза.

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 биотинном. Амплифицированные фрагменты ДНК мишеней гибридизуют с зондами, пришитыми к фильтру, в условиях, обеспечивающих гибридизацию только полностью комплементарными последовательностями. В гибридизационную смесь добавляют стрептавидин, связанный с меченой флуоресцеиной (можно также использовать пероксидазу хрена или уреазу). 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 меченая точка. На один и тот же фильтр можно нанести несколько точек, соответствующих разным рядам различных специфических олигонуклеотидных зондов. Проанализировав эту меченую 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 неравноценные драматические, асимметричные и флуоресцентные системы детекции. 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-зондирования можно будет выявлять болезни, а возможно и еще наиболее перспективные э-

питические и инфекционные заболевания, а также новоборужения.

## 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 мишеню, другим на идентификации специфических последовательностей с помощью гибридизации или ПЦР.

Наиболее распространенным молекулярным методом является EISA. Вкратце он состоит из следующих: 1) фиксации образца на твердой подложке; 2) амплификации первого мишеня, специфичного к мишеню-мишени, и его связывание с амплификом-мишенем; 3) добавление комплекса вторых мишеней – ферментов, который присоединяется к первому мишеню; 4) добавление невариабельного субстрата, который под действием фермента, включенного 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 нуклеиновых кислот соединений в широком спектре биологических образцов. Чтобы повысить специфичность пары зондов, для диагностики часто используют мультикомпонентные мишени. При этом для уменьшения стоимости прибегают к технике клонирования их фрагментов в E coli и получения помеченного субстрата, а не ее синтез – клонирование фрагментов E coli фрагментов.

Высокочувствительным и специфичным методом обнаружения нуклеотидных последовательностей в биологических образцах является гибридизация. Это используют при выявлении 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 тождества, 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 маркером 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, при этом используют «пронизывающие» ферменты. 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 Bio/Technol Winter Symp.* 1: 85.
- Barke R. H., L. Nambaeang, W. Koober, G. C. Alestin, 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. Sakai, C. H. Leeckson, 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. *Bio/Technology* 6: 941-947.
- Chefan D. P., C. Supriko, J. Mackay, M. E. Gualdi, P. Hansen. 1990. Chemiluminescent detection of nucleic acid hybridization. *Frise* 12: 9-12.
- Cardoz C. T. 1987. Disease diagnosis by recombinant DNA methods. *Science* 236: 1223-1229.
- Chefan D. 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. Gifford, J. J. Somaly. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1663-1665.
- Gilman I. 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. Gebreyts. 1990. Dinitrolyated nucleotides for labeling and detecting DNA. *Methods Enzymol.* 184: 561-577.
- Kobayashi, C. Mitachi. 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. Sinauer, 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. *Trends Genet.* 9: 275-279.
- Sadi R. K., P. S. Walsh, C. H. Leveson, 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: 301-308.
- 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, N. H. Persing. 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.* 29: 161-196.
- Wolter G., C. Mikula. 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  $\beta$ -глобулина человека, приходящие к серинилиммуноглобулиновым антигенам.
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-микробиологом, чья функция и исследовать различные тесты и обнаружения содержания вирусных почечных ДНК вируса, выходящими в результате инфекции у крупного рогатого скота. Поскольку эффективность лечения зависит от стадии и тяжести заболевания, 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. Вы также помните матричные и как ее используют для характеристики слюнных количеств ДНК о зубной единице?
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 полурецидив одобрене в США (табл. 10.2), пробует 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 использовать самоэволюционирующую клетку, которая либо не будет «нарушителя» – «универсальной», разрушает если она осеждена «богатырской», 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 расширением молекулярной структуры и функций 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



**Таблица 10.2** Некоторые рекомбинантные белки, полученные во Франции во время исследования по созданию и применению (вместе с другими продуктами) рекомбинантных и комбинированных средств (США) по применению для лечения детей (Lippman et al., 1982)

Белок	Фирма	Указания
Антикоагулянтный фибриноген	Alex. Pasteur Institute, Gustave Roussy	Гемифибрин А
Гемоглобин	Селлгуд	Борсан-1000
Гемоглобин	Ludmerich	Ледигем (коричневый раствор у детей)
ИФН- $\alpha$ 1	Genzyme	Мунтаферондаль
ИФН- $\alpha$ 2	La Jolla	Изаферон (раствор)
ИФН- $\alpha$ 2b	Селлгуд	Изаферон
ИФН- $\beta$	Yale/Smith-La Jolla	Изаферон (инъекции) (серийный А и В)
ИФН- $\gamma$	Schering-Plough	Изаферон (инъекции) (серийные А и В) (серийный В и С)
ИФН- $\gamma$	Intellect Sciences	Изаферон (инъекции) (серийный А и В)
ИФН- $\gamma$	Boehr. Ingelheim and Celanese	Резаферон (инъекции) (серийный А и В)
ИФН- $\gamma$	Селлгуд	Хризаферон (растворитель)
Сывороточный трансферрин	La Jolla	Ледигем
Трансферрин (рекомбинантный)	Genzyme	Пизуферон (инъекции) (серийный А и В) (серийный В и С)
Эритропоэтин	Amgen and Ortho Biotech	Арепо, эритропоэтин (инъекции)

сы синтезирующийся мРНК и белков. Процедура выделения кДНК интерферона состоит в следующем.

- 1 Из лейкоцитов человека выделены мРНК и фракционированы ее по размерам: провели обратную транскрипцию и встроили в сайт *Lac* плазмиды р(R)322
- 2 Необходимым продуктом трансформации *Es. coli* стала *col*. Образовались 6000 клонов и заразили их 12 групп по 312 клонов в каждой. Тестирование проводили на группе клонов, что позволяло ускорить процесс идентификации
- 3 Каждую группу клонов субклинически с неопределенным препаратом ИФ мРНК
- 4 Из образовавшихся гибридов, содержащих клонированную ДНК и мРНК, выделены мРНК и ввели ее транслировать в бесклеточной системе синтез белка
- 5 Определены интерферонную активность (используя активность клеток смеси, полученной в результате транскрипции). Группы, проявившие интерферонную активность, содержали клоны с кДНК, гибридные с ИФ мРНК
- 6 Полученные группы разделили на 8 подгрупп, содержащих по 64 клона, и вновь провели се-

стирование. Различия на подгруппы получили до тех пор, пока не идентифицировали клон, содержащий плазмидную ИФ-кДНК человека

Если нужно получить большое количество ИФ, соответствующую кДНК можно субклонировать в экспрессирующем *E. coli*-векторе, который способен достигать высокого уровня экспрессии.

**Таблица 10.3** Выращивание рекомбинантного интерферона некоторыми методами

Методы	Индикаторы
$\beta_{21}$	Система С, активность белка (клетки)
$\beta_{22}$	Рис (активность вируса при выделении и при выделении, активность белков при выделении, активность при выделении при выделении, активность при выделении при выделении, активность при выделении при выделении)
$\beta_{23}$	ИИФ, активность при выделении
$\beta_{24}$	Активность при выделении (активность при выделении)
$\beta_{25}$	Активность при выделении
$\beta_{26}$	Активность при выделении (активность при выделении)
$\beta_{27}$	Активность при выделении (активность при выделении)
$\beta_{28}$	Активность при выделении (активность при выделении)

### 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 $\alpha$ , ИФ $\beta$  и ИФ $\gamma$ . ИФ $\alpha$  и ИФ $\beta$  синтезируются клетками, образующими преградную вирусную или вирусную ИНК, а ИФ $\gamma$  вырабатывается в ответ на действие веществ стимулирующих рост клеток. ИФ $\alpha$  кодируется семейством генов, включающих как минимум 15 независимых генов, в то время как ИФ $\beta$  и ИФ $\gamma$  кодируются одним геном каждый. Подтип ИФ $\alpha$  различают по уровню специфичности. Например, при проверке эффективности ИФ $\alpha_1$  и ИФ $\alpha_2$  на обезьянах (вирусом лямпы клеток (или эти микроорганизмы проявляют сходную противовирусную активность, в случае же обезьяны вирусом клеток человека ИФ $\alpha_2$  оказалась в 10 раз эффективнее, чем ИФ $\alpha_1$ . Если рекомбинантная вакцинация производится на клетках мыши, то ИФ $\alpha_1$  оказывается в 30 раз менее эффективным, чем ИФ $\alpha_2$ .

Было предпринято несколько попыток сопоставить ИФ с комбинированными соединениями, используя тот факт, что члены семейства ИФ $\alpha$

различаются по степени и специфичности своей противовирусной активности. Теоретически этого можно достичь, соединив части последовательностей генов разных ИФ $\alpha$ . Это привело к образованию гибридного белка с другими свойствами, чем у каждого из исходных белков. Сравнение последовательностей «ДНК ИФ $\alpha_1$  и ИФ $\alpha_2$ » показало, что они содержат одинаковые сайты рестрикции в позициях 61, 92 и 191. После расщепления обеих «ДНК» в этих сайтах и последующего лигирования фрагментов было получено несколько гибридных генов (рис. 10.1). Эти гены экспонировали в *E. coli*, синтезированные белки отсчитывали и исследовали их биологические функции. Примеры чужбных свойств гибридных ИФ на культуре клеток млекопитающих показали, что некоторые из них проявляют большую активность, чем родительские молекулы. Кроме того, многие гибридные ИФ индуцировали образование 2'-5'-уксусной кислоты в системах контрольных клеток. Этот фермент участвует в синтезе 2-5 связываемых олигонуклеотидов, которые в свою очередь активируют лизинную каталонную маторбинуклеу, расщепляющую вирусную мРНК. Другие гибридные ИФ проявляли большую, чем родительские молекулы, интегрированную активность в культурах различных типов клеток человека.

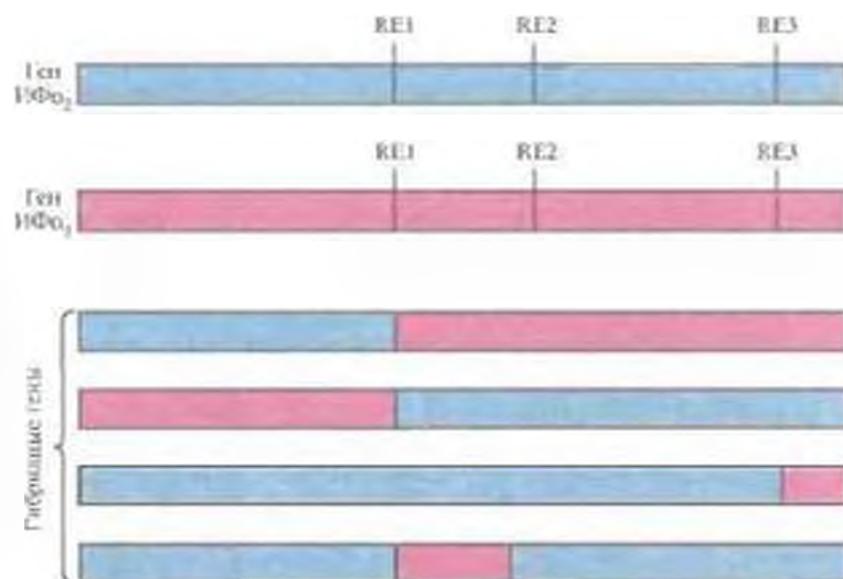


Рис. 10.1 Структура генов ИФ $\alpha_1$ , ИФ $\alpha_2$ , и четырех гибридных генов (различные участки обозначены последовательностями генов ИФ $\alpha_1$  и ИФ $\alpha_2$ , обнаруживаемые одинаково у них). Одинаковые сайты для рестрикции кодируют нуклеотиды (RE1, RE2, RE3). Рестрикции на этих сайтах и лигирование фрагментов приводит к созданию гибридных генов. В нижней части рисунка представлены четыре гибридных гена.

### Гормон роста человека, полученный встадом генов мыши

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 грунте некоторых аминокислот (Asp-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 прокардиотичность 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 сплитинга интерлейкина-3 с участием  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*, а не чуждый аутогенный белок массой 35 кДа. Как правило, подобный димерный белок нельзя использовать в качестве лекарственного средства. Клетки дрожжей *Kluyveromyces fragilis* и *Saccharomyces cerevisiae*, а также клетки человека были способны эффективно синтезировать интерлейкин-3, однако уровень экспрессии в них был относительно низок. Гликозилрование не оказывает заметного влияния на активность интерлейкина-3, но ведет к определенной разнице в роле молекулы.

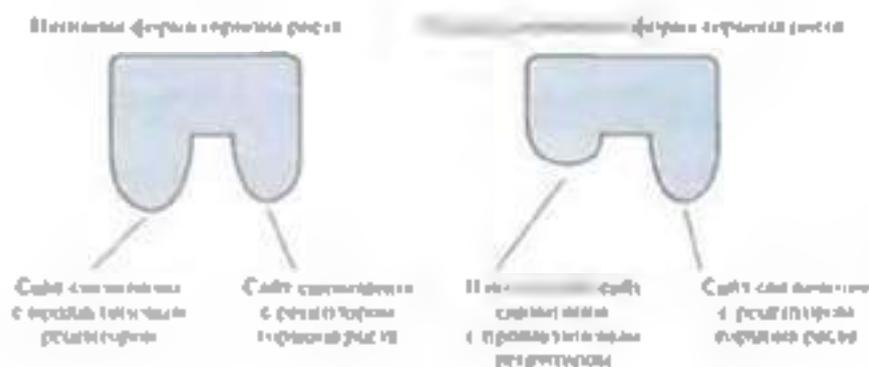


Рис. 10.2. Селективное избирательное направление мутаций и модифицированной формы гормона роста человека (ГРЧ). С помощью сайт-специфического направленного мутагенеза (мутагенеза) удалось изменить форму ГРЧ, чтобы она не связывалась с пролиферативным рецептором, но сохраняла способность связываться с рецептором гормона роста.

Таблица 10.6. Уровень экспрессии гена интерлейкина-3 в разных системах клеток человека<sup>1</sup>

Вид клеток	Применение <sup>2</sup>	Уровень экспрессии, I.E.	Анализ в % от 10 <sup>6</sup> клеток
Клетки эндотелия	Метастазирование	1	30-40
<i>B. lymphocytus</i>	Антираковая	300	15 (средний)
<i>E. coli</i>	Im7	30	15 (средний)
<i>E. coli</i>	Im7	900	20 (высокий)
<i>A. baumannii</i>	Листовые	20	30-100
<i>S. pneumoniae</i>	Фактор неспецифичности	20	20-100

<sup>1</sup> М. Гибсон, Дж. Дженс, *J. Biol. Technology* 9: 47-52, 1991, с благодарностями

<sup>2</sup> В клетках *Staphylococcus aureus* из штамма 8320/83 (штамм «Фабриксон» в листовой культуре)

## Ферменты

### ДНКазы I

Наиболее частым летальным осложнением в большем средн европеоидцы является муковисцидоз. В США ежегодно 30 000 случаев этого заболевания, в Канаде и странах Европы - 23 000. Пациенты с муковисцидозом часто страдают инфекционными заболеваниями, поражающими легкие. Лечение респираторных инфекций антибиотиками в конце концов приводит к появлению резистентных штаммов (типичных бактерий) и продукты их жизни вызывают микроклимат в легких может стать, значительно ухудшить состояние. Одним из вариантов слеза является высокомолекулярном ДНК, которая высвобождается из бактерий пасть клеток при лизисе. Ученые из федерального исследовательского центра (США) выделили и охарактеризовали ДНКазы ферменты, который расщепляет высокомолекулярную ДНК на более короткие фрагменты. Ферментальный фермент имеет в составе кармана и перемещаются муковисцидозом, он расщепляет ДНК, увеличивает слеза слизистой, что облегчает дыхание. Хотя для мира и не исключено муковисцидоз, они облегчают состояние больного. Промышленные варианты фермента были недавно одобрены Департаментом контроля и качеством пищевых продуктов, лекарственных и косметических средств (США), и чтобы его продали компания в 2001 г. примерно 100 млн долларов.

### Альгинат-лигаза

Альгинат - это полисахарид, синтезируемый рядом видов морских водорослей, - также производится морскими бактериями. Это многомерными единицами являются два сахара -

$\beta$ -D-маннуронит и  $\alpha$ -L-гулуронат, относительное содержание и распределение которых и определяют свойства конкретного альгината. Так, остатки  $\alpha$ -L-гулуроната образуют межклеточные и внутриклеточные связи (путем связывания ионов кальция; остатки  $\beta$ -D-маннуроната связывают ионы других металлов. Альгинат, содержащий только сахара, образует пластичный гель, вязкость которого прямо пропорциональна размеру молекулярных молекул.

Выделение альгината сложными методами гидролиза альгината существование повышает вязкость слизи у больных муковисцидозом. Чтобы оценить вызываемые пути и области состояния больного, в дополнение к обработке ДНКазы I следует провести действиями или альгината 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, виск почвенном слое, который образует гелевую среду, а также альгинат лигу колонии, образует слизь и становится муслим. Гидролизом альгината теряет способность в формировании слизи, поэтому среда вокруг синтезирующей альгинатную колоний остается прозрачной. Анализ клинического фрагмента ДНК, присутствующего в одной из положительных колоний, показал наличие открытой рамки считывания, кодирующей полипептида мол. массой около 69 000. Более детальные биохимические и

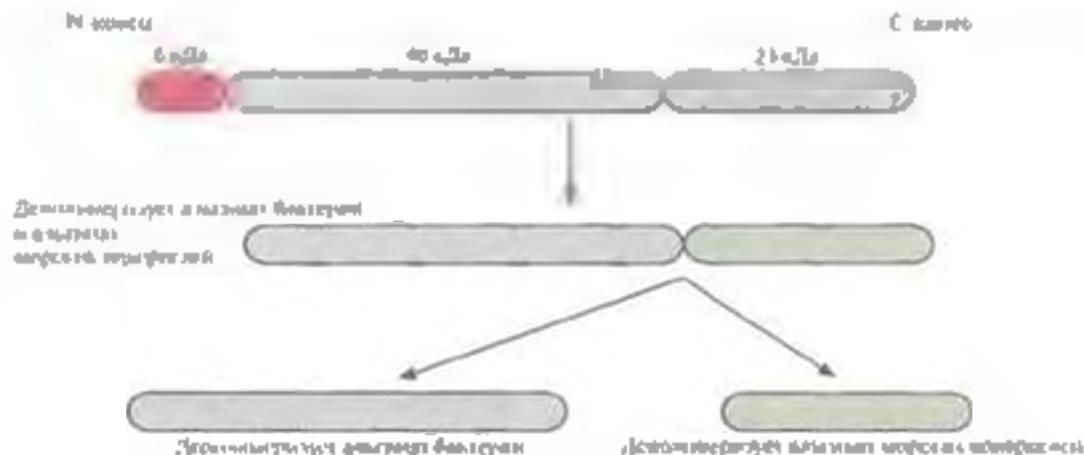


Рис. 10.3. Процесс протеолиза при участии фермента *Staphylococcus aureus* штамма 1. В результате специфического расщепления белка массой 64 кДа, состоящего из двух доменов, образуется фермент массой 63 кДа, состоящий из двух доменов, имеющих различную активность и два ингибитора в составе. Расщепление белка 64 кДа дает белки массой 33 кДа, активно способствующие активации фермента пенициллина, и белки массой 40 кДа, ингибирующие активность фермента

генетические исследования показали, что этот полипептид, из эпитопов, является предшественником трех эпитопов-мишеней, вырабатываемых *Staphylococcus aureus* (рис. 10.3). Сначала каждый из трех эпитопов фермент определяет от него N-конечной цепи массой около 60 кДа. Оставшиеся белок массой 63 000 способен детектировать активит, вырабатываемый как бактериями, так и животными антителами. При его последующем расщеплении образуется продукт массой 33 000, действующий активит ингибитора по отношению к ферменту массой 40 000, ингибирующий активит фермента. Для получения большого количества фермента массой 40 000 использовалась ДНК эпитопинформации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), в этом направлении в настоящее время в лаборатории вектор, несущий ген, кодирующий сигнальный пептид  $\alpha$ -фактора *S. aureus*. Транскрипция минорировалась при помощи системы экспрессии генов эпитопинформации (рис. 10.4). При

трансформации клеток *S. aureus* полученной плазмидой и экспонировании на селективную среду первую среду с добавлением ингибитора активит образовались колонии с большим эффектом. Когда такие колонии выращивали в другой среде, рекомбинантный белок не выделялся в культуральную среду. Последующие тесты показали, что этот фермент способен эффективно взаимодействовать с антителами, синтезируемые с помощью штамма *P. aeruginosa*, которые были выделены из легких больных муковисцидозом. Для того чтобы определить, насколько эффективно эти препараты взаимодействуют с антителами, проводились исследования

### Моноклональные антитела как лекарственные средства

Примерно 100 лет назад была предложена попытка лечения детей, больных дифтерией, с помощью поликлональных антител. Получен-



Рис. 10.4. ДНК, кодирующая эпитопинформацию массой 40 кДа. К последовательности, кодирующей N-концевой эпитопинформации, присоединен сетевой ген  $\alpha$ -фактора *S. aureus*, кодирующий ее ингибиторный пептид. Транскрипция контролируется при помощи системы экспрессии генов неидентичности *S. aureus*

ной от лоявшей, которую инфицировали *Sarbecovirus arbidensis*, вызывающей лифтерию у человека. *S. arbidensis* инфицирует горло и миндалины, вызывает эозинофилию, тремор и ишик 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 рибавирин (или антавирин), содержащий антагонисты вирусной репликации, то у него развивается бессимптомный 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 на чужеродные белки, присутствующие в щипотой или частично опущенной мышце/пропоре, и се повторно выселили в случае сенситивизации организма антител (присутствия в организме иммунологического шока и гибели мышечной).

С развитием гибридных технологий значительно улучшилось то, что антитела можно будет использовать в качестве терапевтических средств для поддержания постоянного уровня чистых иммуноспецифичных антител в организме. Однако остаются проблемы, связанные с риском развития нежелательных реакций, присущих к развитию иммунного ответа и дисфункции гели в организме большого 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 «тяжелых» (I) и двух «легких» (II) 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 дифференциацию с легкими цепями (рис. 10.5). Антигенсвязывающие сайты состоят из трех участков, определяющих комплементарность антител к антигену (CDR, от англ. complementary-determining regions), и образуются сверхпеременной ( $V_H$  и  $V_L$ ) области на N-концах H- и L-цепей. Для CDR характерны очень высокая изменчивость последовательности аминокислот, поэтому их еще называют гиперпеременными. Помимо вариабельных ( $V_H$  и  $V_L$ ), область L-цепей содержит одну константную область, или область ( $C_L$ ), и четыре H-цепей — три константные области, или домена ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ ). При обработке антител протеолитическими ферментами щипотой образуются три фрагмента: два тяжелых ( $F_1$ ), каждый из которых содержит участок V-цепей, специфичную дисульфидную мостиком с  $V_H$  и  $C_{H1}$ -доменами H-цепей, и один Fc, состоящий из двух соединенных дисульфидными связями  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ -доменов H-цепей Fab-фрагмент, точнее его N-концевая часть, называемая Fc-фрагментом, обладает антигенсвязывающей способностью, присутствуя в виде одной молекулы антитела (рис. 10.6) При этом его аминокислотная последовательность у разных молекул существенно различается.

После связывания антител с интактным антителом 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 антител 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.

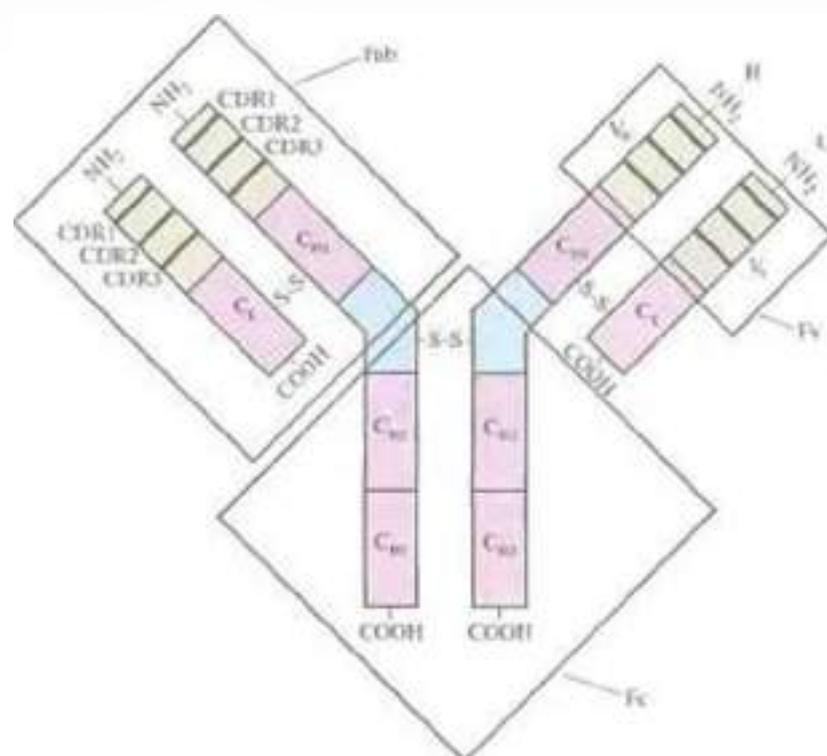


Рис. 10.5. Структура молекулы иммуноглобулина II. H-цепь (верхняя) и L-цепь (нижняя) и соответствующие (V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>) и соответствующие (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> и C<sub>κ1</sub>, C<sub>κ2</sub>) домены Варбургельных доменов содержат CDR-участки (CDR1, CDR2 и CDR3)

### 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 (СНПА) 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 причапли к появлению сыпи.

### Лекарственные вещества, связанные с лимфоцитами и тимическими клетками

Лекарственные вещества, проявляющие высокую активность 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 организм в дозах, не достигших оптимальных, что значительно снижает их эффективность. Для обеспечения доставки лекарственных веществ к месту своего действия используют несколько приемов. Включают это в особые препараты липосомы, эмульсии, об-

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) Присоединяют 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, перешло из неактивного состояния в активную 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 лекарственные вещества в гораздо меньших дозах, чем при прямом введении. Применение в такой системе моноклональных антител мыши может приводить к развитию иммунного ответа, поэтому очень важно использовать фрагменты антител человека или синтетический, максимально схожий с мышиной структурой.

Наиболее частой причиной смерти в странах Северной Америки и Европы является тромбоэмболия мозговых или сердечных артерий. Тромб состоит из молекул фибрина, фибрина, 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



рис. 10.А. Связывание и активация молекулы лекарственного вещества (красная звезда) основным или использованием моноклонального антитела. А Молекула лекарственного вещества присоединяется к моноклональному антителу. Б Моноклональному антителу присоединяется фермент, превращающий неактивную форму лекарственного вещества в активную (красная звезда) только в непосредственной близости от клеток-мишеней. В обоих случаях моноклональное антитело связывается с другим специфичным белком на поверхности клеток-мишеней.

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 триболизических препаратов, разруляющих только фибрин в

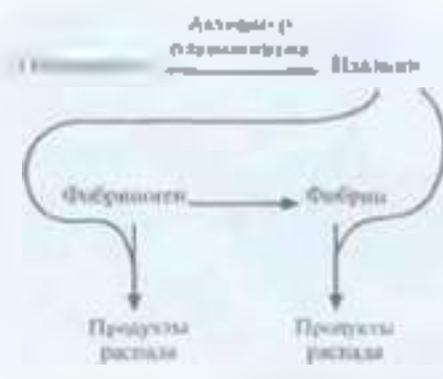


Рис. 10.7. Активация плазминогена с превращением его в плазмин и разрушение плазмином двух субстратов (фибриногена и фибрина) в крови

тромбе. Ученые искали из того, что если в эритроциты плазмикогена «привнести» антиген, специфическое 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 антигену, 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 активатора плазминогена, тоже присоединяющиеся к локальному

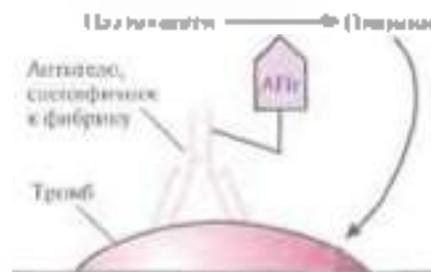


Рис. 10.8. Структура моноклонального антитела комплексного типа. К моноклональному антителу, специфичному к фибриногену, присоединен активатор плазминогена (АПГ). Этот комплекс связывается с фибрином, находящимся в тромбе, активатор плазминогена разрушает находящиеся плазмином тромбы, и локально активирует тромб

обращению плазмину, разрушающего артериальные сгустки

#### Мини-ингаляторы активатора тромболитика

Несмотря на кажущуюся универсальность иммуноферментов, этот метод имеет и ряд ограничений, связанных с применением моноспецифических антител животных и (прежде всего) присоединением к ним нужных молекул. Сам процесс иммунологического присоединения весьма неэффективен, присоединение происходит случайным образом, в крайнем случае, при этом может снижаться ферментативная активность антителора (для минигелей или других неспецифических в терапии). И наконец, если предлагается многократное введение препарата, неизбежно приходится применять антитела человека, а не животных, чтобы предотвратить возникновение перекрестных иммунных реакций и сенсибилизацию пациента.

Создание специфических антител, не вызывающих перекрестных реакций представляет собой весьма 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 моноспецифические антитела человека.
- Пока не удалось получить эффективные клеточные линии мыши человека, которые могли бы синтезировать антитела.
- Иммунный ответ человека различным антителами не проводится по согласованному эталонному характеру.

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 сопоставления получают гибриды В-лимфоцитов «вырабатывающих» 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 биологов стало привлекать к себе внимание особенности структуры и функций так называемых «генов» и биохимическая структура продуктов был интерферон. Не только в форме молекул шизофреников на функциональном уровне против человека вирусных инфекций в ряде исследований с ДНК интерферона человека и его последовательности в *Escherichia coli* сообщали результаты и другие всего мира.

Некоторые особенности интерферона связаны с наличием в ДНК особенно сложным во-

первых, исследователи то что интерферон был синтезирован более чем в 10 000 раз, что означало почти лишь в очень небольшом количестве, поэтому в то время не была известно его точная структура. В истории, в отличие от чужих белков интерферон не обладает всего клетки функцией вирусической или функциональной активности ее вещества только по сравнению с биологическим действием в ряде животных на культуру клеток, а это сложный и длительный процесс. Впервые, в отличие от млекопитающих было не-

известно, есть ли белки человека, способные имитировать интерферон и достаточно высокая совместимость с существованием генома мРНК интерферона. Несмотря на все эти трудности, в конце концов была выделена и охарактеризована ДНК, кодирующая интерферон. С тех пор были обнаружены несколько разных типов интерферонов. Были выделены гены млекопитающих интерферона и показано их влияние при лечении различных вирусных заболеваний, но, в соответствии, интерферон не стал панацеей.

ток (вырабатывал) моноклональные антитела человека, взаимодействующие с секретизирующим антигеном К. Следовательно, мышь моноклональных клеток был очень небольшим и они обладали низкой антигенспецифичностью активности. К тому же вероятность того, что в иммунологическом организме найдутся секретизирующие антигены клеток, которые будут распознавать секретирующий 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 таким методом, стробирующим тяжелым сочетанием иммунодепрессанта (*anti* мышам), они приобретают клетки иммунной системы человека и в ответ на введение антигена могут вырабатывать антигены человека.

Предпринимаются попытки ввести вродившим мышам гены иммуноглобулинов человека с целью создания трансгенных мышей, которые в ответ на чужеродные антигены антигеном смогут вырабатывать иммуноглобулины человека. Чтобы получить от трансгенных животных клетки, секретирующие специфические моно-

клональные антитела, можно использовать стандартную гибридную технологию. Это простейший вариант таких полуклональных клеток линий и определять, какие из них вырабатывают антитела, кошернее всего иммуноглобулинов человека. Недавно появились сообщения о том, что уже получены трансгенные мышь, секретирующие различные формы H- и L-цепей иммуноглобулинов человека.

Гриппозитации стволовых клеток иммунной системы человека *anti*-мышам и получение линий трансгенных мышей — весьма трудные способы при помощи моноклональных антигенов человека. Поэтому ученые пытаются создать генетически модифицированные клетки человека, которые можно использовать в качестве терапевтических средств, и эффективных биологических средств, способных связываться с мишенями и разрушать ее.

*Гибридные моноклональные антитела человека и мыши*

Тот факт, что разные участки молекулы иммуноглобулина взаимодействуют с разными антигенами, позволяют 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 соответствующим участком 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<sub>H</sub>-области 1- и H-цепей мышиной добуитнойoglobulina, наиболее важные для функции специфического моноклонального антитела мыши (рис. 10.9). Таким образом можно осуществлять ретровирусный реинтернировать ДНК in vitro с применением односторонней в качестве шаблона либо экспонировать субкониформные фрагменты ДНК. Сегменты ДНК, кодирующие химерные цепи, встраивают в экспрессирующую вектор и вводят в культуру В-яйцеклетки, из которой выделяют гибридомы, синтезирующие

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 оставались в кровотоке примерно в шесть раз дольше обычных антител мыши, тем самым оказывая 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 CDR участков человеческих антител фрагменты-

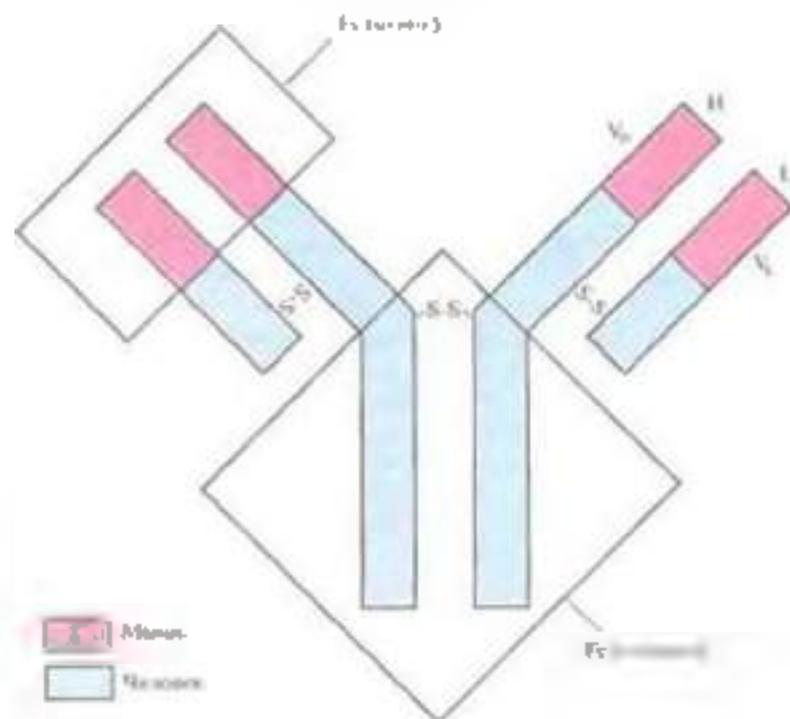
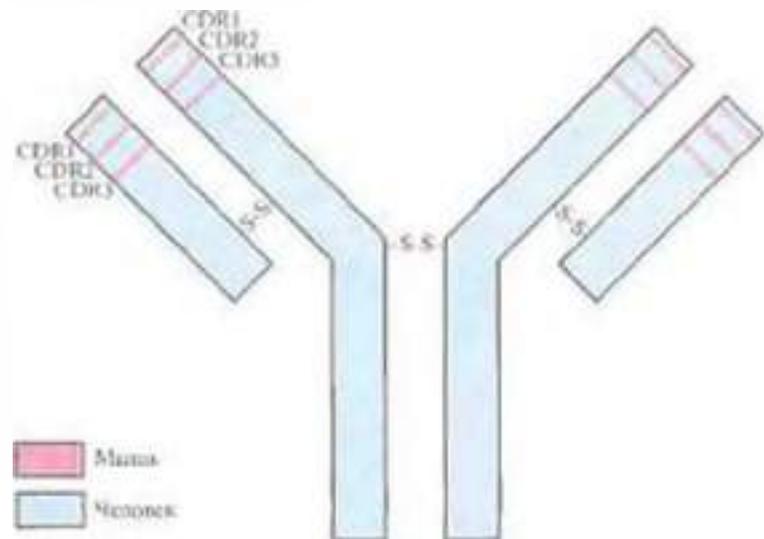


Рис. 10.9. Получение методом генной инженерии антитела, сходное по своей структуре с антителом человека. Участки генов C<sub>H</sub>1 и C<sub>H</sub>2-цепей мышиной добуитнойoglobulina, кодирующие V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>-домены, заменены на соответствующие ДНК, кодирующие V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>-домены мышиной добуитнойoglobulina (образуют рекомбинантные цепи, кодирующие химерный иммуноглобулин, обладающий антигенспецифичностью человека). Участки C<sub>H</sub>1 и C<sub>H</sub>2-цепей мышиной добуитнойoglobulina, кодирующие Fc-фрагмент иммуноглобулина человека и обеспечивающие иммуногенность для человека.

Рис. 10.10. Полученное методом генной инженерии антитело, сходное по своей структуре с антигеном человека. Сегменты ДНК, кодирующие СDR-участки (CDR1 и CDR2) мыши и CDR3 участки CDR-участки H- и L-цепей мыши импортированы в мышь. Продуктом этого рекомбинантного гена является мышиное антитело с антиген-связывающей специфичностью моноспецифичной антитела мыши (участки, выделенные розовым цветом) и антиген-связывающей специфичностью человека (участки, выделенные голубым цветом).



ми минорными антигенами гризунов (рис. 10.10). Такие «экзотичные» формы антител человека могут стать эффективным терапевтическим средством, поскольку они по своей антиген-специфичности 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 имплементируя их в определенные участки с помощью ПИР. В качестве примеров для имплементации можно использовать олигонуклеотиды, комплементарные высококонсервативным сегментам ДНК, формирующим с 5' и 3' концов последовательность, кодирующую вариабельную область. Эти нуклеотидные последовательности гДНК вариабельных областей легкой и тяжелой цепей ( $V_L$  и  $V_H$ ), легко определить, группируя CDR, основываясь на том, что соответствующие им последовательности гипервариабельны, и то время как вариабельные области относительно консервативны. Исходя из данных о нуклеотидных последовательностях ДНК, кодирующих CDR гризунов, сплелировать шесть пар олигонуклеотидных примеров. Каждая пара имплементирует в синтез ДНК, кодирующий одну из цепей CDR гризунов: три, локализованных на H-цепи, и три на L-цепи. Кроме того, на 5'-конце каждого примера находилось 17 консервативных нуклеоти-

дов, комплементарных фланкирующим экспрессивным каркасным участкам ДНК человека, по которым присоединено ограничение CDR-ДНК гризунов (рис. 10.11). Далее с помощью олигонуклеотид-инфракрасного мутагена  $\lambda$  осуществляют последовательную замену CDR-ДНК человека имплементированной CDR-ДНК гризунов — фактически «пересадку» CDR от гризунов в каркасные участки молекулы антитела человека. Модифицированную таким образом гДНК имплемент в векторы экспрессии и трансформировать ими подходящие клетки хозяина, обычно E. coli или клетки млекопитающих, в которых и выращивались антитела.

Данный метод предполагает, что у антител сохраняется способность антитела связываться только CDR участки, а не вариабельные области. Однако, если связывание «гибридного» антитела с антигеном происходит исключительно эффективно, может возникнуть необходимость в замене некоторых аминокислот в вариабельных областях с помощью аминокучающей-натурального 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-

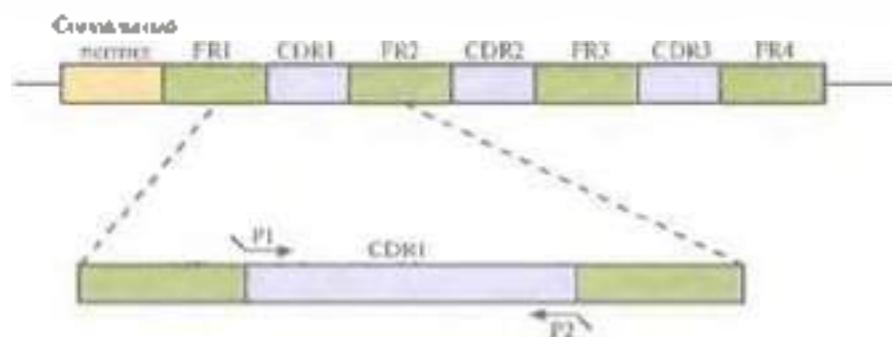


Рис. 10.11 ПЦР-амплификация CDR1-участка кодирующего и несущего κ-ДНК L-цепи человека в линии и животного (рыбу). Схематически показаны праймеры P1 и P2, которые специфичны к последовательности ДНК CDR1-участка в обоих случаях. Кроме того, каждый праймер специфичен к 5'-концу 3' нуклеотидной последовательности соответствующего участка (фрагмента переноса, FR) κ-ДНК L-цепи антитела человека. Используются парные гомологичные нуклеотидные праймеры (три для V<sub>H</sub> и три для V<sub>L</sub>-областей, с помощью ПЦР амплифицированы открытые рамки и ДНК-сегментов кодирующих CDR-участки антитела рыбы. Затем, используя олигонуклеотид-направленный мутаген, выявлены тип соответствующих сегментов генов мыши человека. Таким образом, оказалось возможным обнаружить тот же тип антитела человека.

мени. Возможно, более перспективным способом получения антител человека и их фрагментов окажется метод, основанный на использовании фиговых «химеротермы» библиотек, созданных на основе cDNA, полученных из В-клеток путем мутирования эмульгов.

### 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 представлены методики 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 реплицируемую 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 — κ-ДНК H- и L-цепей) содержат разные, характерные для каждой из них рестриктазные 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.

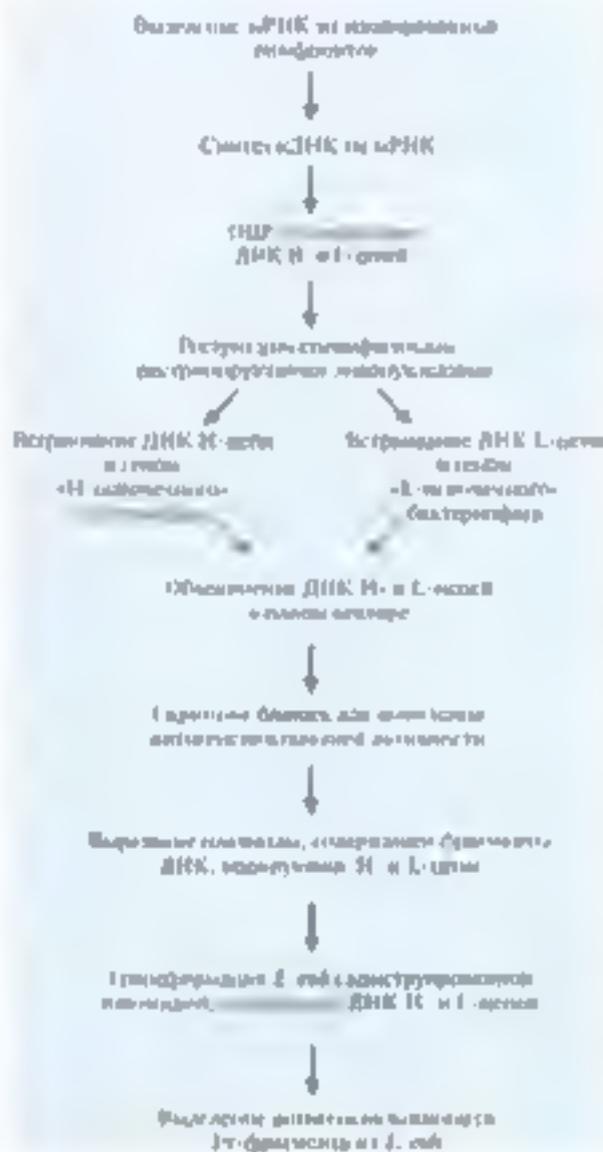


Рис. 10.12. Создание с помощью *E. coli* комбинаторной библиотеки ДНК V<sub>1</sub> и V<sub>2</sub> областей антитела

На этапе соединения ДНК H и L-цепей в полный вектор образуется вирсуальный спектр генов различных антител. Некоторые из них кодируют уникальные сайты связывания, получить которые с помощью обычной гибридомной технологии было бы невозможно. Пул антител из коллекционной включает 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> разных агентов. Фантомная библиотека содержит примерно столько

же все клонов, поэтому можно сказать, что такая комбинаторная библиотека будет вырабатывать такое же количество различных антител (F<sub>2</sub>-молекул), как любое мезокристаллическое. Кроме того, описывая содеянную комбинаторную библиотеку, можно комбинировать I и II-цепи и получать F<sub>2</sub>-фрагменты, распознающие необычные эпитопы. Еще большего разнообразия можно достичь, используя неспецифический мутагенез. Поскольку за относительно короткое время можно провести скрининг миллионов фантомных библиотек, идентификация F<sub>2</sub>-фрагментов с нужной специфичностью занимает от 7 до 14 дней. Для сравнения, скрининг нескольких сотен гибридомных 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 H и L-цепей встраиваются в сайт фантомирования плазмидной ДНК. Такую плазмиду, содержащую ДНК H- и L-цепей, можно вырезать из вектора и трансформировать ею *E. coli* (рис. 10.12). Ячейки быстро реплицируются в клетках *E. coli* с образованием большого количества продуктов, которые 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 фантомных 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, состоящие из антитела, специфичного к белку фантомной оболочки, и фермента. Ячейки промывают для удаления неспецифического компонента и добавляют в каждую из них хромогенный субстрат, который расщепляется ферментом, специфичным к фантому, и окраши-

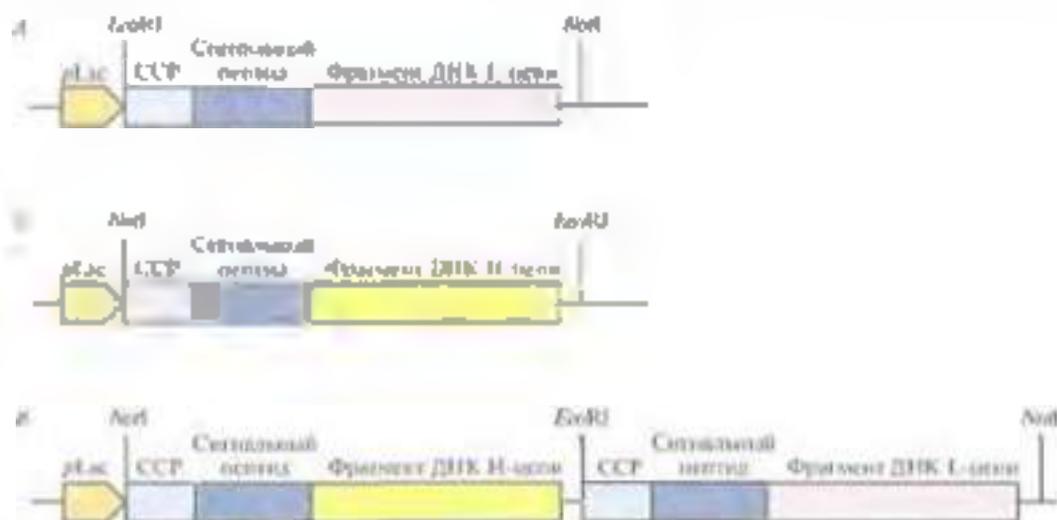


Рис. 10.13. Синтезированные участки ДНК из комбинаторной библиотеки «ДНК I»-фрагмента, клонированные в бактериофаг  $\lambda$ . А и Б. Фрагменты ДНК I (А) и II (Б) цепей разделяют векторы на основе векторной функции. В. Проводя рестриктицией каждой *EcoRI*-библиотеки и инсерцией фрагмента ДНК из библиотеки II-цепи в фрагменты ДНК из библиотеки I-цепи, в результате чего получим комбинаторную библиотеку, содержащую все возможные симметричные фрагменты I и II-цепей с экспрессией специфичного фрагмента в одном векторе. *pLac* – *lac*-промотор *E. coli*, CCP – 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  $\lambda$ . Выделен 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 замещением фрагментов ДНК  $V_L$  и  $V_H$ -областей или с помощью неспецифического мутагена.

Работая методом получения Fc-фрагментов, исследователи попытались определить, способны ли тяжелые белковые цепочки состоящие только из  $V_L$  и  $V_H$ -доменов, образовать функциональную молекулу, способную связывать антиген. Компьютерное моделирование трехмерной структуры предполагаемого одноцепочечного антитела показало, что для образования дисульфидных мостиков, необходимой для связывания антигена,  $V_L$  и  $V_H$ -домены должны быть разделены линейным 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 к специфичности к антигену сходна с таковой 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 моноклонобулина G – 150 кДа) дает определенные преимущества. Кроме того, к одноцепочечному антителу можно присоединить последовательность, кодирующую или эту же белок, позволяющая функционировать молекулу, которая способна связываться с определенной мишенью, проявляя при этом специфическую активность.

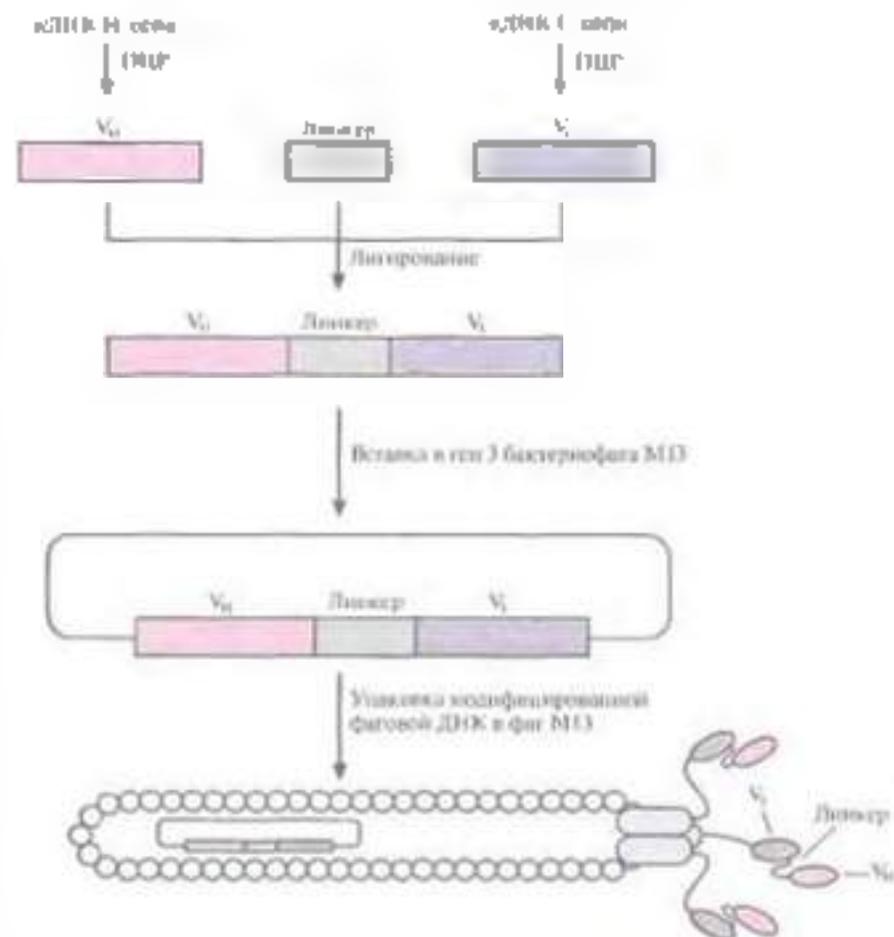


Рис. 10.14. Создание комбинаторной библиотеки κДНК. V<sub>H</sub>-фрагменты лигируются с полинуклеотидными фрагментами M13. κДНК V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> областей гипериммунизации методом ПЦР, а затем лигируются, вставляются в ДНК короткого инверсного гетера. Полученные фрагменты ДНК встраиваются в библиотеку κДНК одноцепочечных антигенов, инверсных в гетере фог М13 и приосекаются на фagosомную гетеру, которая кодирует инверсионный фagosом белок. В М13 в гетере 1 синтезируется при белковой упаковке, поэтому каждая репликационная форма М13, содержащая κДНК гипериммунизации библиотеку κДНК антителоподобных антигенов. Фрагменты при упаковке инверсионного белка, состоящего из фagosомы и гетере 1 и одноцепочечного антигена.

Было проведено также еще один эксперимент; вместо того чтобы соединить V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> участками короткого пептида, выносившими карбоксильную область, модифицированную таким образом, чтобы между ними образовывалась дисульфидная связь. Эффективность такой стабилизации вродившей 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 стабилизированная дисульфидной связью и одноцепочечная Fc-иммунотоксина обладают одинаковой активностью и специфичностью, но первая в несколько раз стабильнее. Можно предположить, что в таких ситуациях стабилизированные Fc-молекулы могут оказаться предпочтительнее одноцепочечных Fc-молекул.

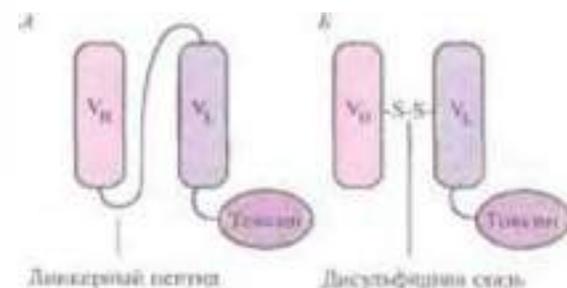


Рис. 10.15. Сравнительное изображение одноцепочечного Fc-иммунотоксина (а) и Fc-иммунотоксина, стабилизированного дисульфидной связью (б).

## Лекарственные средства против ВИЧ

Ученые пока не удалось излечить пациента, достоверно инфицированную приона вируса 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<sub>H</sub>-клетки). В норме в процессе развития иммунного ответа Т<sub>H</sub>-клетки синтезируют продукты лимфоцитарных специфических антигенов и высвобождают факторы, стимулирующие другие клетки иммунной системы к участию в иммунном ответе. Т<sub>H</sub>-клетки играют в этом процессе ключевую роль, и при ВИЧ-инфекции они перестают функционировать. Как только вирус внедряется в Т<sub>H</sub>-клетку, он становится защищенным от иммунной системы организма и начинает оказывать свое разрушительное действие на Т<sub>H</sub>-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<sub>H</sub>-клеток и других Т-лимфоцитов.
- Пораженная клетка связывается с другими Т<sub>H</sub>-клетками, формируя синцитий, который не способен выполнять функции, свойственные незараженным Т<sub>H</sub>-клеткам.

Самым главным 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 оболочки вируса массой 120 кДа (gp120) и рецептором на поверхности Т<sub>H</sub>-клеток CD4 (рис. 14.16, А). В этом процессе Т<sub>H</sub>-клетки блокируются рецептором в CD4, процесс замедляется также при связывании белка CD4. Однако ни один из этих способов не приводит к

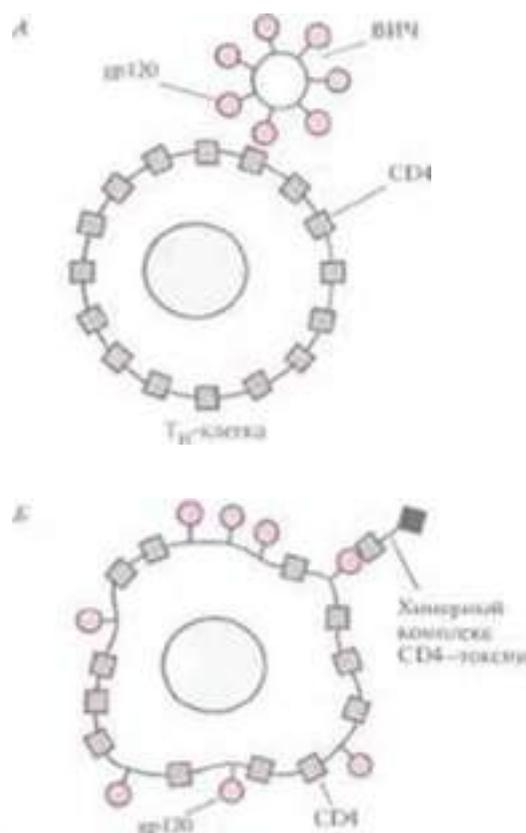


Рис. 14.16. ВИЧ (инфекция) ее таргетив. А. С помощью ВИЧ с Т<sub>H</sub>-клеткой осуществляется взаимодействие вирусного белка gp120 с Т<sub>H</sub>-клеточным рецептором белком CD4. В. На поверхности ВИЧ-инфицированной клетки находится белок gp120, с которым может связываться свободный симметричный комплекс CD4 токсина. После внутриинфицированной клетки, токсинная часть симметричного комплекса убивает ее.

умножению вируса. Один из подходов, описывающих как токсичность Т<sub>H</sub>-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 антигену. После присоединения СМ-индуцированного к свободной вирусной частице или в инфицированной клетке вирус вызывает реакцию опосредованной лимфоцитами клеточной иммунотоксичности, которая обеспечивает уничтожение вируса или пораженной им клетки.

Другой важной патологической характеристикой злокачественных ВПЧ-инфекции, заключается в опосредованной системы метения ВИЧ-пораженных клеток для их специфической уничтожения. Например, если считать два фрагмента ДНК, один из которых кодирует рецептор СМ, а другой - интратоксичный токсин *Рейдоптоксин* (экзотоксин А), то мы имеем тем, кодирующим димерный белок с дифференцированными свойствами (рис. 10.17). Экзотоксин А *Рейдоптоксин* это белок с мол. массой 66 кДа, состоящий из трех доменов: домен I отвечает за связывание с клеткой, II - за транзитное белки в клетку, III - за прикрепление АПВ-рибозы к изотропическому фактору элонгации (EF-2), что приводит к его инактивации. Химерный белок СМ-экзотоксин А *Рейдоптоксин* вместо домена I содержит большую часть последовательности СМ (рис. 10.17), и следовательно что обладает и цитотоксической активностью экзотоксина *Рейдоптоксин*, и др120-связывающей активностью СМ. На поверхности всех ВПЧ пораженных клеток находится гликопротеин gp120, поэтому СМ-домен димерного белка соединяется жакетированно с липид клетками. При присоединении к инфицированной клетке, димерный белок проникает внутрь нее при участии янтария

II экзотоксина А *Рейдоптоксин*. Затем экзотоксичность часть димерного 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» ВПЧ-пораженные клетки, а экзотоксин выступает в роли «наибольшего убийцы».

Синтезируясь в *E. coli*, димерный белок образует экстракционные биологически активные включения. Их растворяют в гуанидинхлоридном растворе 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 химеры на *Рейдоптоксин*-компоненте димерного белка может возникнуть при синтезе реакции, и не исключено, что это придется вырывать вместе с какими-либо индукторами, например индукторами. Нужно иметь в виду, что описанный выше способ борьбы с ВПЧ-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 клинике даже 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

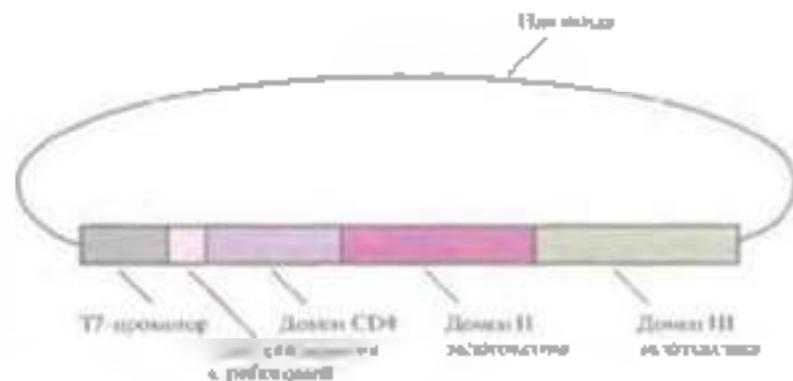


Рис. 10.17. Гетеродимерный химерный комплекс СМ-экзотоксина А *Рейдоптоксин*. (Красный домен - промотер Т7; серый домен - Т7-промотер; розовый домен - домен СМ; красный домен - домен II экзотоксина; зеленый домен - домен III интратоксина). Дисульфидные связи соединяют субъединицы.

оптимизацию ритмичности событий, протекающих в нескольких клетках, прежде чем термистическое приращение реактивности клеток становится рутинным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью клонирования специфических генов и последующей их экспрессии в бактериальных плазмидах целый ряд белков, которые можно будет использовать в качестве лекарственных препаратов. Большинство этих белков имеют уже ритмическое происхождение так что для выделения нужного гена сечемь получивший препарат c ДНК, обогащенный интересующими исследователями фракциями, затем создается c ДНК-библиотеку и встраивают соответствующую ДНК в подходящий вектор для экспрессии. Противя обмен участков родственных генов, кодирующих аналогичные белковые домены, или прямо заменю сегменты клонированного гена, кодирующие функциональные участки белка, можно создавать новые модификации таких белков. В качестве лекарственных средств можно использовать и некоторые ферменты. Например, для снижения вязкости слюны, которая увеличивается в легких больных муковисцидозом, применяют в виде элекролит реккомбинантный ДНК-губительную

С развитием технологии реккомбинантных ДНК и разработкой способов получения моно- и мультимерных антиген, а также с установлением структуры и функции иммуноглобулинов появились интерес к использованию специфических антиген для лечения различных заболеваний. Рядом с тем же интересом наблюдается тем, что из данных работы иммуноглобулинов можно получить различные фракции.

Лекарственные вещества или ферменты можно присоединять к многоатомным антигенам или их Fc-фрагментам, специфичным в отношении поперечносвязанных белков определенных клеток, например опухолевых. При этом лекарственное вещество может находиться в инертной форме. Если предположить многократные введения таких комплексов, то на иммуноглобулиновый компонент должен представлять собой антиген или фрагмент антигена

человека, это позволяет предотвратить развитие перекрестной иммунной реакции и сенсибилизацию больного. Если же предполагается использовать в этих целях моноклональные антитела крызунов, их структуру следует максимально приблизить к структуре антигена человека. Для этого в последние достаточно заменить СDR-участки на аналогичные фрагменты антител крызунов. Изначно удалось провести обмен и синтез моноклональных антител человека с помощью F. coli.

Генноинженерные методы позволяют получать уникальные лекарственные средства, которые представляют собой комплексы белков, синтезирующихся со специфическими клетками, например ВИЧ-инфицированными, и токсинами. Этот подход пока только разрабатывается, но его перспективы обнадеживают.

## ЛИТЕРАТУРА

- Barbas C. E., III, D. R. Burton 1996 Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies *Trends Biotechnol.* 14: 230-234
- Bird R. E., R. W. Walker 1991 Single chain antibody variable *Trends Biotechnol.* 9: 132-137
- Brinkmann U., L. H. Pui, D. J. FitzGerald, M. Winkler, J. Pagan, 1991 HCF<sub>1</sub>-(F<sub>1</sub>)<sub>2</sub>DF1, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3616-3620
- Bruggemann M., H. M. Caskey, C. Tesle, H. Waldmann, G. T. Williams, M. A. Surtak, M. S. Newberger 1989. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6709-6713.
- Brya R. A., J. Mardoni, C. Lucas, D. Smith, S. A. Marsters, J. S. Johnson, P. Collier, S. M. Chaman, F. M. Worm, T. Gregory, J. E. Groopman, H. J. Curov. 1990 Biological properties of a CD4 immunotoxin *Nature* 344: 667-670
- Buchner J., K. Rudolph 1991 Renaturation, purification and characterization of recombinant F<sub>1</sub> fragments produced in *E. coli* *Bio/Technology* 9: 157-162.

- 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. Brink, F. W. Voss, E. 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.
- Huie 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. Braungel. 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. Grayeb, M. B. Khayati. 1989. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4220-4224.
- Muto J. D., A. D. Gillis, M. Mahapatra, T. P. Chelvan, J. M. Rye, G. Winter. 1992. Bypassing 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. Grzes, 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 S., 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. Struell, 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 toxins 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. Schaefer, H. E. Seifick, 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. Brinkmann, 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-Kuriyama, 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. Hodges, 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-жизни для гибридизации, но вам удалось выделить инициаторы человека, в которых можно индентифицировать 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 олигосахаридная Fc-молекула?
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 рекомбинантного средства, которое «помечает» и уничтожает 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 микрорганализму, которые при последующей инфекции приводят к сну (инактивация (нейтрализация или убийство), биологическая протиференция и не выполняются различия убийства)

Эффект выдвинули открыл более 200 лет назад — в 1796 г. — врач Эдвард Дженнер (он выдвинул экспериментально, что человек, переболевший коревой оспой, не очень восприимчив к повторной работе оспы, становится невосприимчивым к оспе (вазальной) натуральной оспе выскол контагиозные заболевания с высокой смертностью. Даже если болезнь не умирает, у него нередко возникают различные уродства, почечные расстройства и слепота. Дженнер публично принял прививку коровой оспы 8-летнему мальчику Джеймсу Финнею, используя для него материал из пустулы больной коровой оспы, а затем через определенное время доказал инфицировал ребенка тем же материалом больното натуральной оспой. Все проявления заболевания ограничили увеличением в месте прививки, после чуждым через несколько дней.

Ранее также инфекционные болезни, как туберкулез, оспа, холера, брюшной тиф, бубонная чума и тифозный лихорадка, были настоящим бичом для человечества. С появлением вакцин, антибиотиков и современных мер профилактики эти эпидемические болезни удалось взять под контроль. Однако чуждые меры со временем становились неэффективными, а по-прежнему новые

вызовки убийствами). В 1991 г. индийская государственная Перу; в течение трех следующих лет было выявлено примерно 1 млн убийств, вызванных тысяч г-г-ми 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 загрязнения — повышение безопасности (например, США).

Как правило, современные вакцины создаются на основе убитых (инактивированных) патогенных микроорганизмов либо живых, но неинфекционных (аттенуированных) штаммов. Для того чтобы штамм действительно вырабатывал в культуре, оценивают, в каком штамме вирус или молекулярный объект, достаточно эффективный и основанный вирулентного штамма. Несмотря на многочисленные успехи в создании вакцин против таких заболеваний, как туберкулез, дифтерия, коклюш, столбняк, оспа и бешенство, производство современных вакцин сталкивается с рядом проблем ограничения.

- 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 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 инфицирует дефицитную сеть, ответственную за вирулентность. Способность выжить и размножиться 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 итерродетерминантного патогенного организма. Такая система переноса способствует развитию и размножению микроорганизма в клетках культуры.
- Если патогенные микроорганизмы не растут в культуре, можно использовать в качестве переносчика и альтернативным способом (например, в *E. coli* или другой клетке-хозяине патогенных клеток) генетический материал, содержащий основные генетические детерминанты, и

использовать его белки для «субъединичных» вакцин (см. следующую главу).

- Некоторые патогенные микроорганизмы действуют исключительно, поэтому развитие устойчивости к их воздействию не инфицированными клетками организма допустимо. Для такой разработки можно создать специальную вакцину, увеличивая количество клеток-мишеней, сконструировать ген, кодирующий компонент белка, одна часть которого будет взаимодействовать с инфицированной клеткой, а другая - уничтожать ее. Эта система не является активной вакциной, хотя она и действует только на инфицированные клетки, устраняя самую причину реакции аутоиммунной реакции.

В вакцинах для животных представляется также достижение увеличения, поэтому первыми вакцинами, полученными с помощью технологий рекомбинантных ДНК, были вакцины против лицевой болезни, джентрилы 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 продукты) или стабилизированные Антигены, 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 интерактивные 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 (например, микроорганизмы, 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-



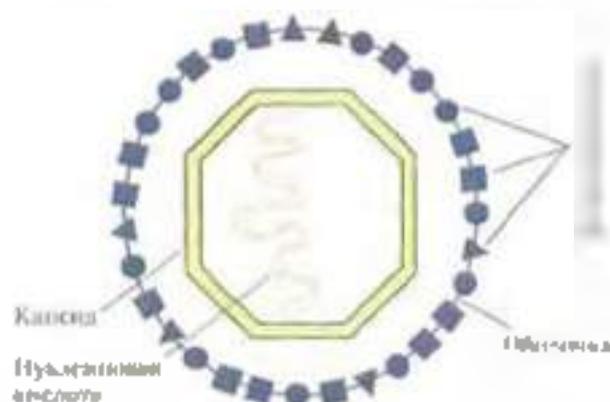


Рис. 11.1. Структура вируса герпеса. Белком вокруг обычно представляют спикетелами оболочкой нуклеотидной кислоты (одно- или двуцепочечный ДНК или РНК длиной от 2 до 200 т. п. н.), заключенной в белковый капсид. У некоторых вирусов капсид окружен еще в внешней оболочкой.

### 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 актуальным является 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 патогенности 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 мышами у них вырабатываются антитела, нейтрализующие интактный HSV. Ген gD HSV-1 был идентифицирован, клонирован и введен в экспрессирующую вектор в клетках млекопитающих и в виде яля-клетки китайского хомячка (СНВ), в которых в ответ на введение генов происходит экспрессия белков. Полностью синтез ген gD кодирует белок, а вирус связывается с мембраной клетки млекопитающей (рис. 11.2, А). Глико белок трудно растворим, чем растворим

мно. поэтому ген gD модифицирован, 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 папилломы (HPV, human papilloma virus) и вирус папилломы человека (HPV) является возбудителем рака шейки матки и рака головы и шеи. Для защиты от HPV-инфекции используют вакцину, содержащую вирус, экспрессирующую фос

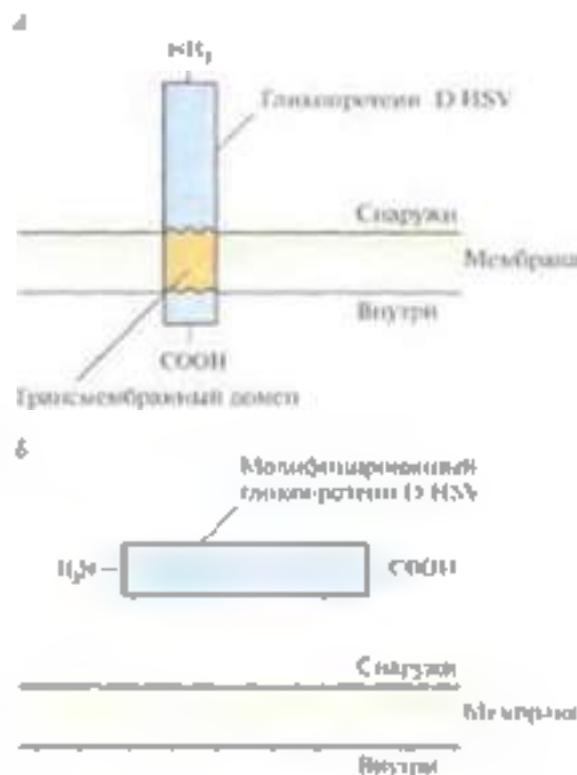


Рис. 11.2 А Молекула gD HSV-1 с трансмембранным доменом, встраиваемым в липидную мембрану. Б Растворимый белок gD, не содержащий трансмембранный домен

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  $\beta$ -интерферон- $\beta$  репрессор. Белок состоит из 396 аминокислотных остатков, состоит из части молекулы репликационного белка MS2 и полирибонуклеопротеина VP1-белок FMDV. Он кодирует чужеродный и индуцирует выработку интерферона  $\beta$  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, субклинический 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 начальной наблюдаются туберкулезные бугорки, потеря веса, в отсутствие лечения заболевание 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, казалось бы 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 иммуноингибирующие свойства множественных антигенных 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 живых патогенных бактерий. При введении некоторых комбинаций очищенных белков потеря веса, поражение легких и селезенки и уровень смертности были такими же, как и при введении чужеродной BCG-вакцины. 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

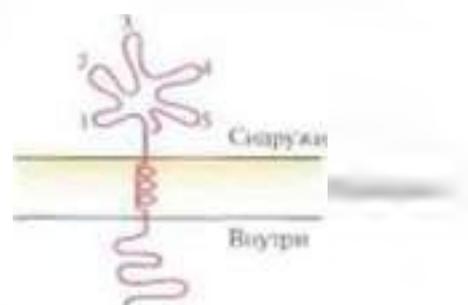


Рис. 11.3. Сферический мембранный белок, внешние концы (1–5) которого могут индуцировать иммунный ответ

Для эпитопов (т. е. те, которые находятся на поверхности вируса), обладают иммуногенными свойствами, а внутренние домены неэпитопны, если только они не влияют на конфигурацию гликозилемного 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

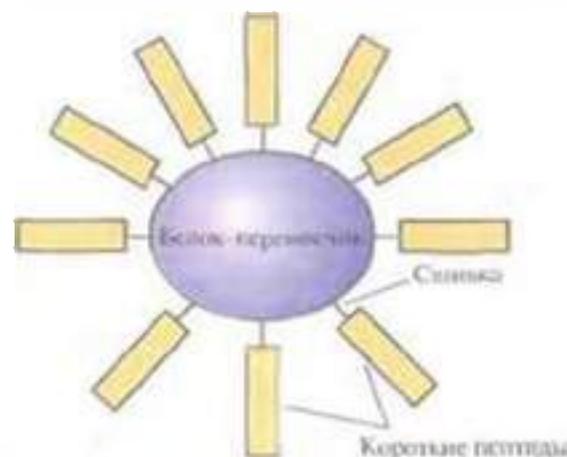


Рис. 11.4. Короткие пептиды, соединяемые с белком-переносчиком и служащие основой эпитопной вакцины.

белком-переносчиком (неиммуногенной молекулой фиксурелина), чтобы преадаптировать их к вирусу, и ввести инъекции мышам (рис. 11.4). Синтез эпитопов в количестве, достаточном для защиты мышного от последующей FMDV-инфекции, выполняется только при введении пептидов 141–160. Введение же целого 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 во вакцинах, необходимых для получения иммунного ответа, примерно в 1000 раз выше, чем в случае защиты FMDV-вакциной. Чтобы решить эту проблему, фрагменты ДНК, кодирующие пептиды из аминокислотных остатков 142–160 VP1 FMDV, соединили с геном, кодирующим ядерный белок гепатита В (HBsAg). При экспрессии этого генетического 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 (вакцина, содержащая домен 142–160 VP1-белка, примененная на морских свинках, показала, что иммуногенность чужеродного белка, состоящего из HBsAg в отношении домена, в 10 раз выше, чем у инертного FMDV-частицы, в 35 раз выше, чем у инертного белка, состоящего из  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* и домен 137–162 из VP1 FMDV, и в 500 раз выше, чем у стабилизированной 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.

И все же существует несомненно стремление к использованию коротких пептидов в качестве вакцин.

- Занято, исследуются способы создания эффективных пептидных вакцин. Лучше представлять собой коротки, но непрерывный участок белковой молекулы, а что будет не всегда.
- Классификация пептидов должна быть такой же, как у эпитопов в интактном вирусной частицы.
- Иммуногенный пептид 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. содержимое клонированного гена белок-антигена, транскрипцию которого вызывала под контролем промотора вируса аденовы, клетки вводили в млекопитающих мышь и бомбардировали эти клетки ультрафиолетом. Впоследствии выяснилось, что клонированный КДНК можно ввести в клетки и с помощью переносимости нуклеиной кислоты с большим количеством плазмиды, несущей соответствующий 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 первичный белок-антиген индуцировал синтез антител. Этот подход открывает и обладает значительными, что требует много времени и средств, для исследования для соз-

дания вакцинной генноинженерных рекомбинантных ДНК. Кроме того, получаемые с его помощью белки с большей вероятностью подвергнутся правильной посттрансляционной модификации, чем белки, синтезируемые организмом-хозяином. Этот метод, выдвинувший на первый план иммунизацию, можно использовать для вакцинации домашних животных.

Перспективы генной иммунизации были тщательно изучены. В одном из серий экспериментов цыплят в вакцинации обесилили вакциной, несущей КДНК гена, кодирующего вирус гриппа А, транскрипцию которого контролирует промотор вирусного генома. Хотя уровень экспрессии гена геном-копиратора был относительно низким, что не позволяло регистрировать через 2 нед после иммунизации в крови мышей обнаружилось антитело 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 вирус гриппа. Такая перекрестная защита не наблюдается при введении традиционных вакцин против гриппа (таким образом, полученные из генома репродуктивных животных вирусы, и только одна вакцина специфична лишь в отношении одного штамма вируса). Более того, традиционные вакцины сохраняют свою эффективность только до тех пор, пока остаются не использованы. К сожалению, 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 пептидные вакцины.

ДНК-иммунизация позволяет не только индуцировать синтез белковых антигенов, но и индуцировать иммунный ответ, направленный именно на кодируемый плазмидный белок, а не на саму нуклеиновую кислоту. Поэтому один и тот же белок можно использовать для доставки разных белков или для многократного введения одного и того же гена.

Судя по введенной в клетку ДНК (сложности возможности. В принципе это может индуцировать и

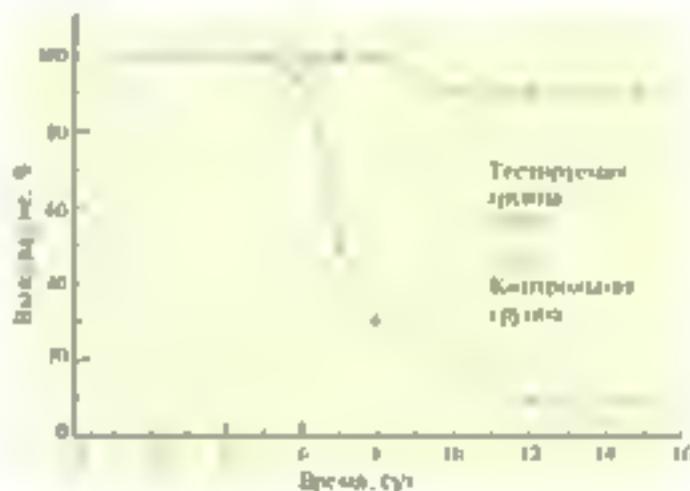


Рис. 11-5. Выделение мышечных культур вирусного ДНК. Тестовая мышечная культура вирусом *E. coli* плевальной, исходный ДНК гадомаринового вируса (группа А) как контроль проинфицирована вирусом. Выделенный мышечный вирусный титр (извлеченный ДНК) до сих пор не обнаружен, однако, появляется после контакта мышечной культуры с вирусом группы А.

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 просуществует в клетке в виде перелатентного или же интенозного 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 *Agrobacterium tumefaciens*. Эта бактерия проникает в эпителиальные клетки животных путем фитоцинома, и при соприкосновении с ней плазмидная ДНК попадает в цитоплазму клетки-хозяина, где и происходит трансформация и интеграция переносимого элемента, происходящая под контролем хлоропластического промотора. *Agrobacterium tumefaciens* — 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-аланилтрансферазу, который участвует в синтезе компонента клеточной стенки диванилмембранной кислоты. Штаммы с мутацией в

этом гене растут только в присутствии диванилмембранной 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 использовался *Agrobacterium tumefaciens*, 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 определенного патогенного агента, либо отными выделенных микроорганизмов, у которых модифицированы или делетированы 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 из исходных данных о нуклеотидной последовательности РНК вируса ящура

J. I. Paik, R. A. [unclear] H. Alexander, T. M. Shinnick, J. C. Smerick, R. A. Lerner, D. J. Rowland, I. Viotto  
*Science* 200 20-23, 1979

Начиная с первых десятилетий столетия Дастинером более 200 лет назад безуспешно пытались создать противочумные вакцины из содержимого убитых или истощенных животных. Впервые вирус ящура или синтезированные с ним идентичные структуры. Эти структуры оказались эффективны при реинфекции распространителей вируса при инфоции, однако они практически не различимы наряду с другими всеми вирусами ящура в культуре, что не позволяет создавать вакцины против них, поскольку они принадлежат к одному и тому же классу и поэтому проявляют все вирусные способности (защита) при реинфекции с помощью противочумных вакцин. С развитием молекулярной биологии и в частности рекомбинантной ДНК технологии удалось

представить в форме белка белок-детерминанты, не имеющие отрицательной и положительной высадки вакцины индуцирует выработку антител к различным четвертичным, и термам присутствующим на поверхности вирусной частицы, поэтому разумно было предположить, что оптимальной иммуногенной может быть только кортикальное структурное белок с такой же антигенностью. Выяснилось, что белок с такой антигенностью, как у вирусной антигенной детерминанты белок, так как белок при этом лишь в том случае, когда антигенная область представляет собой кортикальный четвертичный белок.

Были и др. выделены и охарактеризованы РНК вируса ящура и определены функции отдельной нуклеотидной последовательности вирусного белка - VP1. Выяснилось

соответствующие эксперименты, при этом с помощью, что если антигенные детерминанты находятся на VP1 или VP2-континентальной молекулы. Выяснилось, что именно эти структуры являются наиболее эффективными при реинфекции и белки VP1 и VP2. В ответ на введение вакцины с помощью белков VP1 и VP2 критично важна синтез вирусной белковой оболочки. Вакцинация с помощью белков VP1 и VP2 приводит к выработке антител, которые являются наиболее активными частями, активными частями (или детерминантами) белков (белков) антигенности вирусного белка, и, следовательно, можно создавать вакцины против ящура.

## Противочумные вакцины

Живые вакцины, как правило, гораздо более эффективны, чем неживые (или субъединичные). Основное требование, предъявляемое к ним, отсутствие в инкубационном материале вирусных индикаторов. Эти требования выполняются и при создании живой противочумной вакцины. Живая - быстро размножающаяся клеточная инфекция, характеризуется длительной, асимптомной, безболезненной, детерминантной; передается через летучую пыль, контактно-фекальным. В не инкубационных странах, где системы очистки воды и удаления сточных вод полностью развиты, угроза чумы почти отсутствует.

Вакциной против чумы является *Vibrio cholerae*. Бактерия размножается в тонком кишечнике и выделяет в большом количестве эстеролизин, который и ответствен за патогенный эффект. Эти

термоустойчивый белок; он состоит из субъединицы А, которая обладает АДУ-рибоингибирующей 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 А<sub>1</sub>, отвечающей за ее связывание с субъединицей В. В настоящее время используется противочумная вакцина, содержащая убитые фенолом культуры бактерий; она обеспечивает только частичную защиту от инфекции и лишь в течение 3-6 мес. Поэтому были предприняты попытки создать другие типы противочумной вакцины.

Как показали проведенные ранее исследования, субъединичная вакцина, содержащая инактивированный кодеринный эстеролизин, не приводит к выработке толерантного 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 прерывалась, разорвалась цепочка для  $A_1$ -петли, но штамм стал 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 пазл:

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 вызывая их чувствительности 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*. Проведенные в шестидесятые годы клинические испытания эффективности этой формы как протипокарицидной вакцины пока не дали однозначного результата. Вакцина обеспечивает почти 90%-ую защиту от холеры, но у некоторых незлеченных наблюдаются побочные эффекты. Возможно, понадобится применить другой хромосомный locus этого штамма, чтобы можно было использовать его как вакцину.

#### Применение современных вакцин

Другой способ получения неспецифичных 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 проницаемостью слизистой оболочки и сниженной патогенностью, но обеспечит защиту комбинированного ответа.

Разные штаммы *Salmonella* вызывают острые кишечные инфекции, поражающую инфекцию, брюшного тифа, пищевую токсикоинфекцию. Для профилактики всех этих заболеваний совершенно необходимо иметь эффективную вакцину. Чтобы получить аттенуированные штаммы *Salmonella*, носили децелиацию в генах *ari*, кодирующие ферменты биосинтеза ароматических соединений, и в генах *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 энзимомусказавшим *SalI* и *XbaI*, казавшим 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 встраивании галактозидазы между оставшимися *ori* и *cat*4. Как только чашка последовательности *ori* и *cat*4, кодирующей  $A_1$ -петлю, встроены в  $Tet^r$ -геном, кодирующая  $A_1$ -петля не будет синтезироваться и хромосоме была децелирована с помощью плазмиды *cat*4.

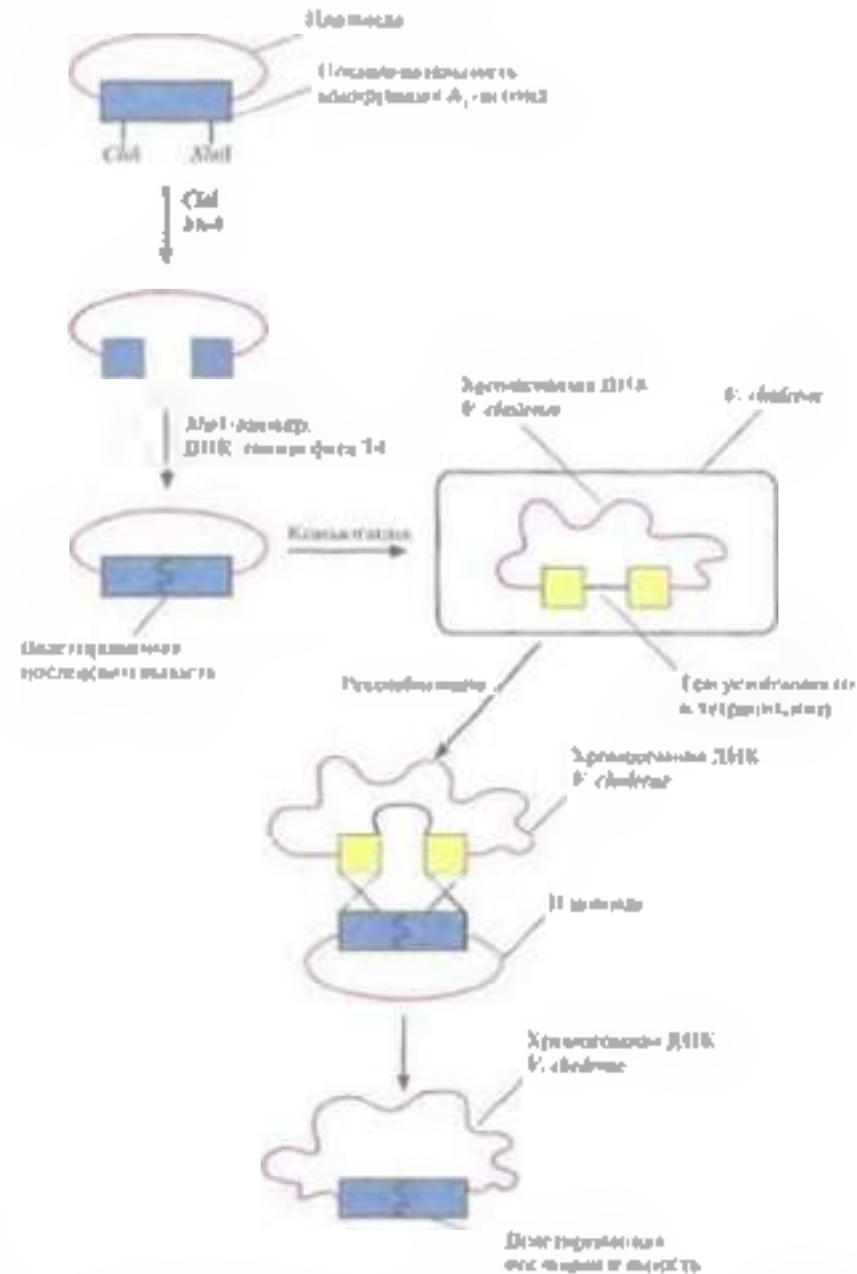


Рис. 11.6. Создание плазмиды *V. chlostrae* с концевой частью пуклонизационной последовательности, кодирующей A<sub>1</sub>-гемолитическую токсину

периферичне і зв'язані для м'язів, овен, крупного рогатого скоту, свинки, а також людини – і для людини.

**Противодействующие вакцины**

Простіше вакцини *Leishmania* таке можуть викликати у людини різні імунні реакції, однак спланне ефективних вакцин при-

ти цих і представляє собою велику задачу. С такою метою можна використовувати аттенуовані лінії *Leishmania*, які часто ревертують і стаються знову патогенними, а крім того, можуть довго часи безсимптомно переміститися в організм людини – ревертаре інфекції – і передаються другим людям. Щоб уникнути цих проблем, планують створити атте-

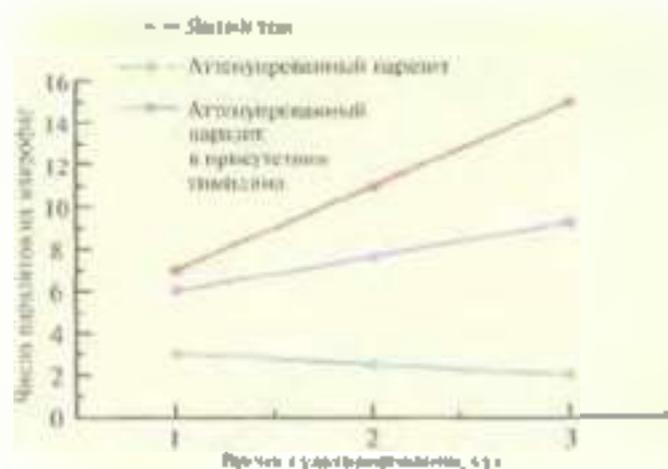


Рис. 11.7. Проникновение и персистенция в печени активированного паразита в различных условиях. Для животных в обоих случаях использовали одинаковое количество *E. 100*, введенное в стандартной дозе (Из работы Tims et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10267–10269, 1995, с изменениями.)

нуронную первертирующую функцию *Leishmania* с помощью введения одного из важных для метаболизма генов (например, гена дигидрофолатредуктазы тимидилатсинтазы). У генов от этих паразитов, *Leishmania major* E10-5A3, как и ген дигидрофолатредуктазы тимидилатсинтазы были внесены гены устойчивости к антибиотикам G-418 и пиримидину. В отличие от паразитов дикого типа, при выращивании *E. major* E10-5A3 в обычной культуре или в культуре макрофагов и среде необходимо добавлять тимидин (рис. 11.7). Портальные лимфатические узлы паразиты оставались жизнеспособными в течение нескольких дней, что достаточно для создания стойкого иммунитета у животных (рис. 11.8), но недостаточно для развития заболевания. Ни первертирующая ни инфек-

ция, ни заболевание не возникли ни даже у наиболее чувствительных видов мышей, тем что лимфатические узлы не подходят для создания иммунитета. Проведя дополнительные эксперименты по животным, можно быть уверенной, ее инфекционность при вынужденной чужеземности.

## • Векторные вакцины

### Противотуберкулезные вакцины

В качестве эффективной живой прививочной вакцины широко использовался возбудитель туберкулеза (*M. tuberculosis*), относящийся к роду микобактерий. Геном этого возбудителя состоит из 24 хромосом, он представляет собой двуцепочечную ДНК длиной 187 млн. нуклеотидов, кодирующую примерно 200 различных белков, ДНК *M. tuberculosis*

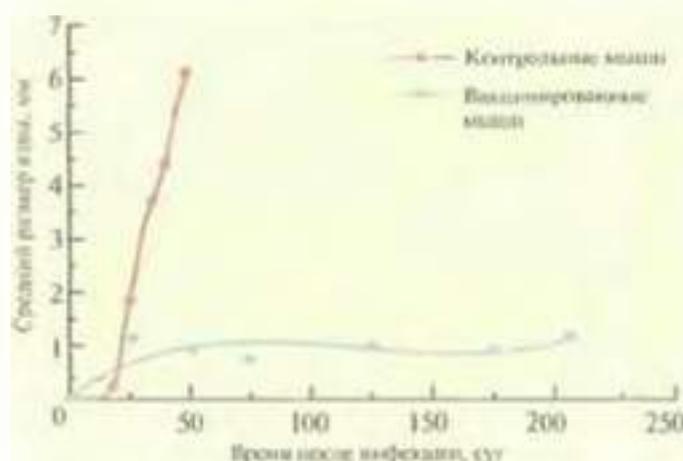


Рис. 11.8. Изменения в вирусном титре паразита *E. major* у вакцинированных и контрольных мышей после введения активированного паразита *E. major*. В момент времени 0 мышей, представленных вакцинированными активированными паразитами, в среднем определяли средним размером колоний (мм) или. Контрольные мыши не вакцинированы (Из работы Tims 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 (полющных и бесполощных), 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 встроить 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 для клонирования ВКО) промотора, расположенного в каждой либо несуществующий 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-

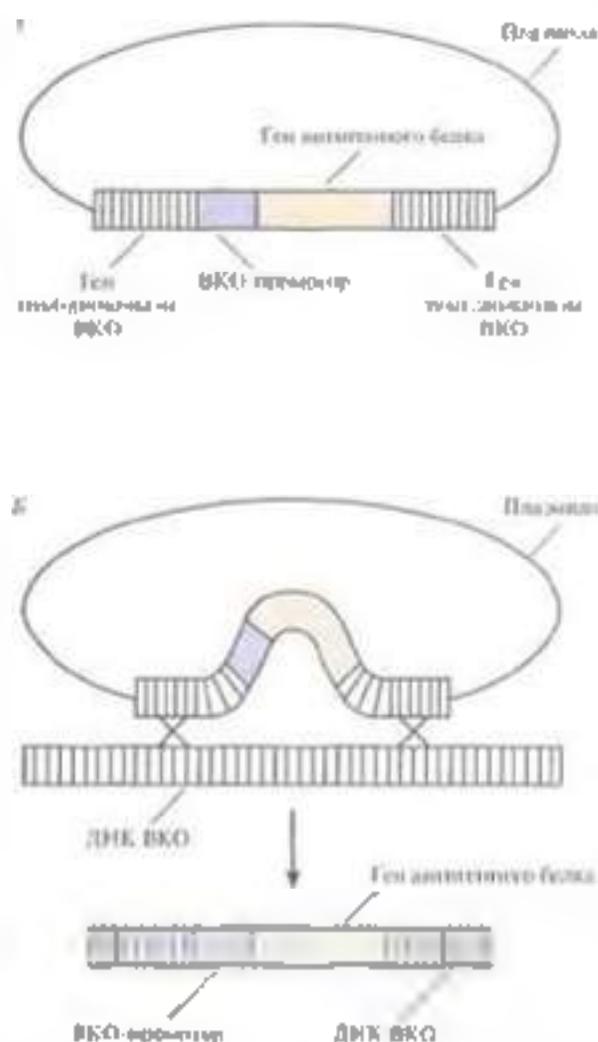


Рис. 11.9. Встраивание в ДНК ВКО гена, белковый продукт которого (обычно вирусный антиген) индуцирует иммунный ответ. А Плазмиды, несущий ген антигенного белка, способный экспрессироваться. Б Дисконтингентная рекомбинация, приводящая к встраиванию гена в ДНК ВКО.

бинированных ВКО, можно обогатить, используя селективную среду с бромдезаминурацином. Этот токсичный аналог тимидина в отсутствие тимидинкиназы не адсорбируется и синтезируется ДНК и 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 к его токсическому действию.

4. Проводят окончательный отбор с помощью ДНК-зонда, гибриды удаляются с геном антигенного белка.

Поскольку дефектные по шимпанзе 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 привычных рамки считывания генов ВКО при встраивании чужеродного гена. При этом отпадает 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 каких-либо 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-

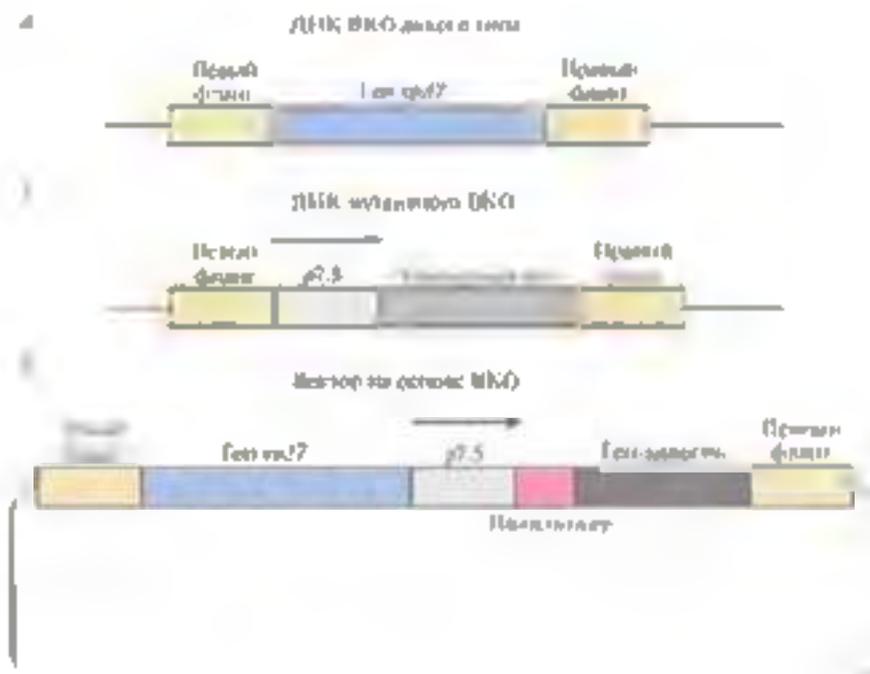


Рис. 11.10. А ДНК ВКО дикого типа. Б ДНК мутантного ВКО. В вектор на основе ВКО. Левый фланк и правый фланк — последовательности, необходимые для инициации и репликации генов ВКО. Ген *pr27* в геноме ВКО широко применяется для образования бляшек. Промотор гена *pr27* (на рисунке *pr27.5* — сигнал «принять» или «опознать») ВКО-промотор для митохондриальной рекомбинации между рекомбинантным вектором и ДНК мутантного вируса. Функционирование маркерного гена *E. coli* на ген *pr27* ген-мишени.

рда белешества, иммерсионного антигена ислэнэи Н, коверытетныа белеша вируса Синабис, NP- и HA-белеша вируса гриппа, N и G-белеша вируса геморройного стомаиты, гликопротеинна вируса простого герпеса. Некоторыа из полуконных на основе ВКО рекомбинантныа вакцин моажо использовать для создания эффективныа вакцин. Так, рекомбинантныа ВКО, экспрессирующаа ген сцепления О вируса простого герпеса типа 1, предотвращает герпетичеа инфекции у мышей, а рекомбинантныа ВКО, экспрессирующаа ген поверхностного антигена вируса бешешества, индуцирует выработку протективных антител у птиц. Основныа перспективныа вируса бешешества в Европе.

Все горныа ВКО-вакцины не должныа провоцировать иммунныа ответ сразу на несколько антигенов. Для этого можно использовать рекомбинантныа ВКО, котораа несет несколько генов, кодирующаа разныа антигены.

Из известности от строения генома ВКО-промотора чужеродныа белок может синтезироваться в рибоней или пощлей фазе инфекционного цикла, при этом его количество определяется силой промотора. Обычно для вакцинации выделают уривныа экспрессии нуклеокапсида «поддинг» ВКО-промотора: р11 (промотор гена, отвечающаго за синтез белка мши массой 11 кДа) и пррСАФ (промотор гена интегралнаго белка вируса коровьей оскы типа А). При экстракционк и инфе ДНК ВКО несколько чужеродных генов вделают на мши вокаждой чужеродной-отвешенной ВКО-промотора, чтобы предотвратить геномные рекомбинантныа между разныаыми участками вирусной ДНК, котораа может привести к утрате нстроенных генов.

Живым рекомбинантныа вирусныа вакцина имеет ряд преимуществ перед неживыми вирусныа и субвакцинными вакцинами: 1) преважно аутентичного антигена практически не отличается от гавриной цми обычной инфекции; 2) вирус может реплицироваться в клетке-хозяине и увеличивать количество антигена, котораа стимулирует продукцию антител В-клетками (гуморальный иммунитет) и стимулирует выработку Т-клеток (клеточныа иммунитет); 3) остраивающаа гены антигеннаа белков в адни и бешешае чашеа сантой системы ВКО еще больше увеличиваа его вирулентность.

Недостаток живой рекомбинантныа вирусной вакцины состоит в том, что при вакцинации даже со сдержанным иммунным статусом (например, больных СПИДом) у них может развиться тяжелая вирусная инфекция. Чтобы решить эту проблему, можно встроить в вирусныа вектор ген, кодирующаа человеческий интерферон-2, котораа стимулирует Т-клеточныа ответ и ограничивает пролиферацию вируса.

Нежелательныа побочныа эффекты пролиферации ВКО можно предупредить инактивацией вируса после вакцинации. Для этого были созданы чувствительныа к интерферону вирусы (ВКО данного типа относительно устойчивы к его действию), экспрессирующаа котораа можно регулировать в случае возникновения при вакцинации осложнения.

Механизм устойчивости ВКО к интерферону остается неустановленным пока не были обнаружены открытая рамка считывания КЗЛ, кодирующаа белок мши массой 10,4 кДа. Этот белок содержит аминокислотную последовательность, гомологичную N-акциевич части адрикатинеского фактора индукции eIF-2а мши массой 16,1 кДа. N-концевые области обоих белков содержат 17 практически идентичныа аминокислотныа остатков, причем в положении 51 в обоих случаях находится серин, котораа в eIF-2а фосфорилируется активированной интерфероном Р1-киназой, что приводит к ингибированию синтеза белка и обрабатывааа интерфероном клетках КЗЛ. Белок действует как конкурентнаа ингибитор фосфорилирования eIF-2а, обеспечивааа устойчивость ВКО к интерферону, и если эти гены ВКО удалять ген КЗЛ или его часть, то вирус становится чувствительным к интерферону С помощью ПЦР-мутации ген КЗЛ, находящегоса в составе плазмиды, и последующая гомологичной рекомбинантныа между ДНК ВКО и плазмидой, неслиаааа мши КЗЛ-последовательности лишили типа модифицированнаа вариант был сконструирован мутантныа 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 безопасныа ВКО-векторов. Последовательности, сходныа с КЗЛ, могут содержать и другие устойчивыа к интерферону вирусы, что по мшиа с помощью де-



земля при соприкосновении, состоит в разведении проективных агентов патогенной бактерии на поверхности другой непатогенной бактерии. Многие бактерии имеют жгутики, состоящие из белка флигеллина; под микроскопом они выглядят как нити, отходящие от бактериальной клетки. Если сделать так, что жгутики неплотнейшего микропрямника будут неспецифически являться адгезивным микроростком, то можно будет индуцировать выработку проективных агентов.

Нашим такой подход осуществляли при создании противохолерной вакцины. Синтетический аденонуклеотид, кодирующий эпитоп субъединицы В холерного токсина, встроили в гипервариабельный участок гена флигеллина *Sabimella* и полукричную конструкцию ввели в репликацию по флигеллину путем *Sabimella*. При этом было известно, что эпитоп, кодируемый 50–64 аминокислотные остатки субъединицы В холерного токсина, индуцирует выработку антител в низкотоксигенном холерном токсигене. Химерный флигеллин нормально функционирует, а эпитоп холерного токсина размещается на поверхности жгутиков. Иммунизируя мышей с помощью микропрямника, содержащего примерно  $5 \cdot 10^8$  эпитоп или убитых формальдином бактерий с модифицированным флигеллином, индуцировали выработку большого количества антител как в петлицу (50–64 аминокислотным участком), так и в микропрямник холерного токсина. Антиточными образцы можно встраивать в ядро еще три раза, так что можно ввести флигеллинный ген *Sabimella* и создать поливалентную противохолерную вакцину.

С помощью переработки введенных эпитопов рибосомный эпитоп *Sabimella* можно осуществлять доставку в эпитопы холерного токсина бактерии, живущие в широком спектре животных, включая рыб. 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 происхождения не являются продуктом системы, в экспрессии чужеродного гена нельзя регулировать применением температуры или добавлением специфических ингибиторов. Регули-

ровать работу может играть только промотор, регулирующий на те или иные стимулы. Например, работу двигателя *lacZ* сдв можно регулировать, изменяя содержание питательных веществ в среде. В том числе активации или ингибирования участка. В одном из экспериментов промотор *lacZ* использовали для контроля экспрессии гена неспецифического иммуногенного С-фрагмента столбчатого токсина в аттенуированном штамме *Sabimella*. В развивающейся стадии инфекции *Sabimella* можно убить более 1 мл. жидкой среды. Если генетически модифицированный штамм *Sabimella* выживет, а в организм человека, то С-фрагмент столбчатого токсина синтезируется и будет при пероральном приеме этой бактерии встраиваться в эпитопы холерного токсина, и эпитопы выработанные антителами в нем. Таким образом, путем *Sabimella*, в котором встроены С-фрагмент столбчатого токсина, можно достигнуть под контролем промотора *lacZ*, можно использовать как живую пероральную противохолерную вакцину. Чтобы выяснить, насколько эффективен этот подход (то бактерии человека, необходимо провести дополнительные исследования).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трехвалентные вакцины содержат инвазивные, неинвазивные или аттенуированные патогены: микроорганизмы (бактерии или вирусы). Эти вакцины имеют ряд недостатков: не все патогенные микроорганизмы можно выращивать в лабораторных условиях для получения больших количеств; работа с бактериями в больших количествах микроорганизмов требует соблюдения строгих мер предосторожности, аттенуированные штаммы нередко ревертируют и становятся вирулентными; инвазивная часто бывает неолонной, срок годности вакцин зависит от условий хранения.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет создавать новые вакцины, используя при этом различные плазмиды. Деактивированные или инактивированные, генетически модифицированные, аттенуированные, иммунологически активные штаммы, которые не могут

репертировать 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 кодирующая домейн 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.
- Dubinsky 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 A. 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.
- Fietzer C., A. Huggs, 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 non-toxicogenic *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. Doubecko, 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.
- Nichel 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.
- Nabel G. J., P. L. Felgner. 1993. Direct gene transfer (or immunotherapy and immunization). *Trends Biotechnol* 11: 211-215.
- Oestus 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. Brandram, J. C. Sudoff. 1995. Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270: 299-302.
- Sliver C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. J. Durbin, I. A. Rowan, 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 BSL<sub>4</sub> 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.
- Thus 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. L. Felgner, V. J. Dwarti, S. H. Grumbach, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, I. A. Howe, 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 полидецилаританизу линейную двоякоцепочечную РНК длиной 10 1 п 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 вывели РНК-содержащий вирус, вы — бешенство у собак и кошек. 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 животными. 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, прешестественников различных биогормонов 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: уробактерии, джаробактерии, фотосинтезирующими, диатомовыми,

микотрифитными, 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 ферментации 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, ферментация 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 эндонуклеазами рестрикции 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 эндонуклеазами рестрикции, 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* гриботрицательных бактерий *Asiobacterium* *sp.*

- 1 ДНК *R. solanum* расщепляют с помощью *HindIII* и встраивают фрагменты в *HindIII* сайт плазмиды pBR322.
- 2 Рекомбинантными плазмидами трансформируют клетки *E. coli* HB101 и выращивают их в жидкой среде, а затем инфицируют бактериофагом  $\lambda$ . Если в комбинаторной клетке экспрессируется ген фермента рестрикции, то она оказывается устойчивой к лизису фагом типа  $\lambda$ . ДНК которой активно расщепляется синтезируемой рестриктазой.
- 3 Трансформированные клетки, устойчивые к фагу  $\lambda$ , подвергают осмотическому шоку, чтобы высвободить периплазматические бел-

ки. Определяют активность рестриктазы *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. п. с инсерцией оперонной рестриктазы и метилазы *RsaI* в промоторном *P. lacZ* сайте. В клоне, несущем эту генетическую конструкцию, соблюдая естественный порядок порядка системы, сначала синтезируется метилирующий фермент, затем эндонуклеаза рестрикции. Уровень экспрессии гена рестриктазы *RsaI* в *E. coli* был примерно в 10 раз выше, чем в *R. solanum*. 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. solanum*.

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.

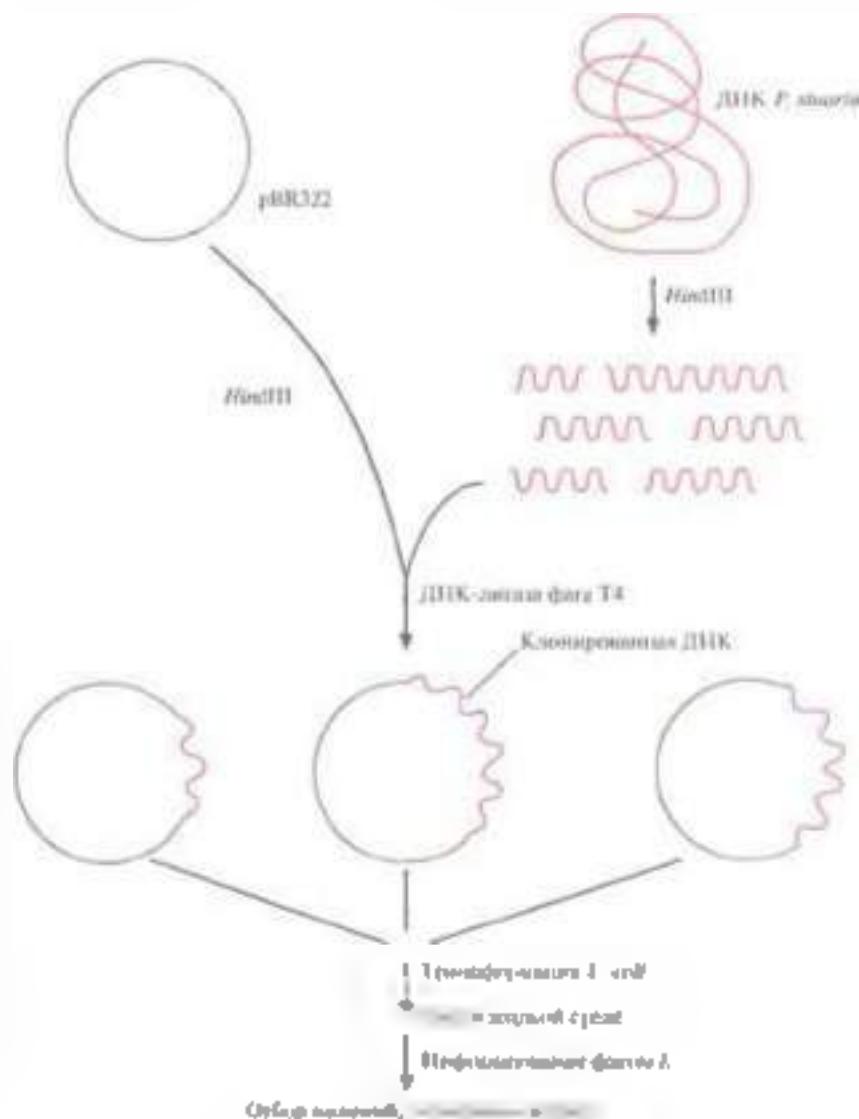


Рис. 12.1. Клонирование с использованием рестриктаз *HaeI* и субстрат несут его трансформированные бактерии из клеток Хромосома ДНК *S. aureus* рестриктаза *HindIII* и экстракт ферменты в плазмиду *pBR322* трансформируют реципиентный организм *E. coli*. Выращивают клетки в агаровой среде и инфильтруют фазой I. Отбирают трансформанты, устойчивые к флу; именно они могут экспрессировать клонированный ген *PstI*.

Рассмотрим следующий пример. В плазмиду *pBR322* встраивали *HindIII*-фрагменты ДНК *Penicillinase* *Staphylococcus aureus* и трансформировали ею клетки *E. coli* выделенную из трансформированных клеток плазмиду ДНК обрабатывали рестриктазой *DdeI*. Плазмиды, несущие и экспрессирующие ген кодирующего фермента, не расщеплялись, поскольку все восемь сайтов узнавания *DdeI* в *pBR322* были метилированы. Смесь плазмид, обработанных *DdeI*, использовали для трансформации *E. coli*. Образование трансформантов, несущих ген функци-

онального модифицирующего фермента *DdeI*, обеспечивали только целые кольцевые молекулы плазмидных ДНК. Остальные плазмиды были расщеплены эндонуклеазой рестрикции. Для того чтобы определить, какие клоны содержат ген фермента модификации, и ген эндонуклеазы рестрикции, трансформанты тестируют на наличие в них активной рестриктазы *DdeI*. 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-кето-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-дикето-D-глюконную кислоту (2,5-DKG), а другие (*Sourbacterium*, *Vivobacterium* 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. В подобных случаях можно культивировать микроорганизмы последовательно (рис. 12.3), при этом такой процесс трудно будет сделать непрерывным, если для роста микроорганизмов необходимы существенно разные среды. Непрерывным выходом из этой ситуации было бы создание гибрида микроорганизма, синтезирующего все ферменты, необходимые для превращения глюкозы в 2-KLG. Однако гибриды осуществляют превращение D-глюкозы в 2,5-DKG в несколько стадий, катализируемых разными ферментами, а то время как *Sourbacterium* способен превращать 2,5-DKG в 2-KLG, необходимо только одна стадия. Следовательно, наиболее простой способ создания одного микроорганизма, способного превратить D-глюкозу в 2-KLG, состоит в выделении гена 2,5-DKG-редуктазы *Sourbacterium* sp. и введении его в *Erwinia herveyi*.

Первым шагом на этом пути является исследование в опытах 2,5-DKG-редуктазы *Sourbacterium* sp. 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 *Sourbacterium* sp. представляют собой либо G, либо C, зонды синтезировали таким образом, чтобы в третьем положении кодонов по возможности находились именно они. Это позволяло минимизировать число ложных ассоциаций между зондами и искомого ДНК.

Синтезирующие живые гибридные зонды скрининга банка клонов ДНК *Sourbacterium* sp. клоны, гибридизующиеся только с одним из зондов, исключали из дальнейшего рассмотрения, считая, что соответствующая ДНК не является искомым. Выделили клоны, содержащие ген 2,5-DKG-редуктазы, и секвенировали его. Нуклеотидные последовательности, расположенные до стартового кода АТГ, вырезали и вносили их в зонды транскрипции и трансляции, функционирующие в *E. coli*, поскольку регуляторные последовательности эукариотических микроорганизмов типа *Sourbacterium* sp. не функционируют в клетках этого микроорганизма. Полученную конструкцию вводили в

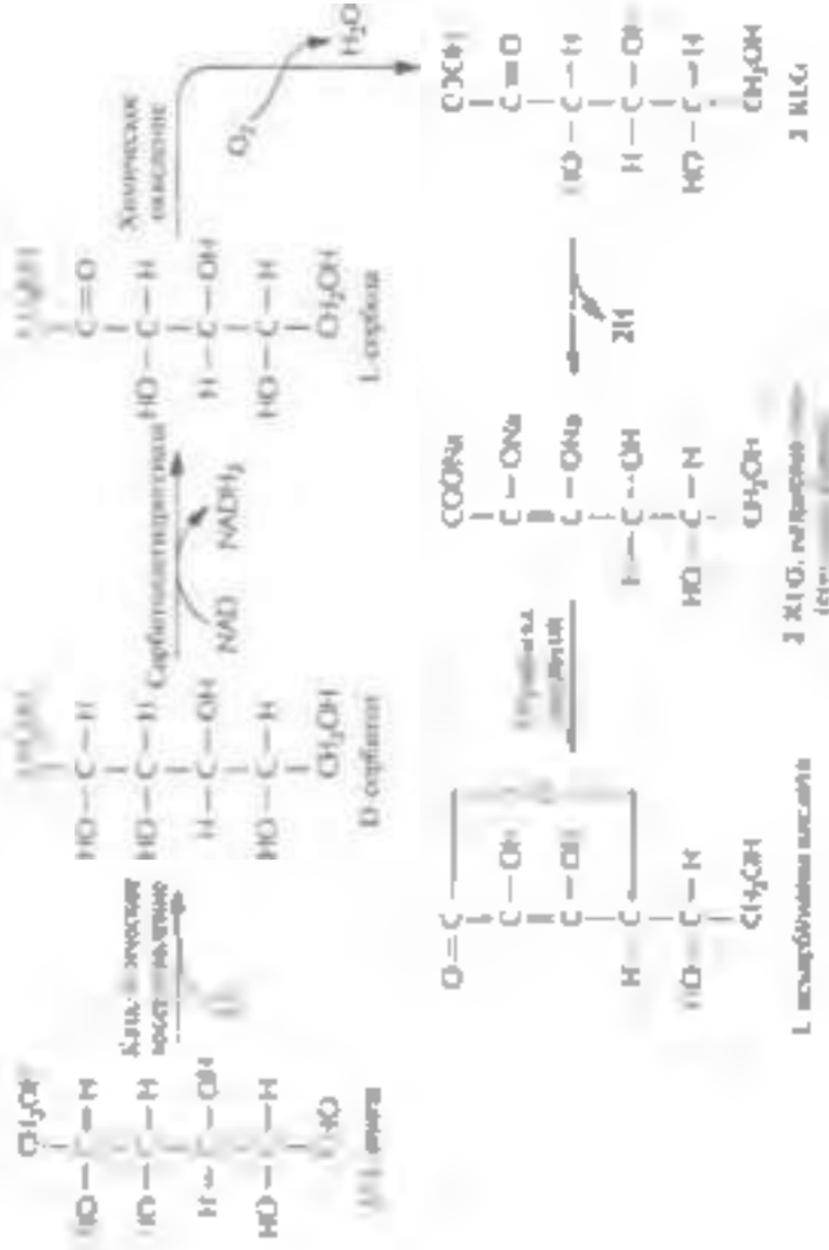


рис. 12.7. Прямая стрелка 1 и выровненная стрелка 2 указывают на то, что в данном случае, в отличие от предыдущих случаев, D-сорбитол в 1 сорбите) отсутствует. Это происходит при участии бактерий *Acetobacter dohrnii*, которая синтезирует фермент сорбитол-дегидрогеназу. Остальные стадии представляют собой часть химической реакции

*E. coli* (при этом синтезировалась активная 2,5-DKG-редуктаза), в этом переломном месте в эксперименте с широким кругом хозяев и трансформированы им *Escherichia herickola*.

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 митохондриях, 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, которая 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 построена его вторичная структура, состоящая из восьми тесно расположенных параллельных  $\beta$ -слоев, пересекающихся попарно  $\alpha$ -спиралями, которые соединялись с  $\beta$ -слоями петлями разной длины (рис. 12.5). Такой характер укладки полипептидной цепи был установлен для 17 других ферментов с уже известной  $\alpha\beta$ -палочковой структурой, а следовательно, они могли быть идентифицированы три петли, возможно участвующие в связывании субстрата. С помо-

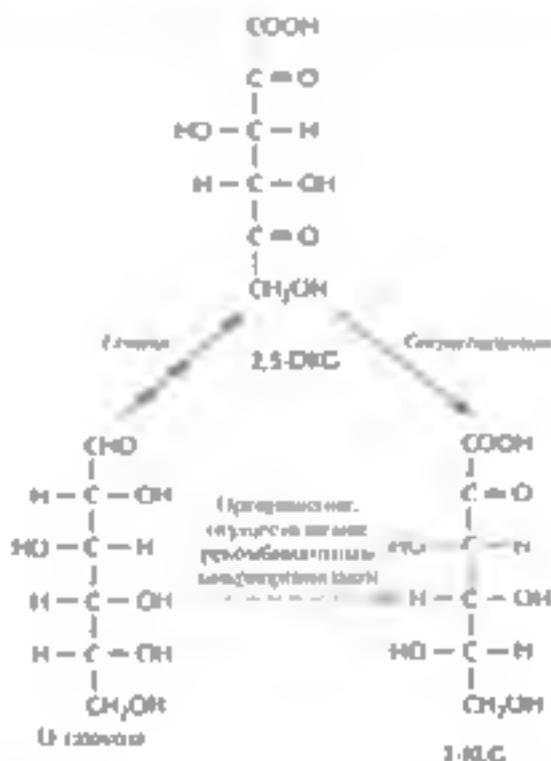


Рис. 12.3. Мы робинзонами несли синтез 2-KLG. Естественный ген фермента, обеспечивающего синтез 2,5-DKG, из D-глюкозы, а синтетический фермент, катализирующий превращение 2,5-DKG в 2-KLG. Таким образом, 2-KLG непосредственно предшественник 1-аскорбиновой кислоты, можно синтезировать из D-глюкозы совместно культивируемым штамм микробиоинженеров. Альтернативный подход состоит в создании гибридных генов бактерий *Escherichia coli* (проявляющих эту совместную функцию фермента *Синтетический*)

одно или несколько направленных мутантов без их получения (2 мутантных белка, каждый из которых содержал одну аминокислотную замену в одной из цепей). 11 мутантных форм 2,5-DKG результаты обладали более низкой скоростью активности, чем дикотипный фермент, а 12 из 3, у которых остаток глутамин в положении 192 был заменен на аргинин, были 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 глутаминовой остатков в положе-

нии 35 и 57 (в дикотипном положении) повлечь более термостабильный фермент по сравнению с нативной формой. Дальнейшие условия будут, вероятно, направлены на получение фермента, сочетающего оба этих свойства.

### Синтез углеводов

Множество бактерий, особенно бактерий типа *Escherichia coli*, способны утилизировать различные органические соединения типа нафталина, толуола, ксилола и фенола, которые являются для них единственным источником углерода. Очень часто гены ферментов, катализирующих расщепление этих органических соединений, располагаются в группах природных плазмид (длиной 50–200 т.п.н.). Чтобы ставить 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. Плазмида NA117 содержит два разных оперона, которые позволяют мезофильной псевдомонаде использовать нафталин 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 нафталин.

При исследовании одного из трансформантов, содержащего вставку длиной 10,5 т.п.н. и способного превратить нафталин в салicyлную кислоту, обнаружилось, что минимальная ростовая среда, содержащая триптофан, при обретает синюю окраску (характерный признак этого штамма) показав, что трансформированные клетки *E. coli* синтезировали фенилаланин. Синтез аминокислот в четыре стадии (рис. 12.6)

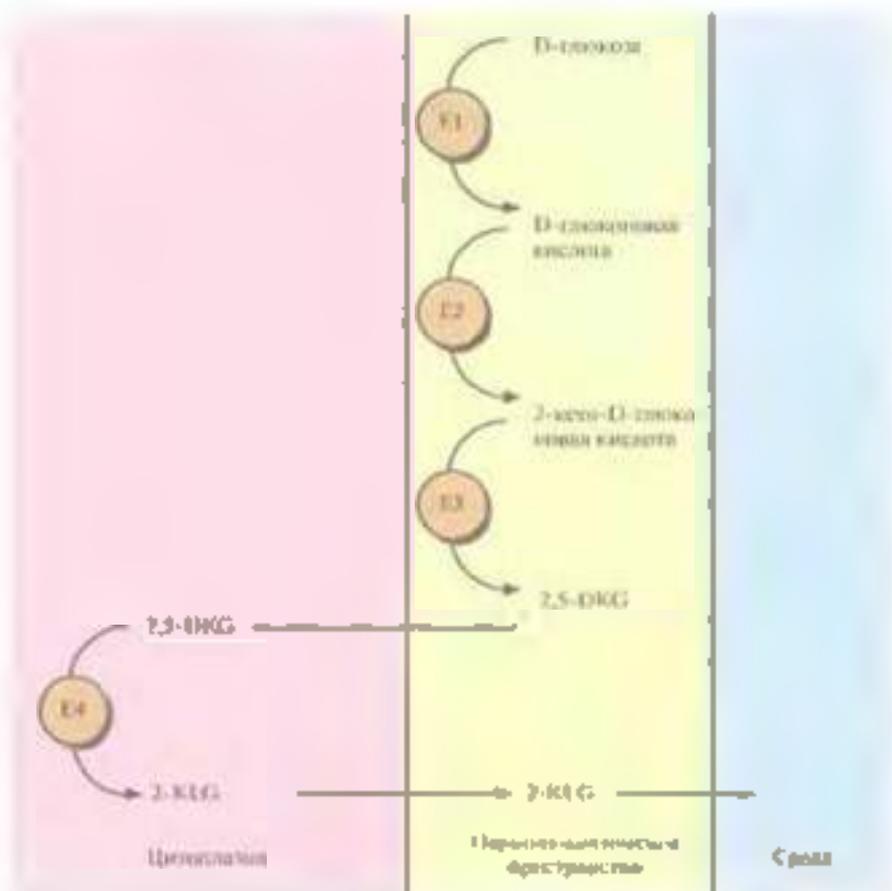


Рис. 12.4. Превращение D-глюкозы в 2,3-ДГФ глицолизисом бактерией *Escherichia coli*. Все участвующие в этом процессе ферменты обозначены буквой E и последовательно пронумерованы, за исключением E4, локализованного в цитоплазме.

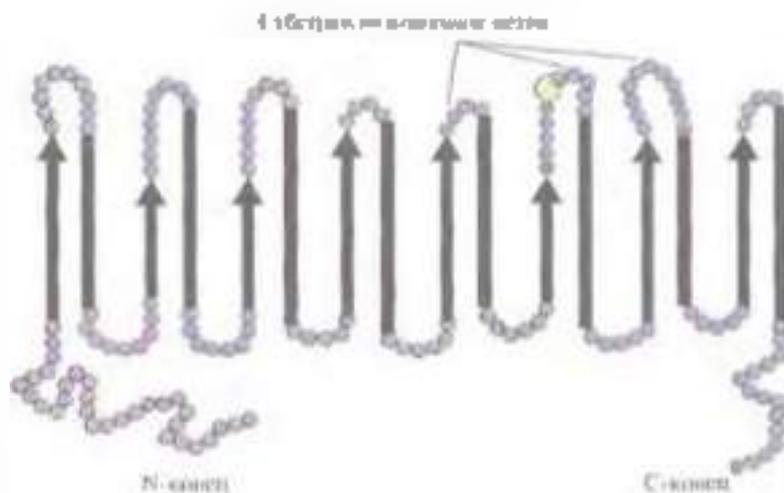


Рис. 12.5. Структура 2,5-ДГФ в действительности, высказанная идея на ее линейном уровне (последовательность). Стрелки — флюид, связан с симметричными участками, образующими кислотные остатки, которые имеют на N и C концы молекулы или соединяющие β-гликози и α-спираль. Показаны три участка, связанные с участием в стабилизации структуры. Желтый кружок — 102 аминокислотный островок.

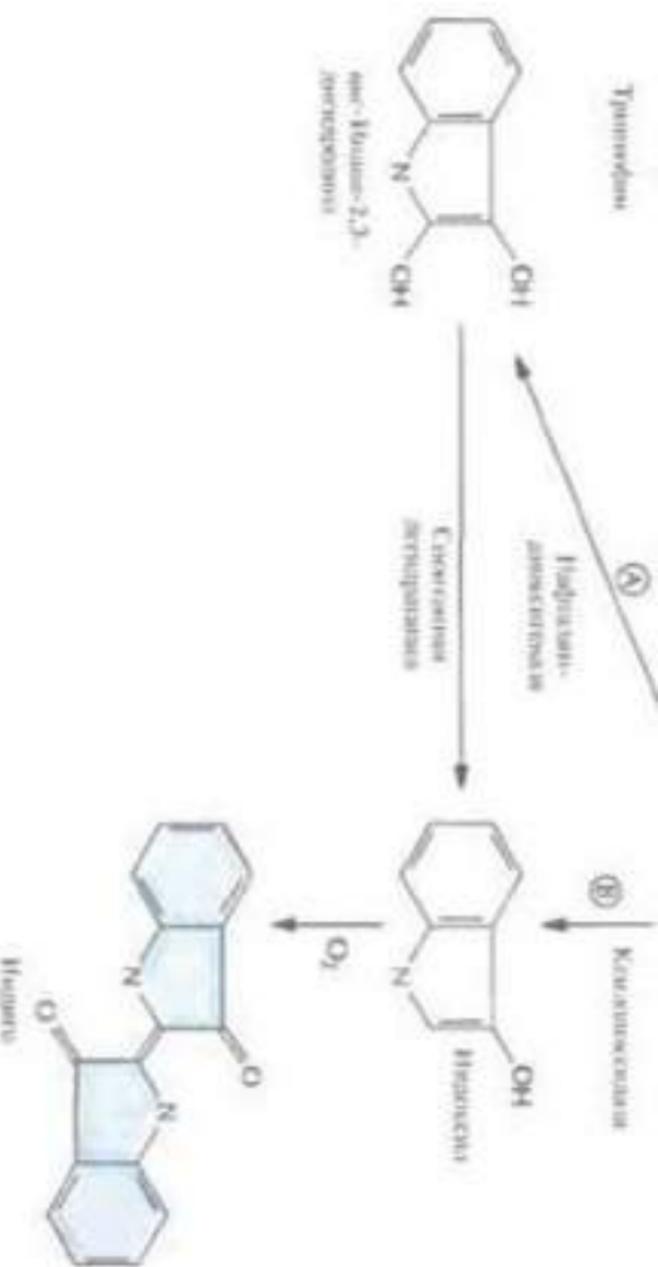


Рис. 12.6. Биосинтез ингибитора триптофана, сульфаниламидный метаболит мочевыводящего *E. coli*. Триметопим – один из ферментов, продуцируемых *E. coli*. Ген гидроксилазы, катализирующей реакцию А, присутствует на плазмиде *NMH*, а ген окислительной, катализирующей реакцию Б, – в хромосоме *TOI*. В трансферривающих клетках *E. coli* ингибитор синтезируется либо по пути А, либо по пути Б, но не по обоим одновременно.



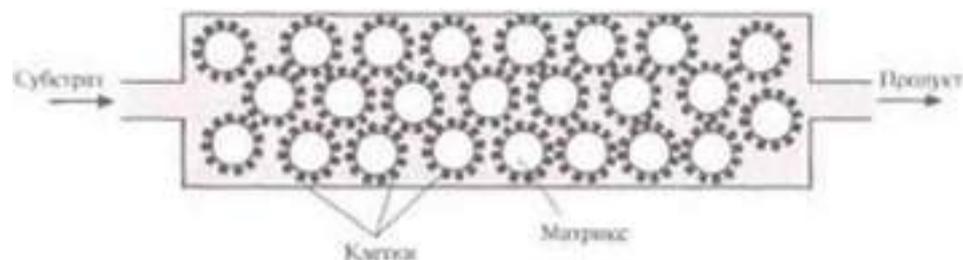


Рис. 12.7. Схематическое изображение биореактора, в котором можно было бы осуществлять синтез метаболитов с использованием рекомбинантных клеток *E. coli*. Клетки иммобилизованы на частицах пористой матрицы. В реактор непрерывно подается субстрат (глюкоза) и непрерывно выводится продукт (глютаминовая кислота). Субстрат поступает через решетки (имобилизуется поверхностью) пористых частиц субстрата и продукт

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 высших биохимических 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, темпы их ферментативные подходы начнутся по стадии разработки. В частности, только со временем уже существующие методы и методики трансформации для триптофановых производных типа *Corynebacterium* и *Streptococcus* spp.

Большинство плазмидных векторов с широким кругом хозяев реплицируются только в граммотрицательных микроорганизмах, поэтому необходимо создать векторы, специально предназначенные для экспрессии в *Corynebacterium* и *Streptococcus* spp. Это могли бы быть членильные векторы *E. coli*-*Corynebacterium*. То же самое, которое происходит из плазмид *E. coli*, может со-



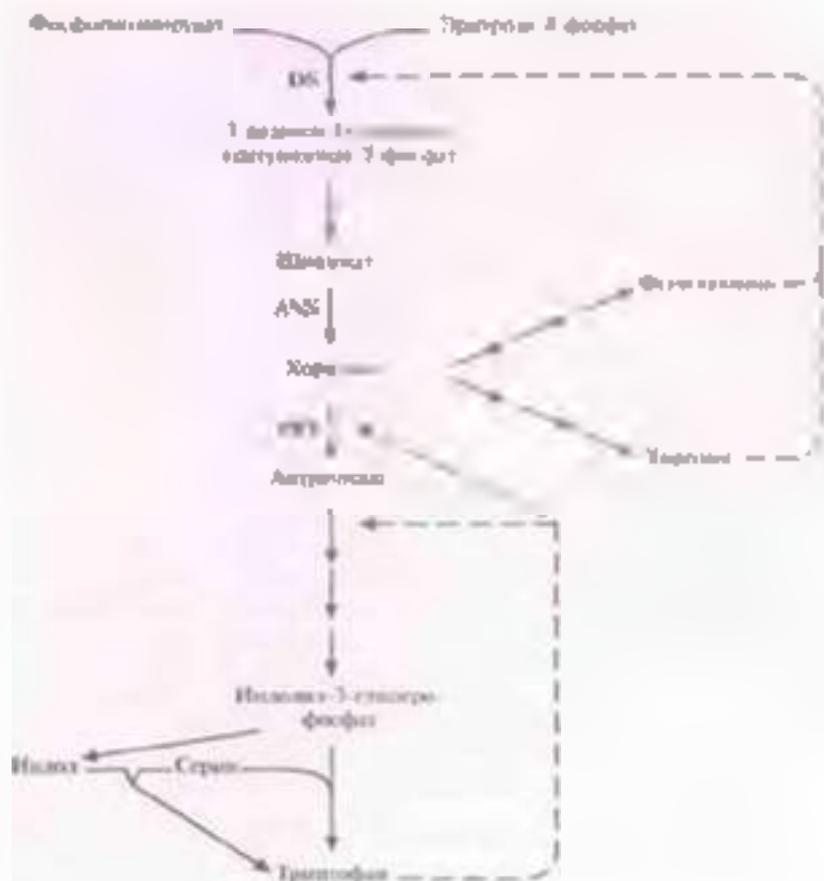


Рис. 12.8. Упрощенная схема биосинтеза триптофана в клетках *S. dysenteriae*. Сплошные линии биосинтетические реакции, пунктирные — регуляторные по типу обратной связи. В качестве побочного продукта образуется маломолекулярный предшественник триптофана под действием триптофанаминотрансферазы II (X<sup>3</sup> — декарбоксилаза индолил-3-ацетиламинотрансферазы, АНА — индолил-3-ацетиламинотрансфераза, АИТ — индолил-3-ацетиламинотрансфераза).

риванный зерн практически полностью вытеснен. Низкая конкурентная способность мушкетера в условиях ринч-трина. Однако эффект введения этого зерна в цитам диконо типа был еще сильнее: уровень синтеза триптофана в этом случае увеличился примерно до 130%, что связано с более эффективным использованием доступных предшественников. Также более высокая уровень синтеза триптофана достигли при введении в клетки *S. dysenteriae* модифицированных генов (рекомбинантных ферментов 3-декарбоксилазы индолил-3-ацетиламинотрансферазы, индолил-3-ацетиламинотрансферазы и индолил-3-ацетиламинотрансферазы. Гены, кодирующие эти ферменты, были получены из клет мушкетера стали нечувствительны к ингибированию конечным продуктом (ингибирование по типу обратной связи).

В качестве альтернативы для синтеза индолил-3-ацетиламинотрансферазы можно 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 микробиологические, в частности для изучения антибиотиков, штаммы грибов, что при трансформации и отбор трансформированных клеток не должны быть слишком сложными. Штамм в качестве от *E. coli* *Streptomyces* существуют 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 все они будут образовываться на твердой среде. В не индивидуализированные клетки: одновременно высеивая, растут 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 семенами на твердую среду, чтобы образовались



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 тинистратин.

### 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 таких генов можно использовать трансформации одних или нескольких мутантных штаммов, не способных синтезировать антибиотик, банксом клонов, созданным из хромосомной ДНК штамма дикого типа. После введения банкса клонов в мутантные клетки проводят отбор трансформантов, способных синтезировать антибиотик. Затем выделяют плазмидную ДНК из клеток сверхплотной культивации и экспрессируются в комплементарной (т. е. ген, восстановительная (комплементарная) утрата) мутантным штаммом функции, обеспечивая ее в клетке. Ключевым моментом является поиск клонов транскрипционной активности генов, из которых инципирует клетка, содержащие нуклеотидные последовательности, которые перекрываются с последовательностями матрицы. Таким образом идентифицируют, а затем клонируют элементы ДНК, прилегающие к комплементарной последовательности, и используют каждый клон 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 в юны ДНК, с помощью которых можно идентифицировать отдельные гены кластера.

Этот подход с успехом использовался для идентификации некоторых генов биосинтеза тетрациклина у штамма *Tetracycline producer A3* (рис. 12.10). В юны лучше комплементарной антагонистической на средах на цвет шимиди: мутанты микробиотиков дикого типа имеют красный цвет, а колонии мутантных микробиотиков кремовые. Таким образом, в результате комплементации образуется красный колония.

Помимо комплементации, для идентификации генов биосинтеза антибиотиков могут использоваться и более простые методы, с

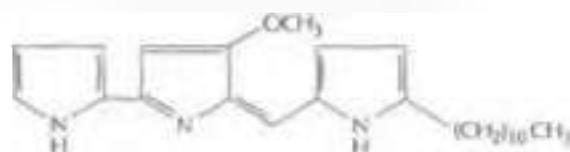


Рис. 12.10. С (структура тетрациклина уксусной кислоты производной).

помощью генетических или биохимических экспериментов можно идентифицировать, а затем выделить один или несколько ключевых ферментов биосинтеза, определить их N-концевые аминокислотные последовательности и, исходя из этих данных, синтезировать соответствующие пептидные молекулы. Этот подход использовался для выделения из *Penicillium chrysogenum* генов синтеза и экспрессии пептида А. Этот фермент катализирует окислительную конденсацию β(1-6)-аминоацилида I (структура II) пептида в аминокислоты N, которые являются ключевыми в биосинтезе пенициллина, ацилосартонина и пероциллина (рис. 12.11).

### Синтез новых антибиотиков

Новые антибиотики с уникальными свойствами и специфичностью можно получить, применяя генетически модифицированные штаммы, участвующие в биосинтезе уже известных антибиотиков. Они из первых экспериментов, в ходе которых был получен первый антибиотик, состоял в объединении в одном микроорганизме двух генов, отвечающих путям биосинтеза антибиотика.

Снова из штамма *Tetracycline producer A3* был получен фрагмент хромосомной ДНК в *Salmonella typhimurium* 32.5 т.п.н., содержащий все гены ферментов, ответственных за биосинтез тетрациклина. Ответственными за биосинтез тетрациклина являются представители семейства и каротиноидных антибиотиков (рис. 12.12). Целую плазмиду и различные субклоны, несущие части 32.5 т.п.н.-фрагмента (например, pT2315), вводили либо в штамм AM-7161 *Tetracycline producer*, синтезирующий родственный антибиотик челеридин, либо в штамм B140 или 10223 *chlorobacter*, синтезирующие родственные антибиотики тропетинин и дигидротропетинин.

Все указанные антибиотики являются β-лактам-пептидными антибиотиками, которые при-

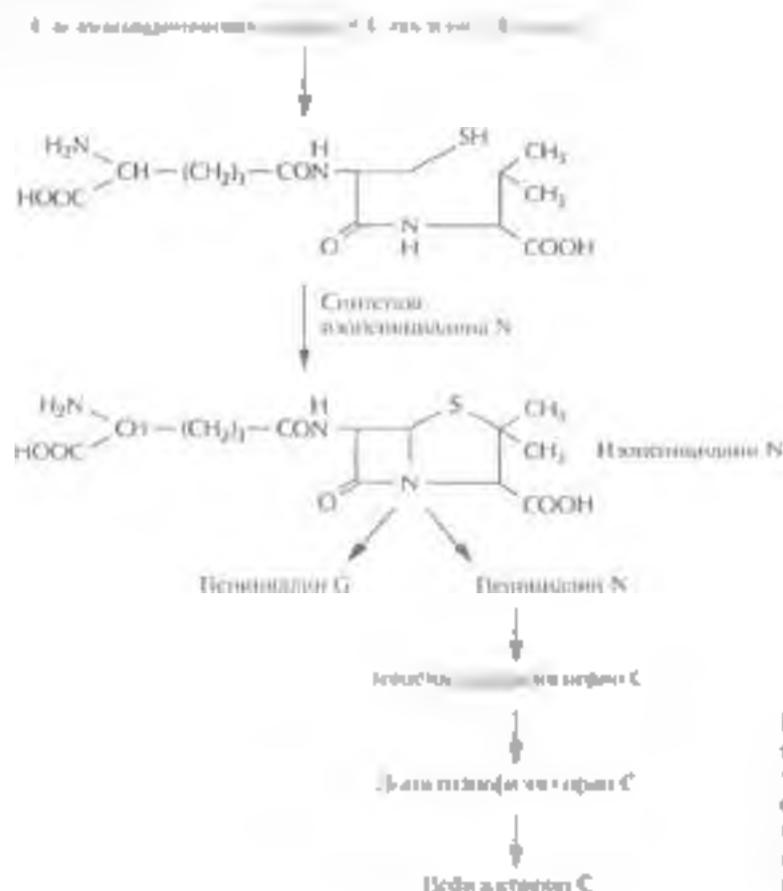


Рис. 12.10. Биосинтез пенициллинов и цефалоспоринов в *P. glaucum*. Синтез пенициллина N является предшественником пенициллина G, пенициллина V и цефалоспоринов C.

дний растущей культуре характерны шель, возникающий от pH среды (табл. 12.3). В связи с изменением pH (и цветом) среды возникает вопрос, какое соединение синтезируется. Мульти-резистентный штамм *S. clavulata* не способен синтезировать альфа-амино-кислоты, белковые. Появление белков после трансформации штамма AM-7161 *Streptomyces* sp. (штамм H140 или Tu22 *S. clavulata* для сравнения, несущий все гены искомого гена, кодирующего фермент биосинтеза пенициллина, свидетельствует о синтезе нового антибиотика (рис. 12.12, табл. 12.3). Трансформанты штамма AM-7161 *Streptomyces* sp. и штамма H140 *S. clavulata*, содержащие плазмиду p1230, синтезируют антибиотик, кодируемый плазмидой, и рибосомной ДНК. Однако при трансформации штамма Tu22 *S. clavulata* плазмидой p1230 (вместе с активированным синтезом) не синтезируется новый антибиотик — как и при трансформации

штамма AM 7161 *Streptomyces* sp. (плазмидой p12115 синтезируется еще один новый антибиотик — цефалоспориин A).

В структурной модификации эти новые антибиотики мало отличаются от их предшественников, пенициллина и цефалоспориина II, вероятно, образуются в том случае, когда первое звено цепи продукт одного пути биосинтеза служит субстратом для фермента другого пути. Когда будут детально изучены биохимические свойства различных путей биосинтеза антибиотиков, появятся возможности создавать новые уникальные высокоспецифичные антибиотики, манипулируя генами, которые кодируют соответствующие ферменты.

#### Разработка новых методов получения полисетимидных антибиотиков

Термин «полисетимидные» относится к классу антибиотиков, которые образуются в результате



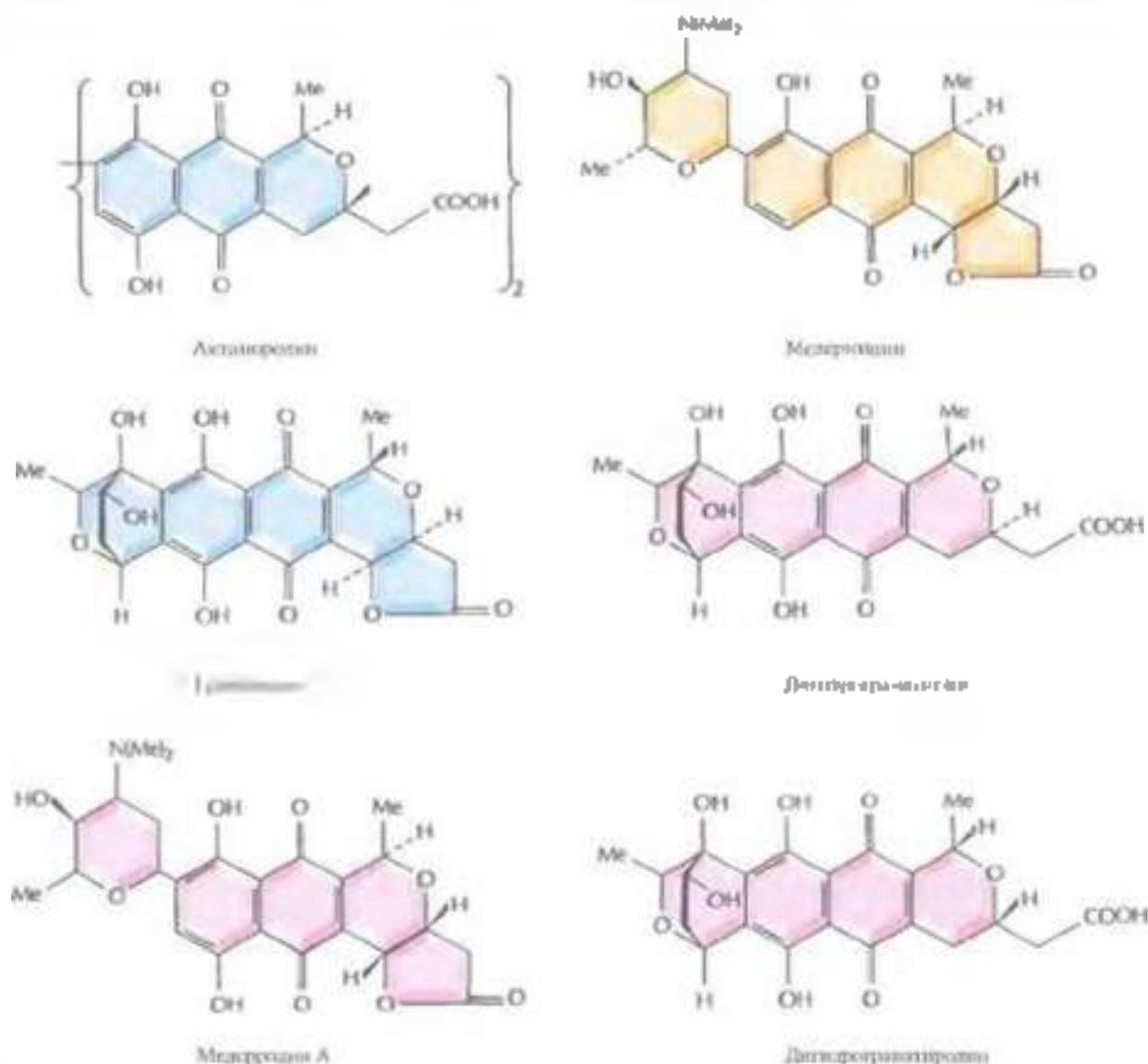


Рис. 12.12. Структурные формулы различным изобретениям в области антибиотиков, синтезированных в лаборатории Мэрионетт С. Сойлсбургского университета в 1920-х годах и аксетоксицилин; метацилин; доксицилин; миноцилин А и диметилполиситрицилин

ния специфические изменения, можно будет направленно изменять структуру антибиотика. Кроме того, выработка и действие на них иных участков ДНК, можно переписать данные участки и включить новые поликетидные антибиотики.

Все кластеры генов арматических поликетидов сиферакт три гена, кодирующие 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 олова, а его модификации осуществляются другими ферментами, действующими совместно

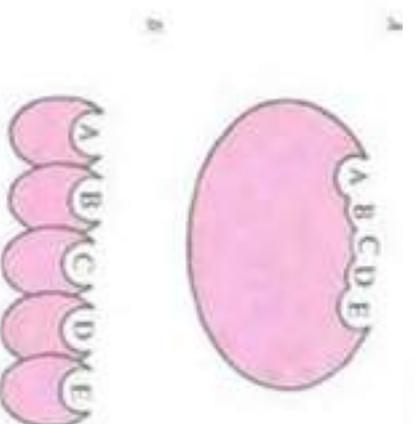


Рис. 12.13. Схематическое изображение структуры иммуномодулирующего пробиотика: А – пробиотический иммуноглобулин, у которого активный центр находится в одной пролиферации (А), в полиактивационной, представляющей собой комплекс из нескольких полипептидов с разными активными центрами (Б), ферменты обеих типов контролируют работу лизоцима (А-Е), который не только обладает окислительной ферментативной активностью,

но ино с тех. 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 пробиотических штаммов антибиотика (рис. 12.16), что еще

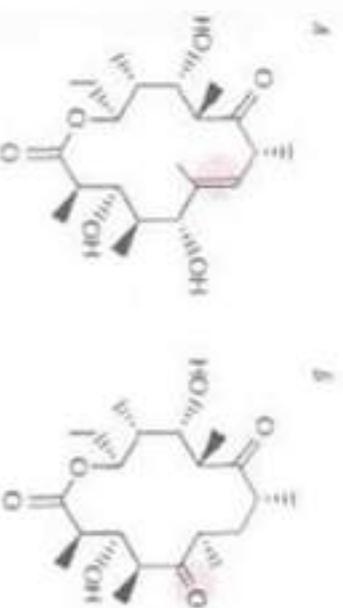


Рис. 12.14. Пробиотический споробацилла, продуцирует гомополисахариды ацетилов, А В результат агонизма в рте споровозрелые образуют споры с лизоцим-связанной ацетилов С-6 и С-7 (цветной группой). В. Лизоцим-связанная ацетилов образует ацетилов ацетилов с С-5-карбонильной, и не гомополисахаридной группой (цветной группой). (По данным работы Katz, Donatelli, *Ann. Rev. Microbiol.* 47: 875–912, 1993.)

раз увеличивает возможность геновой экспрессии.

### Усовершенствованные пробиотические штаммы

С помощью геновой инженерии можно не только создать новые антибиотики, но и увеличить эффективность синтеза витаминов. Липидогенная фактором в пробиотическом штамме антибиотиков с помощью *Streptomyces sp.*, часто является количеством доступного клеткам кислорода. Ветвление плесени растительности кислорода в поле и высокой плотности клеточной *Streptomyces* его часто оказывается недостаточно, рост клеток замедляется и выход антибиотика снижается. Чтобы решить эту проблему, можно, по-прежнему, изменить конструкцию ферментов, которые участвуют в синтезе кислорода, и изменить структуру генов, кодирующих синтез кислорода. Это можно сделать с помощью методов генной инженерии.

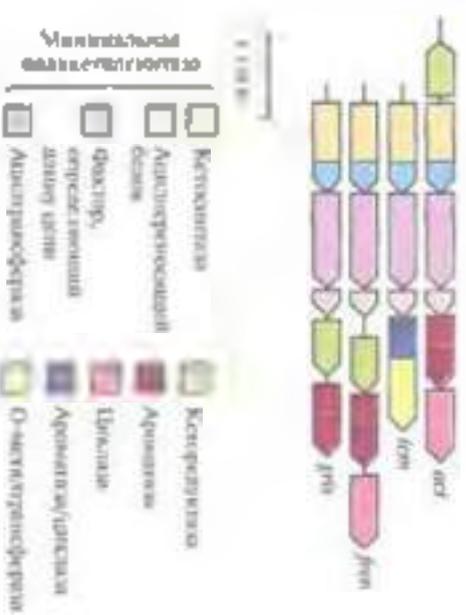


Рис. 12.15. Кластер генов биосинтеза пробиотических иммуномодулирующих антибиотиков ацетилов (act), термостабильных (gen), ферментов (pro) и гомополисахаридов. Каждый кластер кодирует гены, кодирующие синтез определенного антибиотика, который взаимодействует с клетками кишечника хозяина. Ферменты, кодирующие синтез кислорода, кодируются генами, которые участвуют в синтезе кислорода. Сужающиеся стрелы генов указывают на ориентацию его транскрипции.





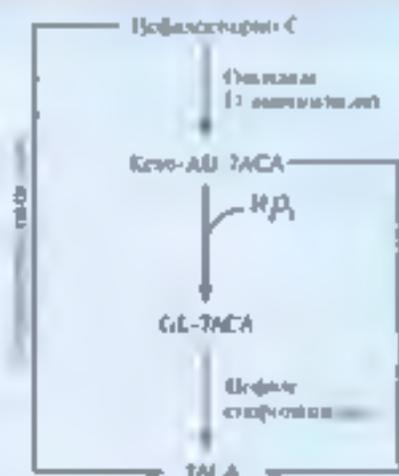


Рис. 12.17. Генетически сконструированная му- тация в гене 7-аминоацетилтрансферазы (7-АТА) из пенициллина G (Pen) позволяет 11-минималног выделения из гриба *P. chrysogenum* 7-аминоацетилтрансферазы из бактерии *E. coli*.

## Биопластимеры

Биопластимеры - это высокомолекулярные соединения, синтезируемые химиями организмами. Пластимеры из них являются ценными физическими и химическими свойствами и могут использоваться в пищевой, переработки нефти и фармацевтической промышленности. С появлением генно-инженерной рекомбинантной ДНК появилась возможность создавать новые биопластимеры, вырабатывать синтетические продукты из биомассы микроорганизмов, 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 кантиновой слизи

*Lactobacillus casei* - грамположительная облигатная аэробная молочная бактерия, синтезирующая ценный коммерческий биопластимер кантиновую слизь, высокомолекулярный желирующий агент. Его структурный скелет состоит из линейной полимерной цепи из молекул галактозы. К каждому второму галактозному остатку присоединены транс-аминогруппы биохимической природы, состоящие из одного остатка галактозидовой кислоты и двух остатков молочной (рис. 12.18). Кантиновая

слизь имеет вязкую консистенцию, не разрушается в агрессивных физических и химических средах и по физическим и химическим свойствам имитирует желатин. В частности, ее можно использовать как стабилизатор эмульсий, муцилизующий, загущивающий или сульфидирующий агент. Для успешного коммерческого применения кантиновую слизь необходимо выращивать в сырной среде и доступном источнике углерода. *L. casei* предпочитает дикий тип субстрата и утилизирует глюкозу, сахарозу и крахмал, но не лактозу. При ферментации сыра в больших количествах образуется такой побочный продукт, как сыворотка. Она состоит из воды (94-95%), лактозы (1,5-4%) и небольшого количества белка, минеральных веществ и низкомолекулярных органических соединений. Ограниченное количество сыворотки дает молочную промышленность, и ее утилизация - это большая проблема. Часто сыворотку сливают в реки и озера, что приводит к загрязнению и кина количества доступного кислорода и ингибирует многих организмов. Трансформировка сыворотки в местный источник энергии является очень важным, в том же случае это проблема связана с загрязнением окружающей среды. Поэтому, большое значение имеет ее утилизация. Все это заставляет промышленность искать способы выделения переработки сыворотки.

Сыворотку можно использовать как источник углерода при выращивании ценных промышлен-



Меланины — это сверхкрупные полимеры, состоящие из остатков нидина, бензильнола и аминопиридола. Первый этап их биосинтеза катализируется меланоколеразным ферментом монооксигеназой тирозиназой и представляет собой окисление тирозина до дицидроксибензилаланина. Последние этапы полимеризации не являются каталитическими процессами и в зависимости от типичной природы исходных соединений, включаются в различные ферменты. Они дают конечные продукты разных цветов: черного, коричневого, желтого, красного или фиолетового.

Выделены и охарактеризованы гены биосинтеза меланина в бактериальных клетках *Moraxella mallei* (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 экспрессировала только ген тирозиназы, а другая — ген тирозиназы и ORF438 (рис. 12.19). Векторы носили ген тирозиназы, обеспечивая синтез больших количеств 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, поставляет ионы меди неактивному предшественнику тирозиназы или тирозиназе, которой катализируется в их присутствии. В естественных условиях после образования лингидроксибензилаланина при участии тирозиназы в полимер включаются раз-

личные низкомолекулярные соединения (пигменты). С учетом этого можно изменить физические и химические свойства меланина, синтезируемого в клетках *E. coli* с высказанными в них к конечным этапам биосинтеза этого пигмента, если добавить в среду определенные низкомолекулярные соединения в разных количествах.

#### Макробиоцимический синтез животного биополимера с адгезивными свойствами

Весьма перспективной представляется также разработка недорогого способа получения белков с адгезивными свойствами, например выделение из моллюска *Mytilus edulis*. Этот моллюск имеет очень прочные нити, с помощью которых моллюски прикрепляются к различным поверхностям. Сразу после секрета биополимера (так называемой биостратомы железой между панцирем и телом) образуются многочисленные доперевые связи, что затрудняет определение аминокислотной последовательности. Это в свою очередь не позволяет установить молекулярную последовательность кодирующей на генон и синтезировать гибридные животные белки. К счастью, удалось выделить муравьиный предшественник адгезивного белка (130 кДа-предшественник). Как показали биохимические исследования, он богат серином, треонином, глицином, 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

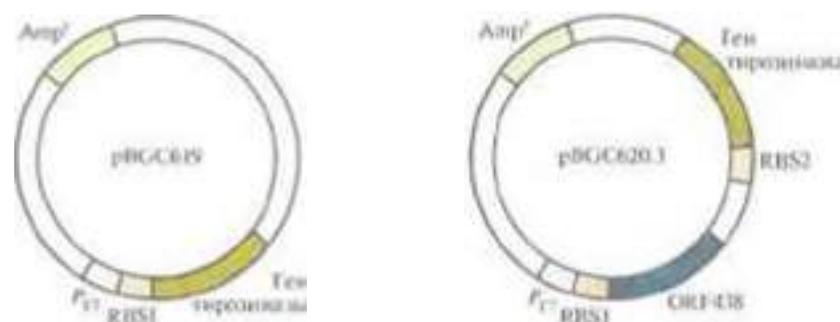


Рис. 12.19. Экспрессирующие плазмиды *E. coli*, содержащие гены биосинтеза меланина. pBGC619 содержит ген тирозиназы, а pBGC620.3 — ген тирозиназы и ген тирозиназы. Гидроксиламин катализирует синтез меланина с помощью тирозиназы. Рибосомные сайты RBS1 и RBS2 для инициации трансляции. Оба плазмиды несут ген устойчивости к тетрациклину (*Amp<sup>r</sup>*)

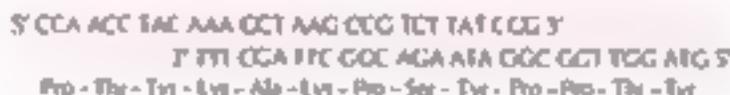


Рис. 12.20. Синтетический олигонуклеотид, получающий контроль для создания темп адгезивного белка, с использованием матрицы *M. luteus*. Искренне синтетический олигонуклеотид был синтезирован таким образом, чтобы обеспечить контроль адгезивного белка с помощью матрицы ДНК с помощью матрицы. Исследователи обнаружили, что матрица с матрицей ДНК матрицы фазы T4 привела к образованию только одного белка, состоящего из представленных на рисунке пептидов. Имя для белкового термина последовательности (температура, адгезивного или белка)

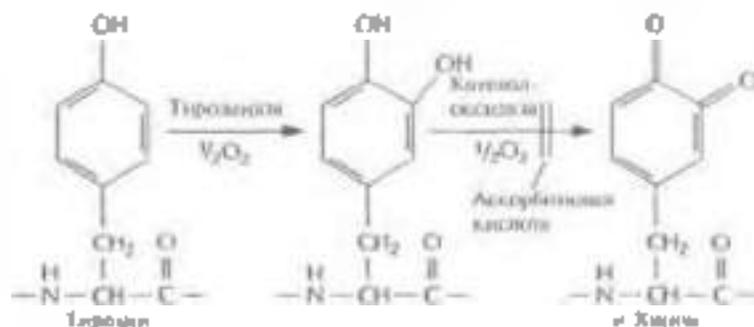
дон Ala Tyr-(Pro или Tyr)-Ser-(Tyr или IXPRA)-Tyr-Tyr-Thr-IXPRA-Lys

Из библиотек кДНК, которые были получены на основе мРНК, выделенных из висцеральной железы, была клонирована кДНК 130 кДэ предшественника адгезивного белка. И адгезивный белок, и его кДНК обладают весьма необычными свойствами, затрудняющими клонирование и экспрессию соответствующими (своей и полезными) 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 пептидов, липидов и углеводов, вряд ли его удастся получить в большом количестве вследствие ограниченности внутриклеточного пула аминокислот-тРНК.

Чтобы преодолеть все эти трудности, явное 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 кДэ, 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 деспептид адгезивного белка, создали синтетический сегмент длиной 600 п. н., который кодирует белок мол. массой примерно 25 кДэ. Его основная часть являлась единичными пептидами и состояла из кодирующей оптимальной для экспрессии в *S. cerevisiae* и фидегиновой экспрессии промотора, когда он встраивался для контроля в промотор фазы T7. Большинство микробных организмов обладают лишь ограниченной способностью использовать посттрансляционные гидроксилированные аминокислоты, так что образующийся белок будет не до конца гидроксилирован. Так, пептиды из его терминального остатка не префилируются в IXPA, что снижает число образующихся поперечных связей. Чтобы решить эту проблему, было создано система гидроксилирования in vitro, в которой бактерии являлись в присутствии аскорбиновой кислоты гидроксилируют остатки тирамина (рис. 12.21). Аскорбиновую кислоту добавляли в реакционную смесь для того, чтобы предотвратить

Рис. 12.21. Посттрансляционные гидроксилирование in vitro с использованием тирозинаминоксигеназы адгезивного белка *M. luteus*. При участии тирозинаминоксигеназы (IXPA), так как это не может быть связано до сих пор в тирозинаминоксигеназу in vivo (терминальный С-концевой остаток предотвращает лабораторную аскорбиновую кислоту)



нуть окисление остатков ДХФА в р-тинии. Этот процесс должен строго контролироваться, поскольку он приводит к снижению субъединиц активного белка. Как и многие другие белки или ферменты, белок необходимо активировать непосредственно перед использованием.

При совместном присутствии как эукариотического белка и образования естественного белка может возникнуть проблема трансформации из стекла, полистирола, ксилита и т. д. Прочность и специфичность связывания можно изменить добавлением к смеси адгезивных белков до окисления и образования естественного белка. Это позволяет создавать белки с уникальными 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 изолюкоз (7 ферментативных реакций). В ходе последующих двух процессов полимеризации изолюкоза в полиизопрен с образованием адвантиродиофата.

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 рибосомных белков полимера 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

эволюционную 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 внутривидочный 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 тонн в год.

Из всех микроорганизмов наиболее полно изучены и охарактеризованы поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксиоктаноат). Это относится как к самому полимеру, так и к кодирующим его генам *A. eutrophus*. Поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксиоктаноат) и другой полигидроксиалканоат, поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксиизовалерат-ко-3-гидроксиизовалерат), получают в больших объемах в промышленном масштабе ферментацией при гетеротрофии *A. eutrophus*.

Сначала этот микроорганизм растет отнесением медленно и неэффективно, 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 клеток) поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксиизовалерат-ко-3-гидроксиизовалерат) синтезирующих из смеси С<sub>12</sub>А 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 эффективно, когда масштабы культивирования малы, но становится

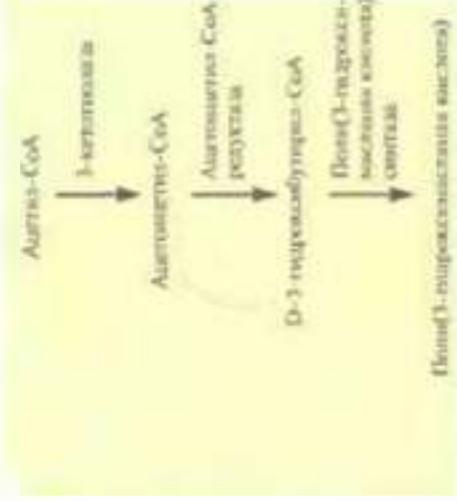


Рис. 12.22. Синтез поли(3-гидрокси-масляной кислоты) из ацетил-CoA. Справа от стрелок указаны ферменты, катализирующие соответствующие реакции.

сы серьезной проблемой при крупномасштабной непрерывной ферментации (см. Рис. 16). Чтобы обойти эту трудность, в плазмиде *placU* оперона *poli(3-гидрокси-масляная кислота)* встроили locus *regB* из другой плазмиды, который обеспечивал стабильность копий *placU* даже при гибели клеток, не позволяя им выйти за пределы стабильности. Метод микроинъекции *placU* позволил стабильно поддерживать locus *regB* в клетках, обеспечивая синтез поли(3-гидрокси-масляной кислоты). Трансформация *E. coli* с помощью *placU* позволила получать в больших количествах поли(3-гидрокси-масляную кислоту), по-видимому, вследствие

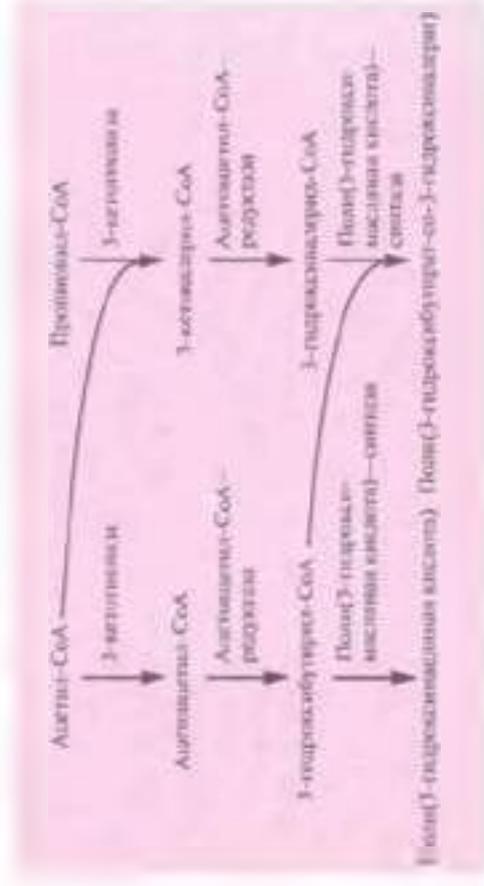


Рис. 12.23. Микробиологический синтез поли(3-гидрокси-бутират-*co*-3-гидрокси-ацрата).

того, что весь избыточный ацетил-CoA преобразовался в поли(3-гидрокси-масляную кислоту), а не в ацетат. Еще одно преимущество синтеза поли(3-гидрокси-масляной кислоты) в *E. coli* состоит в том, что когда ее экстрагируют целочным растительным экстрактом изостеолого натрия (милано), то она разлагается в меньшей степени, чем при экстракции из *A. viniferae*. По-видимому, это связано с тем, что большая часть полимера, синтезируемого в *E. coli*, находится в кристаллическом виде, в то время как в *A. viniferae* — в аморфном. При этом полимеры, полученные этими двумя способами, идентичны.

Поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксибутират) 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-гидрокси-масляную 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 последствие бактериальным пропаноатом из культуральной среды. Последний преобразуется в пропонио-CoA и затем реагирует с ацетил-CoA с образованием 3-



- 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. *BioTechnology* 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: 201-238.
- 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. Ito, I. Oho, Y. Ieda, M. Kabeaka, JI. Imataka. 1991 Construction of a 7 aminocyclohexanecarboxylic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Artemonium chrystepium*. *BioTechnology* 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( $\beta$  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( $\beta$  hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol* 32: 203-211.
- Lee S. Y., H. N. Chang. 1995 Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* using genetic and fermentation studies. *Can. J. Microbiol* 41: 207-219.
- Majumdar S. K., D. J. Levintape, J. A. DeMichele, J. F. Curtis, J. E. H. ... J. Galazo, D. E. Hughes. 1991 Actinophidin production by *Streptomyces* vehicles and growth of *Streptomyces* strains are improved by the expression of a bacterial hemagglutinin. *BioTechnology* 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. *BioTechnology* 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, D. C. Steitz. 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( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -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. *BioTechnology* 9: 84-87.
- 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. Kawan, 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. P. Lohr, 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 эндоуклеаза рестрикции *EcoRI*.
2. Опишите стратегию клонирования гена 2,5-DKG-редуктазы *Corynebacterium* и *Erwinia*. Почему это представляется 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 уродострипинцилина, который обычно синтезируется в *Streptomyces coelicolor*.
7. У чем состоит трудность триондифициции различных штаммовости *Streptomyces*? Как ее преодолеть?
8. Как с помощью генов инженерии увеличить производство антибиотика авидным штаммом *Streptomyces*?
9. Сформулируйте один из подходов к созданию модифицированных вариантов неароматического поликетидных антибиотиков типа триптомицина.
10. Как азотсодержащие белки, обычно синтезируемые штаммом *Aerobas pluvii*, можно синтезировать в *E. coli*?
11. Опишите схему синтеза жидкой (3-гидроксимасляной кислоты) в *E. coli*.
12. Что такое сыпороксы? Какие вещества в промышленности являются соединениями, модами 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 (лигнинер, лигноцеллюлоза) и токсичные вещества. Предпринимаются попытки кооперировать те предприятия, которые перерабатывают отходы промышленности и повторно использовать их сырьем в других производственных процессах.

Универсальной или почти универсальной «биодegradация» 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 ксенобиотиков с помощью микроорганизмов

Проблема утилизации токсичных отходов сейчас стоит очень остро. В 1985 г. мировые правительства приняли решение ограничить производство и использование химических веществ, пентахлорбензола, составляло более 50 000 т. Ранее незначительное количество разрушалось естественным путем, однако это тоже привело к загрязнению окружающей среды, а кроме того, обходилось очень дорого. В середине 1960-х гг. были обнаружены почвенные микроорганизмы, способные к деградации ксенобиотиков (неприродных, синтетических химических веществ; инсекты, яды, чуждые) — тербициды, пестициды, фунгициды, растворители и т. д. Это открытие подтвердило правильность предположения о том, что микроорганизмы можно использовать для экономичного и эффективно разрушения токсичных химических отходов.

Основная группа почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики, 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.) пластинки (табл. 13.1), а

Таблица 17.1. Целевые функции *Regulon* в биореакторе и их взаимодействие с другими регуляторными системами в биореакторе (или ферментере)<sup>17</sup>

Идентификатор	Целевая функция	Роль в биореакторе, %
3A1	Синтеза белка	28
3A2	Синтез ДНК	77
3A3	Синтез РНК	83
101	Контроль температуры	113
1P1	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	87
1P2	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	54
1P3	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	78
САМ	Индуктор	23
ХУ1	Контроль	14
РМС1	1-гидроксибензол	108
РМС2	1-гидроксибензол	83
РМС3	Контроль температуры	136
НАН	Индуктор	69
ХУ1А	Контроль температуры	135

<sup>17</sup> Источник: данные взяты из работы [17].

<sup>18</sup> [17] и [17] и [17].

могут обнаруживаться как в хромосомной, так и в плазмидной ДНК.

Быстрые по разрушению негалогенированные ароматические соединения, как триптофан, превращаются в катехол (рис. 13.1) или протокатехол (рис. 13.2), в шток, в ходе нескольких реакций окислительного расщепления. — в виде  $\text{CoM}$  и сульфидов (рис. 13.3) или  $\text{H}_2\text{S}$  и метансульфида (рис. 13.4). Эти последние соединения метаболизируются практически всеми мезоорганизмами. Галогенированные ароматические соединения, являющиеся компонентами большинства пестицидов и гербицидов, с помощью тех же ферментов расщепляются до катехола, протокатехола, гидрохинона или их галогенированных производных, причем скорость окислительного расщепления обратно пропорциональна числу атомов галогена в исходном соединении. Легкооспиритовые (или безвредные для окружающей среды) галогены не органической природы, необходимые для детоксикации соединений часто осуществляются в ходе неспецифической диксинтезной реакции, путем замещения галогена

в бензольном кольце на гидроксигруппу (группировка). Эта реакция может происходить как в ходе биодетоксикации исходного галогенированного соединения, так и в шток.

## Метаболические пути биодетоксикации ксенобиотиков, созданные методами генной инженерии

Некоторые мезоорганизмы способны переработать ксенобиотик в детоксикации различных ксенобиотиков, однако следует иметь в виду, что: 1) они часто имеют не только одну, но и несколько целевых соединений; 2) промышленные органические соединения в виде их конденсированных или функционализированных или расщепляющихся на микрокомпоненты; 3) большинство из них имеют высокую скорость смеси компонентов, а микрокомпоненты, способная (включая один или несколько ее компонентов) может взаимодействовать с другими компонентами; 4) многие неорганические соединения абсорбируются клеточными мембранами и становятся менее доступными; 5) биодетоксикация органических соединений часто происходит в несколько этапов. Часть этих проблем можно решить, осуществив комбинационный перенос плазмид, которые кодируют ферменты разных каталитических путей, в один реципиентный плазмид (рис. 13.5). Если две плазмиды содержат гомологичные участки, то между ними может произойти рекомбинация с образованием гибридной плазмиды, которая имеет большой размер и обладает синтаксисом исходных плазмид. Если же две плазмиды не содержат гомологичных участков и относятся к разным группам несовместимости, то они могут сосуществовать в одной клетке.

### Перенос плазмид

В 1970 г. Чарльзарт и его коллегами был создан первая бактериальная плазма, обладающая более широкими каталитическими возможностями. Он расщеплен большинством углеводородных нефти и был назван «суперплазмидой». Для его изучения использовались плазмиды, кодирующие контролируемую фермент, расщепляющую специфический класс углеводородов, плазмиды САМ детерминирована детоксикация ксенобиотиков, ОСТ окислы, НАН гидроксила. ХУ1 — ксенобиотик (рис. 13.5). Система путем контролируемого пере-



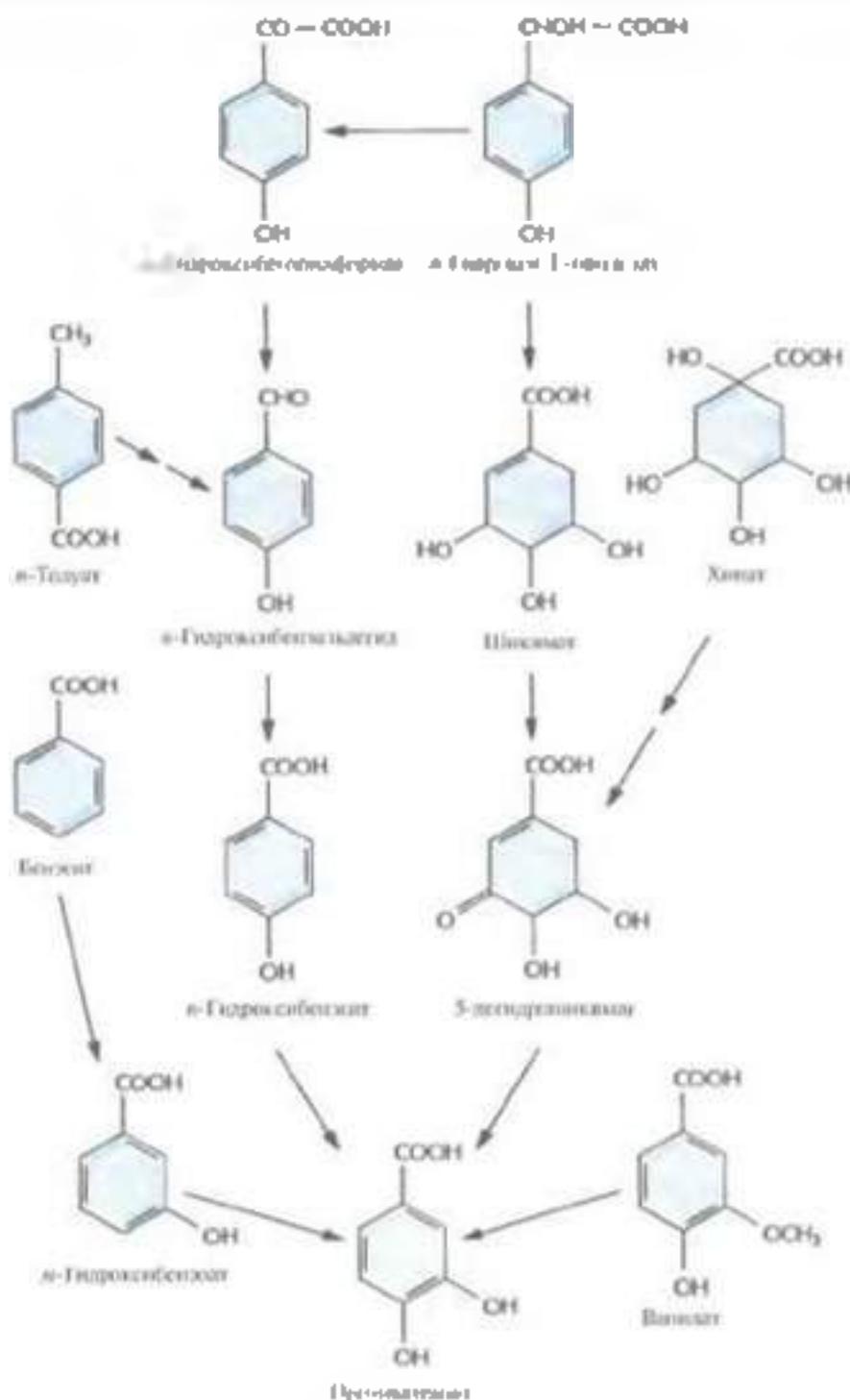


Рис. 13.2. Путь формирования п-кумаройл-КоА из префената и его дальнейшая модификация в различные биогенные соединения (п-кумарат, п-кумарат, п-кумарат)

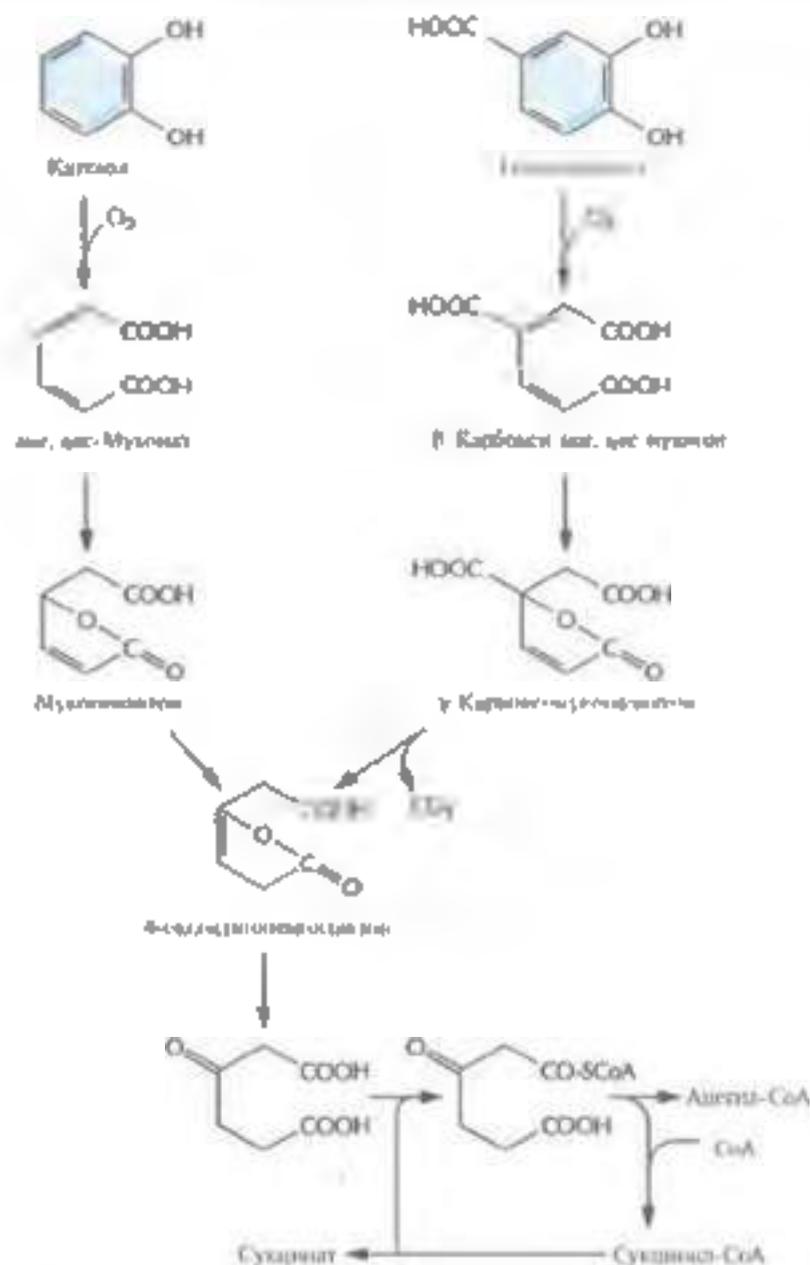


Рис. 13.9. Путь *этно-ферментации* при ферментативном превращении катехола в производное *кофа* и *суццинат*

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. volcanii, 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-

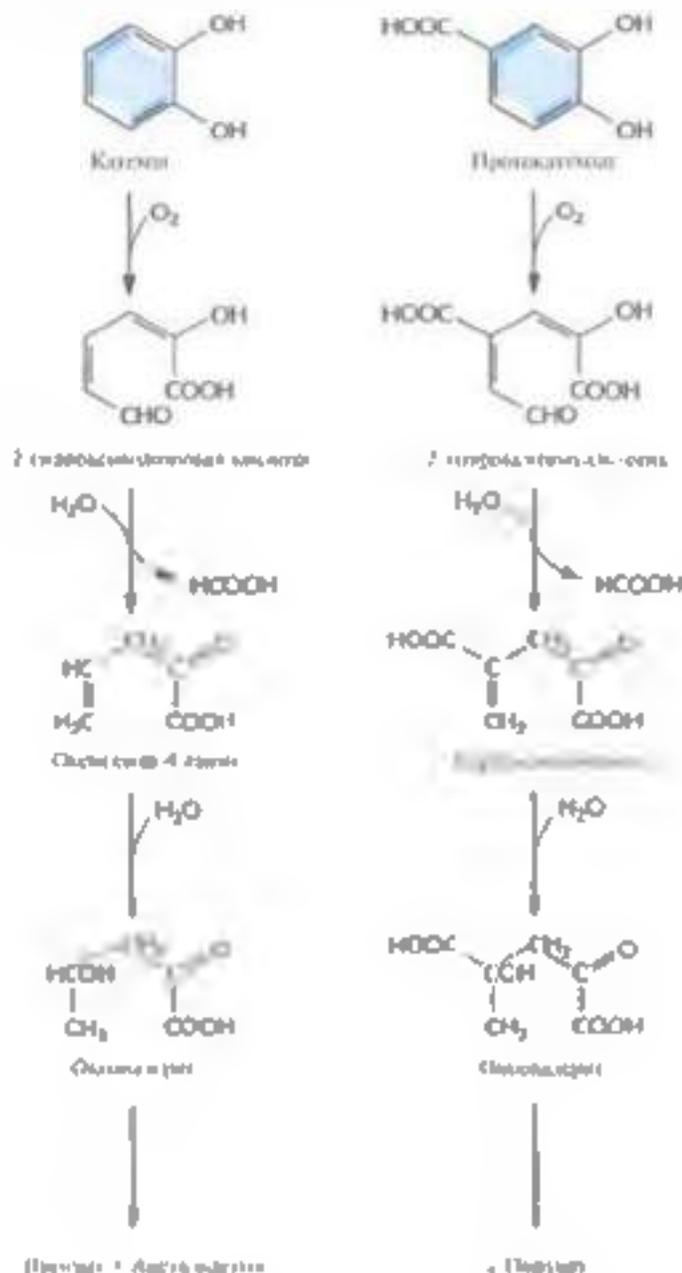


Рис. 13.4 Путь метилглатимисина при ферментативном превращении катехола и протокатехола в пенициллин G и пенициллин V

ской промышленности. Изобретатель «синтетическим» путем получил патент США, описывающий структуру линейного пептида и возможность его применения. Это был первый патент, выданный за создание генетически модифицированной микроорганизма и подтвержденный Верховным судом США, который проиллюстрировал, что биотехнологические компании могут защищать

свои и изобретение (патент) не, как химические и фармацевтические.

Большинство разбухающих ксенобиотиков бактерий, модифицированных путем переноса плазмид, являются мезофильными мезопрототрофными (любили влагу) при 20–40 °C, в том же ряду их можно найти в горячих источниках, океанах и озерах, обычно живут в диапазоне от 0 до 20 °C,



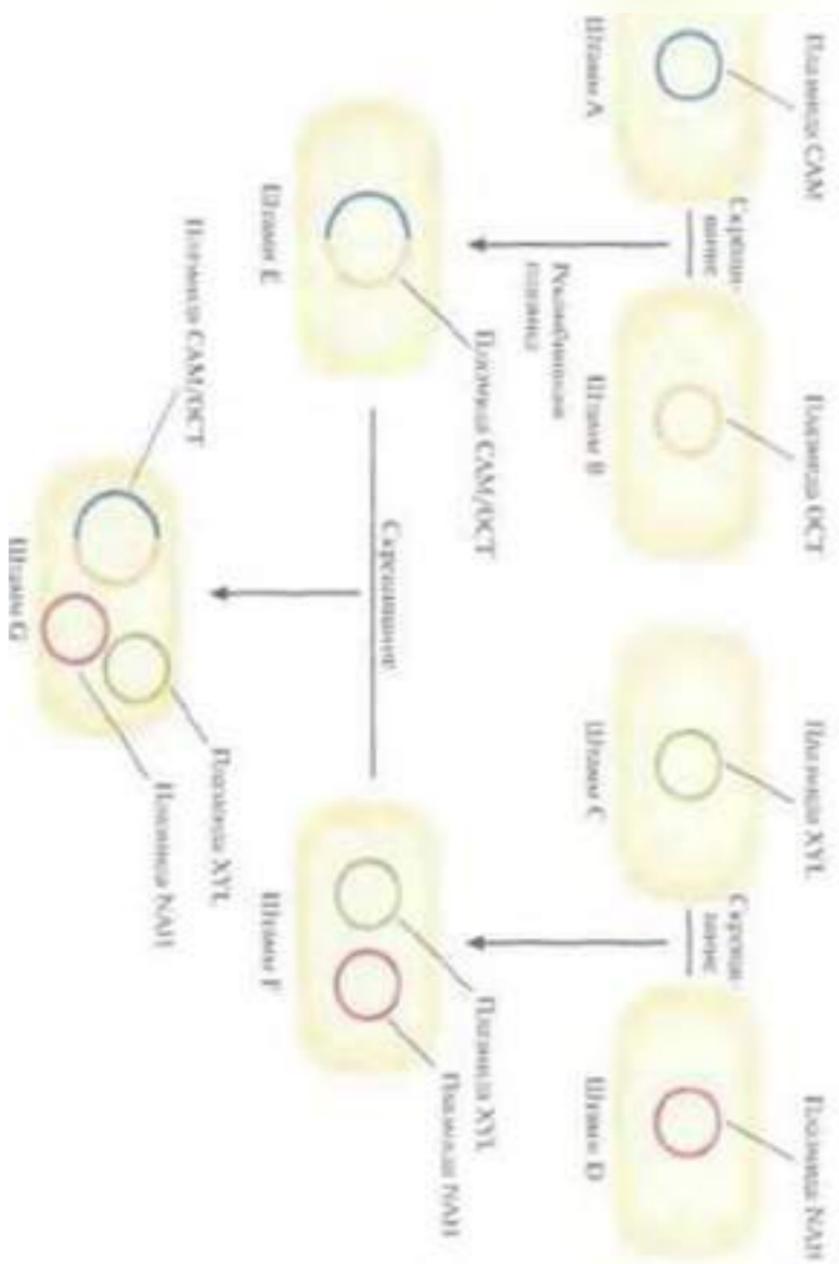


Таблица 13.2 Времени экспоненциального и трансформированного пестрофидельных штаммов *P. putida*, используемых в качестве единственного источника углерода (ацетилен или толуол, при разных температурах)<sup>1,2</sup>

Стратегия, °C	Время (часов) ±		
	использование газа	трансформированный штамм,	трансформированный штамм,
	ср. время ± ст. откл.	ацетилен	толуол
17	16 (range)	16 (range)	16 (range)
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
3	11,9	12,9	13,2
4	18,6	18,1	16,4

<sup>1</sup> Изучены штаммы *P. putida* (штамм 54-539-041, 1988) и *transposon*.

<sup>2</sup> Штамм *transposon* имеет единственную точку роста только при очень высокой температуре. Среднее время экспоненциального и трансформированного штамма — 16 часов.

инного метаболического пути. Осуществимость этого подхода проверили на примере матрицы рWAC, 12 генов которой кодируют метил-гидроксиацетил-тиолазы и кетолы. Обладатели этой плазмиды исследователям могут использовать в качестве источника углерода ацилбензоаты (рис. 13.6). Указанные гены входят в состав одного *lux*-оперона, находящегося под контролем  $P_{\text{lux}}$ -промотора. Транскрипционная активность последнего находится под стативным контролем продукта гена *luxS*, активирующая почти все субстраты дивергентного метаболического пути (например, бензоатом и 3-метилбензоатом) (рис. 13.6). Детальный биохимический и генетический анализ показал, что матрица рWAC-плазмиды бактерии могут распознавать 4-этилбензоат только до 4-этилацетата, который ингибирует один из основных ферментов данного метаболического пути, катехол 2,3-диоксигеназу, являющуюся продуктом гена *luxS*, 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 мета-распознавания 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 плазмиду, несущую ген устойчивости к ампициллину, встроили ген устойчивости к тетрациклину, находящийся под контролем  $P_{\text{lux}}$ -промотора. В результате плазмиды, 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. В результате на этой среде клетки содержат мутантный ген *luxS* и продуцируют измененный *luxS*-белок ( $S^*$ ), который способен взаимодействовать с 4-этилбензоатом и ингибировать транскрипцию гена устойчивости к тетрациклину. Чтобы решить проблему ингибирования катехол-2,3-диоксигеназы, мутантный ген *luxS* встроили в плазмиду с индикаторным геном, несущую ген устойчивости к клиндамицину, и ввели ее в клетки *P. putida*, содержащие плазмиду рWAC (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-

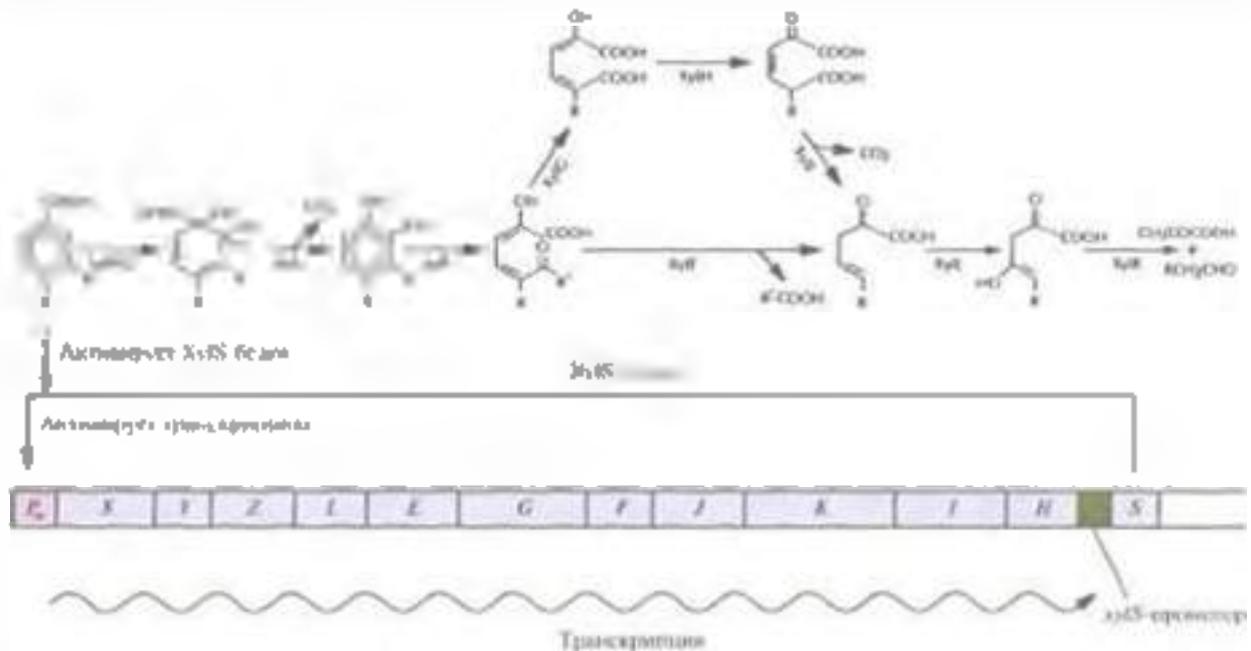


Рис. 13.6. Путь антоцианогенеза в дрожжах и клетках *P. putida* pWWV. *xylE*-ген кодирует один из ферментов  $P_m$ -примотора, который регулируется с помощью продукта гена *xylB*, в свою очередь активирующего при индукции субстратом. Гены *xylD* и *xylH* кодируют еще ферменты  $P_m$ -примотора. Ген *xylG* кодирует в составе оперона и кодирует фермент, катализирующий окисление субстратами оксалат (R и K — это H), 3-метил-бензоат (R — это H, H — это CH<sub>3</sub>), 3-гидроксиат (K — это H), K — это CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>) и 4-метилбензоат (H — это CH<sub>3</sub>, K — это H) гены *xylI* кодируют пептидогенезисы, *xylJ* кодирует фермент, катализирующий окисление 4-окси-п-кумарата до 4-окси-п-гидроксибензоата, *xylK* — фермент, катализирующий окисление 4-окси-п-гидроксибензоата до 4-окси-п-гидроксибензоата, *xylL* — фермент, катализирующий окисление 4-окси-п-гидроксибензоата до 4-окси-п-гидроксибензоата, *xylM* — фермент, катализирующий окисление 4-окси-п-гидроксибензоата до 4-окси-п-гидроксибензоата, *xylN* — фермент, катализирующий окисление 4-окси-п-гидроксибензоата до 4-окси-п-гидроксибензоата, *xylO* — фермент, катализирующий окисление 4-окси-п-гидроксибензоата до 4-окси-п-гидроксибензоата.

ды, что в гене *каталон-2,3-диоксигеназа* pWWV действительно произошла мутация и что эти мутационные гены (*xylE* и ген *каталон-2,3-диоксигеназа*) обеспечивают расщепление 4-гидроксибензоата.

Обе мутационные гены участвуют в процессе активации всех субстратов раннего метаболического пути. Помимо стратегии, используемой для повышения эффективности реакции гена 4-метилбензоата, применимо и в случае других соединений: мутация, приближая и гиперпродукция *XylS*-белка, может усиливать активацию  $P_m$ -примотора и повышать скорость разложения субстрата; кроме того, можно избирательно модифицировать  $P_m$ -примотор, чтобы он стал более сильным, сохраняя способность взаимодействовать с *XylS*-белком. Таким образом, проведенная работа показывает, что наличие реально усиленного гена *xylE* и гена *каталон-2,3-диоксигеназа*

путь с помощью технологий рекомбинантных ДНК, традиционного мутагенеза и соответствующих методов отбора.

Одним из наиболее распространенных веществ, загрязняющих почву и воду, является трихлорэтилен, широко используемый в качестве растворителя и обезжиривающего средства. Он длительное время остается в окружающей среде и считается канцерогеном. Кроме того, анаэробные почвенные бактерии могут его гидроксилировать, превращая в еще более токсичное соединение трихлорэтилен.

Было показано, что некоторые штаммы *P. putida*, разрушающие ароматические соединения, также как толуол, пиридин и трихлорэтилен. С помощью проведенных генетических исследований удалось установить, что для полной детоксикации трихлорэтилена не нужны все ферменты мета-расщепления каталон и толуол



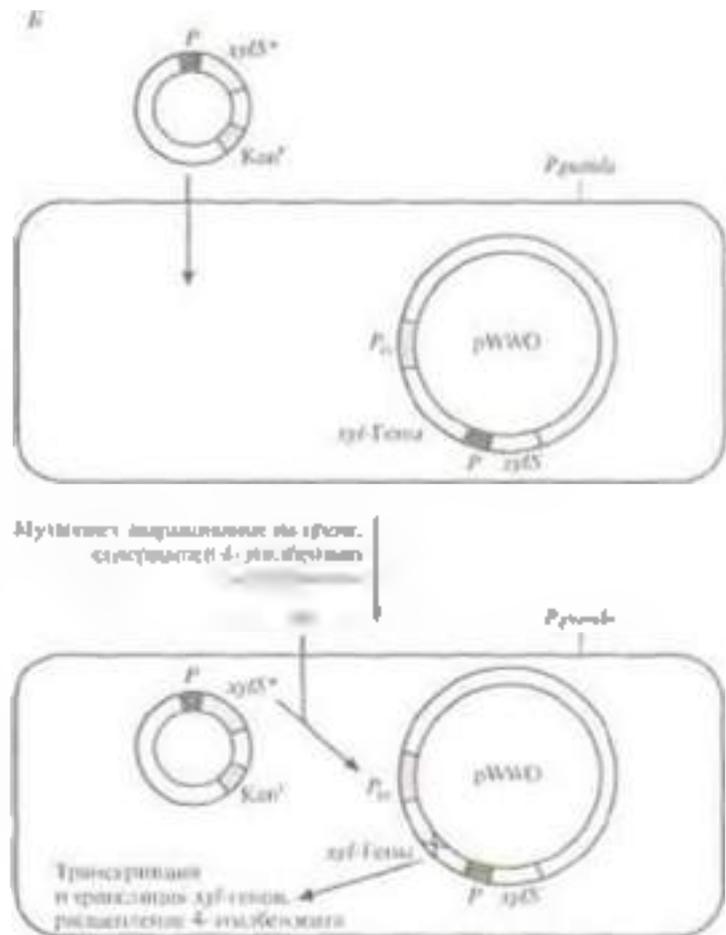


Рис. 13.3. *Escherichia coli* с интегрированной системой модификационной копией 1,3-ксилоксигеназы, которая не ингибируется 4-гидроксибензойной кислотой. Штамм *P. putida*, несущий плазмиду pWAO, трансформирован плазмидой с оператором *xylE* и геном, кодирующим мутантный ген *xylS*, который активирует *P<sub>trp</sub>* промотор. Промотор *xylE* активирован трансформированным штамом и вырабатывает 10-кратно больше белка, чем штамм, несущий 4-гидроксибензойную кислоту. Рост штамма на этой среде, содержащей мутантный ген *xylE* и 2,3-диоксибензойную кислоту X в концентрации 1,1 г/л (серия X).

ла, достаточно лишь толуюриноксигеназы, которая в норме катализирует реакцию окисления толуюла до 4-гидроксибензойной кислоты. Офрекоксиген функциональной толуюриноксигеназы кодируется четырьмя генами (рис. 13.3, А). Не выделены и не протестированы в *E. coli* вид координатного индукционного *lac*-оператора, который активируется индуцирующим β-D-тиоальбоминизмом (ИИТ), в результате чего транскрипция развивается до безразличной соединенной. Исходя из скорости экспрессии транскрипта в *E. coli* ниже, чем в *P. putida*, но она снижается в *E. coli* диамиде. С этим различием может быть связано меньшее, чем в *P. putida*, количество генов *l. coli* и его преобладающему действию транскрипта.

В одном из вариантов этой экспериментальной схемы использованы штаммы *Pseudomonas*, в которых были идентифицированы некоторые другие различные метаболические пути бактериальных штаммов, способные разлагать бифенилы, содержащие бифенилдиоксигенезу. В состав этого ферментного комплекса входят компоненты из двух субъединиц терминальной оксигеназы, ферредоксин и ферредоксинредуктаза. По своей структуре и функции бифенилдиоксигеназа сходна с толуюриноксигеназой, однако утяжеленные бифенилы окисляющиеся не могут расти на толуюле, в штаммы, утилизирующие толуюл, не растут на бифениле. После того как в штамме K1715 *P. putida* ген *brkA1*, кодирующий гомодульную субъединицу бифенилдиоксигеназы, был





Рис. 13.9. *А* Ферментативный гидролиз крахмала. *Б* Ферментативный гидролиз крахмала с фосфатами. Голубые кружки – остатки Р-группы

$\alpha$ -[1,4-связями] линейных цепей, соединенных 1,6- и 1,3-связями и формирующей 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 крахмала состоят из фруктозы и глюкозы*

Крахмал широко используется в пищевой промышленности и сельском хозяйстве; при этом его способность гидролизуют до низкомолекулярных компонентов, а затем преобразуют в другие соединения, преимущественно во фруктозу и глюкозу. Станд-

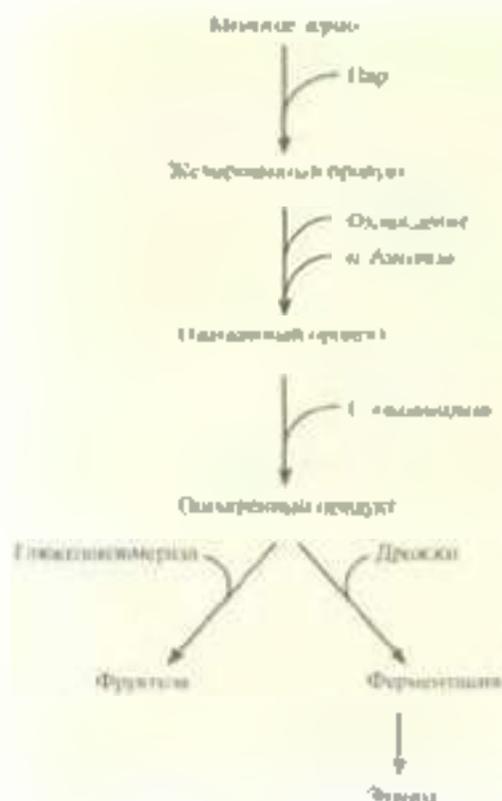


Рис. 13.10. Промышленное производство фруктозы и этанола из зерна

как ферменты, необходимые для гидролиза крахмала и декстринов (прежде всего, —  $\alpha$ -амилазы, глюкаминазы и глюкоамилазы). На стоимость сахара — например 30¢ — влияют стоимость и ее ферментов, применяемых в настоящее время в промышленности.

Промышленное производство фруктозы и этанола из крахмала — это многостадийный процесс, на протяжении следующего ферментативного и ферментативного стадий (рис. 13.10).

1. Желтые ферменты зерна (обычно кукурузные, содержащие крахмал и амилазу составляют примеро 40%) для того зерна обрабатывают (сначала для замачивания, и позднее часто разбухания крахмальных зерен и крахмал становится доступным для гидролиза ферментативного гидролиза. Включением продукта имеет действующий ингибитор(ы)

2. Охлаждение. Желтые ферменты охлаждают до 50–60 °C и добавляют  $\alpha$ -амилазу. При этом происходит гидролиз доступных  $\alpha$ -1,4 связей и образуются низкомолекулярные полисахариды. Выходы (температура и время) шлет эффективность промышленного фермента в сравнении с крахмалом и увеличивают скорость гидролиза.
3. Окислительные (полный спирт) гидролиз. Окислительные гидролизаторы (как лимонная, так и янтарная кислота) по молекулам гидролиза. Происходит под действием глюкооксидазы.

Конечным продуктом такой обработки является глюкоза, из которой затем можно получить этанол (с помощью дрожжей или ферментации) или фруктозу (с помощью глюкозидазы). Благодаря высокой эффективности последнего (применяется вместо сахара при производстве пива и в виноделии в Северной Америке и в других странах) (фруктоза). Крахмал (при промышленном производстве фруктозы обычно включает их отсутствие, но по своей конечной продукту является сахарозы, сахара с высоким содержанием фруктозы, хотя он состоит из примерно равных частей фруктозы и глюкозы.

Фермент  $\alpha$ -амилазы гидролизует  $\alpha$ -1,4-связи в молекулах амилозы в основном случайным образом, при этом образуются смеси тетрамы, пентамы (два остатка глюкозы, соединены виде  $\alpha$ -1,4-связью), гексапентамы (три остатка глюкозы, соединены виде  $\alpha$ -1,4-связью) и ряд  $\alpha$ -декстринов, которые представляют собой фруктозы или амилозы, но с короткими цепями с короткими цепями (рис. 13.9) и-Амилазу можно разделить на много амаририферментов, но для промышленного использования обычно получают из *Bacillus subtilis* фермента.

Помимо для растительных крахмалов (особенно для амилозы или амилопектина с ней взаимодействует) амилазы, амилаза гидролизует также и сахарозу  $\alpha$ -1,4-связью, начиная с конца цепи амилозы и амилопектина, в результате чего образуются остаток амилозы и различные  $\beta$ -декстрины.

Фермент глюкаминаза гидролизует  $\alpha$ -1,3- $\alpha$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6 связи. Связью  $\alpha$ -1,4-связью или гидролизует менее эффективно, чем  $\alpha$ -амилазы, и поэтому обычно используется совместно с

## ВАЖНАЯ ВЕЩА

## Получение мультилатеральных микрорганализмов, способных утилизировать несколько соединений

А. М. Чакрабарти

L. S. pages 4, 279-284, 1981

до получения жизнеспособных рекомбинантных ДНК опыты по созданию переноса генетического материала от одного микроорганизма к другому были малоэффективны. Эффективностью обеспечивала перенос на клетки в клетку техника Юнг и др. А. М. Чакрабарти, проводивший эксперименты по искусству плазмы-разрушительности в E. coli, модифицируя все ферменты пути биосинтеза и определяющего составы, синтезируемая пласмида, содержащая несколько генов плазмиды Калякура и плазмиды гены ферменты выделены из биологических

путей разрушали определенные органические соединения. В эти четыре (или же бактерии) мы создали новые микрорганализмы, со специфичными плазмидами, которые обуславливали деградацию амифары, октавы, салицилата и нефталена. Эти работы были новаторской и очень интересной не только с научной точки зрения, но также и потому, что они были проведены раньше 1970 г. до появления большинства генноинженерных методов. Они сыграли ключевую роль в определении причинно-следственных связей, поскольку данное био-

техническое решение в марте 1981 г., после того как Верховный суд США принял решение в пользу Чакрабарти создание микрорганализмов с помощью генетической инженерии может быть применено в коммерческих целях, которое решение было истолковано как шаг к будущему. Это решение будет способствовать развитию многих методов синтеза не имеет никакого отношения к этому. Это решение будет стимулировать развитие биотехнологической промышленности

тех. Основная функция глюкоамилазы – расщепление сложных углеводов в молекуле дextrина в превращении его в глюкозу. Этот и другие ферменты используются для уменьшения вязкости жидкостей (мацерации) и твердых веществ (пиво и получение так называемых светлых и сухих сортов). Обработку глюкоамилазой обычно проводят перед ферментацией, однако это два процесса можно объединить. Глюкоамилазу синтезируют многие микрорганализмы, но обычно ее получают из грибов *Aspergillus niger*.

## Повышение эффективности производства ферментов и пива

С целью при издании этилового или фруктового брожения зерна в основном определяется специфичностью ферментов, которые обычно используют в пивоварении. Поэтому разработка новых пивоваренных микроорганизмов направлена на повышение эффективности этих ферментов может существенно снизить стоимость конечных продуктов. Этого можно достичь несколькими способами.

- Находящиеся для специализации ферментов быстрорастущие рекомбинантные микрорганализмы, утилизирующие недорогой

субстрат. Это будет зависеть, чем получить ферменты из природных микрорганализмов.

- Использовать рациональные условия (встречающиеся в природе или созданные человеком условия) температуры, которые позволяют более высокие активности и позволить проводить окисление при 30–50 °C. Это уменьшит затраты аглирированной энергии и сэкономит энергию, расходуемую на его охлаждение до температуры, при которой обычно проводится гидролиз.
- Акклиматизировать гены ацидофильных и термофильных видов организмов, чтобы культивируемые или ферменты имели оптимальные условия температуры и pH. Это позволит совместить условия окисления и мацерации.
- Найти ген создать фермент, который будет эффективно расщеплять неабрабатываемый крахмал, что позволит исключить этап велирования и сэкономить большое количество энергии.
- Создать такой микрорганализм для ферментации, который будет синтезировать и секретировать гликоамилазу, что устранит необходимость ее добавления в процессе ферментации.

В настоящее время проводятся исследования, которые позволяют, возможно, не прибегая к таким выщелачиваниям.

Гены, кодирующие  $\alpha$ -амилазу, были выделены из генов микрорганализмов, в том числе из *B. subtilis* и термофильной бактерии *B. pasteurianus*. Для этого экстрагировали из дрожжевой ДНК, как и при выщелачивании ее рестрицирующей эндонуклеазой *Xba*I и встроили в гибридную рестриктазу *Xba*HI (или же в рДНК), которая содержит узнаваемый *Xba*HI-сайт и несет ген устойчивости к кадаммину. Полученными банками в форме трансформантов не обладающих  $\alpha$ -амилазной активностью клетки *B. subtilis*, отбирали трансформированные клетки по признаку устойчивости к кадммину и тестировали их на способность к синтезу и секреции  $\alpha$ -амилазы при помощи индикаторного теста. Для этого клетки с колониями, образующими трансформанты при 65 °C на содержащей артемизин среде, поместили в парчовый контейнер, продуцирующий  $\alpha$ -амилазу, были сформированы в присутствии геля, что свидетельствовало о индукции крахмала. Явления при положительном индикаторном тесте выявлялись на транскрипцию гена  $\alpha$ -амилазы как контролем своего промотора (вектор не содержит промотора) и на наличие сигнала, необходимого для секреции (молекулы субстрата не могут проникнуть в клетку). Возможность включения генов  $\alpha$ -амилазы в различные микроорганизмы позволила исследователям внести в них изменения, необходимые для того, чтобы эти гены можно было использовать в конкретных промышленных процессах.

Возможность включения гена  $\alpha$ -амилазы при помощи геля из крахмала была выявлена следующим образом. Выделенную от грибов *Aspergillus awamori* плазмидную ДНК (сывороточная структура) встроили в одну из плазмид *Saccharomyces cerevisiae* (на чья она находится под контролем промотора и регуляторных последовательностей терминирующей транскрипции гена спороу дрожжей (*ENO1*)). Лабораторными штамми *S. cerevisiae*, трансформированной плазмидой, приобрели характерную активность и вот идентифицировать крахмал в геле.

К сожалению, некоторые свойства этого штамма (чувствительность к высокой концентрации глицерина, неэффективность экспрессии ДНК-экспонированная, поддержание (глицином) только при определенном диапазоне pH) делало его непригодным для промышленного использования. Однако эти недостатки удалось устранить. Во-первых, продуцирующая гликолизомы штаммы примерно в 3 раз, удалив из гелевой области стрессовый элемент *1 ADI* промотора длиной 175 п. и во-вторых, из гелевой удалив «дражжестный» сайт индукции репликации и встроили в носитель ДНК, гомологичный участку дрожжевой хромосомы, претерпевшей изменения и инстрагированной 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 глицерина.

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 деятельность более эффективна, чем «лабораторный» с тем же геном в составе модифицированной плазмиды, что, во-первых, свидетельствует о ее стабильности и утрате нежелательных свойств. Как «лабораторный», так и «индустриальный» штаммы *S. cerevisiae* до введения в них гена *glucanase* не могли утилизировать растворимый крахмал. Плазмидная и инстрагированная ДНК-экспонированная *A. awamori* находилась под контролем результатов исследований гена *ENO1*, откуда было удалено область стрессового элемента длиной 175 п. Для инстрагирования плазмиды создавалась определенное селективное давление.

Для повышения продуктивности гликолизомы и хромосомную ДНК грибов *A. niger* встроили в сывороточную форму ее гена. Следует, что эффективность гликолизомы 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





чений, не выщелачивая индольные *Z. mitorabida* для промышленного производства лизина [3] требовалось чистое универсальное субстратно-акторное соединение (кислота или спирт) для синтез лизина. В проблеме, возникающей при поддержании и небиотрансформации культуры с индукцией азотной смесью, в значительной мере решена [3] приращением устойчивости к различным распространённым антибиотикам, что не позволяет при проведении экспериментов по биотрансформации использовать стандартные системы устойчивости к антибиотикам.

Несмотря на все эти успехи удавалось использовать и *Z. mitorabida* в некоторых других важных целях. Благодаря созданию специальных методов были выявлены наряду с другими новыми утилизаторами сил субстратов. Так, в *Z. mitorabida* были найдены гены ферментов, способных расщеплять лактозу, крахмал, целлюлозу, крахмал и пектинозу. Трансформационные клетки выщелачивают все эти гены, но в биотрансформационных случаях не удалось обнаружить перечисленные выше субстраты в качестве единственных источников углерода. При этом *Z. mitorabida* также способна ферментировать сахара с образованием спирта, при этом в крайнем случае удалось использовать это микроорганизмом для получения этанола из оксидов, содержащих азот.

И сейчас ведутся работы по созданию штаммов *Z. mitorabida*, способных расти и продуцировать

этанол с использованием кислоты в качестве субстрата, в эту проблему внесли свои вкладов/кислорододегидрогеназы и митохондриальные ферменты, необходимые для утилизации кислоты. Но полученные трансформанты не могли использовать субстраты при расщеплении кислоты пептоном (кислотост-3-фосфат, рыбозид-3-фосфат и рыбид-3-фосфат). По плану на следующем этапе в *Z. mitorabida* ввели плазмиду, несущую два сцепленных оператора, один из которых кодирует два фермента, расщепляющих кислоту, а другой – два фермента, стабилизирующих пептому (транскрипцию и трансляцию) (рис. 13.11). Транскрипция генов гетерооператора осуществлялась под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Z. mitorabida* в котором под контролем промотора гена сигнала *Z. mitorabida* Эти два сцепленных оператора встроили в чужеродный вектор *P. coli-Z. mitorabida*, которым и трансформировали *Z. mitorabida*. Как и ожидалось, трансформационные клетки утилизировали кислоту и преобразовывали пептому до фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата, которые затем превращались в этанол по пути Энгелера-Дудороффа. Кроме того, трансформанты эффективно росли на глюкозе, ксилитозе и их смеси и продуцировали кислоту и этанол в больших количествах последовательно. Эта работа продемонстрировала возможность генетической пер-

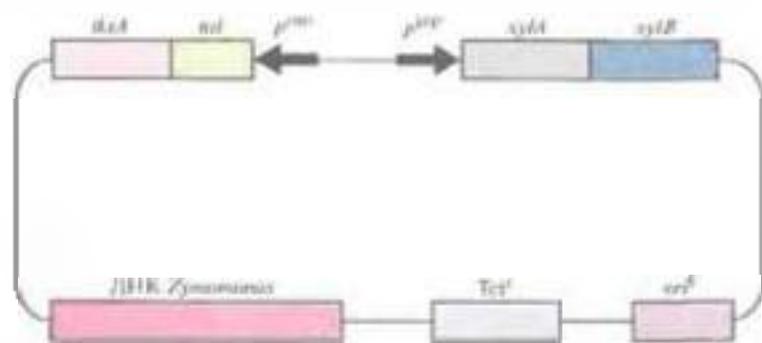


Рис. 13.11. Чужеродный вектор *Z. mitorabida* *P. coli*, несущий два оператора, один из которых содержит гены ферментов, необходимые для утилизации кислоты (*gdhA* и *gdhB*), и другой – гены ферментов, участвующих в синтезе этанола из кислоты (*xylA* и *xylB*). Сильнейшим образом индуцируемые транскрипция с сигнала промотора промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы  $P^{GAP}$  – промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Z. mitorabida*, *xylA* – ген кислоты окислительная, *xylB* – ген кислотозольная, *gdhA* – ген транскриптаза, *gdhB* – ген трансляция и ферментация,  $Tet^r$  – гены антибиотического резистентности  $E. coli$  ДНК *Z. mitorabida* содержит собственную  $ori^E$  (ген) индикаторной резистентности

ной модификации *Z. mobilis* для создания микробиоэнтена производителя этанола, который использовал бы в качестве источника углерода клеточу, побочный продукт деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности.

### Получение сырья

Такие сельскохозяйственные культуры, как сорго, кукуруза и пшеница, широко используются в качестве сырья 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 сырья служит субстратом при синтезе молочной и уксусной кислот. Эти кислоты подавляют ряд других микроорганизмов, следовательно, создавая благоприятные условия для развития молочной кислоты. Если молочнокислые бактерии присутствуют на сырье растительного материала в достаточном количестве, вредные микроорганизмы не могут развиваться (обычно *Lactobacillus plantarum*). К сожалению, эти виды оказываются модифицированной или отсутствующими в результате действия недостаточных для ингибирования роста бактерий и производства молочной кислоты количествах кислотных углеродов.

Для создания бактерий, способной осуществлять «эффективную» ферментацию растительного материала, введены ген  $\alpha$  («защитный ген силовости») штамма *L. plantarum* в хромосомный ген компетентной пилеозина азидный канал (AA) штамма из штамма *L. plantarum* (рис. 13.12). Этот ген кодирует фермент, который активируется при попадании бактерий в кислую среду животного и, следовательно, не нужен при образовании сыра. Другим важным преимуществом этой перемычки на пути синтеза азидного *L. plantarum*, способствующим более «эффективному» образованию сыра из сельскохозяйственных культур, содержащих много крахмала, таких как ячмень.

### Увеличение влажности

Структурный барьер почти всех наземных растений состоит из полисахаридов: лигнина, целлюлозы и пектина. Объединившись в жесткие

Таблица 13.8 Состав сырья животного происхождения (материалы)<sup>1)</sup>

Сырье	Состав (%)		
	Влага	Клетчатка	Сырая клетчатка
Составное сырье	77,8	44,0	26,8
Верхняя древесина	19,3	49,8	49,0
Ботва со составного сырья	18,9	31,4	49,0
Растительное сырье	17,3	42,1	29,0
Дрожжи	Не определено	80-95	3-20

<sup>1)</sup> Data of J. Lee and P. B. B. 122, 1981

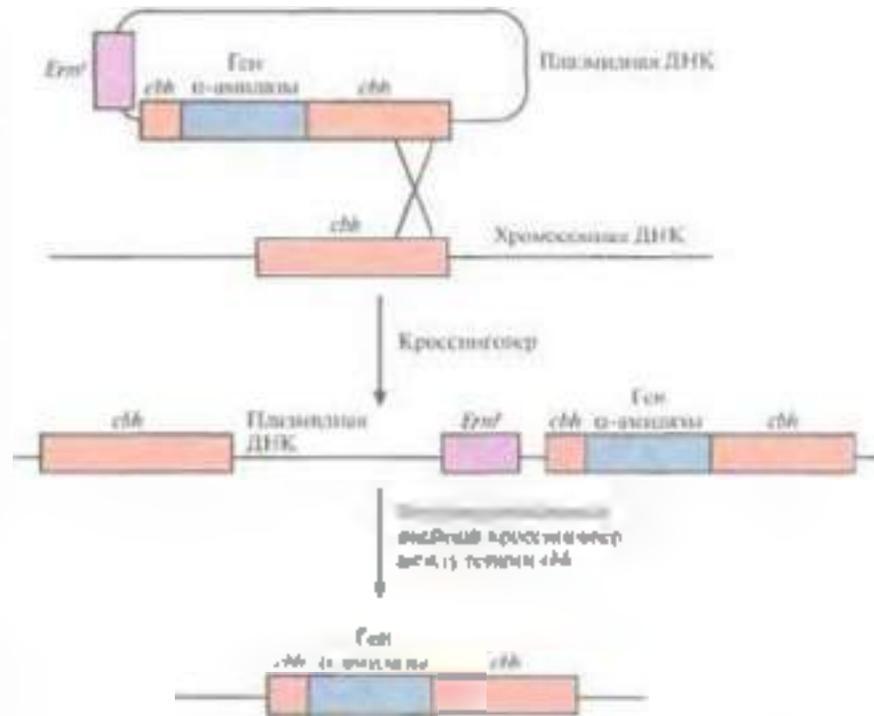
структуры, они образуют лигноцеллюлозные материалы (табл. 13.8), на долю которых приходится основная часть биомассы, остающейся в огромном количестве в виде отходов сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и других отраслей сельскохозяйственной деятельности человека. Эти отходы необходимо переработать или использовать в качестве промышленного сырья. С этой целью растения животного происхождения используются для производства сырья.

- Семя растения, специально выращенное для получения сырья, например, маис, кукуруза или корм для скота (ячмень, древесина, соя).
- Растительные отходы, оставшиеся после уборки и переработки урожая и после обработки древесины (солома, рисовая шелуха, ботва сахарного тростника, древесная щепа, опилки и т. д.).
- Бытовые отходы (использованные бумажные коробки и т. д.).

### Компоненты лигноцеллюлозы

Лигнин – гидрофильный нерегулярный неветвистый 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 быть интегрированы в хромосому хозяина. В результате кроссинговера между *cbh*-локусами плазмидной и хромосомной ДНК образуются клоны *E. coli*, устойчивые к эритромицину и обладающие *cbh*-генотипом. При выращивании трансформированных клеток в течение нескольких дней (не менее 30 поколений) и последующим удалением клеток (пробирки) внутриклеточная ДНК образует кроссинговер, приводящий к образованию цепи устойчивости к эритромицину (*Erm*) и *cbh*-гена в хромосомной ДНК.



такой линии образует комплекс с гемидезинанзой, в которой заключены проводящие пучки. Линия обуславливает ризомность растений, а также их устойчивость к механическим повреждениям и воздействию микробов.

Гемидезинанозы – это короткоцепочечные гетерополимерные полимеры, состоящие из сахарозы (шестьюглеродные сахара, такие как инукоза, мальтоза и галактоза) и пентозных (пятиуглеродные сахара, такие как ксилоза и арабиноза) единиц. Все гемидезинанозы можно разделить на три основных типа: кислоты, основ которых состоит из молекулы поли-β-1,4-кислоты с присоединением к ней арабинозы, глюкуроновой и арабиногалактуроновой кислотами, маннаны, состоящие из галактозанов и галактоманнанола; арабиногалактаны. Тип гемидезинанозы обычно зависит от ее происхождения; так, кислоты обычно содержатся в тысячах сортов древесины, а галактиканы – в мякоти.

Кислоты, наиболее простой компонент «полицеллюлозы», является самым распространенным природным полимером. Его длинные

цепи состоят из остатков D-глюкозы соединенных β-1,4-связями (рис. 13.14). При нагревании из целлюлозы, как и из крахмала, образуется глюкоза. Но если эти исходные вещества имеют разное строение. Крахмал – линейная цепочка молекул, остатки (глюкозы) в которой соединены так, что линейные цепи не могут располагаться упорядоченно и образуют четкую структуру, если притягиваются воду; поэтому он растворяется в воде и легко гидролизуется амлазином и глюкаммиллазином. 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 гемицеллюлозой. Для этого можно обработать лигноцеллюлозный материал сильной кислотой или сильной щелочью либо подвергнуть его действию высокой температуры и давления. В ха-

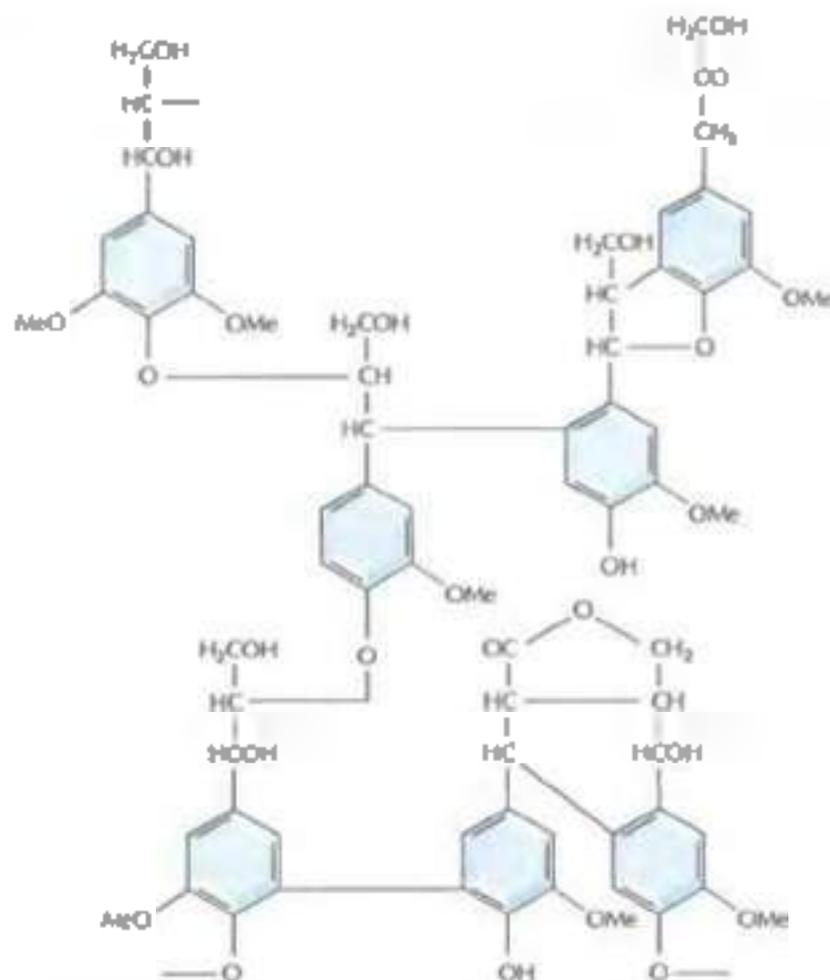


Рис. 13.13. Структура янтария (представлены лишь некоторые из возможных связей окисления остатков фенилпропана (вместительного ароматического соединения, содержащего винильную группу))

бны случаи необходимые для этого исключительские затраты существенно превысят стоимость конечного продукта.

Головоц производства 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 прокарботических целлюлозных генот*

Многие бактерии и грибы способны расщеплять целлюлозу благодаря совместному воздействию нескольких ферментов, называемых целлюлазами

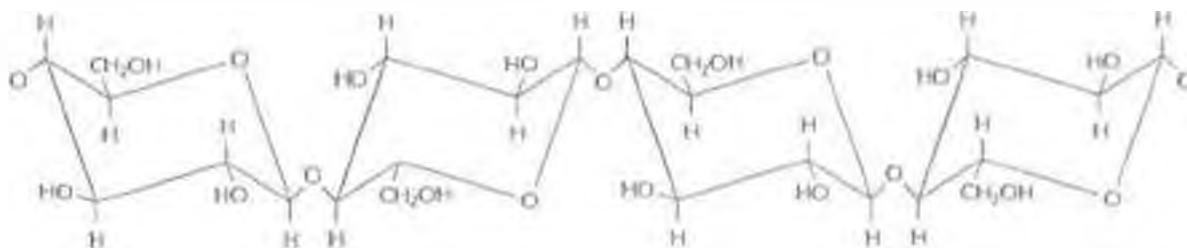


Рис. 13.14. Сцепки мономерной цепи целлюлозы. Остатки глюкозы соединены  $\beta$ -1,4-связями «головы к хвосту».

У некоторых микроорганизмов они входят в состав целлюлозы - белкового комплекса, находящегося на клеточной поверхности. Эти ферменты следующие:

- целлюлозаза, которая гидролизует  $\beta$ -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, ксилобиозы (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-

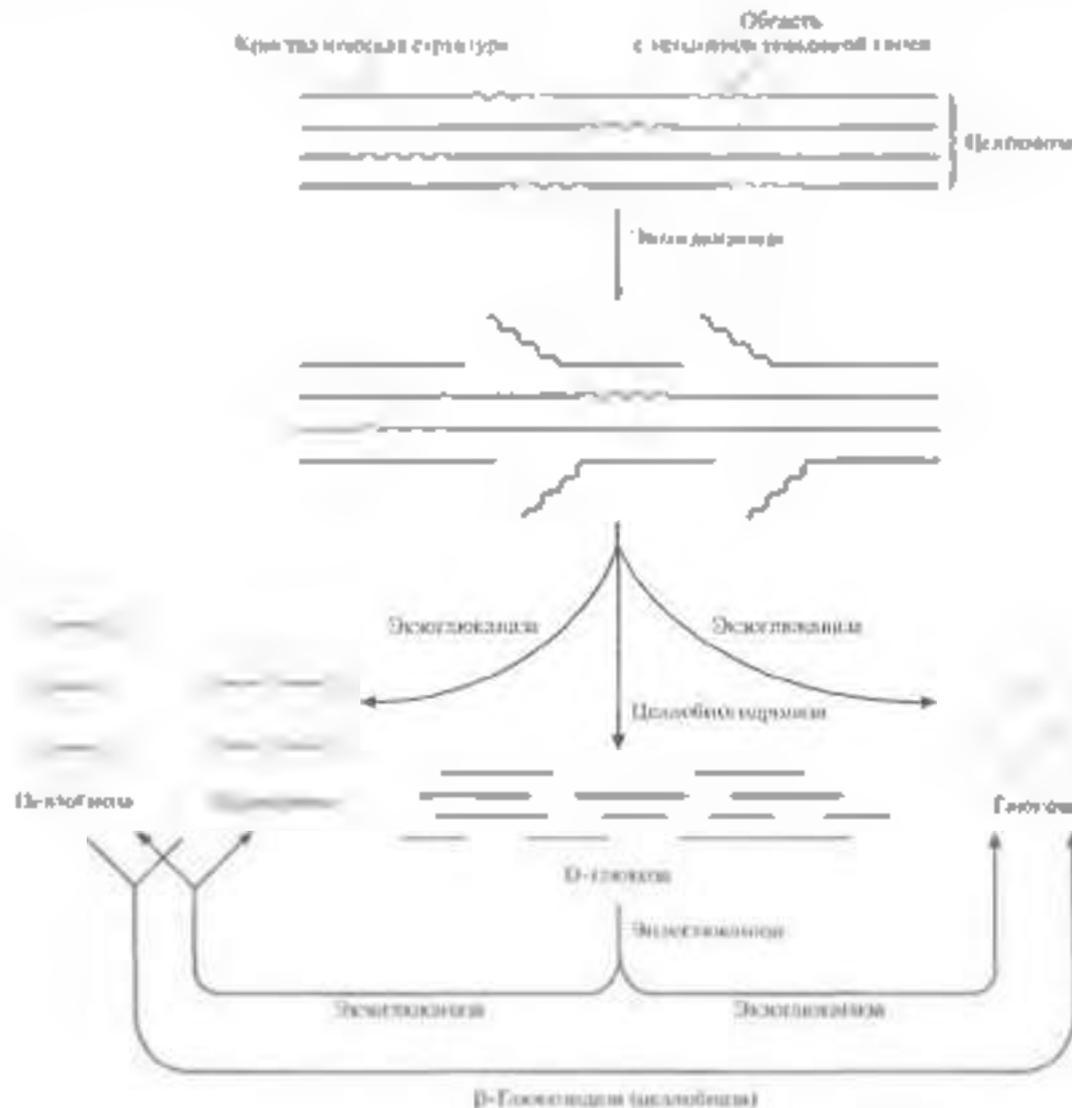


Рис. 13.15. Биохимические механизмы гидролиза целлюлозы начинается с расщепления целлюлозы  $\beta$ -1,4-связей в неплотно упакованных областях. Затем целлюлозазаза(ы) и целлобиозидолиз(ы) гидролизуют отщепленные концы с разрушением концы частично гидролизованных цепей. Далее  $\beta$ -глюкозидаза катализирует превращение целлобиозы и целлюлозы в глюкозу.

среду, содержащую колонии на поверхности

- В зависимости от цели работы, которая выполняется, могут использоваться различные методы (рис. 11.15).

Распространение микроорганизмов 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 процесса, но эффективного подхода.

1. Клонирование в *E. coli* с использованием ДНК-зонной целлюлозного прокаротиотического организма и выделения рекомбинантных клеток в течение 12 ч на твердой среде, содержащей селективный антибиотик.
2. Образовавшиеся колонии покрывали слоем агара, содержащего карбоксицеллюлозу (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 происходит гидролиз 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 целлюлозу, были окрашены желтым цветом, а фон, содержащий нерасщепленную КМК, имел красный цвет.

С помощью этого подхода были выделены гены эндотоксины из *Streptomyces*, *Clostridium*, *Thermotomambacter*, *Thermotomambacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Cellobiobacter*, *Camptospora*, *Cellobiobacter*, *Fibrobacter* и *Bacillus*.

Для вычисления рекомбинантных клонов, синтезирующих целлюлозу, использовались следующие стратегии, позволяющей идентифицировать белок-мишень с помощью специфичных к нему антител; секретные белки при этом необязательны. Рекомбинантные клетки анализируют *in situ* (период хлороформа), перенести целлюлозные белки на нитроцеллюлозу или нитроцеллюлозный фильтр и провести иммуно-логический тест. Источниками при этом служат различные штаммы микроорганизмов.

Прокариотические β-глюкозидазные гены выделены 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

Сравнение кДНК- или геномных библиотек с помощью гибридализации с гетерологичным жондом не очень эффективны при идентификации целлюлозных генов, поскольку их трудно выделить в достаточности для анализа. 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-мишени. Для выделения некоторых генов эукариотических целлюлоз использовались метод «интерференционной гибридализации», суть которого состоит в следующем (рис. 11.16).



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 ретикулоцитарной 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-

- терших эту полосу 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 фagem векторе, вводят в *E. coli*, выселяют на чашки. 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  $\beta$ -ГЛЮКОЗАзы действительно кодируются клетками, их ДНК ингибируют с помощью мРНК из эукариотных 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 мРНК, в каких — разные белки целлюлазы и что кодируется.

Эту схему можно использовать для выделения любых нуклеиновых эукариотических генов.

#### Манипуляции с целлюлазными генами

Клонированные целлюлазные гены можно использовать в разных целях: для обеспечения чистоты рекомбинантных белков с помощью специально подобранных доноров; для получения коммерческих продуктов (например, этанола) из целлюлозных отходов с помощью микроорганизмов, в которые встроены целлюлазные 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 ломена 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 нимулографической хроматографией, но обходится дешевле.

Большинство целлюлазных генов можно клонировать и экспрессировать в *E. coli*, но их можно ввести в другие микроорганизмы и полу-

чить новые штаммы с полезными свойствами. Так, *S. cerevisiae* и *Z. mobilis*, эффективно производящие в этаноле простые сахара (например, глюкозу) после окисления им целлюлозы (сено, солома) бы превращать ее в этанол практически в 100%. Для проверки этой гипотезы провели ряд исследований.

В одной из серий экспериментов гены целлюлазы клонировали бактерию *Cellulomonas fiji*, каждый из которых находился под контролем промотора в специальной последовательности *S. cerevisiae*, субклинировали в специально сконструированную *S. cerevisiae*. Несколько трансформанты секретируют оба фермента и культуральную среду с эффективностью примерно 70% и частично расщепили их целлюлозу, находящую в составе ферментальной буфы и предварительно обработанную древесную стружку. Скорость и степень гидролиза этих субстратов увеличивалась при добавлении в смесь  $\beta$ -глюкозидазы, расщепляющей целлюлозу до глюкозы, но полного гидролиза целлюлозы не происходило. Это связано с существенным дефицитом регуляторных механизмов, отсутствующих по принципу строения. Каким образом целлюлозу ингибирует гидролит целлюлозы, в главоли ингибирует расщепление целлюлозы. Гены  $\beta$ -глюкозидазы выделены из грибов *Trichoderma reesei*, клонировали в четырехклеточной плазмиде и ввели в *E. coli*. Трансформированный штамм продуцировал  $\beta$ -глюкозидазу в 5,5-кратном избытке и расщеплял протравленное целлюлозы этанол (Avicel) на 13% быстрее, чем нетрансформированный тот же. Это подтверждает данные о том, что  $\beta$ -глюкозидазы облегчает ферментативное расщепление целлюлозы, и позволяет предполагать, что для создания более эффективных целлюлолитических микроорганизмов нужно встроить в уже существующие штаммы гены  $\beta$ -глюкозидазы.

Этиоликованные 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 усилить ароматическое получение вина. Это связано с повышением содержания в нем как минимум 12 летучих соединений, в том числе

медицинского назначения. 1-бутанол из полилактида, изовялонионового спирта и изомасляной кислоты. С помощью такой генетической модификации можно стабилизировать процесс ферментации и создать такие штаммы дрожжей, которые будут производить вина с определенной силой вкуса.

Несмотря на то, что существует возможность использовать целлюлозу в качестве субстрата для биопроизводства биотехнологическими методами в этаноле. Для этого отходы частично расщепляя целлюлозой при  $+5^{\circ}\text{C}$ , в итоге, не удаляя кислотный, проводят ферментацию высвобождаясь глюкозы с помощью 5 единиц на единицу при  $37^{\circ}\text{C}$ . Основываясь на полученных результатах, рассчитали, что из 1 тонны сырья можно получить 400 л этанола из 1 т биомассы отходов. Если использовать 1 тонну отходов, газификация образующаяся в Соединенных Штатах, превратить в этанол и использовать его в качестве топлива, можно сэкономить примерно 16% бензина.

### Белок одноклеточных организмов

Белок одноклеточных организмов (БОО) – термин, принятый для обозначения белковых продуктов, синтезируемых многокультурой микробных клеток и использующихся в качестве пищевой добавки или корма для скота. Вопрос об использовании микробной биомассы в качестве источника белка рассматривается вполне серьезно. Это связано не только с дефицитом пшеницы и кукурузы в общем мировом масштабе, но и с тем, что содержание белка в большинстве микроорганизмов весьма велико – на его долю приходится примерно 60–80% сухой массы клетки. Кроме того, благодаря высокому содержанию метионина, лизина, витаминов и важных микроэлементов БОО обладает более высокой пищевой ценностью, чем некоторые виды пищи растительного и животного происхождения. Но широкое применение БОО сдерживается по ряду причин:

- Высокое содержание нуклеиновых кислот, что может представлять опасность при некоторых патологических состояниях.
- Возможное присутствие в продуктах токсичных веществ, азиробактериальных и субстрата

(например, тяжелые металлы) или паразитических семян микроорганизмом (выпрямитель, микотоксины), и связанная с этим необходимость проведения дорогостоящих контрольных анализов.

- Низкая скорость разрушения микробных клеток и инвентаризация в тракте, что может вызвать расстройство пищеварения или аллергические реакции.
- Высокая влажность БОО по сравнению с другими белковыми продуктами, например с бобовыми семями.

Для получения БОО использовались многие микроорганизмы (бактерии, дрожжи, грибы, ваврисия, актиномицеты) и различные субстраты (табл. 13.9). Первым крупномасштабное производство БОО было налажено в Германии во время Второй мировой войны, из-за нехватки в качестве источника углеводов и сырья аминокислот в качестве источника азота вырешивали 5 единиц и добавляли их в супы и колбасные изделия для повышения содержания белка.

До 1973 г. нефть была по-прежнему основным источником, в ее составе считались практически неисчерпаемыми. В связи с этим сразу несколько крупных нефтяных компаний разработали проекты по производству БОО из нефти и переработки ее переработки. Но цены на нефть росли, и интерес к этим проектам пропал. В 1970 г. в компании Imperial Chemical Industries (ICI) разработана непрерывный процесс ферментации метанола с помощью бактерии *Methylophilus methylotrophicus* для коммерческого производства белка прутинна. Эта бактерия использует метан (точнее, метанол) в качестве ос-

Таблица 13.9 Субстраты и микроорганизмы, используемые при производстве БОО

Субстрат	Микроорганизм	Производитель
Пшеница (зерно)	<i>Aspergillus niger</i>	Imperial Chemical Industries
1. Меласса (сахар)	<i>Aspergillus niger</i>	Другие
2. Меласса (сахар)	<i>Aspergillus niger</i>	Другие
Льняное семя (ли)	<i>Aspergillus niger</i>	Другие
Целлюлоза (ли)	<i>Aspergillus niger</i>	Другие
Меласса (сахар)	<i>Methylophilus methylotrophicus</i>	ICI

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 полимеров, 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 в основном получают 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 конформацию. Затем с помощью 14 час. тично перерабатывались аминокислотами синтезировать его ген и синтез его с геном бел-

ка, связывающего мазиты; полученный гибридный ген интронировали в *E. coli* под транскрипционным контролем *lac*-промотора. Но доля гибридного белка оказалась примерно 12% суммарного интронированного 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 эфирных и галогенозамещенных 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 расщеплению нескольких соединений. Кроме того, с помощью генетических манипуляций можно расширить спектр субстратов, разрушаемых с помощью определенных ферментативных путей.

Поскольку сейчас принимается вся сложность веществ и материалов, побочных продуктов индустрии и перерабатываемой промышленности, которая может служить сырьем для получения ценных продуктов. Производятся лимонная или фруктовая и молочная кислоты, пропанол и несколько ферментативных стадий. Улучшающиеся эти процессы ферменты часто используются односторонне. Чтобы повысить эффективность ферментативных реакций и снизить стоимость процессов, исследователи занимаются конструированием и исследованием свойств биотехнологических ферментов. Исследования направлены на получение высокоактивных и устойчивых к действию средств ферменты.

Для повышения эффективности промышленности необходимо в бактериях

*Zyomonas mobilis* были выделены гены, кодирующие экспрессию которых они могут использовать в качестве естественных углеродных источников энергии. Предприняты попытки найти тот путь создания штаммов *Lactobacillus plantarum*, способный эффективно расщеплять крахмал, содержащийся в большом количестве в твердой фазной среде-компонентной культуре, как лимонка.

При переработке растительного материала часто образуются большие количества дигидроксиацетона, которые раньше не находили применения. Сейчас гидроксиацетон служит сырьем для получения этаноладодекариокси-соединений, а первую очередь глюкозы, которая может использоваться в других процессах. Липиды используются в качестве источников энергии, глицерин, лимонная кислота и целлюлоза, как подкормочный субстрат для ферментации при переработке сырья. Продолжаются последние работы исследования биомассы, направленные в основном на изучение возможности расщепления целлюлозы с образованием глюкозы. Клонирование и характеристиками (с помощью докорма, жидкой культуры) и β-галактозидазы микробных штаммов, которые не осуществляют выбор ферментов, осуществляют жидкую культуру эффективное расщепление целлюлозы in vitro.

Некоторые виды биомассы (например, сыроежки, целлюлозные отходы) и продукты переработки нефти могут служить субстратом при выращивании микробиальных. Предполагается, что эти чистые культуры, а также их продукты (так называемый белок одноклеточных животных, БОК) можно будет использовать в качестве подкормки рыболов или корм для скота. К сожалению, вследствие дорочивым получением продукта, их несколько плохих качества, а именно и токсичности промышленно БОК оказались экономически невыгодными. Однако есть надежда, что с помощью генетически манипуляции асс-таким образом создать систему, позволяющую получать дешере 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 *Saccharomyces cerevisiae*. *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 amylovarum* amyglase 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 M. 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  $\alpha$ -amylase production by integrating and amplifying the  $\alpha$ -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. 1988. Enzymic starch utilization and genetic engineering. *Trends Biotechnol* 6: 184-189.
- Kowles J., P. Leppasam, T. Teeri. 1987. Cellulase families and their genes. *Trends Biotechnol* 5: 255-261.
- Kumar R. J., W. E. Jants, B. K. Ghosh, C. W. Robinson, C. I. Mayfield. 1988. 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*  $\beta$ -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 cellulytic bacteria. *J. Bacteriol.* 149: 3392-3400.
- Lund T. R., J. H. Cashman, R. J. Nichols, C. E. Wyman. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 253: 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  $\beta$ -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl Environ Microbiol* 59: 2801-2806.
- Qua W. J., S. F. Mraheil, 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. Wapnerfelen, A. Rowe, A. N. Limon. 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkyl-benzonates. *Science* 235: 593-596.
- Sayano A., R. Izuhara, 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 trichloroethylene. *J. Bacteriol* 178: 4039-4046.
- Thomls K. N., R. J. Steffan, R. L. Interdon. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol* 48: 525-557.
- Verdues J. C., A. D. van Halbelegen, P. J. Punt, A. J. M. Debets, A. H. Stubbauer, 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* 166: 165-175.
- Watanabe M., S. I. Lee, 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. Yoo, H. D. Foster. 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 7: 282-285.
- Witholt B., M.-J. de Saed, J. Kiengas, J. R. van Rielm, M. Koh, H. G. Lagereen, 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 hydriolase by *Caldwellmannia* and endoglucanase and exoglucanase coexpressed as secreted enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* 8: 713-719.
- Zhang M., C. Fddy, K. Ikeda, M. Flohertina, S. Prestaggle. 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 клонирования целлюлозы-зависимых грибов.
3. Как используются  $\alpha$ -ликазы и глюкозидазы в биотехнологическом производстве глюкозы? Какие манипуляции с кодирующими эти ферменты генами следует провести, чтобы повысить эффективность процесса?
4. Что представляет собой фермент глюкозиластераза? В чем состоит ее ценность? Как и чем можно модифицировать кодирующий ее ген?
5. (Нитроген-фиксация и нелетучая аммиака-использующая *Zydenomonas mobilis* вместо *Saccharomyces cerevisiae* при производстве этанола) Как повысить эффективность процесса ферментации с использованием *Z. mobilis*?
6. Как с помощью генетически-синтетических методов модифицировать *Z. mobilis*, чтобы можно было использовать этот микроорганизм для производства этанола из ксилиты?
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  $\alpha$ -кетону с использованием аминокислоты при 35 °C, применить стратегия создания штамма, который сможет использовать в качестве единственного источника углерода фенол, железо или  $\alpha$ -кетону при 0 °C?
8. Как модифицировать штамм *Pseudomonas*, несущий (линии) рН-УО и не способный расти на 4-гидроксибензоате, чтобы он мог утилизировать эти соединения?
9. Предложите стратегии выделения прокаротиноидов из микроорганизмов и  $\beta$ -глюкозидазных генов.
10. Что такое «супербактерия»?
11. Как повысить эффективность биотехнологического процесса, применяющего штамм *Leptobacterium rhotatum*?
12. Как следует модифицировать факториальную культуру, чтобы она обеспечивала крупный рост в среде с измененными температурными?



обложившим им биологически активное вещество соседящие или замкнуто 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 азотазинтрифосфата (АТФ). Для химического (промышленного) преобразования  $N_2$  в аммиак используют высокие температуры и давление.

Для удовлетворения потребностей индустриальной промышленности в сельскохозяйственной продукции 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 продолжительное использование приводит к загрязнению почвы и истощению запасов питательных веществ. В то же время химические удобрения связываются же более азотными. 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 консерватизм производителей сельскохозяйственной продукции и изменить используемые и истощаемые время года. Например, вторая половина сельскохозяйственной культуры в США все еще формирует симбиотические отношения с бактерией *Bradyrhizobium lotum*. В

результате такого симбиоза бактерии обеспечивают растению связанным азотом, в свою очередь от него легко усваиваемые формы азота, образующиеся при фиксации. После индустриальной революции неспецифичными штаммами *R. lotum* 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 сложная технология. Но лишь небольшая часть этой культуры в настоящее время обрабатывается *R. lotum*. Фермеры до сих пор полагаются на природные запасы *R. lotum* 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 перестройки технологии окружающей среды, повышение уровня технологии привели к тому, что ученые вновь 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 относится лишь к небольшому числу видов растений и не взаимодействует с растениями, не являющимися его природными хозяевами (табл. 14.1).

На определенной стадии взаимоотношения *Rhizobium* проникает в клетки корня растения и инициирует дальнейшее образование и формирование корневых клубеньков. Бактерии внутри корневых клубеньков быстро проли-

Таблица 14.1 Специфичность видов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* в отношении разных растений

Виды	Растения-хозяева
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Соя
<i>Bradyrhizobium lotum</i>	Личинья
<i>Bradyrhizobium elaeagnae</i>	Акация
<i>Rhizobium ciceris</i>	Соя
<i>Rhizobium lotum</i>	Соя и <i>Gliricidia sepium</i> , фасоль, акация
<i>Rhizobium loti</i>	Личинья
<i>Rhizobium phaseoli</i>	<i>Gliricidia sepium</i>
<i>Rhizobium ciceris</i>	Турецкий горох
<i>Rhizobium trifolii</i>	<i>Gliricidia sepium</i> , <i>Medicago sativa</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Gliricidia sepium</i> , <i>G. nana</i>
<i>Rhizobium loti</i>	Соя
<i>Rhizobium sp. strain</i> NGK 124	Терминалия (соевые)
<i>Rhizobium sp.</i>	Черная фасоль (соевые), фасоль, акация
<i>Rhizobium sp. strain</i>	Соя

ферментов и включается в форму, не позволяющую клеточной стенке *K. pneumoniae* бактерии свая вложить в нее субстрат, а эти с помощью фермента нитрогеназы. Структурные и биохимические аналогии между симбионтами *Rhizobium* и растениями-хозяевами весьма слабые, и в значительной мере внутри клубенька нитрификация происходит от окислительного действия нитрогеназы (аккорд) двумя способами. Но-первый, кислородный путь, который не происходит в клубеньке. Во-второй, содержащий кислород внутри клубенька регулируется белком леггемоглобином. Темный компонент этой гемоглобиновой пары, который синтезируется бактерией, а глобинная часть молекулы кодируется геном растения. Растение обеспечивает бактериям необходимыми для роста самими формами углерода, образующимися при фотосинтезе. В растении и в клубеньке нитраты и нитриты симбиотическим образом от бактерии связываются эти

### Нитрогеназа

Нитрогеназа нитрифицирует как в биологически удивительным образом после того, как были разработаны методы выделения и модификации генов, и это стало известно ученым Ричардс-

чеким и молекулярно-биологическим методами. Ученые надеются, что биохимики этим исследованием удастся создать более эффективные азотфиксирующие микробиологические препараты, способствующие повышению урожайности сельскохозяйственных культур, а некоторые исследователи даже предположили ввести бактериальные гены фиксации азота непосредственно в растения, чтобы такие растения могли сами фиксировать азот. Но эта идея через несколько лет не удалось осуществить, потому что фиксация азота была детально изучена, так что возможность генно-инженерного усвоения нитрогеназы исключены из-за роковой ошибки в ее реализации.

### Комплексы

Все известные нитрогеназы содержат два кофактора: железо-сернистых комплексов I и II. Комплекс I (по комплексу и азота и субединица (масса примерно 50 кДа) на каждую), а также субединица (примерно 60 кДа) на каждую), 24 молекулы железа, 16 молекул молибдена и железомолибденового кофактора, связывающего FeMoCo (рис. 14.1). Комплекс II состоит из двух субединиц (примерно 32 кДа на каждую) и не имеет четкого числа молекул железа, причем его субединицы не различимы так как в комплексе I. Для фиксации азота необходимы оба компонента, комплекс молибдена и АТР, а также источник восстановительных эквивалентов:

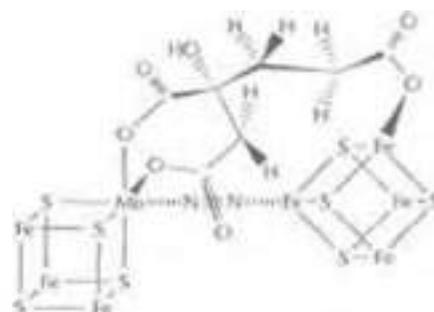


Рис. 14.1. Пространственная структура железомолибденового кофактора, связанного с молекулой азота (N<sub>2</sub>)

Помимо фиксации азота, нитраты также фиксирует также восстановление газообразного азота 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 члестчатых клещей 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

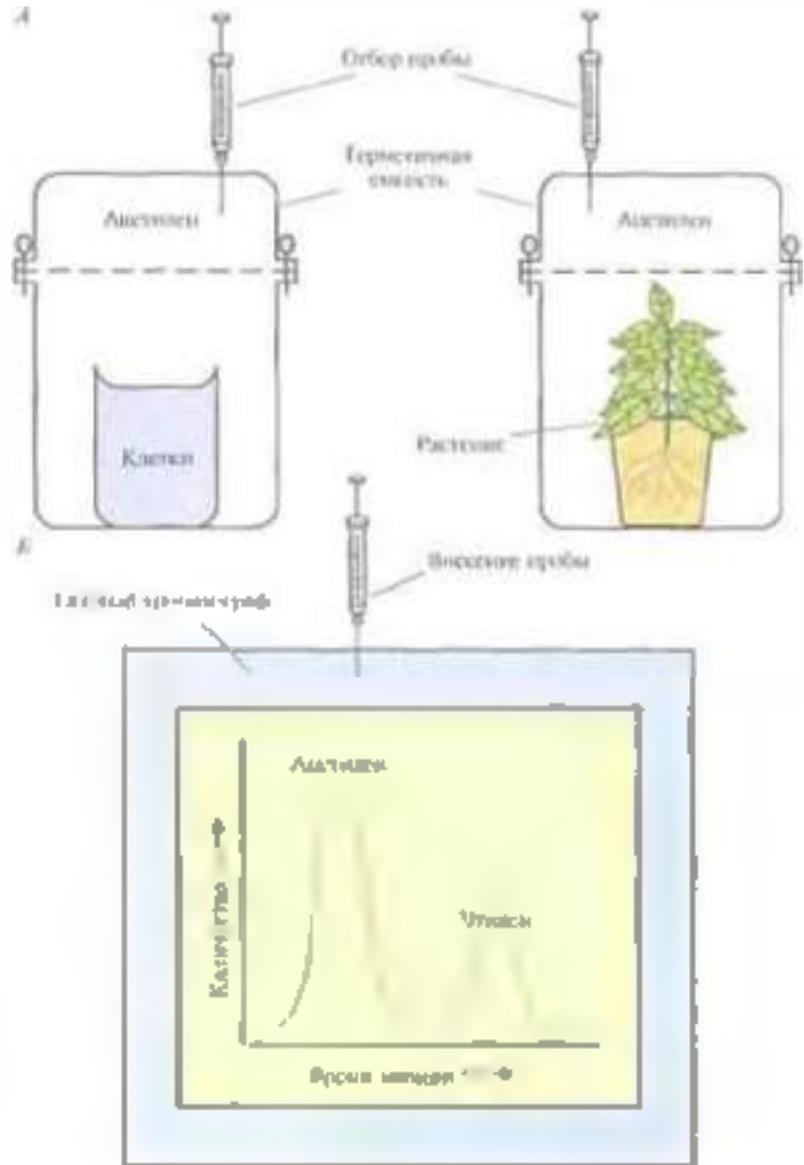


Рис. 14.2. Определение активности нитрогеназы по восстановлению азота до этилена. А. Бактерии (в культуре или ассоциированные с корнями растений), синтезирующие нитрогеназу, либо препарат очищенной ферменты (не привязанной нитрификатор) в герметичную емкость с атмосферой азота. Б. Пикетность в хроматограмме подтверждает наличие азота в атмосфере азота. В. Пикетность в хроматограмме подтверждает наличие азота в атмосфере азота. В. Пикетность в хроматограмме подтверждает наличие азота в атмосфере азота.

компоненту  $Nif$ , в так же и фиксацию азота микробного фактора.

### Фенол инженерия клонов генов 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 вычленишь из генома или геномного микроорганотзма и перенести в недиазотрофный организм. Следует еще учесть, что фиксация азота осуществляется в органике с помощью ферментов, которые должны быть локализованы для фиксации азота в активный 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 мутаций дикого типа рибозимы фиксировать азот. Такой метод называется (генетической) минимизацией.

Первые *nif*-гены, идентифицированные методом комплементации, были выделены из бактерии азотфиксирующей бактерии *Klebsiella fragilis*. Эти бактерии изучены антимикробными, которые обнаруживаются в почве и воде, а также в кишечнике человека. Смена нитрогеназы состоит 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 широким кругом действия, создают банк клонов микробной ДНК *A. rhizobium* дикого типа ( $Nif^+$ ) и модифицируют его в  $E. coli$ .
3. Пропускают кокультуру  $Nif^-$  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* вместе с плазмидой, кодирующей белок, который отсутствует или не функционирует в  $Nif^-$  мутанте.

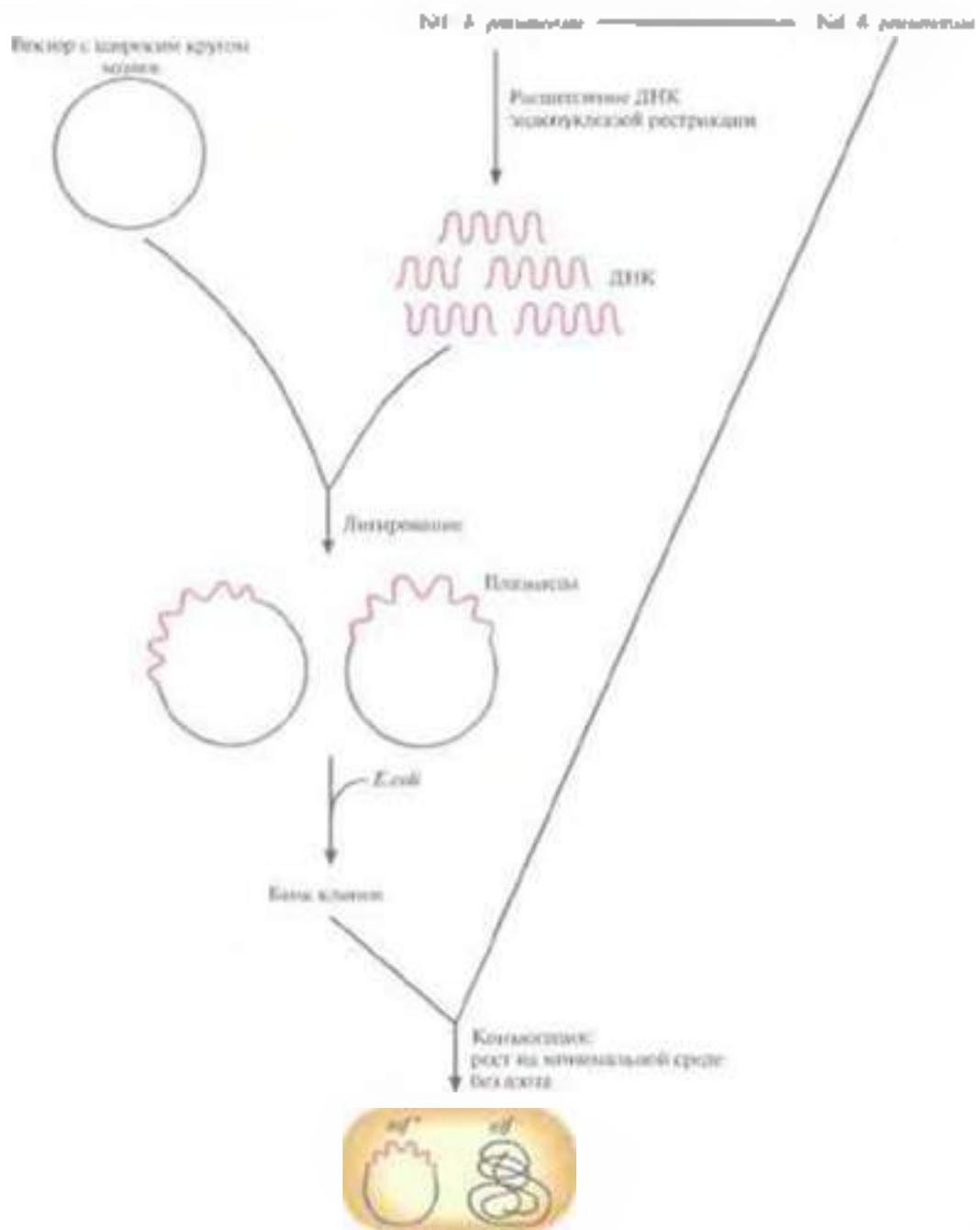
Фрагмент ДНК в плазмиде, комплементирующий исходную мутацию  $Nif^-$ , содержат *nif*-ген, который можно детально охарактеризовать и использовать для выделения других *nif*-генов.

Для выделения других генов, участвующих в фиксации азота, применили два подхода. Во-первых, использовали банк клонов *A. rhizobium* для комплементации не выделенной нитрогеназы  $Nif^-$  мутантом, увеличивая тем самым вероятность того, что в каком-то случае будет выделен другой *nif*-ген. Во-вторых, выделенные *nif*-гены использовали в качестве информации о скрининга банка клонов азотфиксирующей ДНК *A. rhizobium*, используя большие количества (от 7 до  $10^7$  и более), исходя из того, что у прокариот гены одного пути биосинтеза обычно образуют кластеры.

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> ген	Белок (функция)
<i>D</i>	α-Субъединица азотфиксационной нитрогеназы
<i>A</i>	β-Субъединица азотфиксационной нитрогеназы
<i>H</i>	Вспомогательная нитрогеназы
<i>F</i>	Флавопротеин
<i>J</i>	Фермент фиксации азота, кодируемый опероном
<i>G, K, L, E, I</i>	Синтез железина
<i>M</i>	Фермент для фиксации азота нитрогеназы
<i>4</i>	Азотазин
<i>3</i>	Фермент
<i>5</i>	Синтез азотфиксационной нитрогеназы
<i>N, C, T, P, X</i>	Другие, менее определенные функции



Трансформанты *Ni<sup>+</sup>* *glauca*

Рис. 14.3 Выделение *ni<sup>+</sup>* растений методом генетически инженерии. Для комбинирования *Ni<sup>+</sup>* аллеля *A. tumefaciens* используется банк клонов ДНК *Ni<sup>+</sup>* клеток. Трансформированные клетки избраны по их способности расти на минимальной среде, не содержащей синтетической аурин

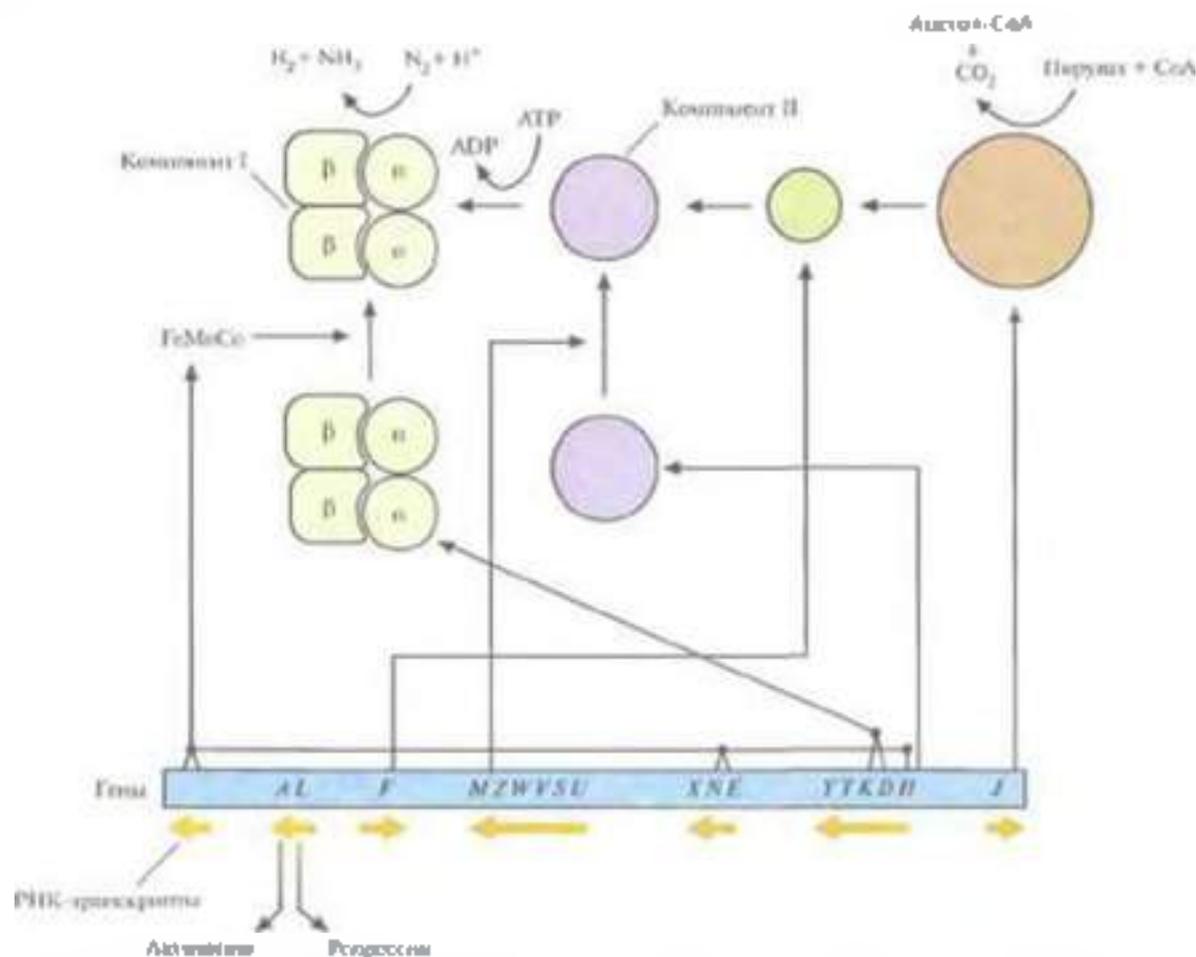


Рис. 14.4. Расположение *nif*-генов и кластеры и некоторые кодируемые ими функции. Гены обозначены стрелками вправо: в равной стрелке для каждой из групп генов была обнаружена специфическая *nif*-функция и указывалась ориентация его транскрипции. С красной стрелкой для обозначения генов, кодирующих, как минимум, участие в фиксации азота (примечание: приросты некоторых из этих генов, *J* (матрица), *O* (уровень-флавоксимин оксидоредуктаза).

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(-N<sub>10</sub>-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  $\sigma^{54}$ . 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* из других источников. При этом *nif-1* и *nif-2* не использовались в качестве гибридных клонных векторов для выделения соответствующих генов из баньков клонов других дивергентных митроорганизов. Большинство митотрофов имеет сходный набор генов, кодирующих этап рет фиксации азота, и масштабности генов ДНК этих генов у разных организмов мало различаются.

Принимая во внимание результаты митохондриально-генетических исследований, вероятно, можно повысить уровень фиксации азота дикоотрофными бактериями, модифицируя *nifA* и *nifH* гены. После выяснения с помощью методов геномной инженерии доминирующих копий *nifA* гена и путем *in vitro* модификации генов, кодируемые ими рекомбинантным путем, достигали больших размеров и длины былые вносимы, чем растения, обработанные митрансформированным штаммом. По-видимому, значительным образом можно поступить с *nifH* геном, так чтобы белок NifH (негативный регуляторный фактор) стал бы менее чувствительным к присутствию свободного азота. При таком нарушении регуляции митроорганизов поставили бы больше азота системе симбиотическому партнеру. Однако имеются данные указывающие на то, что не все аллелирующие организмы синтезируют белок NifH (у некоторых из них локализованы области NifH могут быть сбиты как из-за NifA), так что подобный подход не является универсальным. Кроме того, увеличение количества азота, которое может фиксировать митроорганизм, приводит к увеличению количества энергии (обычно в форме связанного углерода), необходимой для обеспечения метаболизма. Следовательно, рекомбинантный митроорганизм может оказаться неспособным стимулировать рост растений просто в клеточные замедления своего роста.

Именно ввиду этой сложности процесса фиксации азота митроорганизмами, можно сделать вывод, что простое введение в митохондриальную клетку рекомбинантного или дикого *nif-1* или митотрофа для того, чтобы она приобрела способность связывать азот. Более того, даже введение в геном растений полного кластера *nif*-генов длиной 24 kb не дает необходимого

эффекта, тем самым при той концентрации кислорода, которая характерна для растительной клетки, нитрогена не фиксируется. Если же концентрация кислорода понизить, то растительная клетка вернется к состоянию погибшей. Но в первую очередь проблемой создания растительных клеток, способных связывать азот, требуются 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 транскриптом растительной транскрипции *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 энергия (в форме АТФ) расходуется на образование водорода, который в конечном счете просто улетучивается. В результате тратится от 40 до 60% энергии электрона, прошедшего через нитрогеназный комплекс, выделяется же  $H_2$ , что существенно 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 планкой 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 митохондриальных условиях (при



Таблица 14.4. Данные «протекста» нитрогеназ гидрогенных фиксационных симбиотических систем с бактериями семейства *Bradyrhizobium* (N-fix+)<sup>a</sup>

Система	Штаммы N-fix+, %
<i>Bradyrhizobium lotum</i> штаммы из <i>Lotus corniculatus</i>	9,3
<i>Bradyrhizobium lotum</i> штаммы из <i>Lotus corniculatus</i>	21
<i>Bradyrhizobium lotum</i> штаммы из <i>Lotus corniculatus</i>	8
<i>Bradyrhizobium lotum</i> штаммы из <i>Lotus corniculatus</i>	8
<i>Bradyrhizobium lotum</i> штаммы из <i>Lotus corniculatus</i>	31
<i>Bradyrhizobium lotum</i> штаммы из <i>Lotus corniculatus</i>	91

<sup>a</sup> H. G. Roberts, F. H. Martin and A. J. B. Cook, *ibid.* 135-139, 1981

этих 30 лет было совершенно много усн. вид, и тем не менее строения и функции нитрогеназ ферментов до конца не установлены. Многие микроорганизмы синтезируют белок (или нитрогеназу, или этот белок или состоит больше чем из одной полипептидной цепи). Этот гидрогенный белок сам является атмосферный азот, в то время как другие при соответствующих условиях могут также синтезировать его. Но все это следует, что если бы для преобразования азота в нитраты N-fix+ в N-fix+ будет достаточно простого включения в его геном гена одной из нитрогеназ ферментов (или) должен кодировать все субединицы фермента, который должен быть совместим с электрохимическими системами организма-хозяина.

Попытке распространения стратегия выделения генов гидрогенных симбиотических комплексов. Первым из таких генов, ген мембраносвязанной гидрогеназы *F. coli*, был идентифицирован методом комплементации с мутантом *E. coli*, неспособным синтезировать активную гидрогеназу, с использованием банки клонов ДНК *E. coli* этого типа, связанного с помощью плазмиды pBK22. Мутант, содержащий дефектную мембраносвязанную гидрогеназу, не рос на минимальной среде в присутствии (фермента, при этом активность нитрогеназы и нитрогеназы оставалась неизменной. Трансформированные клетки, способные расти на такой среде, превратились на присутствие в них активной нитрогеназы. Трансформант, у которого активность нитрогеназы восстанавливалась до того же уровня, как у штамма этого типа, содействовал развитию, колонизацию бобовых, миссои (примерно 60-80%) да, что соответствует миссои

миссои одной из субединиц мембраносвязанной гидрогеназы *E. coli*. Данные этого исследования показали, что в нитрогеназной системе *E. coli* входит множество генов.

Затем были идентифицированы гидрогенные гены (*Nif*) в *Bradyrhizobium*, для этого использовались банк клонов ДНК этого типа, связанный с помощью плазмиды вектора p1-ATK1 с широким кругом хозяев, и мутанты *Nif* в *Bradyrhizobium*. Присутствие гидрогеназы, связывающей атмосферный азот, в трансформированных мутантных клетках *Nif* определяли по способности включения фермента посылать метильный сигнал в атмосфере азота. Более детальное исследование показало, что *Nif*-гены *Bradyrhizobium* образуют по крайней мере два, а возможно, и три оперона, охватывающих примерно 15 к.п.м., причем *Nif*-гены *Bradyrhizobium* являются аналогами генов *Bradyrhizobium* как в отношении гомологии, так и в отношении организации генов. Таким образом, идентифицированные *Nif*-гены *Bradyrhizobium* можно использовать в качестве гидродинамичной системы для поиска гомологичных генов у других штаммов *Bradyrhizobium*.

После идентификации *Nif*-гена *Bradyrhizobium*, несмотря на всю сложность нитрогеназной системы, удалось «переместить» ее в *Nif*-штамм *R. lotum* в штамм *Nif* (табл. 14.5). Растения бобов на которых образуются клубеньки бактериями рекомбинантного *Nif*-штамма *R. lotum* росли быстрее и содержали больше азота, чем растения, инокулированные *Nif*-штаммом (табл. 14.5).

Работы по исследованию генов гидрогенных нитрогеназ имеют большой интерес, как исследования *nif*-генов, и тем не менее они являются примером использования неэффективности применения методов генной инженерии для повышения способности азототрофных микроорганизмов стимулировать рост растений. Теперь нужно проверить, приведет ли введение *Nif*-гена в геномы других азототрофных микроорганизмов (как несимбиотических, так и симбиотических) к такому же эффекту.

Нитрогеназная система может применяться не только для повышения эффективности фиксации азота. Так, очищенную гидрогеназу можно использовать для преобразования и цикла





- ферилиты, которые несут и экспрессируют ген, кодирующий феруловый дефект образования клубеньков в клетках *R. meliloti*
4. Ни клубеньков выделены бактерии, вызывающие образование клубеньков, а ни бактерии вообще, экспрессирующие кодирующий ген (олигомеры и этот ген больше) оставку перек (попытки и процесс является неэффективны).
  5. Плейотропными ген образуют клубеньков использовать в качестве хозяина для симбиоза (микориза) ген участком промоторной ДНК *R. meliloti* в отношении биомассы.

В результате этих весьма трудоемких экспериментов удалось идентифицировать весь набор генов образующих клубеньков *R. meliloti*. Дальнейшие биохимические и генетические исследования показали, что образование клубеньков не регулируется это сложные процессы, в которых взаимодействуют продукты большого количества генов (примерно 20; табл. 14.6) (Яни

и эти гены высококонсервативны (сильно консервативны у всех микросимбиотизма, образующих клубеньки), другие видоспецифичны (И можно структурировать в три основных класса: консервативные, видоспецифичные и регуляторный ген *nodD*. Так, *nodABC* (гены плазмиды) есть только *Rhizobium* и структурно взаимосвязаны; в большинстве видов они образуют палиндром).

Установлено, что процесс образования клубеньков включает несколько этапов. Сначала привязка к растению экспрессируется ген *nodD* становится с мутуальной флоры для секретирования клетками корней растения хитина. Фазононы - это растительные ферменты сыворотки, структурную основу которых составляют липоарилтрансферазы, созданные в друг с другом зрелыми микробами (не микробами и растениями) или функциями, в частности спороцит и их функциями и участвуют в синтезе азота и железа. Связанные фазононы с белком *NodD*

Таблица 14.6. Некоторые белки, кодируемые геном образующих клубеньков *Rhizobium*, и их молекулярные функции

Белок	Функциональная роль
<i>NodA</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в образовании нодуля, <i>NodA</i> и <i>NodD</i> кодируются в <i>nod</i> геноме
<i>NodB</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в образовании нодуля, <i>NodB</i> кодируется в <i>nod</i> геноме
<i>NodC</i>	Взаимодействует с белком <i>NodD</i> и участвует в образовании нодуля, <i>NodC</i> кодируется в <i>nod</i> геноме
<i>NodD</i>	Кодированный, <i>nodD</i> геном кодирует <i>nodD</i> белок
<i>NodE</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodE</i> кодирует белок
<i>NodF</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodF</i> кодирует белок
<i>NodG</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodG</i> кодирует белок
<i>NodH</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodH</i> кодирует белок
<i>NodI</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodI</i> кодирует белок
<i>NodJ</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodJ</i> кодирует белок
<i>NodK</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodK</i> кодирует белок
<i>NodL</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodL</i> кодирует белок
<i>NodM</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodM</i> кодирует белок
<i>NodN</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodN</i> кодирует белок
<i>NodP</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodP</i> кодирует белок
<i>NodQ</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodQ</i> кодирует белок
<i>NodR</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodR</i> кодирует белок
<i>NodS</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodS</i> кодирует белок
<i>NodT</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodT</i> кодирует белок
<i>NodU</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodU</i> кодирует белок
<i>NodV</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodV</i> кодирует белок
<i>NodW</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodW</i> кодирует белок
<i>NodX</i>	Кодированный в <i>nod</i> геноме, <i>NodX</i> кодирует белок

14.6. *Rhizobium meliloti* геном кодирует белки, участвующие в образовании клубеньков. Эти белки кодируются геном *nod* и являются высококонсервативными. Некоторые из них являются видоспецифичными, другие - нет. *NodD* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodABC* кодируются плазмидой и являются видоспецифичными белками. *NodE* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodF* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodG* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodH* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodI* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodJ* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodK* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodL* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodM* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodN* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodP* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodQ* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodR* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodS* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodT* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodU* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodV* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodW* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком. *NodX* кодируется геном *nod* и является высококонсервативным белком.



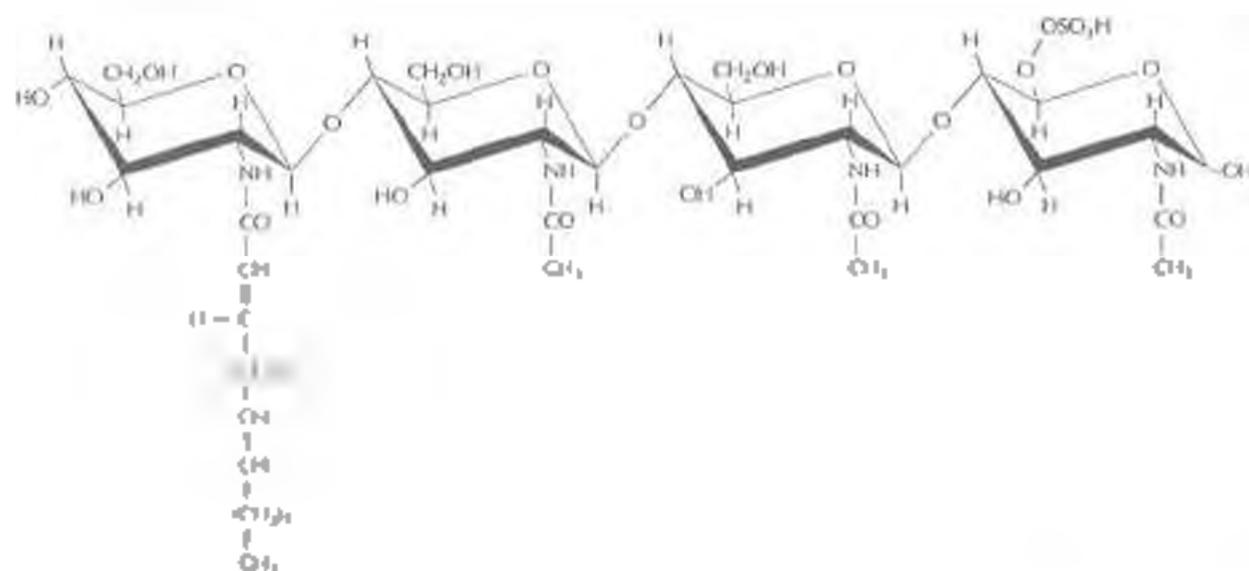


Рис. 14.7. Представлены структура олигосахарина-фактора NodRm-1. Это соединение обуславливает специфический ответ растений-хозяина, в том числе сформировать корни.

люсков, что считается первым шагом инфицирования корня растения бобовыми. Вместе растения и бактерии синтезируют некий овисахаридный фактор, который модифицируется белковым продуктом NodH, в частности, в пептиды NodQ и NodP. Этот фактор, обозначаемый NodRm-1 (рис. 14.7), обуславливает специфический ответ растения-хозяина, в том числе сформировать и сформировать корни.

В частности от штамма *Rhizobium loti* *Rhizobium*, в котором кодируется 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-

тапным 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 путем переноса **nod** генов из штамма *Rhizobium* с широким спектром специфичности в штаммы с узким спектром специфичности. Так или иначе, ясно, что образование клубеньков – весьма сложный процесс, и для дальнейшего увеличения конкурентоспособности штаммов *Rhizobium* потребуются всесторонние 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. Классическая 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 ними используют химикаты. К сожалению, и биологические способы стимулируют увеличение урожая растений (не предотвращают достаточно долго, до тех пор, пока не изменится в окружающей среде не позволят пролиферации бактерий и не приведут к быстрому развитию болезней и к уменьшению шестого 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 повышения эффективности микробиотических биологических, более «биологичными» для среды. Даны из биологических методов в качестве фитопатогенных взаимодействий с другими растениями, устойчивых к болезням или несколькими болезнями микробиотическим (этот подход обсуждается в гл. 18). Если также превратить опыты по оплодотворению в качестве инструмента биоконтроля бактерий, стимулирующих рост растений. Также бактерии синтезируют соединения, которые можно использовать для увеличения урожая, устойчивых растений фитопатогенным. В настоящее время это азиды и антибиотики, а также различные ферменты. Впрочем, несомненно, и другие ферменты, такие как целлюлаза, почти все исследуемые пока применяются в лабораторных условиях, ризовых культур или в спорах. Следовательно, же рынок и рынок той или иной стратегия, основанной на биологических методах, то конкретнее говоря, можно будет сделать только тогда, когда появятся новые методы.

## 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 оксидов и гидроксидов трёхвалентные ионы. 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 небольшие молекулярные железосвязывающие соединения или, чаще (например) АСН (АНА). Да, железные ионы являются 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, производят пролиферацию фитопатогенных грибов, синтезируют сидерофоры, которые связывают большую часть  $Fe(III)$ , выходящую в среду почвы, непосредственно взаимодействуя с микроорганизмами (и ризосфера). Фитопатогенные грибы тоже синтезируют сидерофоры, но они обычно обладают более широким спектром в железе, чем сидерофоры. Синтезируемые стимулирующими растением бактериями. Это позволяет избежать конкуренции между грибами и бактериями за железо.

В отличие от фитопатогенных микроорганизмов, растения, как правило, не страдают от недостатка источника железа в почве в результате взаимодействия с бактериями, стимулирующими рост растений. Биологически растения могут растить при значительно меньших концентрациях железа, чем микроорганизмы. Кроме того, есть данные, что железо, связанное бактериями сидерофорами, может использоваться растениями и использоваться ими для своих нужд.

Поскольку связывание железа бактериями сидерофорами может одновременно приводить к подавлению пролиферации самих

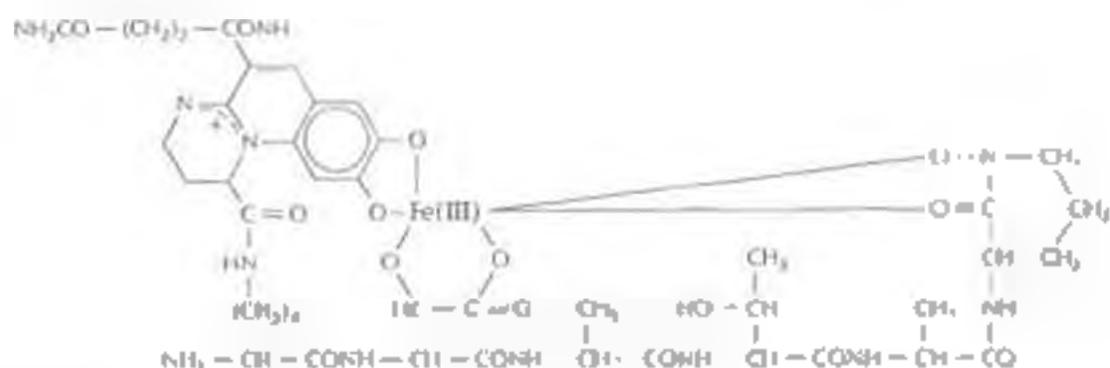


Рис. 14Д. Структура сидероферина (сидероферина), продуцируемого штаммом *Pseudomonas* В10. С основной карбоксильной сидероферин связан один ион  $Fe(III)$ .

разных фитопатогенных микроорганизмов, исследуется возможность использования их для создания более эффективных систем биоконтроля.

Многие стимулирующие рост растений 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 сидероферин, так называемый псевдомонада, обладает способностью  $Fe(III) : 10^{22}$  г моля<sup>-1</sup>. С помощью сидероферина синтезируют все флуоресцирующие соединения.

Предприняты также первые попытки исследовать синтез псевдомонада у стимулирующей рост растений бактерии *Pseudomonas putida* WCS358. С помощью мутантов были получены 26 мутантов этой микроорганизма, не способных синтезировать сидероферин. Из отбор сделаны 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 сидероферин. Был создан банк клонов ДНК *P. putida* WCS358 с плазмидой космоидальной вектора pLAI R1 с широкой кругом хозяев и путем конъюгации осуществлена трансформация всех 26 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 космоидальных клонов со средним размером вектора 26 к. п. н. Действительные исследования показали, 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 инделами генов. Таким образом, как и фальсифицированные клубеньки, биосинтез сидероферина это сложный процесс. Поскольку каждый сидероферин кодируется несколькими генами, получение рекомбинантных бактерий, способных синтезировать модифицированный сидероферин, задача не из легких. К счастью, есть другие способы повысить эффективность использования бактерий, стимулирующих рост растений, в качестве агентов биоконтроля. Например, можно расширить круг используемых штаммов бактерийным штаммом клонированного железобиндующего, так чтобы один рекомбинантный штамм мог унаследовать и использовать сидероферин, синтезируемый другим биологически модифицированным, таким как своим своим конкурентоспособностью. Для этого были использованы те же рецепторы экспрессии железобиндующий из бактерий, стимулирующих рост растений, и введены в другие штаммы.

#### Антибиотики

Один из наиболее эффективных механизмов, которые используют стимулирующие рост растений бактерии для выживания и пролиферации





фермент β-1,3-галактаназу, который разрушал срединной мембраны. В ходе вступил исследованием были показано, что при применении активная роль играет мембранный белок *FlaA* *Flavobacterium odoratum*, стимулирующий рост растений. Обусловлено это наличием у них комплекса из четырех разных полипептидов, которые, действуя совместно, разрушают мембрану клеточной стенки грибов. Эти бактерии способны ингибировать развитие и патогенных возбудителей *Ascochyta blight*. В то же время Tn5-мутанты *F. odoratum*, не продуцирующие активную энциму, не были эффективны ингибировать развитие 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 *Erwinia carotovora* и *A. melonis*. Оба трансформированные 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 получают в свое распространение питательные 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 растительки, исключая образование кристаллов льда и повреждение растительных клеток. Обычно приносится при температуре не ниже нуля радиации ниже точки замерзания (и с применением ее сверхзамораживание). Чтобы предотвратить кристаллизацию на листьях злаков культур, как земляника, можно еще до заморозков растительки под воздействием мутационных бактерий *P. syringae*, не синтезирующие антифризные белки. Антифризные кристаллы ингибируют. Такие мутационные формы могут быть созданы с помощью естественных рекомбинантных ДНК или специально мутагенеза с последующим отбором, и они при достаточной концентрации могут быть бактерии дикого типа.

Планы на малых условиях мутационности биохимическая патогенных микроорганизмов с помощью бактерий, стимулирующих рост растений, является способность этих бактерий в распрямлении в естественных условиях. В Канаде, скандинавских странах и на севере США они способны сохранять жизнеспособность в условиях зимы холодной зимой, а именно (разнообразие при относительно низких температурах около  $(-5 \text{ } ^\circ\text{C})$ ). Поскольку микроорганизмы способны выживать в неблагоприятных условиях, можно попытаться сконструировать с помощью генетической инженерии 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  $5 \text{ } ^\circ\text{C}$  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 малых будет перенести в клетки бактерий, стимулирующих рост растений, с тем чтобы получить трансформированные бактерии, устойчивые к низким температурам. Пока нет никаких данных о наличии связи между антифризной активностью бактерий и механизмом, обеспечивающим их выживание при низких температурах. Очень ин-

терьям проверить, является ли синтез этих функций беззащитным адекватной стратегией, используемой 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 живые бактерии выживут для симбиоза, а многие из тех, что выжили, дают ограниченное 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 оксидативный характер. Однако эксперименты с *Agrobacterium tumefaciens*, что этот организм увеличивает количество 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 живые бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют фермент, способный регулировать уровень растительного гормона этилена. Этот фермент, 1-аминоциклопропан (карбонсукцилат(АИК) декарбоксилаза, 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 поглощает и гидролизует АИК, понижая концентрацию этилена в тканях растения. Во многих растениях этилен стимулирует прорастание семян и влияет на их состояние покоя; обычно, если после прорастания уровень этилена определяется высоким по семя, удлинение корней замедляется. Таким образом, бактерии типа АИК декарбоксилаза увеличивает скорость роста корней, и растение развивается быстрее. Кроме того, многие бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют ИУК, в отличие ИУК, не так растворимый на стимуляцию удлинения растительных клеток или ускорение деления, активирует АИК синтезу, что приводит к повышению концентрации этилена. Присутствие внешнего АИК-декарбоксилазы препятствует выделению

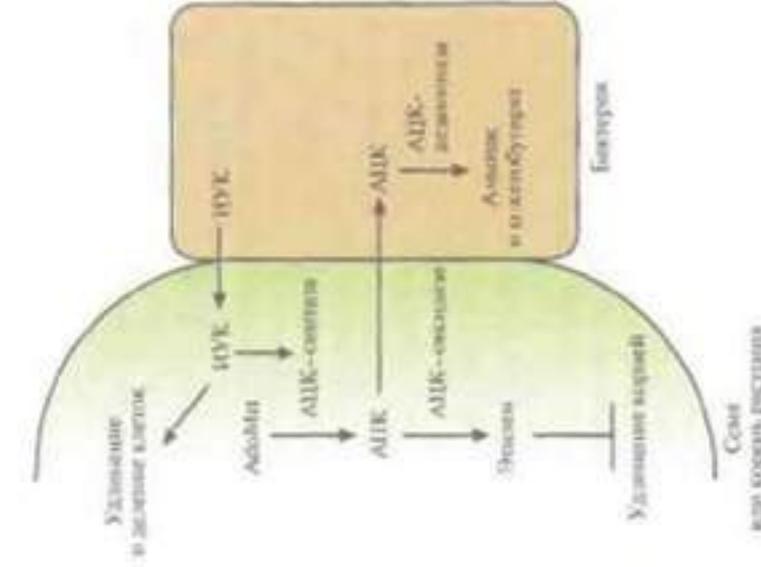


Рис. 14.10. Схематическое изображение механизма, с помощью которого бактерии, стимулирующие рост растений, связывают концентрацию этилена в растительных тканях и тем самым предотвращают избыточное развитие корней. Бактериальная клетка, прикрепившаяся к поверхности стебля или корня разноросистой растения, синтезирует и секретирует индол-3-уксусную кислоту (ИУК), стимулирующую рост растений. Попавши в растение, бактерияльная ИУК (вместе с ИУК, синтезируемой самим растением) стимулирует либо деление растительной клетки и ее удлинение, либо фермент АИК-синтазу, который катализирует преобразование 5-кетоксииндолной (АксМет) в АИК. Значительная часть АИК растеет с другим малым молекулярным, обычно содержащимся в секрете или клеточном экссудате, экстремуретом корнями растений или стеблями, вызываясь бактерией и гидролизуете АИК-активатор до индолла и *o*-кетобутирата. В результате количество АИК вие растения снижается. Чтобы сохранить равновесие между АИК внутри и снаружи, растение секретирует его больше. Соответственно это ингибирует, а следовательно, и концентрация этилена в растительных тканях уменьшается. (Из работы Сидэк и др., *J. Theor. Biol.*, in press.)

лению АИК даже при высокой концентрации ИУК, так что концентрация этилена не повышается до уровня, при котором замедляется рост растения (рис. 14.10). После детального изучения механизма, с помощью которого бактерии,

стимулирующие рост растений, оказывают свое действие, появится возможность создать рекомбинантные микроорганизмы, 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 подавление роста фитопатогенных микроорганизмов.

Из всех бактерий, стимулирующих рост растений и уже используемых в сельском хозяйстве, наиболее детально изучены члены семейства *Rhizobium* и *Beauverbia*. Эти микроорганизмы существуют в сложных облигатных симбиотических отношениях со строго определенными растениями.

Молекулярные основы фиксации азота всесторонне исследовались на *K. pneumoniae*, который может служить модельной системой для изучения симбиотических бактерий семейства *Rhizobium* и *Beauverbia*. Детально охарактеризована интрогеназа, 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 глаза невозможным создание с помощью «глаза»  $r$  или  $m$  в генерии растений, которые могли бы сами усваивать азот, и других азотфиксирующих бактерий.

Азотфиксированный фермент интрогеназа, именованная жеренко с абревиатурой, катализирующей образование газообразного аммиака ( $N_2$ ). Некоторые штаммы *Rhizobium* синтезируют фермент, который катализирует превращение аммиака в нитрит, а нитрит в нитрат, что увеличивает эффект.

тиссия, фиксации азота. Если штамм спорен и имеет типичную гидрофобную, его легко обмануть факторами типа и стимулировать рост растений уменьшив его. С учетом этого единственного минус было предпринято множество работ для предотвращения фиксации азота штаммами *Rhizobium*, осуществляющие симбиотическое фиксирование с сельскохозяйственными культурами. Но предпринятыми действиями, проводимыми с помощью штаммов симбиотических микроорганизмов, штаммы *Rhizobium* обманывают бизнес максимизировать способность стимулировать рост растений.

Важно в симбиотическое взаимодействие с растениями, штаммы *Rhizobium* стимулируют образование азота корнями клубеньков, где и происходит разложение азота бактериями и фиксация азота. Важно было предположить, что, если с помощью методов генной инженерии удастся создать бактерии, способствующие образованию большего количества клубеньков, конкурентоспособность микроорганизмов штаммов *Rhizobium* в борьбе за место на корнях растений-симбионтов повысится по сравнению со штаммами дикого типа. К сожалению, обнаружилось, что в обратном клубеньков азот будет находиться в том же месте, и эта способность нарушает проведение соответствующих исследований.

Опосредованная стимуляция роста растений бактериями состоит в широте растений от почвы, в выветривших факторах, в том числе грибами или бактериями. Также можно осуществлять при участии специфических соединений, синтезируемых бактериями, которые стимулируют рост растений, стероидов, антибиотиков, других малых молекул и различных ферментов. Насколько другие продукты синтеза, в частности фитонормоны и АМК-дезинтоза, влияют на рост растений непосредственно. Есть надежда, что выходя из культуры биологических веществ перечисленных соединений можно будет по-настоящему в союзе бактерии — более эффективная стимуляция роста растений.

## ЛИТЕРАТУРА

Adams M. W. W., I. B. Morrice, J. S. Chen. 1983. Hydrogenase *Biochim. Biophys. Acta* 594: 105-126.

Abrecht S. L., R. J. Muler, F. J. Hanns, S. A. Russell, H. W. Emerich, J. J. Evans. 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by inoculated soybeans. *Science* 203: 1255-1257.

App D. J. 1990. N<sub>2</sub> cycling in — fixation (now, present, and future outlook, p. 67-76. In P. M. Grasshoff, L. E. Rith, G. Stacey, W. C. Newton (ed.), *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Chapman & Hall, New York, N.Y.

Bar-Pess E., Y. Chen, Y. Hadas, H. Marschner, Y. Ramlid. 1994. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and nitrate plants p. 271-281. In Y. Chen, Y. Hadas (ed.), *Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Carroll M. A., R. A. Hauptland, H. J. Evans. 1983. Construction of a *Rhizobium japonicum* gene bank and use in isolation of a hydrogen uptake gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 181-185.

Chet I., J. Ibar. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 37-43.

Chen J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53: 517-530.

Chen J. H., A. H. Harker, H. Papp, S. A. Russell, F. J. Hanns, M. Zinke. 1987. Physiology, biochemistry, and genetics of the uptake hydrogenase in *Rhizobium*. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 335-361.

Fischer H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium*. *Microbiol. Rev.* 58: 352-386.

Glick B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.

Glick B. R., Y. Bar-On. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.* 15: 353-378.

Glick B. R., C. B. Jacobson, M. M. K. Schwarz, J. J. Power. 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Acetobacter pasteurii* CR12-2 do not stimulate couals root elongation. *Can. J. Microbiol.* 40: 911-915.

Glick B. R., D. M. Pearce, J. L. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by

- plant growth-promoting bacterium. *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. E. Kuhl, 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 communities involved in infection and nodulation. *J. Plant Res* 106: 201-211.
- James D. A., M. H. Ryder, B. G. Carey, S. K. Leonard, A. Kerr. 1988. Construction of a Tn<sup>+</sup> deletion mutant of a pAgK84 to telegraph the biological control of crown gall. *Mol. Gen. Evol.* 212: 207-211.
- Klopper J. W., R. J. Schtz, 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-Argbesen. 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.
- Olton P., K. Pawlowski, T. Blissett. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 809-885.
- Op J.-P., T. Blissett. 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948-954.
- Neilands 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. B. 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. Hefags, 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. Wijetunga, 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 H., M. Griffith, J. J. Pasternak, B. R. Glick. 1995. Low temperature growth, freezing survival

- and production of nif-fixase protein by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bradyrhizobium lotii* C.411. *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 lotii*, способным 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*-гена других микроорганизмов, которые можно было бы использовать в качестве референс-последовательности.
4. Как, это поистине миссия, повышает эффективность мутаций в *nifA*- или *nifD*-генах на количество фиксируемого азотом организмом азота?
5. Обсудите возможность создания рекомбинантных растений, способных фиксировать азот.
6. Предложите схему клонирования генов азотфиксаторов.
7. Является ли сидерофор? 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 *Azotobacter vinelandii* как инструмента биосинтеза?
11. Какие ферменты, секретируемые стимулирующими рост растений бактериями, обуславливают их «биоконтролирующее» свойство? Какие молекулярные действия этих ферментов?

## Микробные инсектициды

Насеки в массовых количествах и числ насекомых — самая многочисленная часть биологических видов, приближающаяся 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 множество химических инсектицидов, позволяющих контролировать численность популяций насекомых-вредителей. Самым эффективным из них был пиретроин-метилпиретроин (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 вызывает гибель насекомых. К наступлению времени синтеза ДДТ и широко применялись другие хлороорганические соединения, такие как ялдрин, алдрин, дельталин, диндан, гамма-бензен.

Еще один класс химических инсектицидов — фторорганические соединения, включающие малатион, паратион и димелион. 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 животных уже привела к глубоким последствиям. Так, в Северной Америке были практически истреблены многие виды птиц: сапсаны, истребитель-белоглазый, белоглазые орланы, бурый пелican, ушастые баклань.

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. Зачастую это приводило к весьма неожиданным результатам: обработка вызвала увеличение численности насекомых-вредителей.

С учетом этих все 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 конструкция могут привнести манипуляции с генами, которые кодируют энзимы. В частности, речь может идти о генах инсектицидов, вырабатываемых бактерией *Bacillus thuringiensis* или бактериями насекомых; эти инсектициды безопасны, специфичны и весьма эффективны.

Рядом пестицидов огромной численности мы имеем преимущество 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 биопестицидами.

## Токсины, синтезируемый *Bacillus thuringiensis*

### Механизм действия и использование

Все «микробные инсектициды» можно разделить на микрофитины, либо синтезируемые либо либо естественное вещество, либо синтезируемое

действующее на определенных насекомых, либо микрофитином насекомое-мишень и при этом оно и его токсины. Наиболее изучены, наиболее эффективны и наиболее часто используются микробные инсектициды бактерии *B. thuringiensis*. Они представляют множество штаммов и пептидов (ципр.) и различия между ними синтезируют токсины, специфичными в отношении определенных насекомых (табл. 14.11). Например, *B. thuringiensis* штамм *Ausubel* токсичен для личинок чешуекрылых (в том числе мотыль и бабочек), для личинок толстоножки, мотыль и личинки листовертки и почкоядя сморок *B. thuringiensis* штамм *slendish* уничтожает двукрылых: комаров и мушек. *B. thuringiensis* штамм *paterson* (тоже пестриный комар *larva*) эффективен и отравляет жесткокрылых, в том числе короедского жука и злоязычного долгоносика. Ципины и другие пептиды *B. thuringiensis*, каждый из которых токсичен для определенных насекомых.

Инсектициды (белковые токсины) *B. thuringiensis* штамм *Ausubel* и других штаммов выделены в кристаллы и имеют так называемую иррегулярную кристаллическую структуру, которая образуется во время споруляции бактерий. Такая особая структура белковой функции при структуре не несет. После дождя прилипает от 20 до 30% суспензии споруляющей культуры и системы она главным образом из белка (95%) и некоторым количеством углеводов (5%) кристаллы — это по своему делу имеют белковые агрегаты, диссоциирующей на субъединицы в свободной форме. Субъединицы можно более диссоциировать и это обработкой в меркаптиланолом ково-

Таблица 14.11. Некоторые свойства инсектицидных токсинов, синтезируемых штаммами *B. thuringiensis*\*

Штамм <i>B. thuringiensis</i> и его токсины	Актин	Молекулярный вес	Пестицидная активность	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> 1C1	Cy1I	120	Чешуекрылые, жесткокрылые	7
<i>paterson</i> 11C1	Cy1B	71	Чешуекрылые, жесткокрылые	3
<i>paterson</i> 10C1 (штамм <i>paterson</i> )	Cy1II	66-71	Чешуекрылые	8
<i>paterson</i> 1C1 (штамм <i>paterson</i> )	Cy1A	125-145	Чешуекрылые	8
<i>paterson</i> 1C1	Cy1A	66	Двукрылые	14

\*1982. Lavelle and al. P. 49 in *Microbes in Pesticides*.

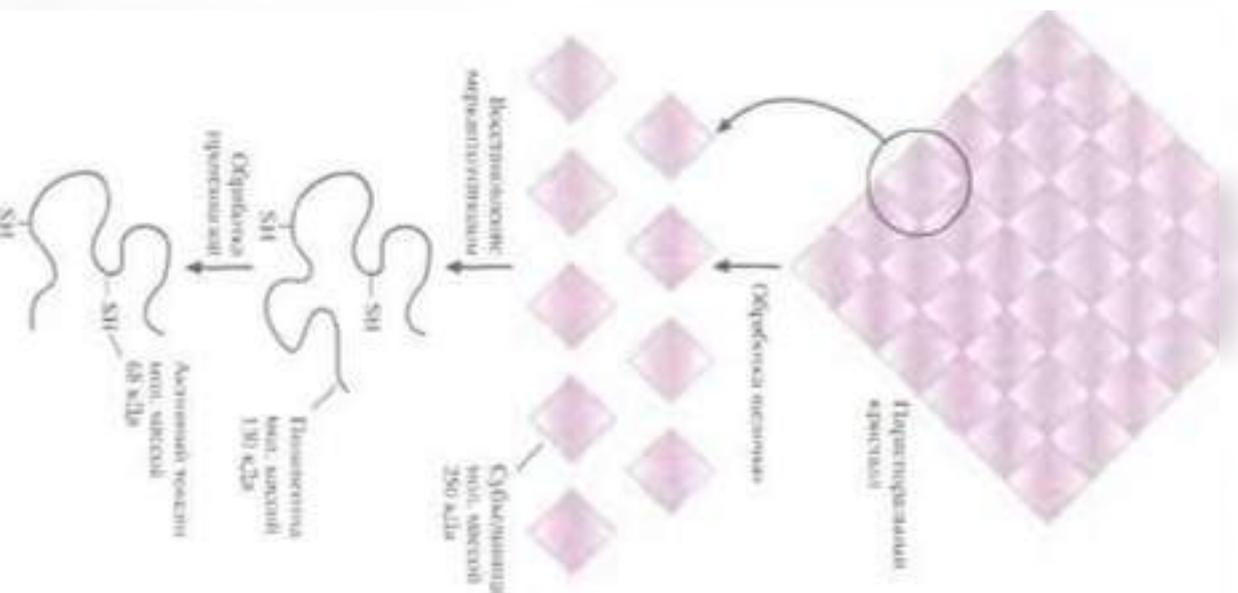


Рис. 11.1. Схематическое изображение синтеза кристаллов при асимметричной очистке. В процессе очистки (1) молекулы белка с молекулярной массой 250 кДа и с симметричной формой (2) очищаются и разделяются на субъединицы с молекулярной массой 68 кДа и с асимметричной формой (3). Затем субъединицы с молекулярной массой 68 кДа и с асимметричной формой (3) очищаются и разделяются на субъединицы с молекулярной массой 130 кДа и с симметричной формой (4) и субъединицы с молекулярной массой 68 кДа и с асимметричной формой (5). Субъединицы с молекулярной массой 130 кДа и с симметричной формой (4) очищаются и разделяются на субъединицы с молекулярной массой 130 кДа и с симметричной формой (6) и субъединицы с молекулярной массой 68 кДа и с асимметричной формой (7). Субъединицы с молекулярной массой 68 кДа и с асимметричной формой (7) очищаются и разделяются на субъединицы с молекулярной массой 130 кДа и с симметричной формой (8) и субъединицы с молекулярной массой 68 кДа и с асимметричной формой (9).

при восстановлении кристалла, восстановленные молекулы италазон *B. thuringiensis*, в соответствии с их токсичностью можно сгруппировать в четыре основных класса: CryI, CryII, CryIII и CryIV. Белок CryI токсичен для шелкопряда, CryII – для жуков-щелкунчиков и мух-журчалок, CryIII – для жесткокрылых, CryIV – для двукрылых.

Классы можно разделить, даже на подклассы (A, B, C, ...) и подгруппы (a, b, c, ...) согласно высказанным особенностям токсичности тех или соответствующих токсенов. Например, класс троп *cryI* включает шесть подклассов (от *cryIa* до *Ij*, в том числе *cryIh* – три подгруппы (от *cryIha* до (c))). Кроме того, в соответствии с иммуногенностью белков можно выделить примерно 30 разных серотипов *B. thuringiensis* (табл. 15.1). Каждый серотип отличается от другого специфическими свойствами антигенных детерминант на поверхности клеток спороносителя италази *B. thuringiensis*.

В параситариях кристаллы италазины обычно находятся в неактивной форме: при со-злеглолизации кристаллы быстро гидролизуются и формируют протеины, преимущественно активного токсина. Протеины класса токсина CryI имеют молекулярную массу 130 кДа (рис. 15.1). После аглитации неактивным параситариям кристаллы протеина италазины растворяются и подвержены в условиях нейтрального pH (7,5–8,0) и при действии специфических пепсидазотических протеиназ превращаются в активный токсин с молекулярной массой 68 кДа (рис. 15.1). В том виде он встречается в мембранах эпителиальных клеток кишечника насекомых и обнаружен в крови и фекалиях, через которые, как полагают, происходит устная инвазия части клеток.

Антигенность италазины определяется наличием 10-11-го эпигенетического детерминанта, который определяет тип токсина, продуцируемого спороносителем. В зависимости от типа токсина, продуцируемого спороносителем, различают

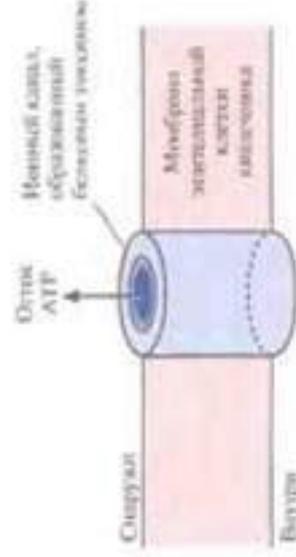


Рис. 15.2. Постраивание токсина *B. thuringiensis* в мембрану эпителиальной клетки кишечника насекомого и образование боковой канальца.

организма и в конечном счете наступает смерть. Поскольку прорывание протокивает и активный токсин проникает только в условиях пеллоидного рН и в присутствии определенных протеаз, вероятность предельно воздействия токсина на человека и сельскохозяйственных животных мала.

Способ действия токсина *B. thuringiensis* указывает некоторые ограничения на область их применения. Чтобы убить насекомое, *B. thuringiensis* обязательно должен попасть в его кишечник, и противном случае никакого эффекта не будет. *B. thuringiensis* чаще всего растворяют, причем бактерии обычно смешивают с аттрактантами насекомых, чтобы повысить вероятность того, что насекомое-кредитор проглотит токсин. Однако для насекомых, обитающих в тканях растений или на корнях, токсин *B. thuringiensis* при такой обработке вряд ли будет представлять какую-либо опасность. С учетом всего этого были предложены попытки разработать другие стратегии защиты растений от таких вредителей. Одни из подходов состоит в создании трансгенных растений, несущих и экспрессирующих ген токсина *B. thuringiensis* и, следовательно, экспонирующих токсин-предела в течение всего периода вегетации.

Второе ограничение, налагаемое на применение токсина *B. thuringiensis*, связано с тем, что этот токсин действует на насекомых, находясь в основном на определенной стадии развития. Именно в этот момент и должна проводиться обработка.

Штамм *B. thuringiensis* subsp. *Kaibab* был выделен в 1901 г., но интерес к нему как к ценному коммерческому продукту возник лишь в 1951 г.,

когда выяснилось, что он способен вызывать заболевание у человека. В 1971 г. в США в штате Колорадо был обнаружен штамм *B. thuringiensis* subsp. *Kaibab*, который вызвал заболевание у человека. Это заболевание называется «болезнь Кайбаба» и характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта. В 1986 г. в штате Колорадо был обнаружен штамм *B. thuringiensis* subsp. *Kaibab*, который вызвал заболевание у человека. Это заболевание называется «болезнь Кайбаба» и характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта. В 1986 г. в штате Колорадо был обнаружен штамм *B. thuringiensis* subsp. *Kaibab*, который вызвал заболевание у человека. Это заболевание называется «болезнь Кайбаба» и характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта.

Для биоинсектицида используется насекомояд-предела растывает 1,5–10<sup>8</sup>–2,5 · 10<sup>8</sup> спор *B. thuringiensis* subsp. *Kaibab* на каждый квадратный метр обрабатываемого участка. Обработку проводят в тот период, когда число личинок в популяции насекомого-вредителя максимально, поскольку параспоральные кристаллы чувствительны к солнечному свету и быстро разрушаются. В лабораторных условиях на свету за 24 ч разрушается более 60% остатков триптофана в белках параспорального кристалла, а в окружающей среде в зависимости от освещенности кристаллы могут сохраняться от одних суток до одного месяца. Такая нестабильность инсектицидного препарата поправляется, что повышает устойчивость к нему насекомых-маловероятно.

Однако в том случае, когда *B. thuringiensis* subsp. *Kaibab* использовался в качестве инсектицида в условиях малой освещенности (например, в зернохранилищах), через несколько генераций появились устойчивые к токсину насекомые. Одна из причин такой передельной устойчивости насекомых заключается в изменении мембранного белка клеток кишечника, в форме выполняющего функцию рецептора токсина *B. thuringiensis* subsp. *Kaibab*. Возможно, она возникает вследствие того, что в этих условиях протоксин не разрушается и служит фактором отбора. Из всего этого следует, что повышение устойчивости к *B. thuringiensis*



1. Клонированные клетки перенесли с агара на питательный жидкий фильтр.
2. Перенесенные клетки частично агрегировали органическими растворителями.
3. Все сайты нестероидически стимулированных термов и стероидов видны на фильтре флюоресценции с помощью бычьего слюногормона дигбулина (БСА).
4. Обработанные БСА фильтры *Yeast* и с красочными индикаторами к нестероидическому термов.
5. Отмыли фильтры от несвязавшихся агентов и обработали  $^{32}$ P-мечеными А-белками *Methylobacterium* *anisoli*, вторичный яминидеет идет с Fe-фитогемоглибинными агентами.
6. Связали на фильтре, которые соответствуют клонированным, активным синтезирующим индикаторам, выщелачивая с помощью флюоресценции.

Используя идентифицированный ген промотора в качестве гибридного вектора, установили, что соответствующая нуклеотидная последовательность содержится в промоторе *B. thuringiensis* штамм *London* 71 T. 1. 1. Амамониметр сеченя к аммониметру и сариниметру индикаторов для идентификации генов термов, а также агентов и термов агентов и термов агентов и термов агентов ДНК других штаммов *B. thuringiensis*.

#### Генная инженерия генов термов *B. thuringiensis*

После идентификации термов генов *B. thuringiensis* было определено термов генов структура кодируемых белков. Сравнение аминокислотных последовательностей разных белковых термов показало, что белки некоторых термов имеют одинаковый домен, соответствующий токсигенности. Кроме того, был субклинирован термов генов кодирующей последовательности, с которой синтезируется умеренный белок, в определенной мере циркулирующий термов токсичность. Таким образом, при получении генов термов генов могут использоваться термов генов генов, с которыми они имеют близкие или идентичные термов генов генов.

В естественных условиях бактерии термов генов *B. thuringiensis* синтезируются только во время споруляции, т. е. дифференциальной

стадии «бурного» только на определенной стадии развития микроорганизма. Если бы экспрессия генов термов происходила во время всего жизненного цикла, можно было бы существенно увеличить количество продуцируемого токсина и уменьшить время его синтеза. Кроме того, было бы возможно сделать синтез токсина непрерывным процессом и тем самым значительно увеличить урожай, поскольку для непрерывной ферментации истощаются небольшие, и поэтому менее дорогие субстраты и оборудование, чем для периодической (более подробно см. абзац 1 гл. 16).

Во время споруляции *B. thuringiensis* специфический фактор инициации транскрипции (сил-фактор) связывается с промотором генов, функционирующих только на этой стадии жизненного цикла бактерии, так что синтезируется матричное РНК (мРНК), специфическое для споруляции. Следовательно, чтобы работать с непрерывной экспрессией токсигенного гена (гена) *B. thuringiensis*, необходимо поместить его (их) под контроль промотора, функционирующего в течение всего жизненного цикла.

Для этого фрагмент ДНК, содержащий ген токсина без его сайта спенинга промотора, встроили в плазмиду так, чтобы он находился под контролем активного конститутивного промотора генов устойчивости к тетрациклину, который ранее был выделен из плазмиды *Vec* 101 и введен в *B. thuringiensis*. На всех этапах развития микроорганизма непрерывно синтезировался полипептидный токсичный белок (рис. 15.4). Кроме того, когда той конструкцией трансформировали муляжный штамм *B. thuringiensis*, не способный к споруляции, токсин все равно синтезировался. При этом процесс был гораздо более эффективен, чем в случае *B. thuringiensis* данного типа; количество продуцируемого продукта было больше, а концентрация его в среде и в клетках значительно меньше.

Дальнейшее усовершенствование этой системы могло бы состоять во встраивании генов, экспрессирующихся в течение всего жизненного цикла, в хромосому ДНК штамма *B. thuringiensis*, не способного к споруляции. Это гарантировало бы сохранность генов при непрерывной ферментации, что не всегда достигается





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 животных чувствительны, 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 *glaucoclavatus*. 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 токсинов с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток кишечника млекопитающего. Домен III, расположенный в C-концевой области молекулы, предположительно 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 млекопитающего, 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 в эксперименте по взаимодействию этих токсинов с рецепторами. К мышькему белковой рецептору на поверхности клеток кишечника *X. edwardsi* и количественно измеряют токсин добавляли меченные *Stx1C* или *Stx1E* и определяли связывание меченных токсинов (Н. Гурбоу *et al.*, *BioTechnology* 12: 915-918, 1994).



Инактивация, продуцируемый *B. thuringiensis* штамм *Beauveria*, предотвращает естественное свертывание, когда он попадает в конечный личиночный сегмент. Если же этот токсин, инвадировавший в виде трансформированного кристаллического растительного материала, то кристаллы быстро утонули, и токсин будет неэффективен из пищевой цепи 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* или *Synechocystis* spp., которые размножаются в поверхностных слое воды, где доминируют солнечным светом 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 комара. Инактивация, синтезируемая трансформированными дрожжевыми клетками или *S. cerevisiae*, в лабораторных условиях была использована для личинок комара. Однако в полевых условиях трансформированные дрожжевые клетки и *S. cerevisiae* быстро оплодотворяются и размножаются клонированная линия была очень мала.

В качестве альтернативной системы для поддержания, кодирования токсичных для комаров белков, можно использовать также грибовидную родственную аэробную бактерию *Aspergillus fumigatus*, обитающую у поверхности водоемов. Были проведены эксперименты, в которых *A. fumigatus* трансформировали плазмидным вектором с шпичками кругом *uidA*, который кодировал белки токсина *Bacillus thuringiensis* (бактерия, аналогичная *B. thuringiensis*). Гены (находясь под контролем промотора *uidA*, обычно не) инвазивно экспрессировали. Полученный трансформант синтезировал белковые токсины мол. массой 51 и 92 кДа и был практически столь же токсичен для личинок комара *Anopheles* и *Culex*, как природные микотоксичные штаммы *B. thuringiensis*. Однако в отличие от *B. thuringiensis* в случае с *A. fumigatus* не возникало проблем, связанных с распространением под воздействием. Кроме того, культивирование *A. fumigatus* обходится гораздо дешевле, поскольку этот микроорганизм растет на более простой среде, чем

*B. thuringiensis* и *B. thuringiensis*. Для него характерно только присутствие в клетках, так что токсин не экспрессируется немедленно при попадании. *A. fumigatus* образует споры и таким образом, как и все грибы или плесневые грибки, имеет устойчивость УФ света. Однако, прежде чем применить трансформированные бактерии *A. fumigatus* для контроля численности комаров и предотвращения заражения, необходимо убедиться, что патогенные токсины не содержат инвазивности, а термостабильность устойчивости к антибиотикам.

Инактивация, продуцируемая *B. thuringiensis*, при их попадании на листья в слезки не прикрепляется к восковым, покрывающим листья восковой. Чтобы обойти эту трудность, можно ввести ген токсина *B. thuringiensis* в тот же организм, что и для бактерий, которые обитают в слое слизи, не прикрепляясь к восковым листьям (например, в форме спор). Такие родственные бактерии, медузиды и грибы, будут прикрепляться к насекомым и растениям, будут прикрепляться к насекомым и растениям, и токсин инвазивно будет связан с ними. Это ускорит эффективность инвазивной обработки растений биологическими или химическими инсектицидами.

Ген токсина *B. thuringiensis* штамм *kurstaki* был вставлен в хромосомную ДНК штамма *Pseudomonas fluorescens*, который обитает колонии на корнях кукурузы, создавшим образцы (рис. 15.6)

1. Трансформант Т05 встраивал в хромосому и тем самым модифицировал его левую и правую фланкирующие последовательности и удалил ген *uidA* с его. Такой модифицированный трансформант не может выжить из плазмы даже с помощью экзотических питательных.
2. Ген токсина *B. thuringiensis* штамм *kurstaki* встраивал в середину модифицированного трансформанта Т05 так, чтобы он находился под контролем конститутивного промотора.
3. Трансформант Т05 встраивал в хромосому ДНК штамма *P. fluorescens*, обитающего на корнях.
4. Плазмиду, несущую модифицированный трансформант Т05 со встраиванным геном токсина, ввели в бактерии и хромосому ДНК матерей был встраиван трансформант Т05 таким образом

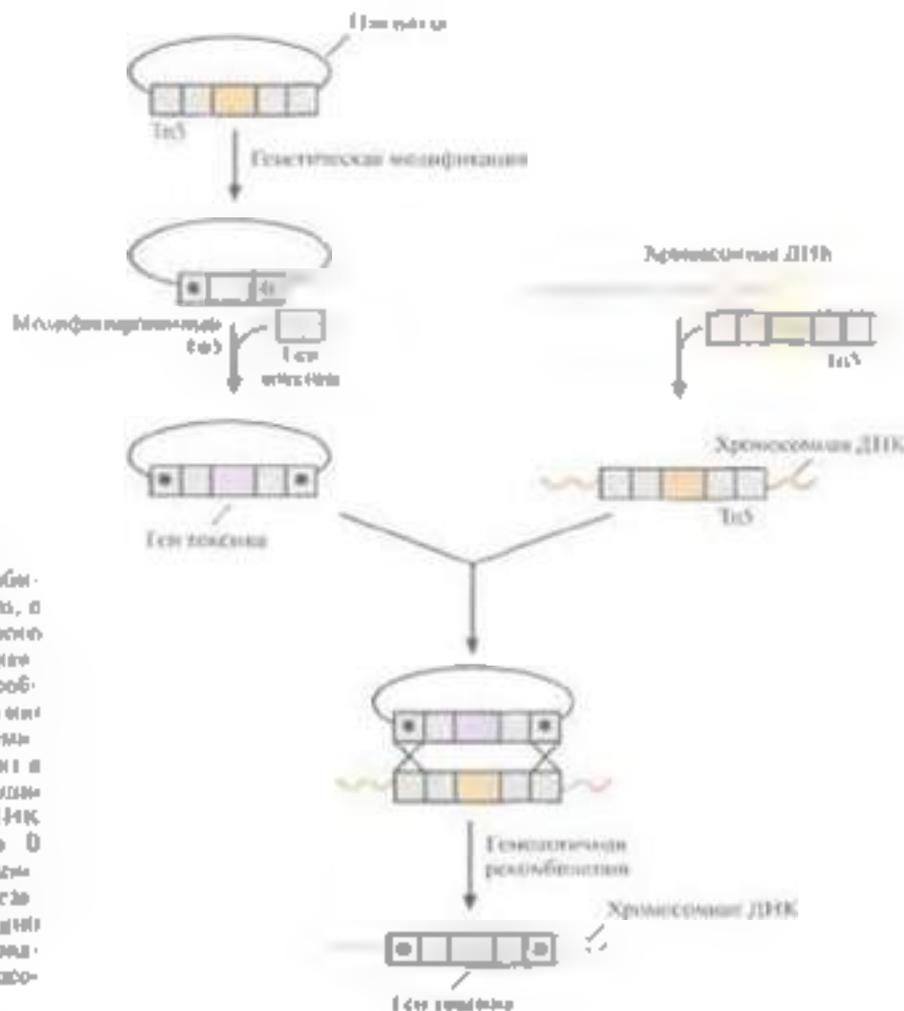


Рис. 15.6. Получение рекомбинантного штамма *P. fluorescens*, в хромосомную ДНК которого встроены ген токсина и не способный к выработке и экспрессии транзита *Tn5*, путем введения в плазмиду *Tn5* транзитамины и плазмиды *Tn5* транзитамины в штамм *P. fluorescens*, способный к выработке своей хромосомной ДНК транзитамины *Tn5* путем (1) в результате генетической рекомбинации не способный к выработке транзитамины *Tn5*, несущий ген токсина и эффективно, оказывается встроены в хромосому *P. fluorescens*.

5. Осуществлять генетическую рекомбинацию с помощью двойки в хромосоме между не способным к транзиту *Tn5* штаммом, несущим ген токсина, и «плазмидным» транзитом *Tn5* штаммом типа, инсертированным в хромосому. В результате интеграции плазмидный транзит *Tn5* с геном токсина оказался встроены в хромосомную ДНК, а транзит *Tn5* до сих пор был замаскирован.

В таком случае ген токсина при этом утратит способность к рекомбинации с хромосомной ДНК микроорганизма и лабораторных

условиях или даже не сможет встроиться в среду. Кроме того, переместить ген токсина (или другим функциями) в окружающую среду очень трудно. Как показали предыдущие исследования, рекомбинантный штамм *P. fluorescens* токсичен для личинок блохи. Теперь планируется проверить способность штамма рекомбинантного микроорганизма к широкой дисперсии спор и клеток в различных средах и в различных условиях.

Гены токсина *P. fluorescens* вводили в хромосомную ДНК с помощью инсертирования *Tn5*, ген *su/A (c)* был введен в ДНК *P. fluorescens*, который кодирует устойчивость к

характерно присутствие от *Edmon kaschabana* Трэнк. Формирует латис (тенон) бактерии *Clavibacter* дубинкер «*gubavivus*», образуя симбиозом в виде миелизированной ткани, приводит к тому, что рекомбинантные бактерии приобретают способность «защиты» растения кукурузы от мотылькой кукурузника (*Diurina nubilalis*)

## Бакловирусы как инструмент биоконтроля

### Мелонидеи добывают

Бакловирусы — это высокопротемные вирусы с двойной цепочкой ДНК геномом, инфицирующие ретикулярные безраздельники. Различные подгруппы латис семейства перечислены для таких групп насекомых, как чешуекрылые, перепончатокрылые, двукрылые, сетчатокрылые, ружейники, жесткокрылые и ретикулярные. 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 значительных масштабов в 1960 г. и., для 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 abaxum*) (табл. 15.1).

Вирус бакловируса имеет (высокопротемный) геном, состоящий из латиса, который 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 габелы инфицированной насекомым в среду выходят миллионы подкарионовых частиц. Подкарион в конечном итоге освобождается, они подготавливаются действительно свободной среде, и вирусные частицы в высвобождении инфицируют вирусные частицы. Они проникают в клетки конечных насекомых, через интродукцию попадают в ядро, где после явления репликационной происходит репликация вируса и образование новых вирусных частиц. Некоторые из них попадают в ядро хозяина насекомого, инфицируя латис от (латисной) оболочки инфицированной клетки, в ядро и в другие органы. Обычно вирусозом погибает по крайней мере 10 раз в год репликация вируса, т.е. примерно через 5–6 сут после инфицирования, при этом до 25% клеток насекомого погибают из-за вирусной инфекции.

Одним из преимуществ бакловирусов как инструмента биоконтроля насекомых является стоимость и эффективность их действия. 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 их защитные механизмы, в основном устойчивость к ним насекомых (по крайней мере роль вируса ниже, чем в *B. thuringiensis*). Более того, устойчивость к бакловирусам насекомые быстро утрачивают из-за способности после того, как прекратились их репликация в вирусных

Фермеры и садоводы предпочитают использовать один инсектицидный агент, действующий на различных насекомых-вредителей, в том числе и насекомых-вредителей. Это означает, что для более широкого применения бакловирусов необходимо разработать вирус, который способен

быть инсектицидом, что при инфицировании инфицированной клетки насекомого латисом вирусных бакловирусов после их репликации и образования инсектицидных штаммов, имеющих эффективность на своем действии от инсектицидных вирусов. Препятствием этому является конкуренция

Таблица 15.1. Некоторые насекомые-вредители, для контроля численности которых применяются бакловирусы

Название насекомого	Виды насекомых-хозяев	Применение
<i>Chrysomelid beetle</i>	Насекомые-вредители растений	Сельское хозяйство
	Насекомые-вредители растений	Широко применяется
<i>Beetle sp.</i>	Сельскохозяйственные вредители	Лесное хозяйство
<i>Leafy miner</i>	Мелкокрылые	Лесное хозяйство
<i>Tree bark beetle</i>	(Сосновый шелкопряд)	Лесное хозяйство
<i>Tree bark beetle</i>	Сельское хозяйство	Лесное хозяйство
<i>Spotted lanternfly</i>	Жук-щитовик	Лесное хозяйство

ния рекомбинация между ДНК разных вирусов. Детальное изучение *in vivo* инфекции показало, 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 нуклеотидном участке содержится информация с высокой точностью специфичностью.

#### Усиление биоконтроля с помощью генной инженерии

Бакуловирусы не оказывают своего действия моментально. В зависимости от условий инфицирования выделение может активировать от нескольких дней до нескольких недель. Чтобы ускорить этот процесс, попытались увеличить вирулентность бакуловирусов, основанном в них сверхразных генов, в результате гиперэкспрессии которых происходит ослабление инфицированной насекомого или его яйца (табл. 15.4). В целом эти экспериментальные предположения исполняемы тем, надпроектный выворот и в целом несколько комбинированно нарушает его нормальную жизненный цикл.

Известно, что понижение уровня количественного содержания у личинок интенсифицирует охотничью и приводит к прекращению их активного питания. Это следствие происходит в результате оповещения гиперэкспрессии специфических эстераз, катализирующей превращение биологически активной формы сложного метильного эфира ювенильного гормона в неактивную форму.

Таблица 15.4. Эффект гиперэкспрессии эстеразы в бакуловирусы для повышения их биологической активности\*

Примеры генов	Влияние на активность на насекомых-хозяев
Дигуанилатический гормон	Увеличение числа личинок
Дегидроэпихолинсинтетазы	Повышение активности
Ген <i>in vivo</i> ингибитора	Увеличение активности
Ген <i>in vivo</i> ингибитора	Повышение
Клеточный геном	Повышение
Токсин <i>in vivo</i>	Повышение активности на насекомых-хозяев

\* Методы Метод. Сит. Сит. *Journal* 8: 315-319, 1992

формы. Ингибирующие эстеразы эстеразы применяются в основном *in vivo* активными насекомыми гормонами, являясь мощные детоксиканты на стадии активного питания и в результате достигают физиологического уровня. Разумно было предположить, что при искусственном повышении уровня эстеразы ювенильного гормона происходит изменение уровня активности животного относительно 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 *in vivo* гиперэкспрессии и экспрессии гена эстеразы ювенильного гормона. Фермент выделили из насекомых *Heliothis virescens* (соедин) и синтезировали Сиринезин *in vitro* с помощью ферментативности, синтезировали аминокислоты, соответствующий аминокислотному составу белковой молекулы, и использовали его в качестве матрицы для гибрида. Из фермента ДНК *H. virescens* выделили кодирующую последовательность для эстеразы ювенильного гормона и встроили ее в генетический материал бакуловируса так, чтобы она находилась под контролем контрольного вируса. После обработки таким рекомбинантным бакуловирусом *Trichoplusia ni* (капустный шелкопряда) на первой личиночной стадии развития, содержащее ювенильного гормона у насекомого *in vivo* в рост личинки резко уменьшилось по сравнению с контролем. Контрольные личинки, обработанные бакуловирусом другого типа.

К сожалению, применимость этого метода для повышения эффективности биологической деятельности бакуловирусов ограничивается тем, что улучшение питания личинки при гиперэкспрессии эстеразы ювенильного гормона происходит на первой стадии развития личинки. Личинки, находящиеся на второй стадии развития, гораздо менее чувствительны к обработке бакуловирусом. Таким образом, бакуловирусы, специфично синтезирующие для гиперэкспрессии гена эстеразы ювенильного гормона, эффективны лишь тогда, когда личинки большей частью инкупируются на первом-втором стадиях развития, что и естественно улавливая формы насекомых.

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 токсического нейротропного белка, синтезируемого северофризскими скорпионами, *Androctonus leucotis* Nestor. Этот нейротоксин, не оказывающий никакого действия на мшелку, блокирует транспорт ионов натрия и калия в нервных насекомых-мшелках, что приводит к параличу и смерти. Известные, конечно были инфицированные бакуловирусом, несущим ген нейротоксина скорпиона, повреждая листья виноградных растений на 50% меньше, чем насекомые, инфицированные бакуловирусом другого типа.

Клонирование и экспрессия генов вируса паразитического дельта-скорпиона, *Deltaus flavo-digitalis-like hebetus*, 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 меньший вес по сравнению 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 злаков. В проведенных ранее лабораторных экспериментах наблюдалось уменьшение времени, необходимого для уничтожения насекомого 7 кл. на 25–50%, но еще больший эффект оказывали рекомбинантный бакуловирус и комбинированные полевые испытания (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-го возраста (7 кл.) после обработки листьев капусты бакуловирусом дельта-токсина или рекомбинантным бакуловирусом, экспрессирующим ген нейротоксина скорпиона. На инфицированных растениях инсекция проводилась личинками насекомых. Чем выше выживаемость, тем больше личинок инсекции 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 общепризнанные факты, они могут решаться только в живом организме или в культуре клеток насекомого. Стоимость производства бакуловирусов, как минимум от 1000, является 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 в 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 то, что бактерии *Bacillus thuringiensis*

ли образуют пептиксыны, которые, появившись в клетках насекомых и угнетив их мембранную среду и под действием (интегральных протеин) преобразуются в активный токсин и вызывает гибель насекомых. Металлоидное действие токсина обуславливается образованием в мембранах клеток катионных ионных каналов, через которые АТФ выкачивается из клетки. Это приводит к нарушению метаболизма, прекращению питания, активации и т.д. Токсина *B. thuringiensis* выслеживаются в отношении ограниченного числа видов насекомых и метостабилен для всех остальных; они разрушаются в окружающей среде и поэтому редко оказывают вредное влияние 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 с помощью различных токсинах *B. thuringiensis*. Одним из таких токсинов был введен в массовую циркуляцию штамм *Beauveria*. При этом ген экспрессировался он в стадии развития микроорганизма, а не только на стадии образования спор, когда формируется микроспоральный кристалл.

Чтобы расширить специфичность токсина *B. thuringiensis*, гены различных токсинах 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 токсичным 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 был создан рекомбинантный белок, состоящий из двух доменов, кодируемых разными генами *B. thuringiensis*. Он оказался более токсичным действием. В ходе другого эксперимента рекомбинантный белок однократно был объединен с обладающим токсичностью доменом другого вида насекомого, что привнесло только улучшение

уменьшил вероятность появления устойчивых насекомых.

Гены токсинах *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 токсинах *B. thuringiensis* в организм насекомого-хозяина. Генотоксичными металлами были штаммы так же бактерии, обитающие в ризосфере и экспрессирующие гены токсинах *B. thuringiensis*. Это позволяет бороться с насекомыми, повреждающими корни растений.

Бактериальные пестициды для многих видов насекомых, но каждый из них специфичен в отношении большинства видов насекомых. Обычно гибель инфицированного насекомого происходит лишь спустя довольно длительное время, поэтому бактериальные не очень эффективны как средство контроля численности насекомых. Однако и различные штаммы бактериальных можно ввести в 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 бактериальную вакцину 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 resistance 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 toxin 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 herbicide resistance gene *htr* 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  $\delta$  endotoxin combinations. *Biochem. J* 270: 133-136.
- Crozier G., L. Crozier, D. Argoul, D. Paudsiguer. 1994. Emergence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus from range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helix 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*  $\delta$ -endotoxin protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 4037-4041.
- Gebrater W., G. E. Schwab. 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.
- Hawthorn B. D., B. C. Bunting, R. D. Piesse, T. N. 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. Hanson. 1994. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pantelenomus fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 682-690.
- Kalman S., K. L. Kelme, N. Cooper, M. S. Rejzner, 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 *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kerstali* in a recombinant strain of *Clostridium lyli* subsp. *cytotoxicus*. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 501-508.
- Letecky D., H. Agabse, 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. Leclerc. 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. *brachensis*. *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 fumigatus* 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. Grendley, D. Maddox, S. G. Kunka, 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*  $\delta$  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 *Agmenetium 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* 49: 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 Marsac. 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 fumigatus*. *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 выявить, где локализован ген интересующего 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 геной инженерии, повысить эффективность биологических инсектицидных штаммов?
7. Каким образом можно расширить эффективность токсинов?

8. Какую информацию вы можете извлечь, имея в своем распоряжении тот или иной белок *Ces1*?
9. Как бы мы модифицировали белок *Ces1*, чтобы уменьшить вероятность появления насекомых, устойчивых к токсину?
10. Почему бактерия *Aeromonas hydrophila* является несмысленным естественным индуктором для осуществления явной инфекции гусениц шелкопряда *B. mori*?
11. Как расширить круг насекомых, инфицируемых данной факториальной?

## 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 их 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 мощности лабораторного эксперимента. Конечно, увели-

чить размер реактора (биореактора ферментера) пропорционально невозможно, поскольку для получения 10 000 л клеточной культуры не имеет смысла использовать 50 000 отдельных колб по 200 мл. Однако именно 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), важно 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 аэрирующей и стерилизации культуральной среды и оборотовании. Сначала выращивают исходную культуру (5–10 мл), затем инкубируют ее на питательной колбе (200–1000 мл), после

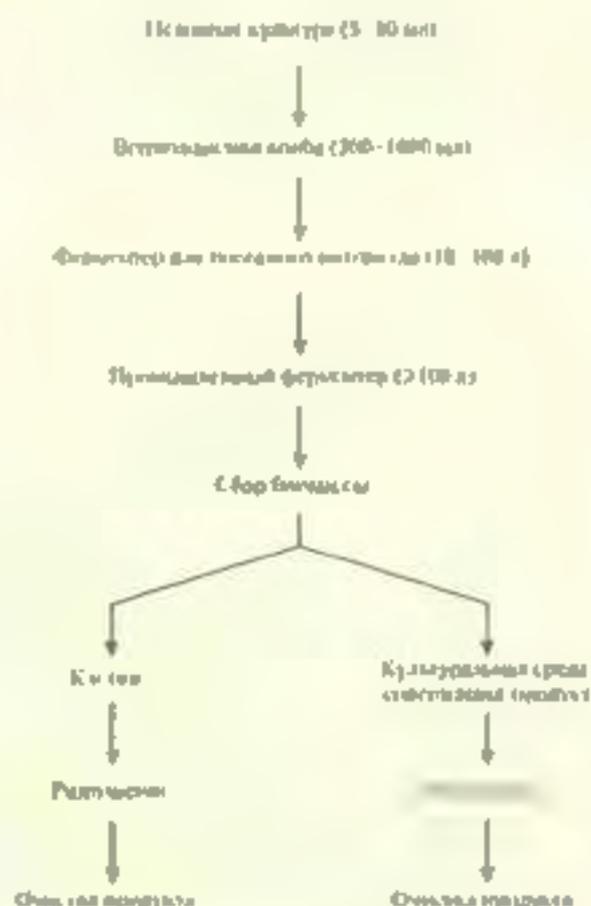


Рис. 16.1. Обобщенный вариант процесса промышленной ферментации. Выделенный продукт извлекается либо в кислоту, либо в культуральную среду, но не в обоих фракциях одновременно, так что дальнейшие манипуляции проводятся с одной из этих фракций.

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 фильтратный осадок. Если продукт локализован внутри клеток, после их разрушения удаляют клеточные осколки и высевают продукт из осевшей среды. Секретируемый продукт выделяют непосредственно из среды

### Рост микроорганизмов

Микроорганизмы можно выращивать в ферментере практически в любых условиях, в ферментере берем известное количество действия 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 стерильных сред, 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 клеток суспензии. Во всех случаях рост среды при необходимости производят аэробно (обычно в виде стерильного воздуха), добавляют питательные и (если это нужно) кислоты или основания

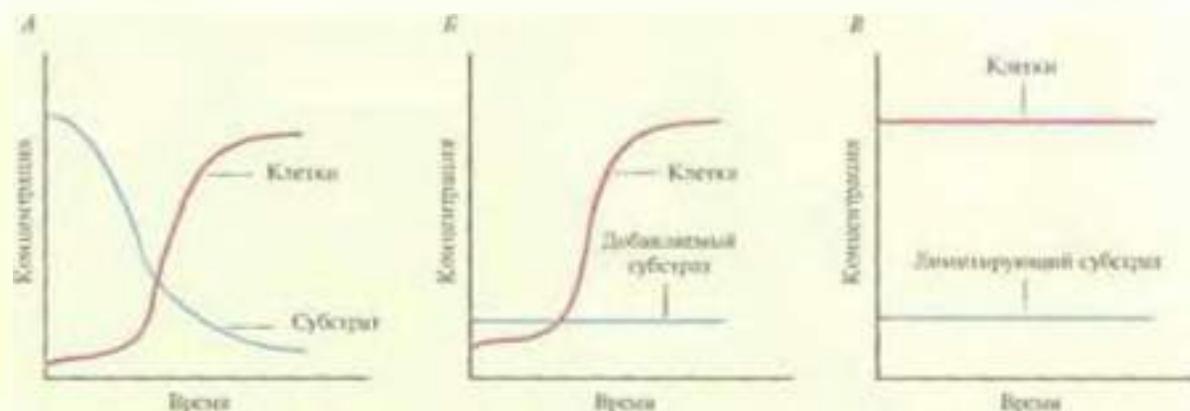


Рис. 16.2. Изменение во времени концентрации клеток и субстрата в периодической культуре (а), периодическая культура с добавлением субстрата (б) и в непрерывной культуре (в).

### Периодическая культура

В ходе периодической ферментации состав культуральной среды, концентрация микроорганизмов (концентрация биомассы), химический состав клеток и количество безводной продукции или metabolites зависят от фазы роста, клеточного метаболизма и наличия питательных веществ. Различают шесть основных фаз роста: латентную, фазу ускорения, экспоненциальную (log), или экспоненциальную фазу, фазу замедления, стационарную фазу и фазу старения (рис. 16.3).

Обычно после инокуляции стерильной культуральной средой наблюдается увеличение числа клеток. В течение какого-то периода времени, начального латентной фазы, клетки адаптируются к новым условиям, достигают pH или концентрации питательных веществ. В конце латентной фазы может произойти увеличение количества новых, ранее не проявившихся путей метаболизма. Латентная фаза характеризуется тем, что, когда посевной материал (почвенная культура), рост которой прекратился в результате истощения субстрата или ингибирования продуктом (т. е. культуры и стационарной фазы). Продолжительность латентной фазы зависит от времени, в течение которого клетки посевной культуры адаптируются к стационарной фазе, и от того, как сильно различались среда, в которой росли

культуры, и пован, среда культуральной среды. Если же посевным материалом служит культура, выращенная в экспоненциальной фазе, то латентная лат-фаза может отсутствовать и рост начнется немедленно после инокуляции. Между лат- и экспоненциальной фазами есть короткий период, так называемая фаза ускорения, когда скорость роста клеток увеличивается до достижения постоянной величины.

Во время экспоненциальной фазы клетки претерпевают несколько делений, в результате скорость роста становится постоянной. При из-

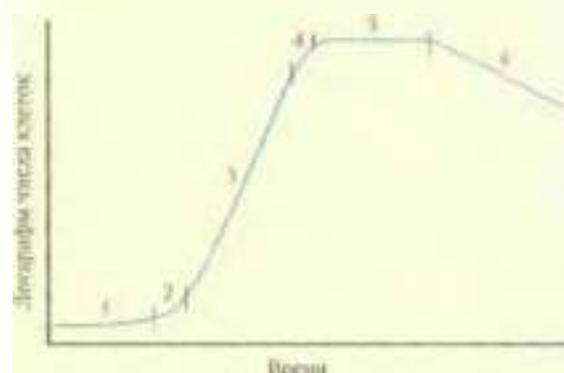


Рис. 16.3. Кривая роста бактерий в культуре при периодической ферментации. 1 - латентная, 2 - фаза ускорения, 3 - экспоненциальная фаза, 4 - фаза замедления, 5 - стационарная фаза, 6 - фаза старения.

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  $\mu$  на биомассу  $X$ :

$$dX/dt = \mu X.$$

Аналогично, прирост числа клеток  $dN/dt$  равен произведению удельной скорости  $\mu$  на число клеток  $N$ :

$$dN/dt = \mu N.$$

Удельная скорость  $\mu$  зависит от концентрации лимитирующего субстрата (источника углерода или азота)  $S$ , максимальной удельной скорости роста  $\mu_{max}$  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 микроэтаноловой ферментации  $\mu_{max}$  обычно находится в диапазоне от 2,4 до 0,086 ч<sup>-1</sup>, 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, удельные числа клеток постепенно снижаются 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), рибосомные все протеинозные или белки. 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 показатели, коррелирующие с его расходом, например количество синтезированных органических кислот, ионичные pH или количество выделяющегося CO<sub>2</sub>. 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 избежать наступления стационарной фазы, во время которой ингибируются клеточные отходы из стрессовые воздействия, происходит синтез протеина и другие и различные метаболиты, уменьшающие выход рекомбинантного белка. Для поддержания метаболизма клеток должно постоянно добавляться субстрат и постоянно увеличиваться. Чтобы обеспечить непрерывный синтез рекомбинантного белка и его стабильность, нужно тщательно контролировать процесс и добавлять субстрат (используя углерода и вода вместе с микроорганизмом) сразу, как только в этом возникнет необходимость. В зависимости от технологии микроорганизмов 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 работы не только микроорганизмов, но и клеток млекопитающих и насекомых. Это можно сделать, поскольку в такие культуры все чаще применяются для получения белковых продуктов, имеющих медицинское значение; 2) без необходимости добавления субстрата животные клетки способны синтезировать и секретировать 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 (уменьшение продукта) в точности уравновешивается их увеличением в результате деления. Таким образом ферментативным реактором для непрерывного процесса в стационарном состоянии скорость размножения  $D$ , определяемая как скорость прироста

среды  $F$ , деленная на экстономный объем среды  $V$  в биореакторе,

$$D = F/V,$$

равна удельной скорости роста  $\mu$ :

$$D = (dX/dt)(1/X) = \mu$$

Чтобы получить непрерывную культуру с постоянными стационарными условиями, при которых увеличивается скорость роста была бы такая же максимальная величина. Для этого надо использовать выключатель, 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 пока не так уж часто, представляется потому, что ученые поочередно изобретали один 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 микрофрезирования, многократно приходится собирать культуру. 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 рибозимом, чистой или сверхчистой – 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 иногда 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 клонированные или в целом организованные клетки.
- 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.
- К качеству компонентов культивируемой среды, используемой при крупномасштабной ферментации, не предъявляются 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 служат примером в любом другом типе ферментации, даже при том что непрерывный режим является более эффективным. И все-таки нельзя было сказать сразу, насколько установок, лабораторных (до 10 л) и промышленных (до 1000 т), для непрерывной и термодинамической ферментации с добавлением субстрата – с целью исключения 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 нужен короткий аэрируемая культуральная среда. Максимальная скорость утилизации кислорода при ферментации  $Q_{O_2}$  зависит от массы клеток  $X$ , максимальной удельной скорости роста  $\mu_{max}$  и скорости роста, зависящей от количества потребленного кислорода  $Y_{O_2}$ . Эти величины выражаются следующей формулой:

$$Q_{O_2} = \mu_{max} X Y_{O_2}$$

Поскольку кислород плохо растворим в воде (0,024 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 8:49-53, 1990

Поскольку кислород является важным фактором в мире, рост аэробных биотехнологических микроорганизмов в культуральной среде кислорода. Это проблема особенно остро стоит при биодифференциации культур или при крупномасштабной ферментации. Чтобы решить ее, биотехнологи пытаются увеличить количество кислорода в среде культуры. Прочисленные методы состоят в следующем: 1) введение в культуральную среду чистого кислорода (кислород); 2) введение воздуха (или кислорода) или закваски; 3) добавление в культуральную среду жидких

жидких элементов, таких как перфторуглероды, позволяющих растворимость кислорода. 4) использование в культуральной среде жидких элементов, чтобы обеспечить наличие кислорода и перемешивание культуральной среды. Все эти методы требуют «кислородную проблему» решить, частично. Для каждой из этих культуральных сред, выделены некоторые варианты, которые зависят от количества кислорода, используемого в культуре. Эти варианты могут использоваться для увеличения количества кислорода в культуре.

Исследователи Бейли и др. предложили модифицировать микроорганизмы, использовать для культивирования,

таким образом, чтобы они могли более эффективно использовать тот кислород, который присутствует в культуральной среде. Они переиспользовали ген, кодирующий гемоглобин (Hb), который кодирует гемоглобин (Hb), который кодирует гемоглобин (Hb), который кодирует гемоглобин (Hb). Этот подход привлекателен, потому что он позволяет использовать кислород, который присутствует в среде, что стимулирует рост и экспрессию целевого белка. Этот подход привлекателен, потому что он позволяет использовать кислород, который присутствует в среде, что стимулирует рост и экспрессию целевого белка.

черным растворителем (по всему объему и протеканием перемешиванием культуры, обеспечивая эффективное аэрирование пузырьков).

Большинство микроорганизмов растут лучше всего 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 замедляется и может полностью остановиться. Если же, напротив, 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 активирует клеточные регуляторы и синтез белка белками продуцента

Тщательное переопределение 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 переопределение оптимально легко обеспечить при культивировании в небольшом объеме, при крупномасштабном же культивировании под держание возможности культуральной среды становится одной из главных проблем.

Переопределение культуральной среды влияет и на другие параметры: скорость переноса кислорода от пузырьков газа 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 определенных переопределенных среды и могут возникнуть гидрохимические эффекты, губительные для биотехнологических клеток и клеток

механизмов. Они проявляют температурную зависимость, которая также связана с температурной зависимостью Тивым образом, вы всегда будете сталкиваться с тем же между необходимостью тщательно перебирать среду и стремлением сократить ее сложность и объем.

Есть еще один объект, казавшийся крайне необычным ферментации, который не имеет отношения к основной стороне процесса, а касается того, что происходит на его границах. Биохимические микроорганизмы и биологические стресс-факторы вызывают культуральные реконструктивные микроорганизмы, образующиеся в результате взаимодействия определенных параметров и условий. Хотя биологические реконструктивные микроорганизмы не представляют никакой опасности, также не допустить их случайного попадания в среду. Для этого используют специальные лампы, предотвращающие доступ живых реконструктивных микроорганизмов из окружающей среды, для этого же применяют. Кроме того, перед окончательным запуском на установку все реконструктивные микроорганизмы должны быть инкубированы в соответствии с определенными параметрами. Входящую культуру необходимо также подвергнуть протектированию и негидролизным микроорганизмам, чтобы исключить их попадания в окружающую среду.

#### Адаптация к высокой плотности

Вообще говоря, при получении чистых культур безной с помощью реконструктивных *L. coli* руководствуются тем, что при максимальной конечной плотности культуры получается и максимальное количество продукта. В ферментерах периодическое действие с добавлением субстрата концентрирует реконструктивные клетки *L. coli* достигает 50 (грамм сухого вещества на 1 л среды) в некоторых случаях  $>100$  г/л. (Все сухое вещество клеток *L. 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 большом количестве снижают рост клеток. (Таким образом, рост при концентрации  $>50$  г/л. ам-

миак 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 раз к раз, ферментация в нем всегда бывает вольтроизвольной.

Анализ который может обеспечить рост клеток, производится с *coli* при росте в условиях недостатка кислорода, но избытка глюкозы. Проблема с *coli* обычно можно решить, если использовать в качестве источника углерода глюкозу вместо глюкозы, повысить температуру или использовать реконструктивный штамм *L. coli*, способный преобразовывать 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 поднять культуру чистой культурой, а не чистой, в которой содержится только 20% кислорода, или выращивать клетки под давлением, чтобы увеличить растворимость кислорода. В качестве альтернативы представлялось рассмотреть и другие клетки *L. coli* с повышенной способностью к фиксации азота, что значительно увеличило бы потребление кислорода растущими 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 вносят определенные количества питательных веществ. Однако в этом случае увеличение скорости роста непрерывно останавливается. При ступенчатом режиме питательные вещества добавляют на определенных концентрациях клеток до все большего количества, так что сначала увеличение скорости роста в десятикратной мере компенсируется. При экстенсивном режиме питательные вещества добавляют в количестве, обеспечивающем постоянную скорость роста клеток. Периодическую подачу питательных веществ можно автоматизиро-

ровать, 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 содержится пропускается воздух или другая газы (рис. 16.4, Б)

- эрлифтные реакторы с внутренним (рис. 16.4, В) или внешней (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 пробные
- обеспечивают эффективную доставку газа к растущим клеткам (если сравнивать на уровне

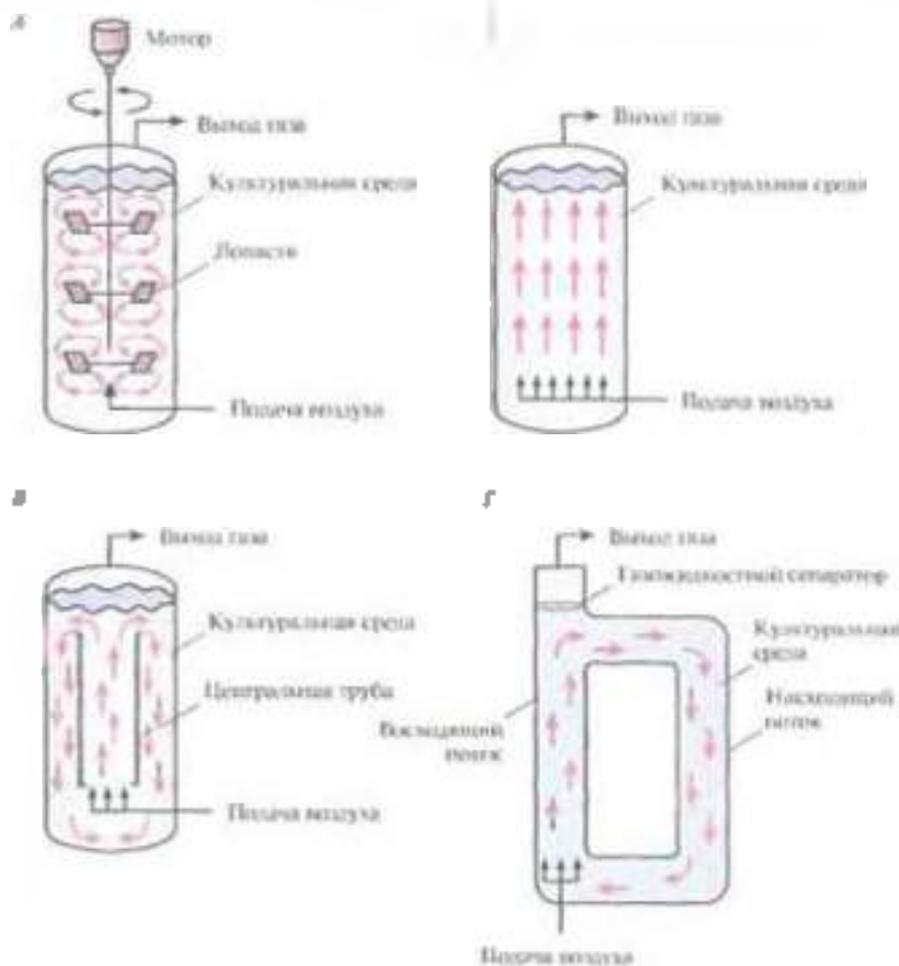


Рис. 16.4 Разные типы биореакторов (упрощенный рисунок). А Реактор с механическим перемешиванием; Б Ферментационная колонна; В Эрлифтный реактор с внутренним рециркуляцией; Г Эрлифтный реактор с внешней системой рециркуляции. Среды (культуральная среда)

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 ухудшиться перенос кислорода, а иногда привести 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 аэробных микроорганизмов), а не механической мешалки, позволяющей много мерять. Кроме того, в отсутствие механической мешалки исключается и один из путей протекновения в биореактор посторонних микроорганизмов. В пневматических биореакторах в культуральной среде не возникает столь сильная гидродинамическая нагрузка (сдвиги слоев жидкости друг относительно друга), при этом в трифазных биореакторах перемешивание происходит более равномерно по всему объему. Уменьшение скорости диффузии 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 выживать 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 инклюзивных или повреждённых клеток, что приведёт к ухудшению условий на выходе и, таким образом, к снижению эффективности рекомбинантного белка.

В барботажных колоннах воздух подается под давлением в нижнюю часть биореактора: по мере подъема малые пузырьки воздуха объединяются, что приводит к неравномерному его распределению. Кроме того, под воздействием высокого давления может происходить в значительном объеме образование. Все это ограничивает универсальность данных конструкций и сужает диапазон реализуемых технологических условий, а также уменьшает возможный размер барботажных колонн.

Трифазные биореакторы могут использоваться как в экспериментальной 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 — такжидкостьтиму сепаратору, и часть частично выходит в воздух. Более глубина дегазированной жидкости осуществляется по другому вертикальному каналу со дну 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 суспензий микроорганизмов с большой вязкостью или индукцией. Переоборудован в них более эффективно и проблемы сепарации пузырьков не столь велика. И особенно биологически трифазные ферментеры, таких как ферментер на 1 500 л (в форме 3С1 (Англия), сконструированный для получения белков овин: клеточная культура растет 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

Ресурсоёмкие 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 замедлители 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 цепи, наклоненные под контролем системы регулируемых промоторов. Включая гены или, что это получается гораздо качественнее, продукт будет достаточно конститутивной экспрессии кинетически цепи. Однако опыт показал, что при непрерывной транскрипции и трансляции кинетической цепи истощаются все энергетические ресурсы клетки и ее рост замедляется. Чтобы предотвратить экспрессию кинетической цепи к определенной фазе роста, можно использовать медленное индуцирование. Для этого вначале инкубируют клетки в оптимальных условиях до относительно высокой численности, а затем индуцируют трансляцию, либо транскрипцию, либо добавляют в среду или или иной химический индуктор в зависимости от принципа промотора (например, кинетический индуктор тетрациклин).

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 индуктор добавляют в другом. Это позволяет оптимизировать процессы роста и индукции по отдельности и увеличивать количество продукта, синтезируемого за единицу времени.

#### *Двухступенчатая ферментация в танк-реакторе*

Штамм *S. cerevisiae* NM989, несущий ген ДНК-лигазы T4 под транскрипционным контролем промотора *p<sub>AD</sub>* и температурно-чувствительного репрессора *p<sub>TRC</sub>*, выращивали и индуцировали в двухступенчатом танк-реакторе (рис. 16.5). Ген

ДНК-лигазы был встроен в хромосомную ДНК, что снизило все проблемы, связанные с нестабильностью плазмиды в ходе длительной ферментации. Клетки выращивали при 30 °C в танк-реакторе с внешней рециркуляцией и работы объемом 10 л. В этих условиях ген ДНК-лигазы не экспрессировался. Для индукции при 42 °C в танк-реакторе с танк-реактор с внешней рециркуляцией и работы объемом около 5 л биореакторы были соединены (субстрат) насосом, который обеспечивал непрерывность подачи суспензии из первого биореактора во второй. Клеточную суспензию, достигшую определенной плотности, удаляли из биореактора, где проводилась индукция, и подвергали минимальной обработке.

Максимальная удельная скорость роста культуры ( $\mu_{max}$ ) составляла примерно 0,66 ч<sup>-1</sup> в первом биореакторе и 0,54 ч<sup>-1</sup> во втором, что свидетельствовало о времени удвоения 61 и 77 мин. Среднюю скорость непрерывно добавляли в ферментер, где росли клетки, за 2 л/ч, а во ферментере, где проводилась индукция, отбирали такой же объем суспензии. Плотность рабочих объемы биореакторов различались, клетки колоулись примерно 5 ч в биореакторе, где производился рост, и 7 ч в биореакторе, где осуществлялась индукция. Различия во времени пребывания клеток в биореакторах было необходимо для оптимизации числа клеток, выхода продукции и стабильности ДНК-лигазы. Само время пребывания клеток в разных реакторах можно варьировать изменением их относительного рабочего объема и объема инкувирующей в первом биореакторе инкувирующей суспензии.

Используемая в этой работе танк-реактор 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 полученные 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 инкувирующей суспензии с 30

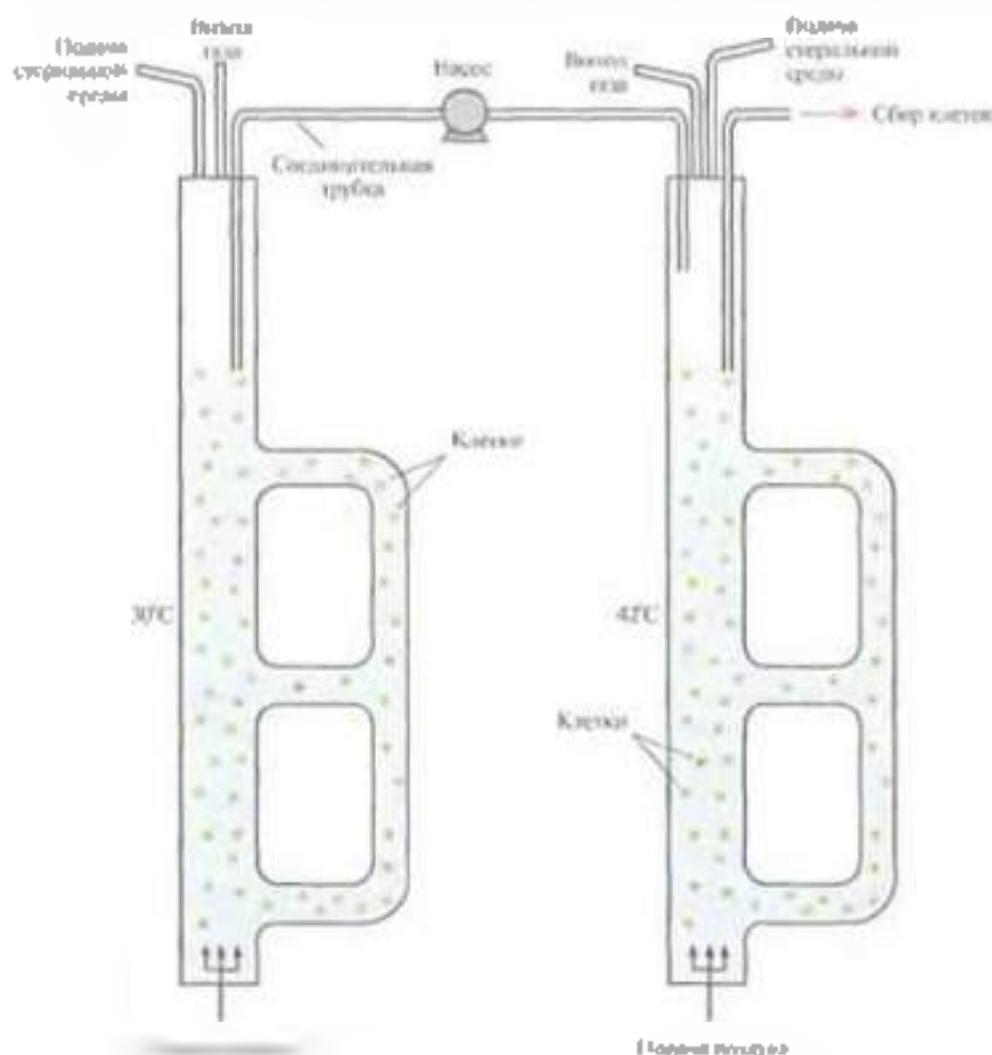


Рис. 18.5. Система из двух аэрируемых биореакторов, используемая для температурной индукции синтеза белкового продукта. В первом реакторе устанавливается культивируемые при 30 °С (с левым) клетки (наступают в ферментер с температурой 42 °С (справа), где происходит индукция). В обоих биореакторах имеются двойные вертикальные мешалочные устройства, соединенные шлангами. Наличие охлаждения жидкостей, только вращающийся роторный сборник отходов и насос для перемещения культуры

лы 42 °С. Для поддержания роста клеток, накопивших во втором биореакторе, в экспоненциальной фазе в него непрерывно добавляется нужное количество питательных веществ в концентрированной форме. Это обеспечивает расширение ДНК клеток при помощи ферментов, которые обычно синтезируются клетками в фазе деления и в стационарной фазе

При росте в таком двухступенчатом биореакторе непрерывность действия культуры (штамма *E. coli* NH489) может достигать плотности 4 г (сухой вес) на 1 л, а (за долю ДНК-лиганды T4) может достигать до 4% суммарно белка в клетке, что соответствует примерно 25 000 ЕД ферментативной активности на 1 г (сухого веса). Впрочем же с помощью оптимальной подкормки можно синтезировать примерно 100 000 ЕД

ферментивный активист на 1 л культуры, т. е. до 4 000 000 1:Д в сутки. С учетом того что каждая единица фермента имеет эффективность уменьшена до 30% и что стоимость единицы активности равна примерно 0,25 долларов, получаем, что существенно можно синтезировать количество фермента на сумму 240 000 долларов. Мы не учли всех затрат на сами производящие белки, однако ясно и так, что прибавить от реальных основных затрат, полученных при непрерывной ферментации в биореакторах среднего размера, значительно превышает затраты.

*Двухступенчатая ферментация в одном реакторе с механическим перемешиванием*

Ирредуцируемый рекомбинантный белок AG[*gal*], использующийся при определении иммунологических тестов, синтезировали в промышленных масштабах в одном биореакторе с механическим перемешиванием. Ген этого белка был сконструирован методом склейки генов перри и содержит сегменты, кодирующие пептид ситоксинамином иммуноглобулина G (IgG) А белка *Staphylococcus aureus*, два сайта связывания IgG G белка штамма G148, *Streptococcus* и  $\beta$ -галактозидазу E coli. Он кодируется под контролем промотора *p<sup>lac</sup>* бактерии *E. coli*, регуляция которого осуществляется так же, как регуляция *p<sup>lac</sup>* промотора, и был встроен в плазмиду, несущую ген устойчивости к ампициллину; этой конструкцией трансформировали клетки *E. coli*. Штамм с плазмидой, несущей ДНК AG[*gal*], содержал торью для вытеснения несущего ген температурычувствительного белка-репрессора *cI* 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. Суховесные клетки из 45-литровой ферментеры в свою очередь служили основным материалом 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 ферментации при выращива-

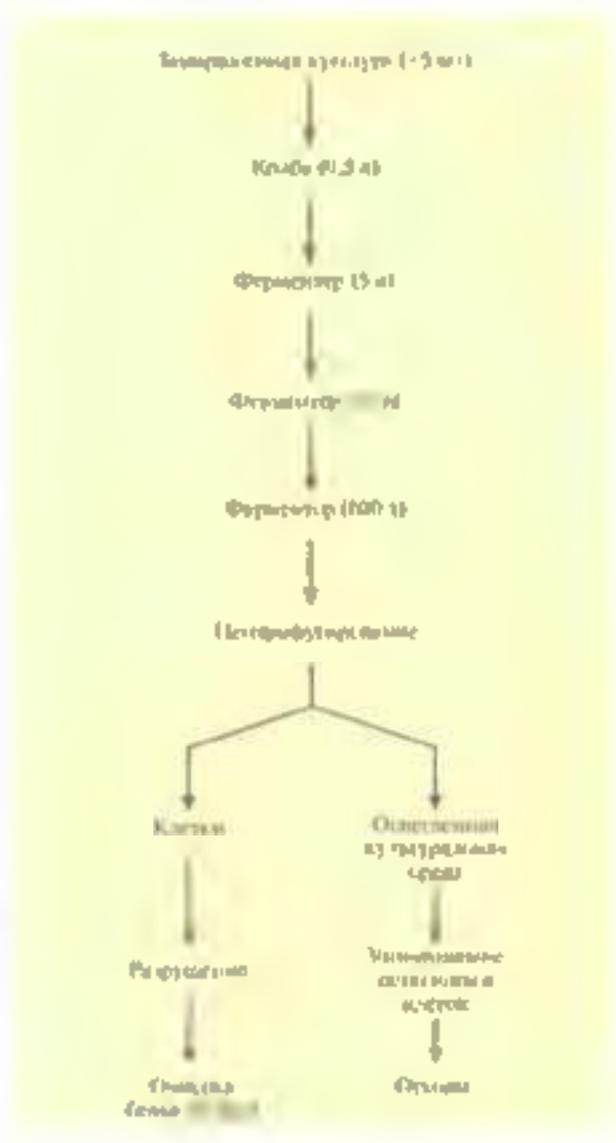


Рис. 16.6. Схематическое представление промышленного синтеза белка AG[*gal*]. В скобках указан объем культивируемой среды на каждом этапе. На ее долю приходится от 10 до 75% объема соответствующим биореакторам (ферментерам).

настаивания в ультрафильтрации 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 этот период уходило около часа. Незадолго до окончания при 40, а не при 42 °C, по-

самаму при более низкой температуре синтезируется в том же количестве белка AcPgal, но клетки могут расти в течение более длительного периода. Новые штаммы при более высокой температуре инкуляции (40 °C) давали большое количество биомассы.

Увеличиваем активность белка AcPgal в течение 2 ч после начала индукции, получившаяся в этом случае биомасса была почти в 10 раз меньше, чем у клеток, перенесенных в фазу экспоненциального роста или в стационарную фазу. Кроме того, примерно в 10 раз меньше в течение 2 ч при 40 °C, увеличиваем плато. Но даже при этом после 4-часового культивирования при 40 °C на долю AcPgal-белка приходилось примерно 20% всей массы сухого вещества. Учитывая все это, можно их интегрировать с тем же белком AcPgal и репрессором cI 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 продукта и получения биомассы большого количества клеток можно проводить ферментацию в обычном периодическом режиме. В этом случае индукция происходит, используя стандартное белок, при этом количество клеток было почти в 10 раз больше, чем в предыдущем варианте. В этом случае при использовании *E. coli* и индукции и при этом *E. coli*, трансформированные клетки

культивировали в среде с разным содержанием триптофана. При высокой концентрации последнего габриэль белок не синтезировался, последующее понижение триптофана из среды в результате клетками приводило к увеличению синтеза необходимого белка. Таким образом триптофан в среде привнесло в увеличенном количестве как биомассы, так и синтез целевого белка, а следовательно, и количество фермента 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 с помощью тех же методов. Однако трансформированные клетки часто обладают другими физиологическими свойствами (они имеют другой размер или синтезируют внеклеточные полисахариды), и в результате условия, оптимальные для сбора трансформированных клеток, могут не подходить для клеток, синтезирующих целевой белок.

Для выделения клеток из большой объемов культуральной среды часто используют высокоскоростное центрифугирование. Для этого стандартным способом используются высококачественные центрифуги непрерывного действия. Существует клеточный перенос (получен в лаборатории работающей центрифуги, клетки индукции

Таблица 16.1 Титры различных белков, выделенных из трансформированных клеток *E. coli* индукцией индукции В, при индукции ферментацией и при периодической ферментации с добавлением субстрата<sup>1, 2</sup>

Индукция субстрата	Выход		
	периодическая ферментация	периодическая ферментация с Trp	периодическая ферментация с добавлением субстрата
Биомасса, г/л	67	12	20
Среднее содержание белка, %	2,6	2,0	0,1
Среднее количество белка/клеточной массе, г/г	0,17	0,23	1,21
Вход в клетку, мг/г биомассы, %	26	62	91

<sup>1</sup> По *Current Microbiol. Appl. Biotechnol.* 1991, 10, 101-102.

<sup>2</sup> В настоящее время в промышленности используются штаммы *E. coli* с интегрированными копиями генов *lacZ* и *lacY* в хромосоме. При этом индукция происходит в течение 2 ч при 40 °C. При этом индукция происходит в течение 2 ч при 40 °C. При этом индукция происходит в течение 2 ч при 40 °C.

продукты в воду, в осветляемой среде улавливаются. Когда барабан заканчивается осевшими клетками, центрифугу останавливают и клетки собирают. Основное неудобство данной системы заключается в необходимости останавливать процесс, и затем снова начинать его. Кроме того, недостатками являются высокая стоимость оборудования и потребляемый им энергии, вероятность утечки микроорганизмов в окружающую среду, невозможность полной улавливания клеток из среды.

Альтернативным методом выделения клеток из культуральной среды является использование мембраны К сели ксина, при обычном фильтровании 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 лишь временным эффектом; клетки все равно будут накапливаться на поверхности мембраны, и процесс

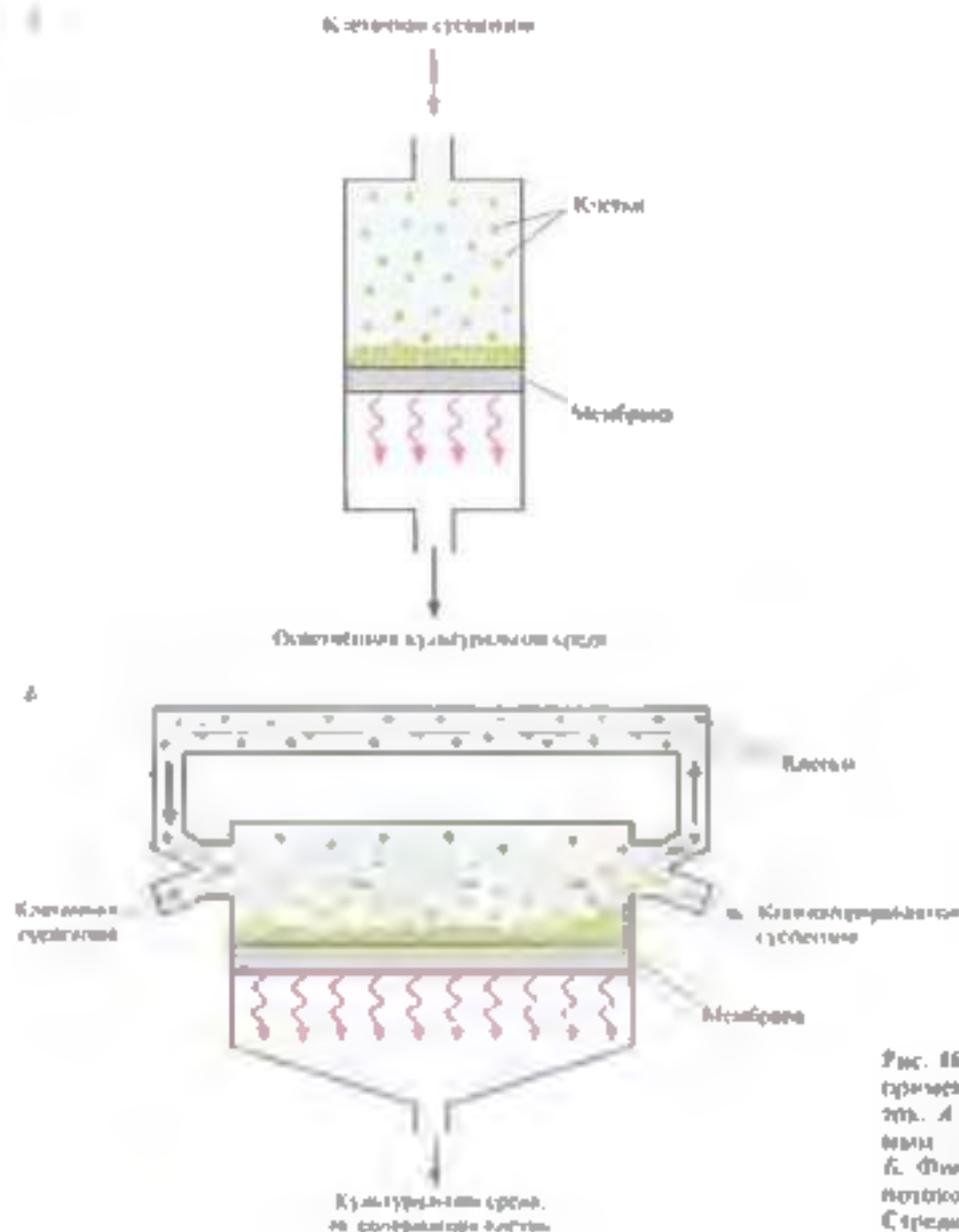


Рис. 16.7. 4 способа фильтрации: применяются для сбора клеток. А Фильтрация с неограниченным количеством фильтрата. Б Фильтрация с параллельным потоком культуральной суспензии. Средним направлением потока

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 жидкости. 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.

Далее более детально читают об приростах и локализации продукта. Если продукт представляет собой белок, находящийся в культуральной среде, то его можно центрифугировать, а белки очищать от хроматографическими или другими методами. Если продукт — это низкомолекулярное соединение, находящееся в культуральной среде, то используя 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 весьма деликатными, чтобы разрушить клеточную стенку и в то же время не повредить и не денатурировать белки. 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 водородными связями.
- У грамотрицательных бактерий клеточная стенка тоньше и снаружи покрыта слоем липидов.

- Стенки дрожжевых клеток состоят 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. (Хорошо работают органическими растворителями — но процент и желательной степень разрушения клеток голый исключается для выделения ферментов из дрожжей). Однако, чтобы убедиться в том, что в индивидуальных случаях большая проточка не денатурирует, необходимо провести предварительные тестирования. Под действием дегерметов в мембранах бактериальных клеток образуются поры, через которые белки и другие молекулы выходят из клеток. К сожалению, дегерменты 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

ности (сферический фермент: β-1,3-галактоза, β-1,6-галактоза, манноза и декстрины). Ферментативная обработка так окислительна, а лицев приколн в чистых условиях. Пока использование ферментов для анализа клеток сдерживается из-за высокой стоимости, но с применением рекомбинантных микроорганизмов 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 пшени под давлением, сепарации). Обычно после обработки немеханическими методами многие клетки остаются неповрежденными. Напротив, механическое разрушение высокоэффективно, что делает его более привлекательным. Особенно часто ультразвуковые излучатели, генерирующие высокочастотные звуковые волны, используются для обработки мелких объемов. Клетки разрушаются при этом под действием гидродинамических сил (сдвиг в слое жидкости друг относительно друга, вихревание и т. д.)

Для разрушения большого количества клеток обычно используют шаровые мельницы. Концентрированную клеточную суспензию добавляют в камеру высокооборотной шаровой мельницы, заполненную инертным абразивным материалом (например, стальной 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 том же отношении к высокой температуре концентрированную клеточную суспензию продавливают через небольшое сито с помощью выталкивающего поршня, 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 трубе с небольшим диаметром или в трубку по трубе другой суспензии. В месте сепарации выделится большое количество энергии, разрушающей клетки. Таким способом с помощью устройства под названием *Micellizer* можно при том же давлении разрушить большую часть клеток. *1 cell* и двух встречных потоков суспензии (одно для разрушения клеток, другое — инертное) может изготавливаться большое число роторов. В отличие от шаровой мельницы выталкивающим давлением и высокоскоростных шаровых мельниц, в которых, как правило, используют концентрированную клеточную суспензию, данные устройства пригодны для обработки любых суспензий. Как показала предварительная экспериментальная 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 выталкивания по сравнению с обычным давлением и при небольшой скорости, то сохраняются активность некоторых чувствительных белков, ингибирующихся при выделении давлением.

### Дальнейшая обработка

После разрушения клеток на осколки удалено либо низкоскоростным центрифугированием большого объема, либо микроцентрифугированием меньшей. Вспомогательными осадками и супернатантом оседания можно обработать или оседанием на дне образующихся роторами (центрифуги или дистрибуции) или сульфатом аммония. Достигаемое при этом обогащение — 2-5 раз. К сожалению, лизисована

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 поры, — 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 надлежит использовать. В одних случаях это может быть довольно грубой препарат, в других (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 (близкостроенными другими клеточными компонентами). Вплоть до недавнего времени не удавалось детерминировать выделенные только выделенные так, чтобы при этом не применялся несбалансированный регулятор белков, но позже были разработаны методы, позволяющие восстанавливать рекомбинантный белок и восстанавливать его активность Ясно, что все эти дополнительные процедуры увеличивают стоимость процесса получения.

### 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) человека массой 7,6 кДа примерно 90% рекомбинантных молекул локализованы в периплазме, а 10% секретируются. Чтобы выделить растворимую и периплазматическую формы IGF-1 в периплазме, для солюбилизации нерастворимой формы in situ добавляли метионин и дипицитрат до массовой

концентрации при центрифугировании. При этом клетки погибали, но не разрушались, так что интраплазматические 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 солюбилиция in situ, и двухфазная жидкостная экстракция высокоэффективны; 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 также параметры, как температура, pH, скорость и характер перемешивания, потребности в робинных организмах в кислороде, количество питательных веществ.

Ферментацию можно проводить по разному. При периплазматической ферментации основным источником энергии является культуральная среда и происходит культивирование, не достигая субстрата до тех пор, пока количество питательных веществ достигнет максимума. В этих условиях рост культуры происходит шесть часов, липидную фазу, фазу ускорения, стационарную фазу (lag) фазу, фазу 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 культуральная среда через ряд интервалов времени, как правило два раза, чтобы получить логарифмическую фазу. Непрерывная ферментация предпочтительна для длительного течения и получения высокой и одновременно чистого продукта и стабилизированной 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 тысяч литров, 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 диффузитель в дне сосуда. 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, постоянства pH, температуры и других параметров используют разные способы и комбинации их на разных биореакторах. 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

- Bailey J.E., D.F. Ollis. 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.
- Gossel 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  $\beta$ -gal I from *E. coli*. *Bio/Technology* 12: 113-117.
- Kromer K.D. 1986 Cross-flow filtration in the downstream processing of enzymes: current status. *Biotechnol. Forum* 3:20-31.
- Kroer, K.H., H. Nishida, 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. Hong, 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  $\lambda$  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.
- RamTrey 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. Chou, C.Ya 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. Nawri, F. Berry, J.N. Barbato, Th. 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. Jubbett. 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)apM in *E. coli* using two-stage continuous culture system. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 28-33.
- Siegel M.H., H. Hallgulle, J.C. Merechuk. 1988. An airlift reactor: 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.
- Tanny G.D., H. Mirelman, J. Pincus. 1980. Improved filtration techniques for concentrating and harvesting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 269-273.
- Tatunjan 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 перемагнивание 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 пустыни и рис, однако были осуществлены программы и по созданию других сельскохозяйственных и декоративных культур. В качестве основного инструмента прямого генетического воздействия на растения применяется технология рекомбинантных ДНК, широко используемая в микробиологических системах. К числу наиболее развитых исключительно эффективных систем переноса ДНК и экспрессии генов относятся системы, работающие в среде растительных клеток. Одним из достоинств последних является их универсальность: из одной клетки может быть регенерировано целое растение, так что из клетки, сконструированной генными инженерными методами, можно получить сорбитовое растение, все клетки которого несут пулеродоминые гены (и) (трансгенные растения). Если такое растение имеет и летелю способность семян, то семена при этом высеваются последующим поколением.

Можно привести три основных применения в области выведения трансгенных растений. Во-первых, введение генов (генов) часто приводит к повышению биологической ценности и декоративных качеств культурных растений. Во-вторых, трансгенные растения могут служить живыми биореакторами при массовом или промышленном производстве биологически важных веществ 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 семян 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 успешно применяется в традиционных приемы размножения растений, в рамках которых для введения 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 травы, кустарниковые фруктовые деревья, розы.

Многочисленные корончатые галлы образуются в результате заражения растительных клеток и экспрессии специфического белка бактериальной плазмидной ДНК – так

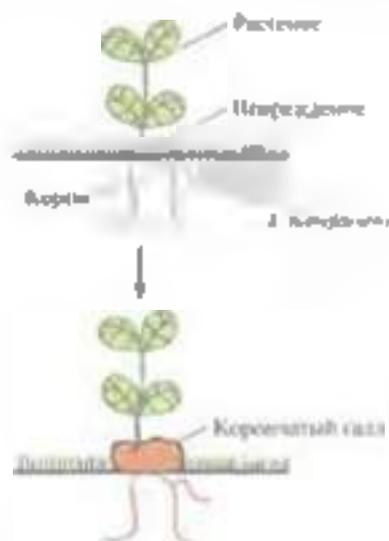


Рис. 17.1. Инфекция растений *A. tumefaciens* и образование корончатой галлы

изометилной Т-ДНК (от слова *transferred DNA*) Т-ДНК – это часть плазмиды, осуществляющей функцию отбора (transfer) (перенос) ДНК-плазмиды (Т-плазмиды), ее носитель – штаммы *A. tumefaciens*.

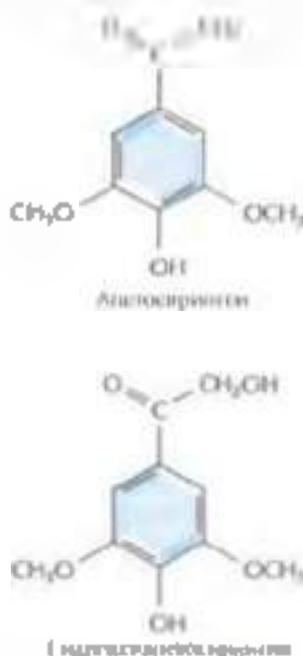


Рис. 17.2. Структурные формулы ацетосирингона и гидроксициная кислоты. Эти соединения участвуют в развитии и отборе от корончатых и других опухолей Т-плазмиды

Для то Т-ДНК кодирует от 12 до 24 г. г. и в зависимости от штамма. Штаммы *A. tumefaciens*, не содержащие Тi-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 гидроксициная кислота (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 гидроксициная кислота активируют ген вирулентности (*vir*), который кодирует окислитель и уместе Тi-плазмиды длиной 35 г. б. н., эти кодируются за пределами Т-ДНК. Продукты генерации необходимы для транспорта и интеграции Т-ДНК (рис. 17.3) в ядро растительной клетки (экзистуют по меньшей мере семь разных типов).

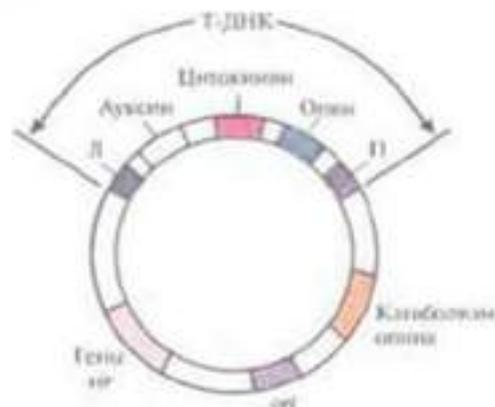
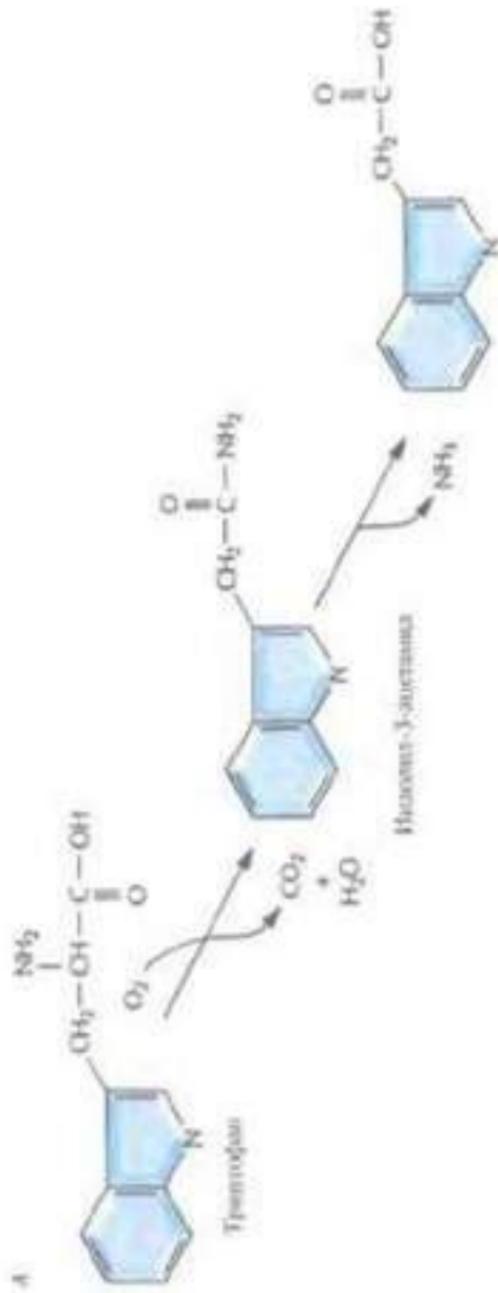


Рис. 17.3. Структурная карта Тi-плазмиды (содержит все необходимые Т-ДНК компоненты для аутомы, трансформации и интеграции, но, как правило, не репродуцируется в трансформированной растительной клетке). За пределами Т-ДНК находятся участки *vir*-генов (*virA*), *virB*, *virC*, *virD* и *virE* (*virA*), *virG* (*virG*), *virK* (*virK*), *virM* (*virM*), *virN* (*virN*), *virP* (*virP*) и *virS* (*virS*). *ori* – участок репликации плазмиды и *A. tumefaciens*. Л и П – участки (оригины) фенольных соединений (ацетосирингон и гидроксициная кислота)



Индол-3-уксусная кислота



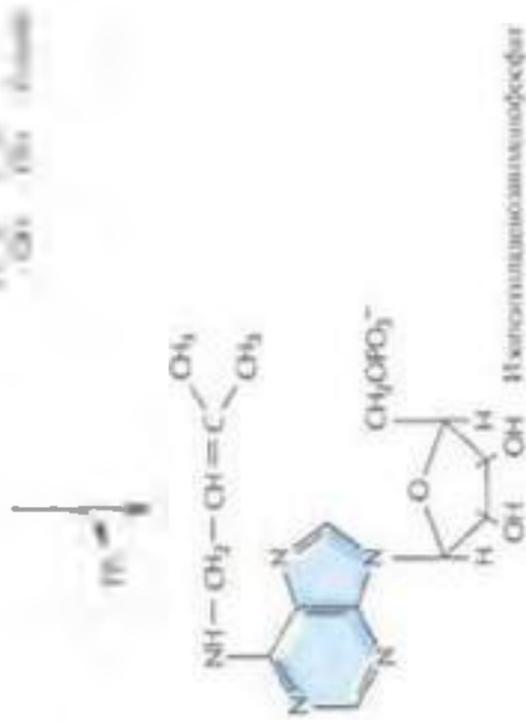


Рис. 17.4. Биосинтез нуклеида и штевления при участии ферментов, кодируемых геном Т-ДНК Т4-вирусами *A. laticollis*. А Синтез нуклеида начинается с превращения триптофана в индол-3-ацетамид, катализируемого триптофанаминоксигеназой. Затем происходит превращение индол-3-ацетамид в индолуксусную кислоту ферментом индол-3-ацетилтрансферазой. Б Синтез нуклеида включает превращение мононуклеотидной группы аденозиндифосфата в 5'-AMP при участии фермента аденозинотрансферазы с образованием аденозиндифосфата.



мог не способна использовать одинн 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 оных ограничена на их использование в качестве векторов для клонирования.

- Фитогормоны, такие как ауксин и цитокинины, стимулируют деление клеток и 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 рекомбинированной 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 рекомбинированными Ti-плазмидками в этих бактериях. Следовательно, при конструировании векторов на

основе Ti-плазмид необходимо делать в них сайт инициации репликации, обеспечивающий их поддержание в *E. coli*.

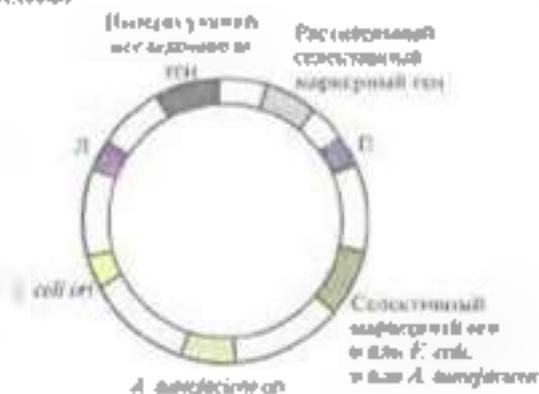
Несмотря на все эти сложности было сконструировано несколько векторов для растительных клеток. Все векторы на основе Ti-плазмид имеют юбаты «одинаковым» и имеют следующие элементы.

- 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 осуществляла сайты интеграции (используемый для *E. coli*, и для *A. tumefaciens*, но не может генерировать, т.е. это фактически маленький вектор *E. coli* *A. tumefaciens*). Все сайты клонирования при-

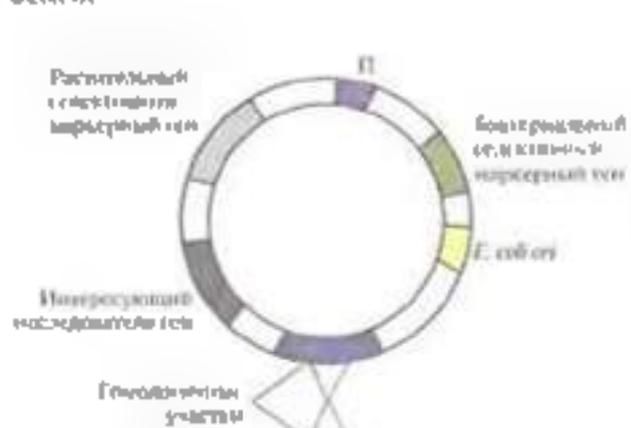
А

**БАЗИСНЫЙ ВЕКТОР**

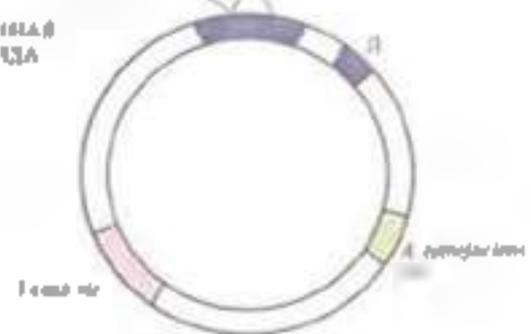


Б

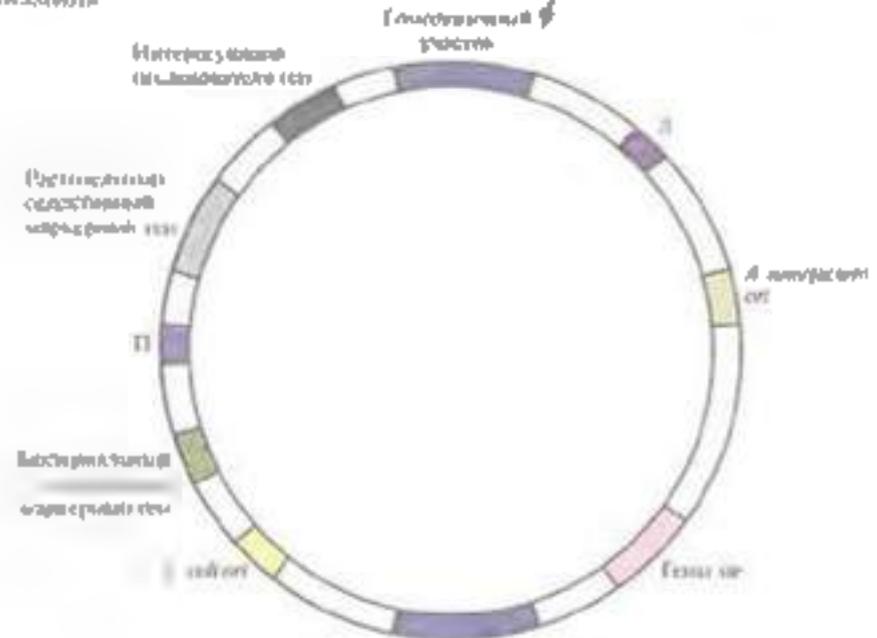
**КОНТИРАТИВНЫЙ ВЕКТОР**



**РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА**



**РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА**







**Таблица 17.2.** Трансгенные растения, полученные биотрансформацией растительных клеток с помощью вирусных векторов

Растение	Векторная система
Культура	Система репродукции клеток, содержащие вирусные векторы
Рис	Нерасеянные зерновки, содержащие вирусные векторы
Японский рис	Система клеток, содержащие вирусные векторы
Пшеница	Нерасеянные зерновки, содержащие вирусные векторы
Дрожжевые клетки	Векторная система
Пшеница	Микроорганизмы
Соя	Нерасеянные зерновки, содержащие вирусные векторы
Желтый рис	Нерасеянные зерновки, содержащие вирусные векторы
Грибы	Система репродукции клеток
Пшеница	Система репродукции клеток
Тростник	Культуры
Сычужный фермент и казеин	Система репродукции клеток
Корень	Нерасеянные зерновки, содержащие вирусные векторы
Линн	Культуры
Корень	Нерасеянные и виллы культуры
Пшеница	Пшеница
Дрожжи	Векторная система
Баклажан	Векторная система
Хмель	Векторная система
Виноград	Система репродукции клеток
Зерновые культуры	Векторная система
Линн	Пшеница

© M. J. Bevan, S. J. Olliver, and M. J. Bevan, eds., *Plant Cell Culture*, 1995.

с помощью этого метода были трансформированы гены в хлоропласты и митохондрии. На возможность микро-вспышек можно сослаться, поскольку ДНК, растапливаясь в буфере, это позволяет обеспечить частую трансформацию путем увеличения количества плазмидной ДНК, однако следует иметь в виду, что слишком большое ее количество могут оказывать губительный для клеток.

В трансформированных таких способом клетках, идентифицируемых по экспрессии маркерного гена, введенная ДНК зачастую экспрессируется лишь кратковременно. Пока чужеродной ДНК не встроится в геном растения, она с большой вероятностью утрачивается при делении трансформированных клеток.

Как и при трансформации так и при трансформации с помощью вирусных векторов, для того чтобы получить стабильные трансформированные растения, необходимо иметь вирусные векторы, которые способны реплицироваться в растительных клетках, а также содержать гены, кодирующие репродукцию вирусных векторов. Кроме того, по мнению некоторых исследователей, присутствие некоторых генов в их прекурсоры может приводить к

### 1. Функциональные трансформированные растения с помощью вирусных векторов

Для идентификации трансформированных клеток необходимо иметь обнаруживать «жужжащую» ДНК, интегрированную в геномную ДНК растения. Кроме того, при исследовании систем репродукции трансформированных и их функций, в специфических растительных тканях (листья, корни или цветы) зачастую можно видеть количество оценить уровень экспрессии гена, кодирующего легко идентифицируемый продукт. Все это требует применения репродуктивных генов, которые позволяют либо производить, либо трансформированных клеток, либо обеспечить активность кодируемого или ферментов. Было предложено несколько разных систем, которые можно использовать как доминирующие селективные маркеры, и генов, чей белковый продукт можно обнаружить с помощью специфических антител (табл. 17.2). Поскольку многие из репродуктивных генов имеют биотрансформационные свойства, они были слабыми регуляторными последовательностями, объективными для их экспрессии в растительных клетках. Производя отбор по доминантному маркеру, можно получить культуру, содержащую только трансформированные клетки. Так, в присутствии капазиновой антител только клетки растений, синтезирующих активную неоминифосфотрансферазу.

Выбор того или иного репродуктивного гена зависит от характера конкретного экспримента. Если экспрессия гена мешает нормальному росту растения, то это нельзя использовать как селективный. Кроме того, по мнению некоторых биотехнологов, присутствие некоторых генов в их прекурсоры может приводить к

Таблица 17.4. Исходы реинтерференции и селективных экспрессионных генов растений (400 мл, 2, 1994)<sup>41</sup>

Фермент	Исход реинтерференции селективных экспрессионных генов	Исход селективных экспрессионных генов
Нисинин	Да	Да
Гидролизин (фермент) (1) (2) (3)	Да	Да
Делигулиф (1) (2) (3) (4)	Да	Да
Хитиназы (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Глюкозидаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Нисинин (1) (2) (3) (4)	Нет	Да
Синтеза пектиназы	Нет	Да
$\beta$ -D-глюкозидаза	Нет	Да
Синтеза пектиназы (фермент) (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Фермент, синтез пектиназы (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Нет
Синтеза пектиназы (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Нет	Да
Уреаза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Медь (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
Фосфоэстераза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Нет
Фосфоэстераза (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8)	Да	Да
$\beta$ -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. B. 1992. *Plant Cell Culture*, p. 101-110. © R. K. & G. L. E. Plenum Press, New York, NY.

Гендер, Р. 1994. *Растения и их культура*. М.: Мир.

шарнирным коммерческим продуктом. В связи с этим лучше не надевать себя устойчивости к антибиотикам в селекционных растениях.

Некоторые продукты репортерных генов (например,  $\beta$ -D-глюкозидаза, а также люцифераза, синтезируемая бактериями и светлячками) можно обнаружить в клетках растительных тканей. И системы трансформации чаще всего используют ген  $\beta$ -D-глюкозидазы *gus*, cod (CUS ген). Он кодирует стабильный фермент, обычно отсутствующий в растениях, который кодирует растительные  $\beta$ -D-глюкозидазы. Его активность в трансформированных растительных тканях можно обнаружить по появлению синей окраски в результате гидролиза искусственно синтезированного субстрата, 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-глюкозидазы. Альтернативным более чувствительным методом количественной оценки активности Gus-гена в растительных тканях является анализ на определение концентрации флуоресцентного продукта гидролиза 4-метилюмбеллифераза- $\beta$ -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 растения. 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, фунгисинтезирующего по пест растительных тканей в течение всей жизни растения, эк-



необходимых фосфотрансферазы (pH) При этом экспрессия данного гена можно проконтролировать подбором канонических/стойчивых 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/высокой температуре или конститутивной промотора. Стимулы отбирают (и размножают) устойчивые клетки, а затем проверяют функциональную активность трансформанта 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-промоторы имеют мощную (иногда копируемую) часто используемую растительных системах слабую 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 эндосерные последовательности, расположенные на расстоянии от одной до нескольких сотен нуклеотидов до промотора, итроны, стабилизирующие m<sup>6</sup>PK, и сигналы терминации транскрипции

Были протестированы ДНК-конструкции, содержащие все или некоторые из следующих элементов: 35S-промотор, сигнал терминирующей транскрипции геномной матрицы (табл. 17.5); от одного до семи tandemных повторов эндосерных последовательностей (1), последовательности, которые предположительно усиливают экспрессию генов на уровне трансляции Наиболее эффективная конструкция содержала семь tandemных последовательностей (табл. 17.5). Протестированные промоторные конструкции контролировали экспрессию в трансгенных растительных культурах (табл. 17.5). Протестированные промоторные конструкции (местонахождение круга чужеродных генов) во всех случаях, вероятно, обманываются тем, что T-ДНК встраивается в разные сайты в геноме растения. Поскольку эти сайты, 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 хромосомную ДНК, длина которой примерно в  $10^4$ – $10^5$  раз больше Кроме того, необходимо чтобы чужеродные гены присутствовали во всех (у примерно  $10^4$  молекул хлоропластной ДНК, содержащихся в одной клетке)

Таблица 17.5 Генетически протестированные конструкции в трансгенных растениях<sup>1</sup>

Растение	4-кратный уровень экспрессии гена		Минимум одной копии промотор-гена	
	35S-промотор	сильный промотор	35S-промотор	слабый промотор
Табак	0,0	—	1,0	10,1
Рис	0,0	14,4	7,7	47,3

<sup>1</sup> Таблица Мейерс и др. Plant Cell, 1990, 2: 46–50 (1990).

<sup>2</sup> В этом случае от растения-трансформанта отбирают

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

табл. 17.5. Функциональность и эффективность промоторов в трансгенных растениях

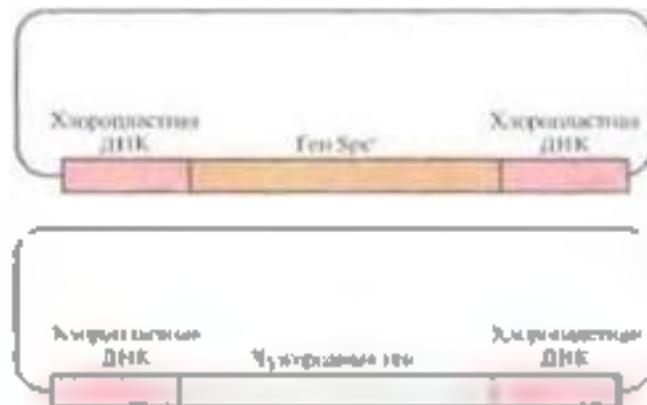
Рис. 17.2. Примеры типичных векторов, используемых для встраивания генов в хлоропластную ДНК. *Spc<sup>r</sup>* – ген устойчивости к спектромицину



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 которых 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 трансформаций проверяли на наличие продукта, детерминируемого геном устойчивости к хлоромицину (неселективным чужеродным геном). Удивительно, что примерно 50% спектромицинустойчивых трансформаций 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<sup>r</sup>* – ген устойчивости к спектромицину.





Чтобы использовать природную способность *A. tumefaciens* проникать в растительные клетки для доставки в них клонированных генов, были созданы модифицированные Ti-плазмиды. На T-DНК удаляли гены фитопансии и гены метаболита опухоли и встраивали эту же измененную T-DНК в плазмиду, способную стабильно существовать в *E. coli*. Встроенный в T-DНК ген-маркер помещал вместе с ней в агро растительной клетке-реципиенте. В случае биотрипной системы членистый вектор с клонированным в T-DНК геном вносил в клетки *A. tumefaciens*, несущие модифицированную плазмиду с геном, необходимыми для переноса T-DНК в клетку растения (агробактерии). Кроме того, разработаны конструированная система, которая предполагает введение членистого вектора в *A. tumefaciens*, где он рекомбинирует с несомкнутой Ti-плазмидой, несущей T-ген, с образованием одной плазмиды, в которой есть и функционирующие T-гены, и T-DНК с клонированным геном. Удаление T-DНК *A. tumefaciens* не создавало для переноса генов и растений. К сожалению, 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 усилить общегенетическую, были разработаны методы введения маркерных генов на трансгенных растениях.

## ЛИТЕРАТУРА

Ан С., Я. Ким. 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. Morth, L. Wilmshere. 1992. Gene tagging 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:  $\beta$  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. Perryman. 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. Nishimura, 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, M. Marchant. 1995. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotecnol Adv* 13: 631-651.
- Yan P., J. de Boyser, V. Bai Teng, H. Nakamura, Y. Hwang. 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 генная инженерия на растениях 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 ослепляющими химическими пестицидами (вместо того вырысывающие при этом привлекать от вредителей запах). Но идея эта, в 1995 г. на химические инсектициды во всем мире было израсходовано примерно 4 млрд долларов. Сколько 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 области которого проводил один из этих ингибиторов, было не способно переманить растительную ткань, потому что ингибиторы присутствуют 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 питается внутренними тканями растений, так что присутствие в тканях растений, растительные их способность растений, оказывается малоэффективной. Эту проблему можно решить, если обеспечить экспрессию генов ингибитора в самих растениях. Растительные ингибиторы в этом случае не потребуются и вредители не пойдут 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 нуклеотидная 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 протоксина попытались увеличить, осуществив экспрессию «полностью» измененного гена протоксина под контролем промотора гена малой субъединицы рибулосекарбоната-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 синтезируемый в них протоксин не передается пыльцой и семенами в потомство (АИНА, 1998). Кроме того, в 100 раз больше токсина синтезируют растения с геном протоксина с помощью на другие растения.

Одним из первых генов, введенных в растения, это экспрессируемый в тканях растений как в листьях табака, картофеля, грейпфрута, дыни, баклажана, капусты, перца, томата, сливы, вишни, винограда, клубники, ореха, цитрусовых, гороха и хлопчатника. Первыми были использованы методы «впрыска» растению в тканях в виде чужеродных ДНК, в трансгенных растениях картофеля осуществлена эффективная экспрессия синтетического гена на основе гена инсектицидного токсина *B. thuringiensis* var. *kentuckyensis* с помощью словарем, используемым растениями. 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 трансгенные растения, несущие ген протоксина *B. thuringiensis* под контролем PR-1a-промотора, химическим индуктором, обнаружил, что они синтезируют инсектицид в





Рис. 18.4. Зависимость эффективности трансформации *Arabidopsis thaliana* от концентрации трансформационного комплекса (Cohen et al., *Plant Cell Methods*, vol. 4: 239–244, 1994.)

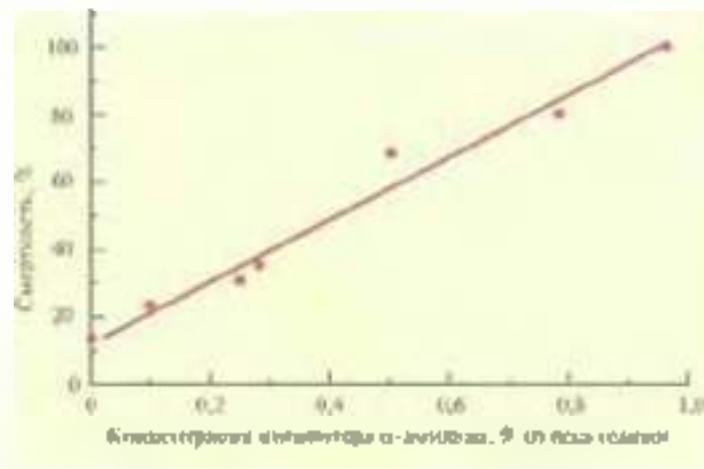
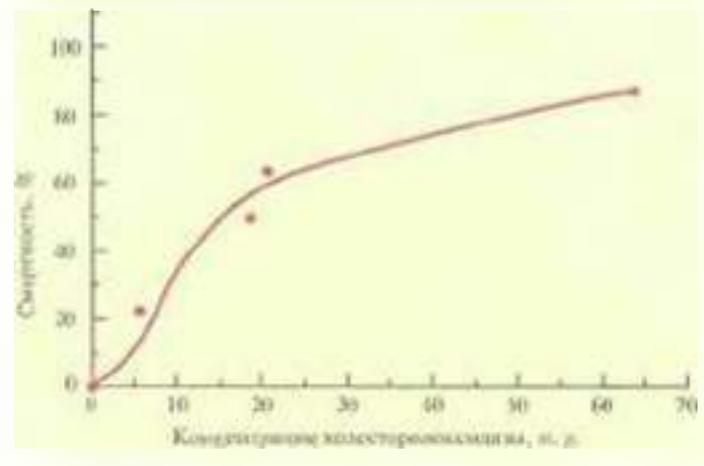


Рис. 18.5. Зависимость эффективности трансформации *Arabidopsis thaliana* от концентрации трансформационного комплекса (Cohen et al., *Plant Cell Methods*, vol. 4: 239–244, 1994.)



эпоксилипиды, кодируемые белок мол. массой 75 кД (75 аминокислотных остатков) и липопротеин липид мол. массой 300 кД (43 аминокислотных остатка), был выделен из штамма *Sterigmatocystis* и встроил в вектор вместе с промотором вируса мозаики индустриальной шпинатового и сплайсом термостабильности из 3'-области гена полипептида *A. fumigatus*. Когда такую конструкцию ввели в протопласты клеток табака, трансформированные клетки стали активно экспрессировать холестероластеразу. В будущем, вероятно, этот ген будет введен в растения хлопчатника либо совместно, либо в комбинации с геном других биологических инсектицидов — он станет эффективным инсектицидом защиты растений от насекомых-вредителей.

### Растения, устойчивые к вирусам

Вирусы растений часто причиняют значительный ущерб сельскому 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 вирусным инфекциям обусловлен как разными причинами (блокированием проникновения вируса в растение, прелогарнизацией 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 увеличивает эффективность 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 вируса<sup>1</sup>

Растение	Вирус — патогенное тело
<i>Antennaria dioica</i> , A	Вирус скрутки махров цветка
A <i>Antennaria</i> , цвето	Вирус 3 летняя яблужа
A <i>Antennaria</i> , цвето	Вирус летней махровой саблевидной
Пшеница, табак	Трансгенно индуцирует устойчивость
Картофель	Вирус мозаичности картофеля
Картофель	Вирус 3 картофеля
Картофель, <i>Solanum tuberosum</i>	Вирус 5 картофеля
Картофель, табак	Вирус 4 картофеля
Рис	Вирус рисовой мозаики
Табак	Вирус табачной мозаики
Табак	Вирус мозаики табака
Табак	Вирус мозаики табака
Табак	Вирус мозаики табака
Табак, картофель	Вирус мозаики картофеля
Табак, огурец	Вирус мозаики огурца
Табак, A <i>Antennaria</i>	Вирус мозаики табака
Табак, томаты	Вирус мозаики томата
Сладкий перец	Вирус мозаики перца

<sup>1</sup>Из аннотации к статье *Antennaria dioica* в журнале *Plant Cell* 1991, 3: 1161.

Для сравнения эффективности подходов, основанных на использовании вирусного гена белка оболочки, с одной стороны, и антисмысловой РНК — с другой, клонировали кДНК белка оболочки вируса мозаики огурца (СoMV) 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 CoMV 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 антисмысловую РНК, вкратце следующие

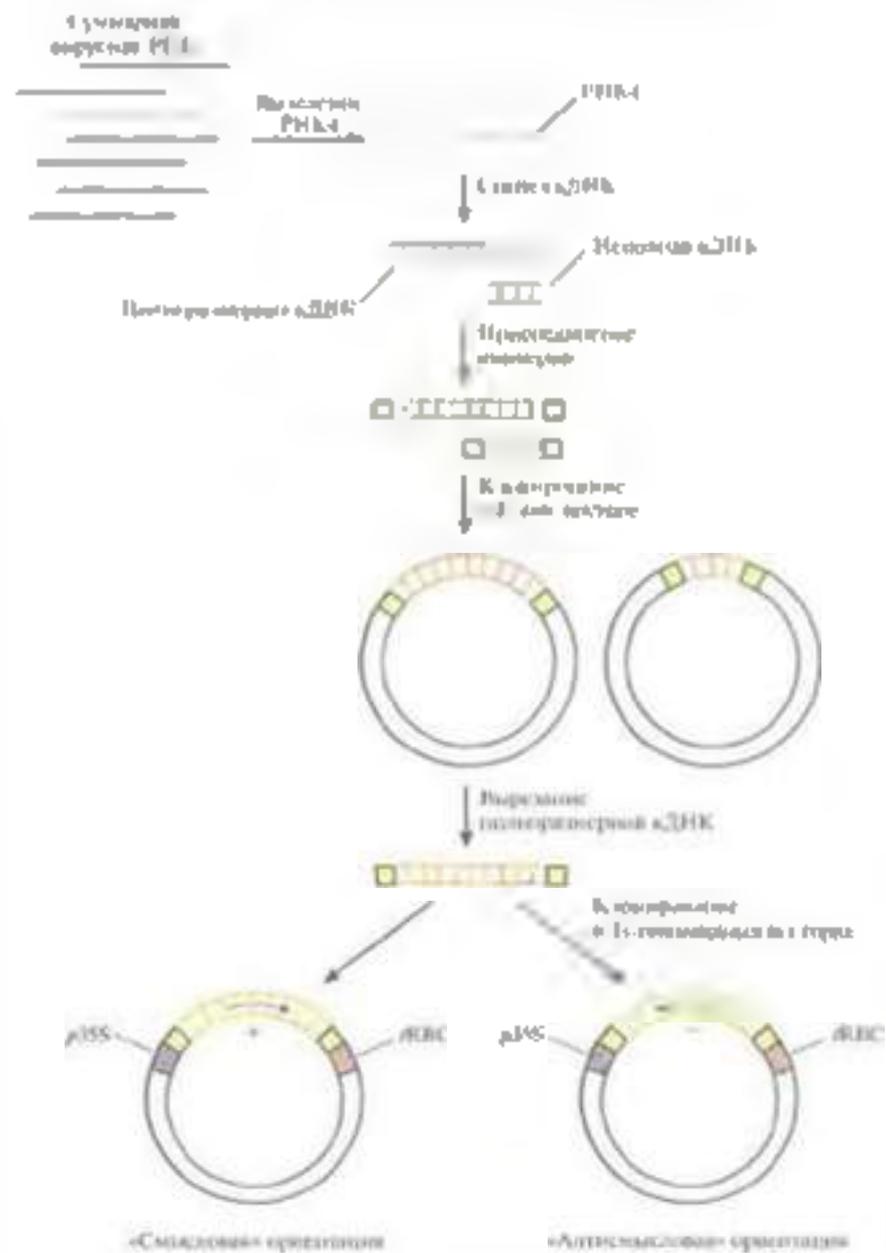


Рис. 11.6. Процедура введения  $cDNA$  белая оболочка вируса табачной мозаики (ТМВ) в растительный клеточный РНК4. РНК4 кодирует эту белую оболочку, взаимодействуя со суммарными (фрагментами) вирусной РНК и взаимодействуя в качестве матрицы для синтеза двухцепочечной  $cDNA$ . К  $cDNA$  присоединяют универсальные последовательности и инсертируют ее в вектор (например  $\lambda$  *cat*-и плазмиды *ColE* или *klona*, содержащие генетическую информацию  $cDNA$  врезанная в  $\lambda$  *cat* или плазмиду и инсертируют в T<sub>0</sub>-изменчивый вектор между 35S-промотором и геном млекопитающих (известной области ( $\rho$ 35S) и сигналом терминации транскрипции гена млекопитающих (рибулосибисфосфат-карбоксилазы (rbcL)). При этом  $cDNA$  РНК4 встраивается в двух ориентациях, так что в этом случае транскрипция осуществляется с помощью РНК и синтезируется белок оболочки, в другом образуется РНК, антикомплементарная РНК белая оболочка. — антикомплементарная РНК

1. Введение РНК4
2. Ферментативный синтез  $in vitro$   $cDNA$  на РНК4.
3. Присоединение к  $cDNA$  универсальных последовательностей
4. Встраивание полинуклеотидной  $cDNA$  в вектор для клонирования в обеих ориентациях, в каждой из которых она находится под контролем 35S-промотора вируса мозаики (известной области

5. Регенерация отдельных трансгенных растений, в геном которых встроены  $cDNA$  в одной из двух возможных ориентаций

Для введения  $cDNA$ , кодирующей белок оболочки (белок-капсидную) и антикомплементарную



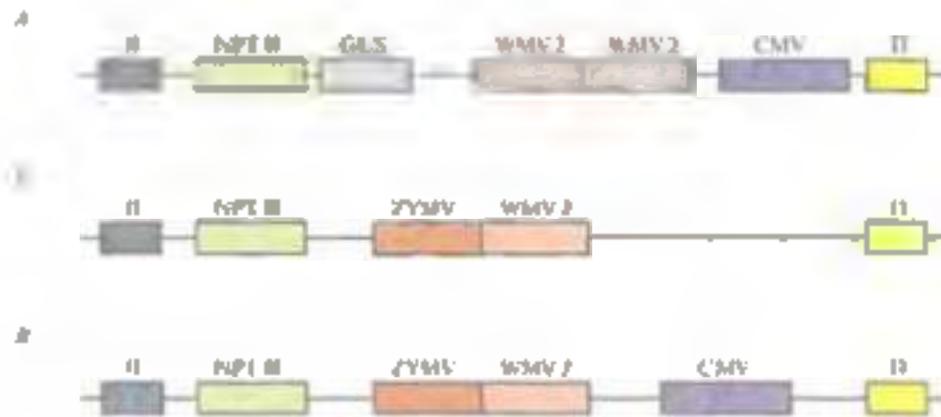


Рис. 18.8. Т-ДНК, несущая ген нонинфосфорилтрансферазы (NPT II) в качестве селективного маркера, ген β-окси-α-уринидазы (GLS) в качестве репортерного гена, две копии гена оболочки вируса 2 оболочки арбуза (WMV2) и ген белка оболочки вируса мозолистого огурца (ZYMV). Печень и почка филляриоза не последовательности 1-911 К обоим участкам A и B соответствуют B. Конструкция, отличная от конструкции A, но без CMV и NPT II, содержала одну копию WMV2 и ген белка оболочки вируса желтой мозоли кабачков (ZYMV) B. Конструкция, отличная от конструкции B, но содержащая CMV. Во всех трех конструкциях присутствуют соответствующие промоторы и сигналы терминирующей транскрипции

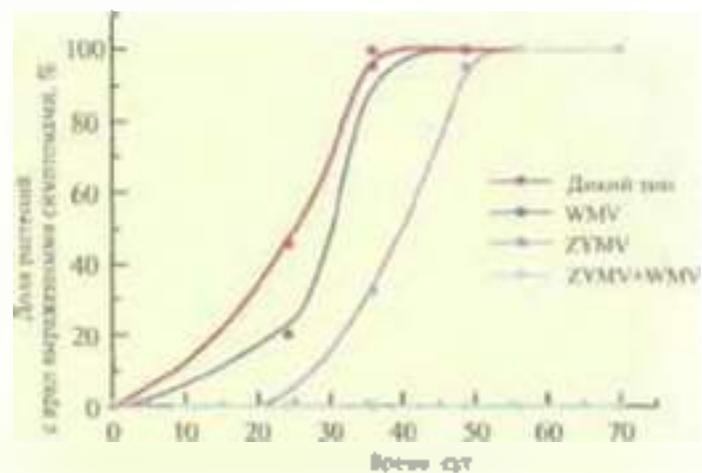


Рис. 18.9. Частота заболеваний транзгенных растений в листовых вырезках тканей и растительного материала в полевых условиях. Для контроля растениям только смесь вируса желтой мозоли кабачков (ZYMV) и вируса 2 оболочки арбуза (WMV) использовали как (по данным работы Lucysh, Gomysh, *Вис/Генетика* 13: 1466-1471, 1995.)

но в конце концов все симптомы вирусной инфекции проявляются, и растение утрачивает конкурентную способность. Итак, ясно, что наиболее эффективной стратегией при выведении транзгенных растений, устойчивых ко всем основным вирусам, занимающим нишу роста и развития, является введение в них нескольких генов, детерминирующих синтез белков оболочки вируса

Имеется предварительных данных о том, что транзгенные растения, в которых экспрессиру-

ются вирусные гены, отличные от генов белковой оболочки (например, ген вирусных капсидных РНК или ген репликационного вируса), также оказываются в какой-то мере защищенными от вирусных инфекций, но насколько эффективными и применимыми будут соответствующие подходы, пока неясно.

Защита растений от вирусных инфекций может осуществляться не только на уровне экспрессии генов вирусных белков, но и при участии противовирусных белков, синтезируемых самим

ми растений. Например, в клеточном соке фитопланктера *Mythobolga obovatona* 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 или выделенных чистой формой. Если небольшое количество РАР нанести на листья других растений, то полезнее также оказуются устойчивыми 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 вида *Грансформанты*, симметричного РАР в большом количестве (>100 мг (1 мг суммарного белка), быти чашками, платиными и бестимляемыми, растения же с более низким содержанием РАР (1–5 мг 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 малом количестве, 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 <sup>14</sup>С-обильные хотя бы некоторые из этих видов, 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 выделение присутствовал физически в присутствии гербицида
- увеличить способность белка, чувствительного к гербициду, в синтетическом или
- обеспечить взаимодействие гербицида и растении в ходе метаболизма

Из этих способов были реализованы три последние. Выделение с их помощью гербициды устойчивые трансгенные растения перечислены в табл. 18.4.

Уменьшение поглощения растения, устойчивые к глифосату (гербициду, быстро разлагающемуся в почве из-за нестойкости составлению и потому безопасному для окружающей среды). Глифосат является ингибитором 5-эмолипуриновой кислоты (фосфатсинтазы (EPSPS) фермента, осуществляющего роль в синтезе ароматических аминокислот у бактерий, и у растений. Из глифосату соответствующим образом *E. coli* был выделен ген коинвазии (EPSPS, плазмиды для контроля растительного промотора и синтеза терминальных транскрипционных/полноразмерных 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 бромаксифена (3,5-дифенил 4-пид

рессибициоптрином) – грибоциды, которые ингибируют фитооксигеназу. Устойчивые растения созданы путем селекции и их генном биотехнологическом тегин, кодирующем интрипалзу, которая ингибирует бромоксианала спаз до того, как он начинает действовать (рис. 18.10). На почвенной бактерии *Klebsiella aerogenes* был выделен ген интрипалзы, помещен под контроль спериусти-интесимого промотора гена малой субъединицы

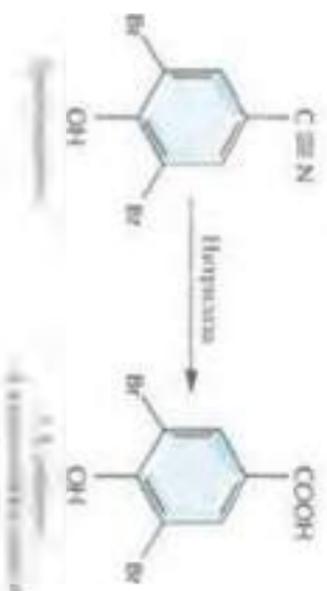


Рис. 18.10. Ингибирующая активность интрипалзы при ингибировании бромоксианала

рибулозобифосфат-карбокситилазы и гидрокси-тенной тилазы. Трикетониды растений синтезируются актиноидо интрипалзу и белки устойчивы к бромоксианату.

**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 порожения грибом, вызывающим пиренуларный, одного из основных злаковых тогов рениона, риса, составляют примерно 5 млрд. долл. в год. Сейчас основной способ борьбы с фитопатогенными грибами состоит в обработке растений химическими 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 в *Agrobacterium tumefaciens* для трансформации протопластов риса. Трансформации осуществляли обработкой протопластов малыми количествами в присутствии плазмидного вектора. Затем *Agrobacterium tumefaciens* клонировали, устойчивые к гентамицину, и проводили тестирование кластерных генов устойчивости к грибным болезням риса с помощью трансформации по Сабурину и на наличие одной или нескольких меток в кластере-блоттинга. Далее из кластера реинтергрировали целые растения

Часть в ответ на патогенные патогенов растения начинают синтезировать группу специфических РР-белков (от англ. pathogenesis-related proteins). В эту группу входят  $\beta$ -1,3-глюканазы, хитиназы, гуаматинподобные белки (таумалины – нефбелавин, 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  $\beta$ -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, вделанные в растительный генетический материал, были вставлены под контроль 35S-промотора вируса мозаики табачной культуры. Кроме того, были созданы трансгенные растения табука, которые конститутивно синтезировали не только хитиназу, но и  $\beta$ -глюканазу. Такие растения были получены скрещиванием одного трансгенного растения, экспрессирующего ген хитиназы, с другим, экспрессирующим ген  $\beta$ -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 zeae* прикрепляться к корням растений никак не нарушалась. Выяснилось, что если вино с различными в составе клеточных стенках липидных 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 solanum*, 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 выведения устойчивых коммерчески сортов. Чтобы решить эту проблему, ученые исследователи начали трансгенные растения картофеля, активно экспрессирующие ген антиметаболита бактериофага T4. При этом лизисом сформировались в апоцитазе (межклеточное пространство), компартмент, в который проникает и где распространяется *E. carotovora*. Чтобы обеспечить специфичность секрета, к гену антиметаболита T4 был инсертирован последовательность, кодирующая специфический сайт от антиметаболита, и ген помещен под транскрипционный контроль 35S-промотора вируса мозаики табачной культуры, сигнала терминации транскрипции и сайта полиаденилирования. Хотя ген антиметаболита находился под контролем столь сильного промотора, синтезировалось лишь небольшое количество липидов. 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 ВЕЩЬ

### Светоиндуцируемая экспрессия химерного гена, введенного в *Nicotiana tabacum* с помощью T1-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 T1-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 трансформации контроль синтеза вирусного 35S-промотора вируса мозаики листовой капусты или иного менее сильного конститутивного промотора гена новалтиситаза, сконструированного в некоторых T-DНК. 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 плода или образования пахучих или уловных высокомолекулярного стрессовых веществ. Первый шаг к введению такого растения был сделан Херрера-Эстреллой с сотрудниками, которые сконструировали химерный ген, состоящий из участка алемелиты, 5'-флакокарионный участок гена малой субъединицы рибулобисфосфат-карбонилкиназы генов, кодирующей участок бактерияльного гена хормонфенилал-ацетиленового гена 3'-флакокарионный трансфермаз 3'-флакокарионный участок гена новалтиситаза, состоящий из участка генов новалтиситаза, транскрипции и регуляции тран-

скрипции мРНК. Обычно ген малой субъединицы рибулобисфосфат-карбонилкиназы экспрессируется только в листьях или фотосинтезирующих тканях, как и ожидалось, тем же экспрессировался ген химерного алемелиты-трансфермаза. Это было одно из первых работ, показавших, что, несмотря на всю свою сложность, растительные промоторы способны обеспечивать синтез генетически белков в строго определенных тканях. Впоследствии различные растительные промоторы широко использовались для регуляции экспрессии генетически генов в трансгенных растениях в нужных 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 используется в качестве индикатора, это позволяет различать различные штаммы бактерий. Кроме того, поскольку люциферин используется в качестве индикатора, это позволяет различать различные штаммы бактерий. Кроме того, поскольку люциферин используется в качестве индикатора, это позволяет различать различные штаммы бактерий.

### Получение растений, устойчивых к болезням и вредителям

В отличие от большинства животных, растения физически не могут защитить себя от неблагоприятных воздействий со стороны окружающей среды. Высокой освещенности, ультрафиолетового облучения, высокой температуры и концентрации солей в Т. А., поэтому в процессе эволюции у них выработались физиологические механизмы противоборьбы с экстремальными условиями. Одним из способов борьбы с болезнями и вредителями

кислорода. Разумно было предположить, что если удастся создать растения, толерантные к большому содержанию радикалов кислорода, то такие растения смогут противостоять различным неблагоприятным воздействиям.

### Окислительный стресс

Наиболее распространенным радикалом кислорода, представляющим опасность для растений, является супероксид-анион. 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 супероксид-дисмутазы под контролем 35S-промотора вируса мозаики табачной мозаики. Они синтезировали супероксиддисмутазу и были устойчивы к повреждающему действию радикалов кислорода.

У растений имеется несколько изоформ супероксид-дисмутазы.



Рис. 18.12. Последовательное супероксид-дисмутаза и каталаза в гербициде метохлол в присутствии воздуха и кислорода

мутины содержатся в равных количествах в контрольных и в обработанных количествах в присутствии Mn-супероксид-дисмутаза локализуясь в митохондриях в некоторых растениях синтезируют Fe-супероксид-дисмутаза. Трансгенные растения табака, несущие гДНК хлоропластной *Cu/Zn-супероксид-дисмутаза* под контролем 35S-промотора вируса мозаики папируса *Nicotiana glauca*, были гораздо более устойчивы к яркому свету, чем нетрансформированные растения. Обнаружено, что фотосинтетическая активность у трансгенных растений снизилась на 94% в условиях, при которых нетрансформированные растения полностью погибли. Трансгенные растения, синтезирующие Mn супероксид-дисмутаза, аккумулируют меньше хлорофиллов, были в три-четыре раза менее чувствительны к повреждению листьев, чем контрольные нетрансформированные.

Полынь (однолетнее супероксид-дисмутаза) даже еще одно преимущество растения становится более устойчивым к гербициду метохлол (в присутствии света). Супероксид-дисмутаза способствует также образованию (включая) при трансформации. На основании выше описанных в результате образования радикалов дисоксида. Если бы удалось создать трансгенные растения, содержащие ген супероксид-дисмутаза, который экспонируется под контролем промотора, специфичного для клеточной, то можно было бы стерилизовать растение.

### Сложные эфиры

Многие растения произрастают в регионах, где часто бывают засухи или где сильно засолены почвы. Чтобы приспособиться к этим условиям, они синтезируют метилсалицилатные метоксигруппы вместе с фенолпропаноидными. Эти вещества способствуют потере воды и увеличению воды, а также предотвращают разрушение тканей

растворившись, присутствующим в клетках растений, под действием выделенных в окружающей среде. Фенолпропаноиды включают также хлорогеновые кислоты, катехины, или сальвар, сальвары, пропани и четвертичные соединения выделены. Многие из высокоэффективных осмотических агентов в бетани, который накапливается в некоторых растениях во время засухи или при высокой засоленности.

Некоторые растения сарискоидные являются культуры, в том числе артишок, рис, томаты, их стебли можно использовать в бетани. Уменьшить такие растения можно было бы введением в них генов, кодирующих ферменты синтезирующие бетани как у растений, так и у бактерий бетани синтезируется в основном в эпидермисе (рис. 18.13). У этих растений, как у шпината, присутствие воды в бетани, а также увеличивается количество антоцианов, а впоследствии присутствие в бетани бетанидегид-гидроксилазы. У бактерий гена *F. coli* в бетани каталитическая активность ферментов увеличивается в 100 раз. Это можно использовать для создания сортов табака, была использована *A. tumefaciens* для трансформации растительных клеток бетани (табак) на основе Ti плазмид, несущим ген *bet F. coli*, который кодирует полидегидрогеназу, ген экспонирован под контролем 35S-промотора вируса мозаики

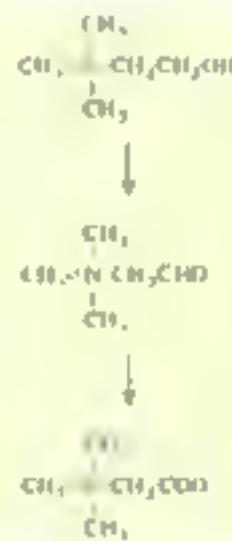


Рис. 18.13. Преобразование метана в бетани.



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-хлоропласты, 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. Эти ферменты АСС-декарбоксилазы, выделяемые из одного штамма штамма, были использованы для контроля 35S-принципио вируса мозаики шестилепестковой и встраивали в геном томата. Полученные растения синтезировали тиамина тиамина, чем и отличались, 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 создавать растения растений которых имеют более привлекательный внешний вид и лучше сохраняются после сбора, как из срезу? С помощью традиционных методов скрещивания в течение годы были выведены тысячи новых сортов, отличающихся друг от друга цветом и формой шестков. Однако скрещивание растений — это трудоемкий процесс, требующий много времени и значительных затрат усилий, связанных с генным пулом хвостовидной дыни. Поэтому, например, никому не удалось вывести шестковидную дыню. В качестве альтернативы для выведения шестковидных шестковидных можно использовать методы, основанные на использовании генов ферментов биосинтеза дитиоаминокислот. Амилосинтазы, соединенные классом флавоноидов, являются наиболее распространенными биогенными шестковидными

синтезируются из аминокислоты (фенилаланин) и могут использоваться ферментативных реакций. Структура шестковидных определяется количеством соединений (в основном шестковидных), при этом производимые соединения ответственны за красный цвет, а производимые за шестковидный — за синий (рис. 18.15).

Дигидрофлавонол-4-редуктаза пестуны катализирует превращение бесцветного антоцианидиновидного в антоцианин-3-гликозид, соединенные красным цветом, а бесцветного дигидрофлавоноидина — в синий дельфинидин-3-гликозид, но не может использоваться в качестве субстрата бесцветного антоцианидиновидного (рис. 18.15). Однако после трансформации пестуны (своем дигидрофлавонол-4-редуктазы кукурузы) ее шестки приобрели ярнично-красную окраску. Этот необычный цвет, возникающий у пестуны из выделенных, обусловлен синтезом и трансгенном растении антоцианидиновидного-3-гликозида из дигидрофлавоноидина.

Примерно 70% объема пестуны (пестуновость) производится из дыни хвостовидной (рис. 18.15). Дыня, выделенная и хранится, поэтому все шестковидные (полученные селекционно трансформированные растения) с шестковидной окраской были направлены на работы совместно с дыней растениями. Например, были выделены трансгенные растения, несущие синтетические и естественные конструкции генов хвостовидной дыни. Этот фермент шестковидной дыни стабильно функционирует в хвостовидной дыне (рис. 18.15). Ученые надеются и того, что в следующем, и генетически модифицированные гены хвостовидной дыни (пестуны) «модифицируются», позволяющая дыня «комурированность», соединить и том, что в присутствии антоцианидиновидного соединения шестковидные растения могут использоваться для производства шестковидных шестковидных. Однако, например, никому не удалось вывести шестковидную дыню. В качестве альтернативы для выведения шестковидных шестковидных можно использовать методы, основанные на использовании генов ферментов биосинтеза дитиоаминокислот. Амилосинтазы, соединенные классом флавоноидов, являются наиболее распространенными биогенными шестковидными

Синтез и антоцианидиновидных соединений, полученных из дыни хвостовидной 35S-принципио вируса мозаики шестковидной дыни, были направлены на выделение вектора (в основе T1-ген) и выделены в клетки растений. У дыни из 133 «мозаичной» трансформированной и при (1) 83 «мозаичной» шестковидной дыни без дыни, что указывает на возможность «мозаичной» шестковидной дыни хвостовидной дыни.



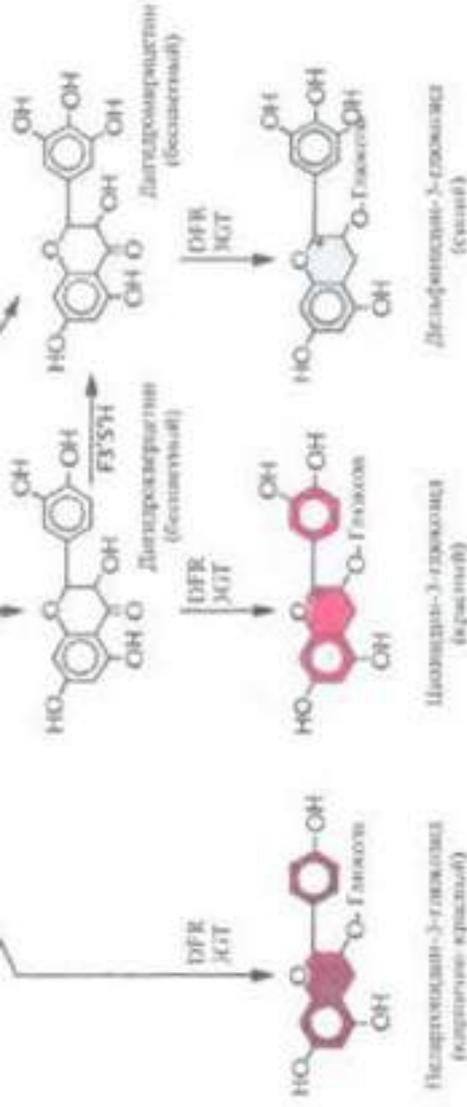


Рис. 18.15. Биосинтез антоцианинов. Сокращения: CHS – халконилсинтаза, СНН – халконилтрансфераза, F3H – флавонон-3-гидроксилаза, F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза, F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза, DFR – дигидрофлавоноид-4-редуктаза, 3GT – UDP-глюкоза: флавоноид-3-О-глюкозилтрансфераза. DFR действует самостоятельно катализируя превращение дигидрофлавоноидов в катехины-3-глюкозиды, а дигидрофлавоноиды – в дельфинидин-3-глюкозиды, соответственно синтез из дельфинидин-3-глюкозида, соответственно кверцетин-3-глюкозида, соответственно кверцетин-3-глюкозида.

## Изменение пищевой ценности растений

Т. е. подолжение синтеза антоцианина. Выступают с белыми цветками вегетативно размножаемые черенками и полувзрослых и примерно у 50–95% из них происходит образование белых, а не розовые цветы. Эта работа является важной основой в изучении новых сортов (сорта с необычной окраской), представляющих интерес.

За многие годы агрономы и селекционеры добились больших успехов в улучшении качества и повышения 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 питательными 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 сайта трансляции, то ее структура не нарушается. Прямой метод введения генов остается и при создании семян.

Чтобы увеличить содержание лизина в семенах, была предпринята попытка изменить регуляторно-белковую часть, Аминокислоты лизин, пролин, метионин и гистидин синтезируются из аспарата (рис. 18.16) в нескольких этапах. Первый этап состоит в фосфорилировании остатка аспарагина (АК) с образованием  $\beta$ -аспарагилафосфата. Далее, при фосфорилировании, происходит выделение аспарагинафосфата  $\beta$  по механизму с протонированием кислотной, катализируемой сильной динитрофенолсульфовой кислоты (DNDS). Регуляция объема ферментативной активности (АК и DNDS) осуществляется с помощью гена по принципу обратной связи, которую нужно изменить, чтобы синтез лизина ничем не ограничивался. Для этого использовался ген DNDS 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 маркером и вносили их в растение кукурузы и сеи в составе бинарного вектора на основе  $\text{Ti}$  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 неи добавляют соевую муку и очищенный лизин. Однако вместо этого чтобы использовать пороговую 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 имеет бы большую пищевую ценность.

#### *Липиды*

По оценкам, в 1995 г. во всем мире было выращено растенийенного масла на сумму примерно 45 млрд долл., а в 2010 г. — в четыре раза

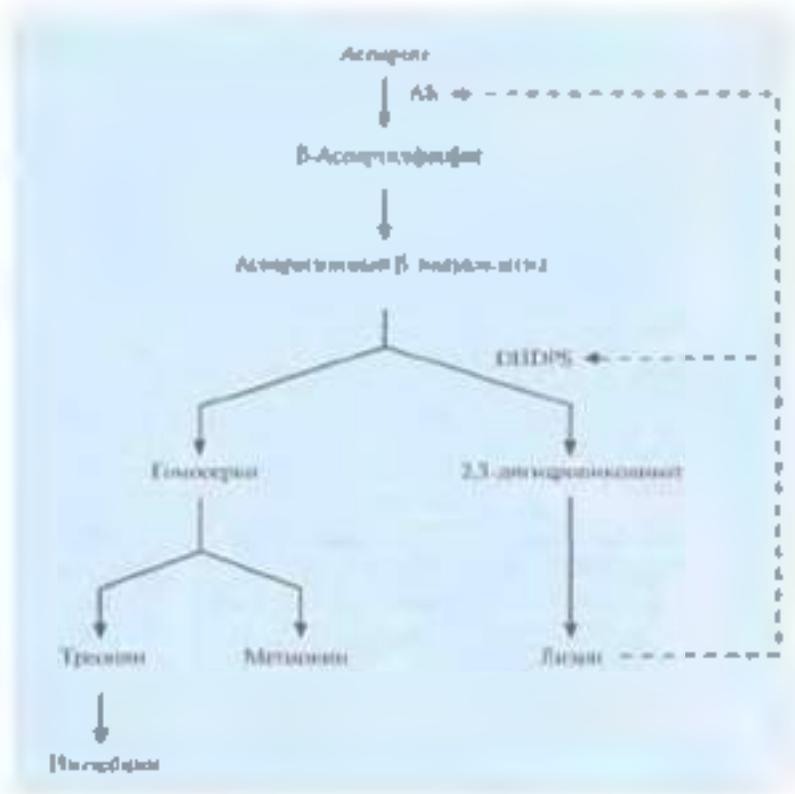


Рис. 18.16. Схема функционирования цикла триглицеридов: триглицериды являются (здесь представлено не все реакции и формы жирных продуктов) триглицеридными структурами, которые синтезируются по принципу обратимости с  $\text{OHDPS}$  – состоят из гидроксилированных жирных кислот. АК – ацетил-КоА



Рис. 18.17. Pl-плазмидный вектор, используемый для трансформации *coli* и клеток с целью получения сферопластов животных и растительных. P<sub>S</sub> – промотор гена β-галактозидазы, P<sub>U</sub> – сигнал терминирования транскрипции гена β-галактозидазы, SD – последовательность, обеспечивающая эффективное связывание с инициатором трансляции рибозонобидеосом-карбосмакта, *ori* – ген *ColE1* системы, кодирующей систему гидроксилированной кислоты, не чувствительной к линцину, *hly* M4 – муравьиный ген *hly* I *coli*, кодирующей не чувствительную к линцину ацетил-КоА. M – место и время клонирования олигонуклеотидности T-DNA соответственно

70 млрд тонн более 90% масла производится на протяжении маргарина, а также масла для салата и для жарки. Примерно 75% всех масляных культур производится на полях США, включая пшеница (выжимка) и рапсовое масло, а получаемые из них масла состоят главным образом из следующих жирных кислот: пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой (табл. 18.5).

С помощью генов триглицеридов можно изменить степень насыщенности (т.е. число двойных связей C=C) и длину цепи этих кислот. Была создана и проверена в колоне устройств множество триглицеридных смесей, которые синтезируются из смеси с насыщенными жирными кислотами (табл. 18.6). Каждый триглицеридный сорт содержит один или несколько *tail* ген. Например, растительные, синтезирующие в



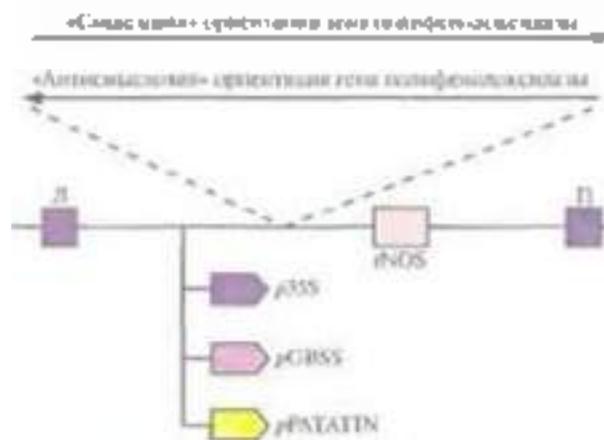


Рис. 18.18. Конструкция от «самосинтеза» и «антисмысловый» ориентацией гена терминации/активации. Транскрипция в обоих случаях осуществлялась под контролем одного из промоторов 35S-промотор вируса мшиной клеточной культуры (p35S), ориентация терминации/инверсии/активации гена (pSTATIN) или промотора гена терминации I (pSTATIN), а также сигналами терминации транскрипции гена инверсии/активации (pNOS). A и B – левая и правая ориентация гена соответственно. (По данным работы Виллетт *et al.*, *Bio/Technology* 12: 1101–1105, 1994)

трансформированные линии конструктивными, были высокоустойчивы к черной пятнистости (ферристаллическое изменение цвета), причем уровень устойчивости был (порядка) выше, чем тот, которого удавалось достичь при обычном скрещивании. Трансгенные растения, экспонированные в условиях заражения, предвещают по-прежнему, в этом отношении не устойчивости к черной пятнистости. Большинство трансгенных растений, в том числе которые присутствуют в генетическом материале гена инверсии/активации, инверсия гена контролирует либо 35S-промотор вируса мозаики картофеля культуры, либо промотор гена сигнала транскрипции/активации хромозома были значительно более устойчивы, чем нетрансформированные. Активные промоторы гена терминации и клубных картофеля, По-прежнему, представляется лишь частично, и накопление полифенилоксидазы не блокировалось. Все растения, содержащие смысловые конструкции, синтезировали полифенилоксидазу в большем количестве и были подвержены поражению в большей степени, чем контрольные. Хотя все эти результаты имеют существенное значение

характер, инверсионный инверсия может оказаться полезным для борьбы с ферментативными изменениями цвета клубню картофеля, 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» продуктов можно улучшить в процессе «приспособления» добавлением соли, сахара, аромата специй или других добавок, однако с экономическими целями этого было бы лучше, если бы натуральные продукты имели бы естественный вкус/ароматизацию естественными веществами и выглядели более аппетитно.

В случае картофеля гены *Glucanase* и *Starch synthase* (StS) содержатся в клубнях картофеля, примерно в 100 000 раз более сладкий, чем сахарный в эквивалентном количестве. Этот белок является важным компонентом вкуса, следовательно может служить индикатором вкуса, следовательно, и тем преимуществом, что, не являясь углеводом, он не должен оказывать вредного воздействия на метаболизм.

Моделью для двухцепочечной ДНК: A – цепь состоит из 45 аминокислотных остатков, B – цепь – из 50. Цепи связаны между собой слабыми нековалентными связями, и это определяет его структуру и качество взаимодействия, поскольку при нагревании в процессе приготовления пищи или под действием кислоты (например, лимонной или уксусной) он легко диссоциирует и теряет свой сладкий вкус. Задача создания трансгенных растений или микроорганизмов, способных синтезировать белки, усложняется тем, что необходимо контролировать и координированно экспрессировать два отдельных гена. Чтобы решить эту проблему, был генетически синтезирован ген моделирующей структуры A- и B-цепей как один интронный белок. Были созданы трансгенные растения тыльной и клубня, синтезирующие гибридный белок. Для этого использовался для ретинида промотор. В случае клубня это был ER-промотор, специфичный для клубня и активирующийся в самом начале их созревания. В растениях клубня ген находился под контролем 35S-промотора вируса мозаики картофеля. В обоих случаях не использовались сайты терминации

транскрипции/репликации генов подоплицитата в составе T1-плазмиды. Синтетический ген кодирует белок, входящий в растительные клетки инфицированными эк *A. tumefaciens*, используя конъюгативную векторную систему на основе T1 плазмида. Моноклона был обнаружен в делях и частично делях шпалах и в листьях салата, но не в тканях картофеля, при этом его содержание в томате повышалось при резком повышении концентрации растительного гормона этилена. Сообщения о успешных попытках искусственных качества генетически модифицированных пищевых продуктов пока отсутствуют, но если результаты окажутся令人满意ными, то искусственный способ производства такой пищи 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 конечного 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-гидроксибутирата, 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, и во время как домашнее растение микроскопически трансформируется плазмидами, которые могут утрачиваться в виде д-плазмидной или крупномасштабной ферментации. Кроме того, процессы и укладки углеводов белков в растениях значительно точнее в живых клетках, и во 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. И 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-гидроксибутирата 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-гидроксибутират синтезируется из ацетил-С<sup>14</sup> в три стадии, катализируемые тремя ферментами (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 поли-β-гидроксибутирата были присоединены фрагменты ДНК, кодирующие хлоропластную сигнальную последовательность малой субъединицы рибулосом-бисфосфат-карбоксилазы (сфрб), и каждый ген был помещен под присоединенный контроль 15S-пробатора вируса мозаики шестой капс-

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  $\beta$ -гидроксибутирата. В зрелых листьях некоторых трансгенных растений, экспрессирующих все три бактериальных гена, синтезировалось более 1 мкг поли- $\beta$ -гидроксибутирата на 1 г сухой ткани листа. Эту работу можно считать первым важным шагом в создании сельскохозяйственных культур, которые можно использовать для получения в больших количествах поли- $\beta$ -гидроксибутирата.

#### Чужеродные белки, аккумулирующиеся в семенах

Овещины или белки жидких телец, содержатся в семенах различных растений. Они весьма гидрофильны и стабилизируют масляные телца как дискретные структуры. При этом на N- и C-концевые участки белков гидрофильны, чем образуется «область молекулы», э жесткой рамкой в водном окружении. Поскольку генетическая инженерия, можно попытаться создать реком-

бинантные белки из овещинов и полиэфирформных белков (рис. 18.19) рекомбинантные белки будут аккумулироваться в масляных телцах, что является относительно легко их очистить. При этом полиэфирформный белок будет неочищаемым в водном окружении, и при необходимости его можно будет отделить. Это является многообещающей процедурой 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, растения, имеющие более высокую устойчивость к засухе, 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. Многочисленные 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. James, 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.

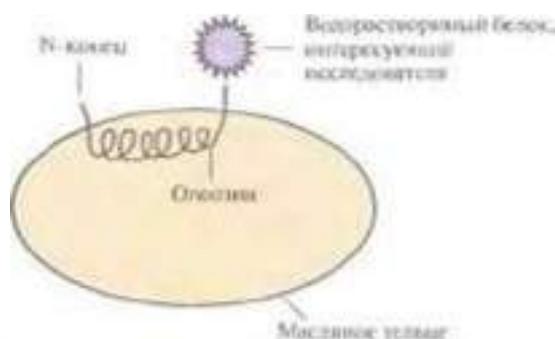


Рис. 18.19. Рекомбинантный белок, стабилизирующий водную эмульсию и прочно ассоциирующийся с ней. Овещина обладает высоким содержанием в масляному телцу семена растений, а его N- и C-концы, а также второй белок гидрофильны и стабилизируются в водном окружении.

- 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 cartouche melon fruits. *Mol. Biotechnol.* 14: 862-866.
- Bachetti C. W. B., G.-J. Speckmann, P. C. G. van der Ende, 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 tryptin 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. Nybensen, M. Van Montagu, D. Inze. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EATBO 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. Bohyard, R. C. Saxena, M. B. Sackin. 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a  $\delta$ -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*  $\delta$ -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.
- Flechlhoff D. A., K. S. Bondish, F. J. Perlak, P. G. Morrison, S. M. McCormick, J. G. Nordmeyer, H. A. Dean, K. Komano-Kristof, E. J. Mayer.

- B. E. Rochester, S. G. Rogers, H. T. Fraley. 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-Besvet, M. Schneider, N. Lucante, L. Olsen, J.-J. Lepay, 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. Stevenson, 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 in Arabidopsis. *Nat* 366: 276-279.
- Johansen R., J. Kanyet, 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. Stalter, 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. Hatfield, K. A. Kerttamer, G. F. Barry, G. M. Klucher. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3: 1187-1193.
- Koutoun 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. Mize olefin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the mize olefin gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 6181-6185.
- Libus G., N. Holmberg, L. Bolom. 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio/Technology* 14: 177-180.
- Liu 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.
- Long K., S. Nishio, 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 pinewood unihedral protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 7089-7093.
- Maj J. K.-C., M. B. Heia. 1995. Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *Trends Biotechnol.* 13: 522-527.
- MacIntosh S. C., G. M. Klucher, F. J. Pezdek, P. G. Murrone, 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. Florigenetic 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 Hekken, P. de Lange, A. H. Stuitje. 1991. Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *Trends Genet.* 268: 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: 949-953
- Perkins F. J., H. L. Furber, D. A. Dean, S. L. 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. *Bio/Technol* 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 Protease 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. Chrispeels. 1994. Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -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. Quetada. 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 Rie J. 1991 Insect control with transgenic plants: resistance or not? *Trends Biotechnol* 9: 127-139
- 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*  $\delta$ -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 рибосомы инциркулярны вирусам без оболочки с одноцепочечным РНК геномом (RIBO инциркулярно). Почему и это РНК можно легко выделить. Кроме того,

- у нас есть антитела мы 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 антиметаболитов ДНК можно обеспечить устойчивость растений к сизимфическим вирусам?
  - Каковы эффекты ингибиторов протеаз, ингибитор амилазы и желатиназы? Как они защищают растения от насекомых-вредителей?
  - Предложите стратегии защиты растений от повреждения несколькими видами вирусов.
  - Опишите основные стратегии 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 доклада при из трансформации. Какой способ вы выберете?
  - Как с помощью методов геновой инженерии получить растения с необычной окраской цветков?
  - Как с помощью генов инженерии повысить содержание лигнина в сое?
  - Что такое коопрессия? Антигеновая супрессия? Сравните их.
  - Как упростить процедуру очистки растительных белков, например ферментов антител, синтезируемых растениями?

## 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 множества 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 «холодной» и «вредной» геном, вследствие чего потомки могут оказаться менее привлекательными. Чтобы быть уверенными в том, что новая, улучшенная линия сохранит полезные помесные 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, клональные) позволили вносить в хромосомную ДНК выделенные из отдельных функциональных генов или целые их кластеры. Наиболее разумная стратегия состоит в следующем.

- Клональная линия ген входит в ядро оплодотворенной яйцеклетки.
- Инкубированным оплодотворенным яйцеклеткам имплантируют в реципиентную женскую особь (выскалку успешное завершение развития гибридных млекопитающих в таких условиях невозможно).
- Отбирают потомство, развившееся из имплантированных яйцеклеток, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
- Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

Такой подход имеет много практических приложений. Например, если продукт гена вызывает или стимулирует рост, то трансформированные животные будут расти быстрее при том же количестве пищи. Повышение эффективности использования пищи всего на несколько процентов может существенно снизить стоимость конечного продукта (товарным, шерстью и т. д.)

Над генетическим и физиологическим путем введения генов в клетку трансформированные яйцеклетки были реализованы на практике в 1980-х гг. Как и во многих других новых областях науки, для ускорения обмена информацией между учеными был проведен ряд новых терминов. Так, клонирование генов было определено путем введения чужеродной (экзогенной) ДНК, было названо трансгенным, введенная ДНК — трансген, а весь процесс — трансгенная генетика, или трансгенезом.

Эксперименты по генетической модификации млекопитающих органичным путем введения и интродукции требуют много времени. Тем не менее трансгенно созданные животные

Таблица 19.1. Белковые составы (г/л) молока мышей и овец

Белок	Мышь	Овца
<b>Казеин</b>		
$\alpha_1$ -Казеин	10,0	12,0
$\alpha_2$ -Казеин	1,4	3,1
$\beta$ -Казеин	3,9	1,6
$\beta$ -Лактоглобулин	10,0	16,0
<b>Сывороточные белки</b>		
$\alpha$ -Лактоальбумин	1,4	0,1
$\beta$ -Лактоальбумин	3,0	2,8
<b>Другие белки</b>		
Сывороточный альбумин	11,4	Не обнаружен
Иммуны	1 г. овца не обнаружен	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 создания молекулярных систем, позволяющих изучать белки человека, в том числе для генетической модификации клеток животных также являются целью получения с помощью животных для получения 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 в больших количествах это можно использовать в качестве сырья для производства лекарств. Выделяемые из животных белки и секреторный плазма (молоко) белки не должны быть таким образом индукции побочных эффектов на организм животных, происходящих из организма, и подвергаться истощающим вмешательствам, которые по крайней мере близки к таковым в клетках человека. Кроме того, его наличие и 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 эпигенетической специфичности, молекулярной регуляции 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 том, что метод 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-почкования), 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 в качестве сырья для получения коммерчески продукта. Поскольку существуют альтернативные методы трансгенной, ретровирусные векторы редко используются для создания трансгенных животных, имеющих коммерческую ценность.

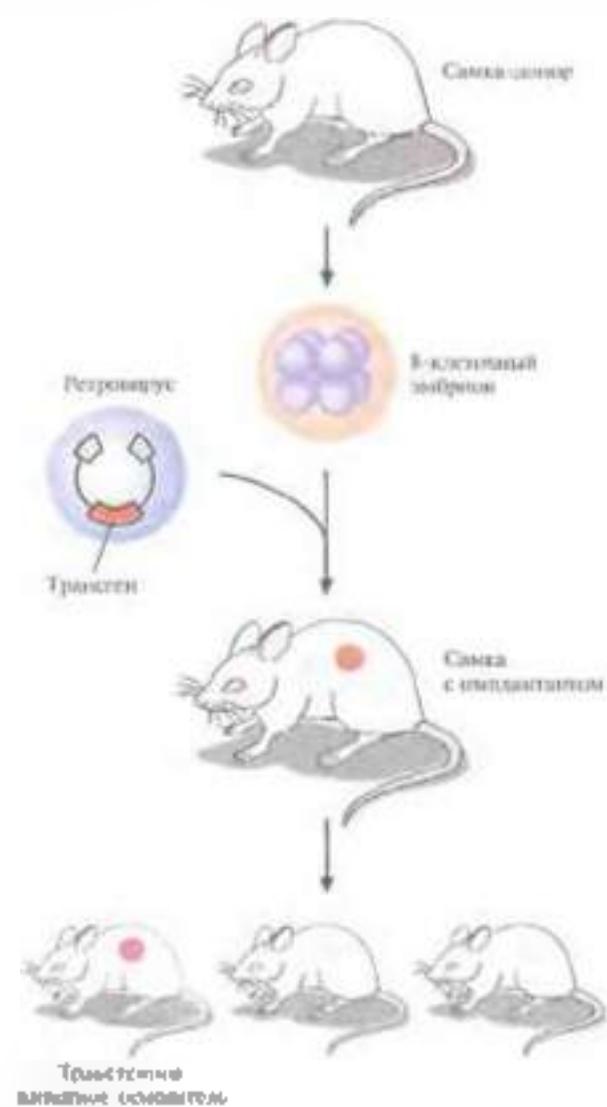


Рис. 19.1. Получение линий трансгенных мышей с использованием репродуцируемых эмбрионных стволовых клеток. В клетках эмбриона, состоящего из 8 клеток, инфицируют репродуцируемым ретровирусом, который несет трансген. Самка, в которой был имплантирован эмбрион («суррогатная мать»), приносит на свет трансгенные потомки. Для идентификации мышей, несущих трансген в клетках зародышевой линии, проводят скрещивания

#### 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 гаметозоит оплодотворенной яйцеклетки. Яйцеклетки или имплантируют в суррогатную мать, которая приносит на свет трансгенные мыши. Скрещиванием трансгенных животных



ное число оплотируемых векторов. Например, при изучении трансгенных мышей после инъекции ДНК получали только 66% оплотируемых векторов; мыши получают примерно в 25% интраназальных инъекциях, причем трансгенными из них оказываются лишь 25%. Таким образом, из 1000 интраназально оплотируемых векторов реально удается от 30 до 50 трансгенных мышей. Кроме того, введенная ДНК может интегрироваться в любое место в геноме, и зачастую митохондриальная ДНК оказывается в одном сайте. И наконец, не все трансгенные мыши будут обладать нужными характеристиками. В отличие некоторых видов трансген может не экспрессироваться из-за неадекватности регуляции сайта интеграции, а в противном случае часть клеток подвергнется генной мутации или гибели вследствие действия иммунной системы хозяина, 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 ячеек 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 зародышевую стадию бластоцисты. Такие клетки называются соматическими ядерными переносными клетками (ES), ES-клетки в культуре могут модифицировать, вводя в геном нужные гены без нарушения их экспрессивности. Например, в определенный сайт неспецифического гена в ДНК генома можно встроить функциональный трансген. Затем можно отобрать измененные 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 и некоторым

клеткам ДНК встраивается случайным образом, в другом направлении происходят 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, встраивающуюся в нужный сайт, и негативной селекции клеток с векторной ДНК, интегрированной в случайный сайт.

Этот метод должен начаться в таком объеме трансгенной ДНК, которая не кодирует никаких белков, чтобы интеграция в нужном сайте не повлияла на процессы развития или клеточные функции. Кроме того, существует, чтобы избежать трансгенные эффекты, трансгенную сайтоспецифичность учитывать заранее. Поскольку сайты неведомы, непереносимо.

Векторы для позиционной селективной селекции обычно содержат следующие элементы: 1) два блока положительной (P1) и (P2), расположенных отдельным участком сайта мишеней; 2) трансген (T), кодирующий новую функциональную активность; 3) последовательности, кодирующие устойчивость к антибиотикам G-418 (Neo<sup>r</sup>), 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 селективной селекции является взаимодействие между двумя участками ДНК, соматическими сайтами-мишенями, а гены HSV- $\theta 1$  и HSV- $\theta 2$  – по блокам 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- $\theta$ ) (рис. 19.5, А). Напротив, если интеграция происходит в результате соматической рекомбинации путем дупликации (дублирования) нужного сайта, то в геном встраиваются только трансген и ген Neo<sup>r</sup>, а гены HSV- $\theta$  – нет (рис. 19.5, Б). При выделении трансфицированных клеток в присутствии G-418 клетки, не несущие ген Neo<sup>r</sup>, расти не будут. Выживут только клетки, в которых произошла интеграция одним способом, осуществившая интеграцию селектив. Если одновременно с G-418 в среду

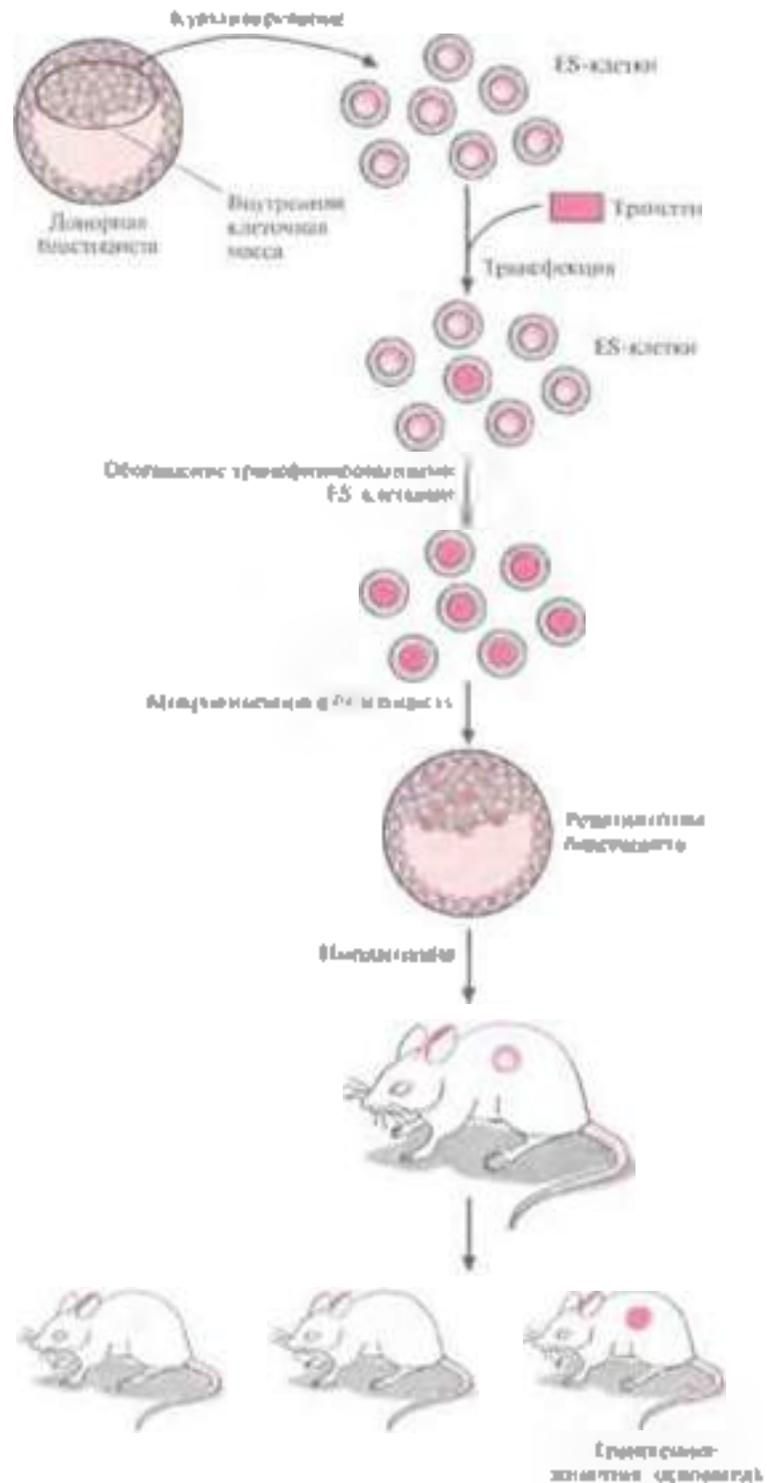


Рис. 14.4. Получение трансгенных мышей с помощью эмбриональной внутренней клеточной массы (ЕС) клеток. ЕС-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши. Их трансфицируют вектором, несущим трансген, вульгаризуют и идентифицируют трансфицированной клеткой методом полимеразно-цепочечной реакции или ПЦР. Потомство трансфицированных клеток очень трудно получить и только в бластоцисты, которые затем инъецируют в эмбрионы беременных самок. Существенная особенность — отсутствие цитометрической сортировки эмбрионов, что позволяет получить трансгенных мышей.

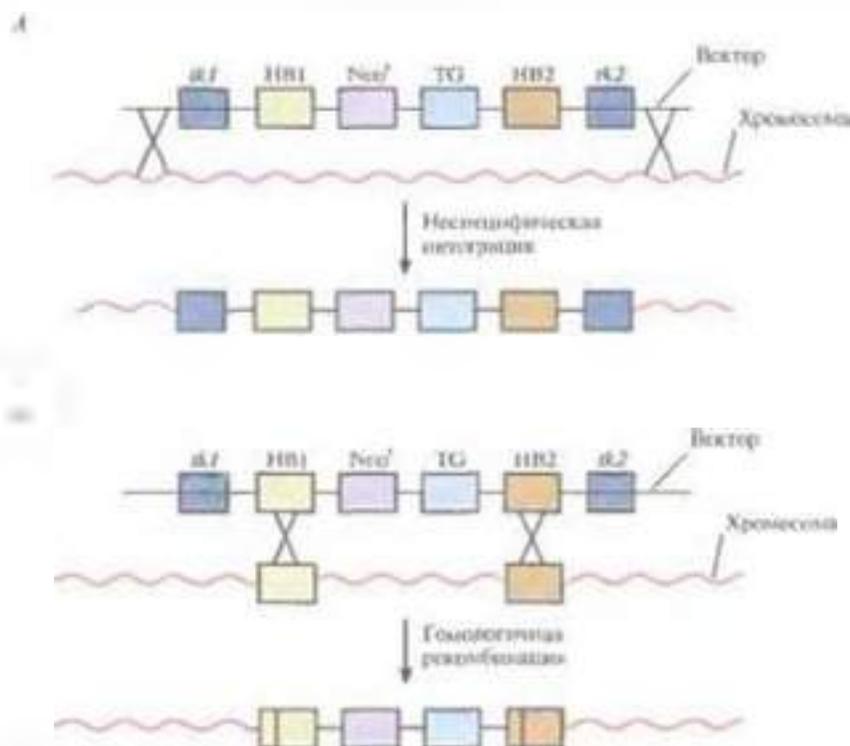


Рис. 19.5. Позитивно селективные стратегии. А. Несомыфическая интеграция. В присутствии селективной среды (или хромосомной ДНК реципиентных клеток (HRI и HR2), или  $Neo^r$ ) обеспечивающей устойчивость в эукариотической среде к антибиотикам G-418, и трансгена (TG) после трансфекции образуют устойчивые клоны не устойчивые к G-418 и тем (или другим) селективному фактору (или факторам) в не селективной среде (например, эмбриональной фибробластной культуре). Интерференция может происходить и по-другому, от интеграции в хромосому путем неоминимации или в присутствии G-418 и при индукции все также клоны могут погибнуть. Б. Специфическая интеграция в гомологичные рекомбинантные сайты. В результате комбинации гомологичных участков (HRI и HR2) векторной и хромосомной ДНК в присутствии селективной среды могут не селективных клонов эмбриональных фибробластов G-418 и селективной фактора образуют только клоны, в которых произошла гомологичная рекомбинация.

добавить гидроксиаминоф, то рост клеток, синтезирующих гидроксиаминоф, будет подавлен, поскольку этот фермент катализирует превращение газинкловера в токсичное соединение. Летальные для клеток, в е происходит негативная селекция. Клетки, приспосаблившиеся через такое двойное эмто, скорее всего будут содержать последовательности, интегрированные в нужный сайт. Хотя этот метод не застрахован 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 ПНР. 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 ПНР. Один из ПНР-примеров (P1) комплементарен участку клонированной бактериальной или синтетической (уникальной) нуклеотидной последовательности нисея (примечание: вектора, а другой (P2) — участку хромосомной ДНК, прилегающему к одному из гомологичных участков ДНК. При интеграции последовательности-мишени в случайный сайт

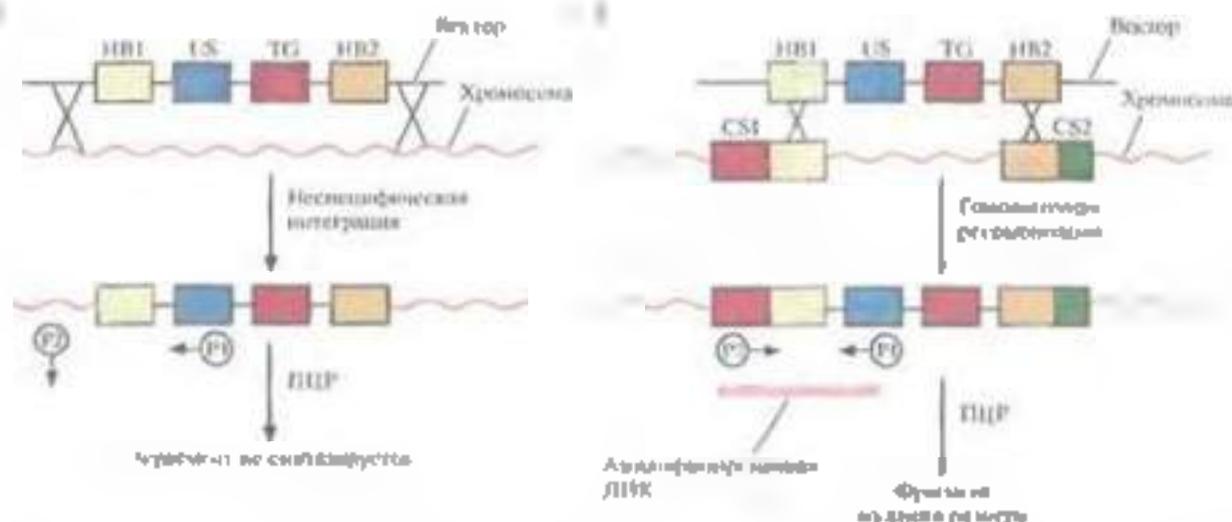


Рис. 19.6. Идентификация мест, несущих транзены в специфическом сайте. При помощи ПЦР А) в результате неспецифической интеграции векторной ДНК (или ее фрагмента) в участок хромосомы, находящийся на определенном расстоянии от места сидитя праймера P1, и фрагмента другой цепи размером при амплификации не образуется P1 амплифицируется с уникальным участком (US) векторной ДНК, присутствующим в хромосомной ДНК в месте реинтеграции. Б) В результате гомологичной рекомбинации между участками HB1 и HB2 векторной 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 являются 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 образуется, значит транзены (или ТГ), вставившиеся между гомологичными участками (HB1 и HB2), встроились в определенный сайт хромосомы.

скаковыми продукт амплификации образуются не будет (рис. 19.6, А), в при сайт-специфической интеграции в результате ПЦР амплификации образуется фрагмент ДНК известного размера (рис. 19.6, Б). Такие образцы можно идентифицировать при ES-клетках, содержащих транзены в нужном сайте, а переселяя их из этой среды получить клеточные линии с сайт-специфической вставкой.

ES-клетки, в темя которых в нужном сайте нетушен транзена, можно культивировать в присутствии эмбриона на стадии бластоцисты, а затем имплантировать такую эмбриональную псевдоопределенную «суррогатную» материю. Мышата, у которых генетически модифицированные ES-клетки участвовали в образовании клеток зародышковой линии, могут дать начало трансгенным линиям. Для этого из нужной окрестности особым тоном из линии, а затем скрестить их транзгенными клетками. В результате будут получены трансгенные мыши, homo дисные по транзгену.

В специфический хромосомный сайт ES-клетки можно не только встроить, но и разрушить какую-то конкретную функцию, но и наоборот разрушить этот сайт интеграцией с его контролирующей областью специфической последовательности (обычно селективно маркерного гена) (рис. 19.7). Одна из задач направленного введения («нокаут») гена состоит в последовательном анализе этого процесса на развивающемся организме 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 «нокаут» ген родственно мыши приводит к инвазивной патологии сетчатки, что имитирует такую болезнь человека, как пигментный ретинит. На мышах с «нокаутированным» геном различные методы изучают процесс дегенерации сетчатки, а также



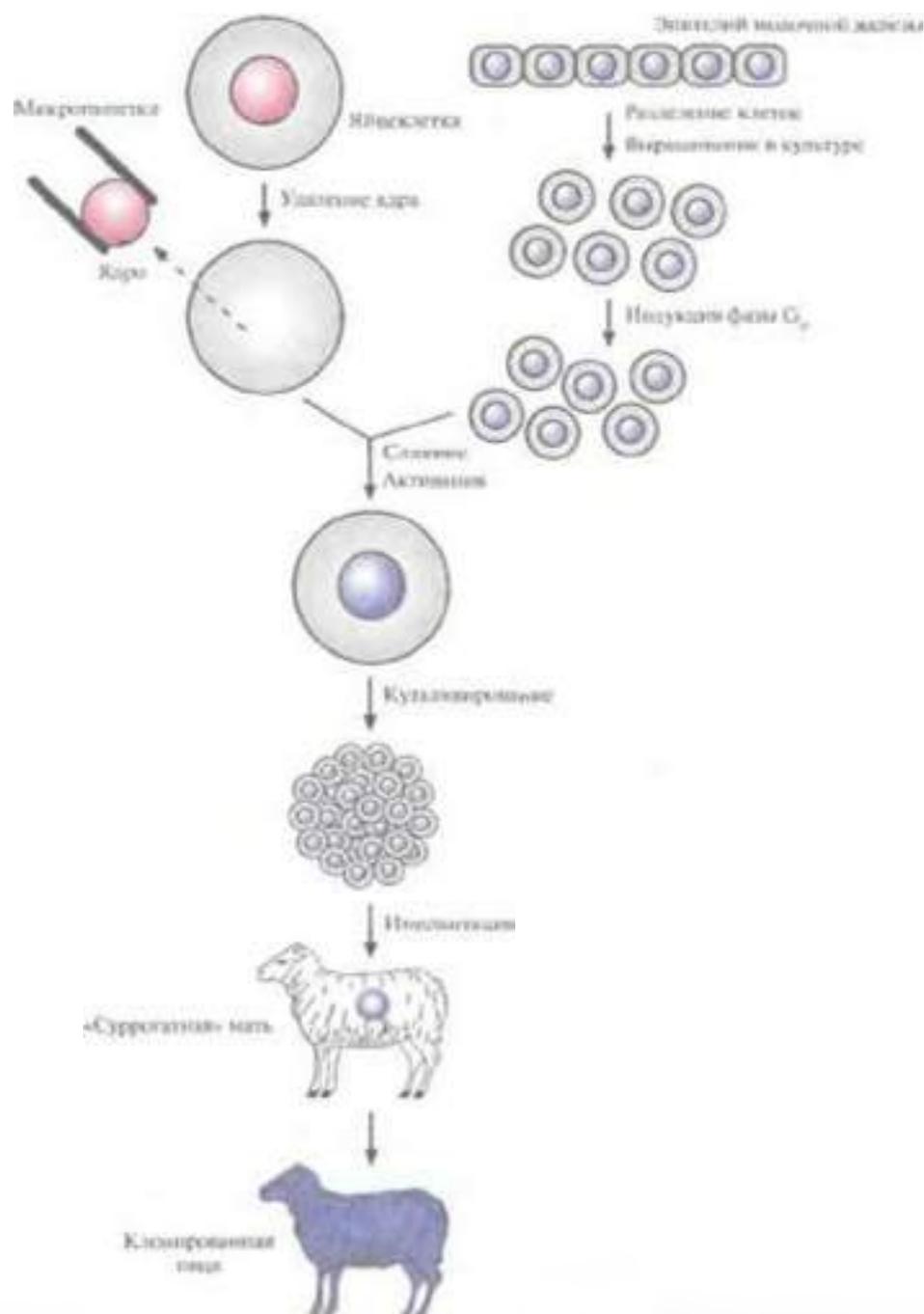


Рис. 19.8. Клонирование овец методом переноса ядра. Ядро яйцеклетки удалено и помещено микронипетом Кэмпбелл-Штерн в яйцеклетку клетки молочной железы вырощенной осс и индуцируют их слияние в фазе  $G_2$ . Осуществляют слияние клеток в  $G_2$ -фазе и вращивают, активируют ядро, и индуцируют их слияние в фазе  $G_2$  путем  $\alpha$ -мембран или в фазе  $G_2$  с помощью культуры до ранней фазы эмбрионации, и затем имплантируют их в матку суррогатной матери где и происходят дальнейшее развитие. В эксперименте, описанном Уинчлом и др. (Winchell et al., 1997), были произведены следующие 277 яйцеклеток с удвоенными хромосомами клеточной молочной железы в фазе  $G_2$ ; из 39 эмбрионов только один выжил до момента рождения пасца.



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 чуждыми 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 F<sub>1</sub>- и F<sub>2</sub>-формами, зачастую обладающим каким-то средством к специфическому антигену. Возможно, генетическое программирование даст возможность 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 из цепей определяются комбинацией вариабельного (V<sub>H</sub>), дивергентного (D<sub>H</sub>), инвертного (J<sub>H</sub>) и константного (C<sub>H</sub>) участков (доменов) соматической ДНК в H-клетке. Известны два типа легких цепей, λ и κ, которые образуются в результате перестройки из соответствующих парабазальных (V<sub>L</sub>, V<sub>K</sub>), инвертных (D<sub>L</sub>, J<sub>L</sub>) и константных (C<sub>L</sub>, C<sub>K</sub>) доменов. Данные H-клетки синтезируют или она 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<sub>H</sub>-доменов, 30 D<sub>H</sub>-доменов, 6 J<sub>H</sub>-доменов и 5 основных константных (C<sub>H</sub>, C<sub>μ</sub>, C<sub>δ</sub>, C<sub>ε</sub>, C<sub>γ</sub>) доменов. Локус κ-цепей содержит примерно 76 V<sub>K</sub>-доменов, 5 J<sub>K</sub>-доменов и один константный (C<sub>K</sub>) участок (рис. 19.9). Паттерн H-локусов и κ-цепей — от 1 до

1,5 × 10<sup>6</sup>. Для создания трансгенных мышей, способных синтезировать множество различных человеческих антител, необходимо активировать мышные гены H и L-цепей, а затем встроить в ихомикротубулу ДНК ялины YAC, содержащую гены H- и L-цепей и хлороминомицинского гена микротубулу.

Чтобы решить эту задачу, мышные гены H- и κ-цепей были заменены («показуированы») небуковыми участком кластера генов H-цепи человека (который включает 4 V<sub>H</sub>-домены, 16 D<sub>H</sub>-доменов, 6 J<sub>H</sub>-доменов, C<sub>μ</sub> и C<sub>δ</sub>) и кластера генов κ-цепи человека (содержащего 4 V<sub>K</sub>-домены, 5 J<sub>K</sub>-доменов и C<sub>K</sub>). 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 гемоглобина человека.

Вместо четырех разных YAC с генами H-цепей гемоглобина человека, создали YAC длиной 1100 т. н., несущую 66 V<sub>H</sub>-доменов, около 30 D<sub>H</sub>-сегментов, 6 J<sub>H</sub>-доменов, C<sub>μ</sub>, C<sub>δ</sub> и C<sub>γ</sub>. Аналогично, из трех YAC, несущих различные домены V<sub>K</sub>, создали YAC длиной 800 т. н. с 32 V<sub>K</sub>-доменами, 5 J<sub>K</sub>-доменами и C<sub>K</sub>. F<sub>1</sub>-клетки трансфицировали по отдельности YAC с генами H- и κ-цепей методом слияния клеток, отбора клеток, в которых произошла интеграция YAC, с помощью селективной культуры и проверили целостность каждой цепи в источнике ИЦР. Интегрировали клетки, несущие встраиваемые гены H- либо κ-цепей, в целостности и активировали с помощью селекции с помощью ИЦР. Трансгенных мышей со вставками генов H- и κ-цепей сращивали по отдельности с мышами с инaktivированными локусами этих цепей. Затем животные скрещивали между собой, чтобы получить мышей лишними функциями с двумя генами H- и κ-цепей, но несущих обе вставки генов H- и κ-цепей гемоглобина человека.

Трансгенные мыши с увеличенным числом человеческих V<sub>H</sub>- и V<sub>K</sub>-доменов синтезировали

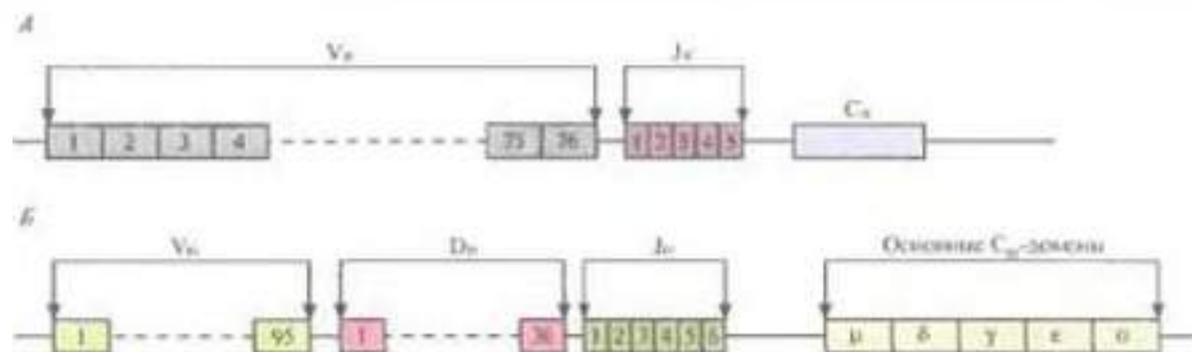


Рис. 19.9. Схематическое изображение генов  $k$ - и  $H$ -цепей иммуноглобулинов человека. А. Струкция гена  $k$ -цепи иммуноглобулина в клетках зародышковой линии Штросмана линии — промежуточные домены, здесь не показаны. Ген функциональный  $k$ -цепи, компьютер  $V_{\kappa}J_{\kappa}C_{\kappa}$ , образуется в В-клетках в результате перестройки перестройки соответствующим ДНК доменов. Представленные здесь аллели имеют — а здесь один из 500 вариантов. Б. Струкция гена  $H$ -цепи иммуноглобулина в клетках зародышковой линии Штросмана 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 вариантов. На рисунке показаны только один вариант, хотя на самом деле их четыре ( $C_{\mu}2$ ,  $C_{\mu}2b$  и  $C_{\mu}3$ ).

человеческие антитела. Их иммунохроматограммы различны антителами, и в каждом случае индуцированы секретировать человеческие моноклональные антитела, обладающие высоким уровнем 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 системными для исследования возможности синтеза продуктов, представляющих интерес для медицины. Используя целые животные, можно моделировать и выявлять новые патологические процессы. 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 выявления возможности (структурной сложности) болезни. Принимая во внимание все это, ученые разработали «мышиную» модель такой генетически более чем человека, как болезнь Альцгеймера.

мыши, артрит, мышечная дистрофия, образованные опухоли, инсульты, непродуктивные 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 deposits, называемые сенильными бляшками (рис. 19.10). Кроме того, в кровеносных сосудах мозга обнаруживаются конгломераты — амилоидные бляшки.

Основным компонентом сенильных и амилоидных бляшек является белок  $A\beta$  (выполнен  $\beta$ ,  $\beta$ -белок,  $\beta$ -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-

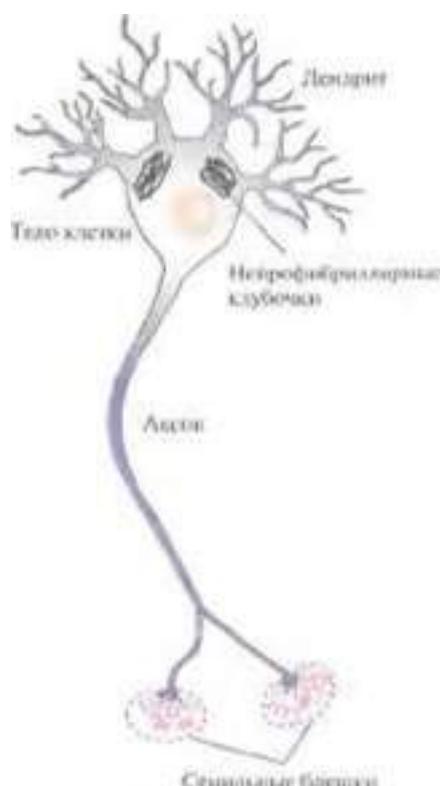


Рис. 19.18. Схематическое изображение нейрона во рту голубиного мозга человека с указанием нейтрофибрилярных клубочков (особенностей), характерных для болезни Альцгеймера. У синапсов образуются синаптические бляшки, содержащие амилويدные бляшки и амилоидные клетки. В теле нейрона накапливаются нейрофибриллы, образующие агрегаты из бета-амилоида и других белков. Проксималь и другие типы нейронов, если не показаны

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 унаследованной в ювенильном возрасте данной патологии. К сожалению, трудно следить и доказать механизм возникновения и развития болезни Альцгеймера на человеческом уровне. Пониманию помощи в этом могла бы оказать разработка «животных» моделей.

Было получено множество трансгенных мышей, несущих человеческий ген APP или его часть под контролем нейротрофического промотора. При этом у большинства животных

развивались амилоидные бляшки, нейрофибрилярных клубочков, губель нейронов или и другие патологические изменения. Однако у животных, несущих трансген, кодирующий участок от 100 последних аминокислот APP, который включает и A $\beta$ -белок, обнаруживалась деградация нервных тканей, инкогнитивное состояние при болезни Альцгеймера.

Более адекватные «животные» модели, позволяющие изучать болезнь Альцгеймера, были созданы с использованием трансгенов, содержащих мутацию в гене APP, характерные для некоторых семей с высокой частотой встречаемости болезни Альцгеймера в раннем возрасте (<50 лет). У одной группы таких семей в инкогнитивном 717 APP (APP-717) вместо наличия трансгенной функции, в другой группе в положении 670 и 671 APP (APP 670/671) цистин и метионин были заменены на аспарагин в жизни соответствовали.

Трансген с мутацией APP-717 был создан на основе cDNA APP использованием между цистинами 67, 7 и 8, 8 и 9 модифицированными интронов Интроны удалялись потому, что сформированным эксперименту, содержащим на трансгенном трансгенном белке «инфективно» чем трансгенном без интронов. Конструкция «cDNA APP-интроны» использовалась под контролем промотора гена  $\beta$  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), несущих около 40 копий P1APP, образуются амилоидные бляшки, отмечались гипотеза нейронов и эффект памяти. Конструкция APP-670/671 под контролем нейротрофического промотора олигопептида у трансгенных мышей симптомы, подобные симптомам болезни Альцгеймера, в том числе образование амилоидных количества A $\beta$ 2. Интересно, что при у стареющих мышей, несущих P1APP-мини-ген, ни у трансгенных мышей APP-670/671 нейрофибрилярных клубочков не обнаруживались. Возможно, эти структуры возникают у человека как следствие сверхэкспрессии A $\beta$ 1.

В развитии болезни Альцгеймера у человека участвуют еще три гена - ApoE4, гены пресенилина 1 (PS1) и пресенилина 2 (PS2). Наличие аллеля ApoE4 фактора ApoE, мутаций ответственны

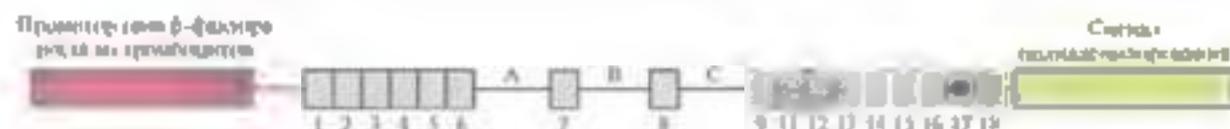


Рис. 19.11. Генетическая конструкция, кодирующая мутантный белок Р13АРР, с помощью которой можно исследовать влияние белков А<sub>2</sub>μ<sub>2</sub> (интроны 7 и 8) у трансгенных мышей. В ДНК белка-предшественника интрона А С — наследственные интроны. Регулирующие элементы промотор гена β-казеина роста и транскрипции и сигнал посттрансляционной модификации (N40)

фрактур (понижен), коррелирует с увеличением переносимости поликлональной болезни Альцгеймера у людей старше 60 лет. В семье, где отмечается развитие этой болезни в молодом возрасте, обнаруживаются мутации в генах трансиллинов, однако роль каждого из них в развитии данной патологии не выяснена. Но другим важным автором, мутации в генах пресенилина приводят к увеличению аккумуляции Аβ42. Например, у родичей трансгенных мышей, полученных скрещиванием трансгенных мышей, которые несли гоморазмерный человеческий ген APP, с мышиным, несущим мутантный ген пресенилина 1, отмечалась сверхпродукция Аβ42. Чтобы описать болезнь Альцгеймера мало что известно, но есть надежда, что животные модели помогут 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 использовали 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 — распространённый 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 изольвировал организм, 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 клеток. 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 глорбулином и ферментов псевдокарливания. Жирные кислоты инкапсулируются в плазматической мембране и в таком виде секретированы в молоко.

Чтобы проверить действительность этой системы, полноформатную cДНК CFTR встроили в среднюю дефектно гена β-казеина мыши, из которой бы удален участок от конца экзона 2 до начала экзона 7 (рис. 19.12). Получившиеся конструкции содержали промотор и сигнал терминиции транскрипции гена β-казеина возм. 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 генном более крупном клеточном участке коровы, овцы или козы.

### Трансгенный крупный рогатый скот

Если предполагается использовать минимальную железу в качестве «биореактора», то наиболее предпочтительным животным для трансгенного «племени 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 рекомбинантного 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, не использующегося для предопределенных тромбообразований, требуется ежегодно. С другой стороны, одной трансгенной коровы 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 самца трансгенного мышей 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. Цептирование оплодотворенных зygот для концентрирования желтка, который в нормальных яйцеклетках мешает оплодотворению мужского протопласта с помощью секционного микроскопа.
5. Микроинъекция ДНК в мужской протопласт.
6. Разделение зygот *in vitro*
7. Полиуриническая имплантация ооцита зygотной реципиентной самке во время течки.
8. Скрининг ДНК потомков на наличие трансгена

В тестах эффективности из нуля в 240 ооцотов были получены для трансгенных теленок. Этот результат указывает на результативность описанного метода, 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 зygот с развитыми зygотными зygотами *in vitro* и встраивать их на наличие трансгена; такая процедура зygотам зygотам не помешает его нормальному развитию. Этот тест позволит микроинжектировать только зygоты, несущие трансген.

Один из целей трансгенного крупного рогатого скота – увеличение содержания в молоке различных компонентов. Так, количество сыра, получаемого из молока, прямо пропорционально содержанию в нем казеина, поэтому весьма



Рис. 19.13. Производство трансгенных коров

перспективным представляется увеличение количества синтезируемого κ-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 молока-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 породы), холере (домашняя птица). Если в основе устойчивости к каждой из этих болезней лежит один ген, можно попытаться создать животных с его трансгенных животных. В настоящее время для борьбы с инфекционными заболеваниями домашних животных используют антибиотики и лекарственные препараты. Владельцами животных предпочитают, в основном, безудачное лечение. Стоимость всех этих мероприятий может достигать 30% общей стоимости конечной продукции.

Для выведения явной животных, устойчивых к возбудителям инфекций, можно использовать генов, кодирующих в составе генома трансгенных животных различные 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 свиньям генов, кодирующих H и L-цепей свинко-чума моноклаонального антитела. Идея этой работы заключается в том, чтобы снабдить трансгенные животных наследуемым механизмом защиты, позволяющим обходиться без иммунизации с помощью прививок.

Введение в организм реципиента генов антител, которые связываются со специфическими антигенами, было названо иммунной инакцией in vivo. Для этого гены H- и L-цепей иммуноглобулинов моноклаонального мульт-

него антитела к антигену, связывающиеся с 4-гидроксн-3-нитрофенилактамом, 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 сыворотке 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 производство моноклональных антител этих животных к специфическим биореакторам 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 молока жвачных (табл. 19.2), были созданы трансгенные овцы и козы, в которых конкретные секретируемые белки человека. Они были тикопилированы и обследованы активностью, близкой к таковой соответствующим белкам, изучаемым от человека. Однако, для того чтобы убедиться в полной функциональности этих белков, нужны дополнительные исследования. Экспрессия трансгенных в клетках млекопитающих овцы и козы не оказала никаких побочных действий ни на эмбрион и

период лактации, ни на вскармливаемое потомство. В отличие от этого при введении свиньям трансгена быстрого роста под контролем промотора металлотенина наблюдаемые эффекты наблюдались. Количество гормонов у разных особей в группах трансгенных свинок различалось, однако в целом все же группа быстрого прибавления в весе. Кроме того, это положительный результат частично объясняется различиями паттерновми: у животных отмечались вздутия желудка, почечная недостаточность, хромота, воспаление перикарда, уменьшение подвижности суставов, эритроцитопения и пневмония. Причины этих симптомов неизвестны. Возможно, они связаны с длительным присутствием в организме избытка гормона роста. В этих экспериментах трансгенные свиньи родились 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 обеспечивает гиперэкспрессию гДНК. При этом у трансгенных свинок отмечены от симптомов не наблюдаются.

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 глобина человека, для гена  $\alpha_2$ -глобина человека и гена  $\beta^A$ -глобина человека. В результате ее экспрессии в клетках крови свинок синтезировался человечес-

Таблица 19.2 Трансгенные конструкции, содержащие гены человека под контролем промоторов, специфичных для жвачных жвачных и ретикулярных организмов

Ген/гены	Промотор	Сыворотка
Ген $\alpha_2$ глобина (человеческий) и $\beta$ глобина (человеческий)	Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Коза
Ген $\alpha_2$ глобина (человеческий)	Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Овца
Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Овца
Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Коза
Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Свинья
Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Свинья
Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Ген $\beta$ глобина (человеческий)	Коза

сими гены крови, при этом в результате замены человеческого промитоза гена H глутамина свиньи человеческая гемоглобин становится в значительно большем количестве. Человеческий гемоглобин, продуцируемый трансгенным свиньями, обладает теми же лимитирующими свойствами, что и природный человеческий. Его можно было очистить от гемоглобина свиней обычной хроматографией.

Эти результаты указывают на принципиальную возможность замены цельной крови, испорченной при трансфузии, человеческим гемоглобином, полученным методом трансгенности. Однако и очищенный 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 для переливания. Таким образом, исключение контакта человеческой крови с помощью трансгенности — это дело далекого будущего.

В последнее время большое внимание уделяется поиску обходных путей обрести антитела для трансплантации человеку. Основная проблема медицинской трансплантации — это гиперострофическое отторжение. Гиперострофическое отторжение влечет за собой связывание клеток органа хозяина с угнетенной лимфоцитной детерминантой на поверхности клеток пересаженного органа. Связывание лимфоцита вызывает остроую воспалительную реакцию (активацию каскада химических агентов), приводящую к массовой гибели клеток и быстрой потере пересаженного органа.

В естественных условиях постнатальная 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 гиперострофической 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 комплексной системе каскада комплексного взаимодействия.

В эксперименте по пересадке органов трансгенным свиньям применяли животных, в которых пересаженный орган прорастался слабо, а сам орган не отторгался совсем. Возможно, трансгенные свиньи, несущие человеческий ген ингибитора комплексного взаимодействия, являются переносчиками белка, который является основным источником для трансплантации для человека.

## Трансгенные птицы

Множество птиц ДНК рекомбинированы и в яйцеклетки птиц с целью включения в их состав антител — ингибитора гиперострофии. Это свиньи с которыми объединены функции и функции птиц. Так, при оплодотворении у птиц в яйцеклетку вводят цитоплазму сразу нескольких стриматозидов, а не один, как это обычно бывает у млекопитающих, и каспаифицируют тот мужской промуклус, который соединится с женским, становится невозможным. Метод микроинъекции ДНК в цитоплазму тоже не подходит, поскольку в этом случае ДНК не инкорпорируется в гены 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 промуклусы и образуется рылец. Чем скорлупа. После введения ДНК каждая яйцеклетка культивируется *in vitro*, и когда образуется зародок, его помещают в суррогатные яйца, чтобы инкубировать яйцеклетку. При помощи такой стратегии была получена свинья-птица трансгенных цыплят. Однако в настоящее время лотоклетки неинфекционны 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-

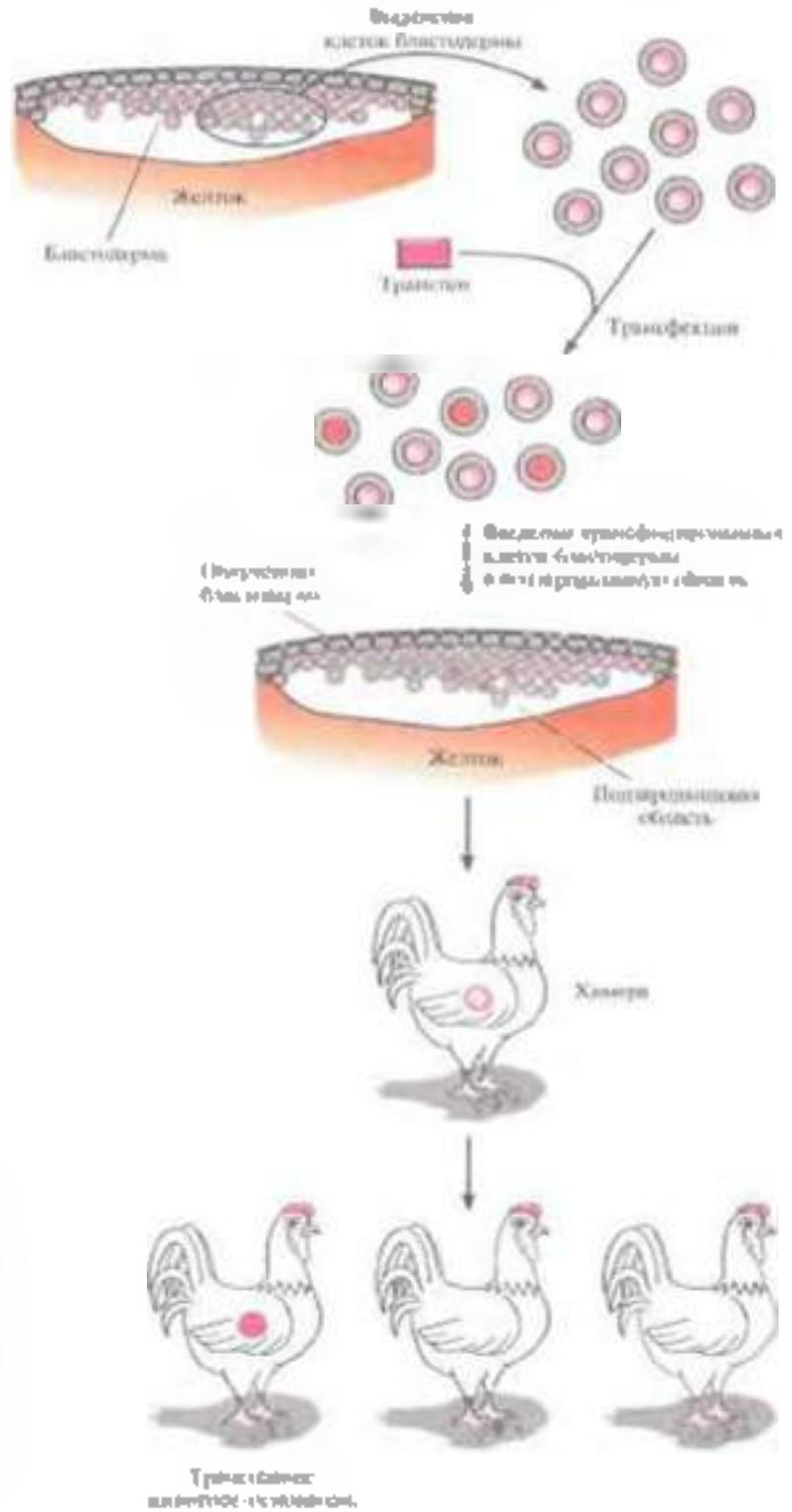


Рис. 19.14. Получение трансгенных животных трансфекцией в культуре внутренних клеток бластомеры эмбриона и чужеродной ДНК трансгена с помощью электропорации и последующую «область облученной бластомеры» реципиенте. Часть полученных потомков выведена чистыми, а остальные не так. Многие трансгенные животные проявляют признаки сцепленного наследования метода трансгенности животных

го доработав ретровирусными векторами с вирусной 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 все же менее эффективные ретровирусные векторы и качество - по сравнению с чужеродными генами животным, которые затем могут использоваться в пищу, тем не менее способны вызывать вопросы относительно безопасности такого подхода. Кроме того, ретровирусные векторы могут быть выделены в окружающую среду и в составе ретровирусного вектора, не превышая 3 т. н. в исключительном случае интеграции и интеграции септационной. Но это действие неслучайно, поскольку альтернативные способы трансгенной

Иногда специфичных для птиц ES-клеток не обнаружено, поэтому подход, основанный на их использовании, для птиц неприменим. Более перспективным представляется метод с использованием рекомбинантных эмбриональных клеток (ли состоит в следующем. Взрослым клеткам бластомеры из куриного эмбриона, трансформируют их с помощью катионных липидов (линосеол), связанных с трансгенной ДНК (линосеол или трансфекция), и повторно вводят в полупрозрачную область соседствующей яичной (рис. 19.14). Часть потомков будет нести в каждом из небольшого количества клеток донора: таких животных называют химерами. У некоторых химер клеток, производящих эмбриональные клетки, могут образовываться линии зародышковых клеток, и после нескольких циклов скрещивания такая химера может выделить линии трансгенных животных. Чтобы увеличить вероятность создания химер, несущих чужеродные гены в клетках зародышковой линии, число донорских клеток у химеров можно увеличить облучением эмбриона репеллента перед введением и этих 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 репеллента 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 (и этой) устойчивости к вирусным инфекциям и заболеваниям, вызванным канцерогенами, повышение эффективности усвоения пищи, снижения уровня жира и холестерина в мясе, повышение качества мяса. Было предложено также использовать птиц с его высоким содержанием белка и качеством источника белковых продуктов, использоваться в фармацевтической промышленности. Экспрессия трансгена в клетках репродуктивного пути курицы, как обычно секреторится большее количество овальбумина, может способствовать незначительно специфическому белковому продукту в мясе, однако это можно затем 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 трансгены вводили микроинъекцией ДНК или электропорацией оплодотворенных икринских различных видов рыб - карпа, гуппи, форели, лососа и т. д. Поскольку у рыб продукция в оплодотворенной яйцеклетке плохо различима в обычных условиях, микроинъекцию трансгенной ДНК вводят в оплодотворенных яйцеклетках или клетках эмбрионов, достигших 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 на скорость роста и выживаемость в

литического лосося был введен трансген, состоящий из следующих элементов: промотор гена антифризот белка американской бельдюги, «ДНК» гормона роста лосося, «инициатор терминации/полладемия» ровиния 3'-конца гена штифренного белка американской бельдюги. Как правило, трансгенные лосося были крупнее и быстрее прибавляли в весе, чем контрольные (нетрансформированные) особи. В этом случае была избрана система экспрессии с усиленной 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», если не примечать и Цир) больше, чем контрольные. Физиологическая совместимость линии галки (трансгенных лососей) и естественных условий является очевидным 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 генотипичные линии трансгенных животных). Большинство исследований в этой области проводилось на мышах. Обычно для этого вводили в зародышевую клетку мыши с помощью микроинъекции, или трансформации *in vivo* в репродуктивную самку и прокормили потомков на наличие исследуемого гена. Чужеродный ген можно вводить и оплодотворяющую яйцеклетку мыши и с помощью ретровирусного вектора. Альтернативный подход заключается в выделении мышечных эмбриональных

стволовых клеток и трансфекции их клонированным геном. При этом инцидентная экспрессия липиды интегрируются 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 (то-тентипотентны), 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. Только образцы были получены мыши, синтезирующие только человеческие антитела. Их использовали в качестве модельных систем для изучения генетических особенностей человека (например, болезни Альцгеймера).

С помощью аналогичных экспериментальных подходов были получены трансгенные коровы, овцы, свиньи, птицы и рыбы. Есть надежда, что трансгенно позволят улучшить генотип существующих пород домашнего скота и вывести породы животных с новыми признаками. Кроме того, во многих случаях домашнего животного, как коровы, овец и козы, удается получать в качестве своеобразных «биологических фабрик» для получения продуктов и инновационных тканей, секретируемых в молоко.

## ЛИТЕРАТУРА

- Blumberg P. L., K. M. Allen, R. H. Behringer, H. E. Gelfand, R. D. Palmiter, 1989. Intensive transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 836-840.
- Chow M., D. Westaway, W. Xu, 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. Hetherington, J. Rommens, 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  $\beta$ -protein in both transgenic 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.
- ITullo 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. Schramm, N. Lamm. 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, H. Snyder, E. Soriano, H. Tan, J. Vitale, S. Wadsworth, B. Wolozin, J. Zhao. 1995. Alzheimer type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -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 $\beta$  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 $\beta$ 2 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1550-1555.
- Arthropoel 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. Shik, M. Malter, L. Mucke, H. Scheek, D. Games. 1996. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -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-Greene 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.
- Petit J. N., M. E. Clark, G. Liu, A. M. Veerlander-Gibbins, H. J. Tuboi. 1990. Production of somatic and germline chimera 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.
- Stricker M. E., M. J. Marlow, K. O'Donnell, K. Hoover, W. Lago, V. Hultsch, 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.
- Wetle U. H., H. Izui, G. Klein. 1991. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits, and pigs. *Genet* 98: 185-191.
- Winnit 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 позиционной регуляции 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, усложняя окружающую среду, но и являются системой сравнительности и т. д. За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в понимании, лечении и профилактике онкологических болезней, патологий более специфичны слабо связанные генетическая факторы, особенно в развитии старости. 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 заболевание, включая в той или иной степени наследственный порок. В настоящее время более половины случаев заболевания в детском возрасте уже достигли стадии 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 заболеваний (патологий), например рак, определяется мутациями в нескольких генах. В том случае, когда имеется полнота, точность и наследственность патологий симптомов заболевания (фенотипа), определенное единичным геном, генетическую природу заболевания можно установить исходя из типа его наследования в семье, представленных экзотическими проявлениями. Существует четыре основных типа наследования аутомомно-доминантный (рис. 20.1), аутомомно-рецессивный (рис. 20.2), X-сцепленный доминантный (рис. 20.3) и X-сцепленный рецессивный (рис. 20.4). Термин «аутомомно-» относится к 22 парам хромосом человека, в термин «X-сцепленный» указ-

ывает на локализацию гена на X-хромосоме. Доминантным называется такое состояние, когда 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 являются гомозиготными, являются или гомозиготными или рецессивными, являются в практически все заболевания.

Аллели генов могут передаваться отцов или материнской линии наследования специфически определенно, однако не для признаков информации об комбинировании с другими заболеваниями генах, а биологический признак индукции или в случае аутомомно-доминантного и X-сцепленного доминантного гена. Более того, не всегда можно сказать, является ли заболевание наследственным. Во-первых, не у всех людей имеются дефектные гены, проявляющиеся симптомами заболевания (металлазия (неистинность) Во-вторых, симптомы (фенотип) могут определять, не только из генов (наследственных) (информация наследственность). 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 (наследственный) к ряду фенотипов. В-пятых, не все заболевания являются связаны со с геном все наследственные заболевания определяются сложными данными в зависимости числе расщепления, чтобы следовало и принцип того заболевания.

Ученые в установлении корреляции между нормальным или патологическим фенотипом, с одной стороны, и соответствующим ему генотипом, с другой, в значительной степени зависят



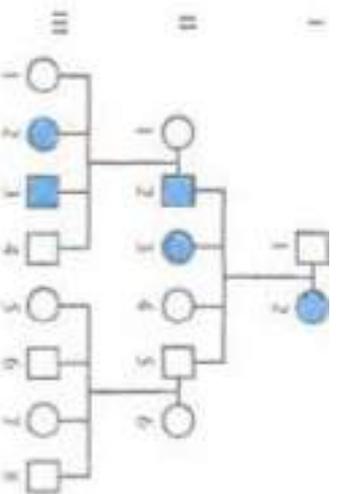


Рис. 20.1. Аутосомно-рецессивный тип наследования. Картирование родословия мужчины, страдающего артритом; заболевание связано с болезнью Ханриксона; заболевание связано – артритом. Картирование дна, соответствующая кариотип и аутокот, подтверждает, что данные мужчины и женщины являются сыновьями. Вероятность мутации мутации в их потомстве, помноженное на то, что оба родителя являются носителями, равно 1/4. Родители (I, II и III) обозначены поочередно, арабскими (1, 2 и 3) – номера семьи и каждой поочередно. Для типового обозначения конкретного члена семьи используются буквы латинского алфавита (например, II-3). Характерными признаками аутосомно-рецессивного типа наследования являются: 1) частота заболевания примерно в 1/4 отцовства и материнства в семье; 2) наличие носителей (т.е. если каждый генотип проявляется детерминистично); 3) наличие аутокота и кариотипа семьи определяются с одинаковой частотой.

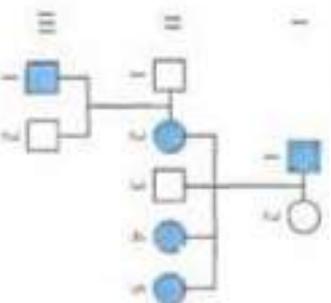
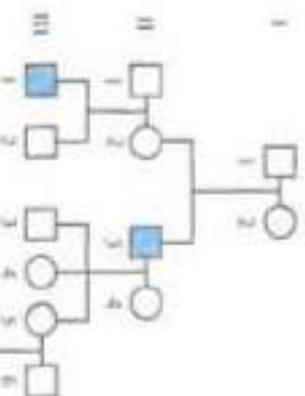


Рис. 20.3. X-связанный рецессивный тип наследования. Характерные признаки: 1) в семье носитель заболевания; 2) болезнь все больше распространяется в семье; 3) болезнь все больше распространяется в семье; 4) носитель заболевания «отдает» к дочери – к ее сыну; 5) носитель заболевания «отдает» к дочери быть больным, чем мужчине.



наши знания о функциях генов, ответствен-  
но за или иные заболевания, тем более эффек-  
тно само лечение или скорее предотвратить.

К наиболее генов человека не всегда состоит  
того определенного последовательных проце-  
дуры и способов, используемых в зависимости от  
наших условий. Например, тивальный этап  
переноса генов, ответственного за данное заболевание,  
структуры генов информации о его продук-  
те. Как правило, при идентификации генов, ассо-  
цированных различными заболеваниями, нецелес-  
на без генетических и физических карт, а по-  
лучение данных карт в конечном счете поможет оп-  
ределить функциональную последовательность всего  
гена человека. Генетическая карта (карта сцеп-  
ления) показывает расположение определенных  
в (локусов) 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 клониров-  
анных, охватывающих всю хромосому или какую-то  
ее область. На практике эти клоны перерезаются,  
приводя к последовательности фрагментов, называе-  
мых зондами. Длинная область, охватываемая ком-  
плексами, выделяется в перх нуклеотидов. Физиче-  
ские карты, состоящие из клонов, служат основой  
проектирования окончательной физической карты,  
которая представляет собой полную нуклеотидную  
последовательность хромосома.<sup>11</sup>

### 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

<sup>11</sup> Помимо геномовых последовательностей клонированных хромосом че-  
ловек для картирования. Более того, картирование генов человека  
для связи генов, определяющих структуру. (J. C. Venter et al., Science,  
1976, 2001, т. 291, 360-369, т. 1987, E. Lander, Nature, 2001, т. 408,  
No-602, т. 1993, — *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 пар генов 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

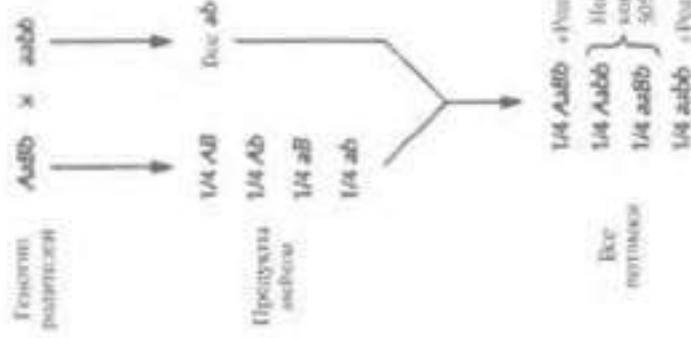


рис. 20.5. Независимое распределение генов. При скрещивании дигетерозиготного индивида ( $AaBb$ ) с индивидом, гомозиготным по двум рецессивным признакам ( $aabb$ ), 50% потомков будут иметь родительские генотипы ( $AaBb$ ,  $aabb$ ), а 50% — новые комбинации генотипов ( $Aabb$ ,  $aaBb$ ) — в том случае, 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 являют, они сцеплены.

В гаметогенезе при кроссинговере гетерозиготной паре генов той же хромосомы должны переключаться в гомозиготные элементы в виде (кроссинговерных) блоков, не образуя в процессе мейоза новых генетических комбинаций на хромосоме (рис. 20.6). Однако в большинстве случаев сцепление является неполным. При мейозе происходит обмен (рекомбинация, кроссовер) между гомологичными хромосомами (хроматомами), и создаются новые комбинации генов (рис. 20.7). Поскольку

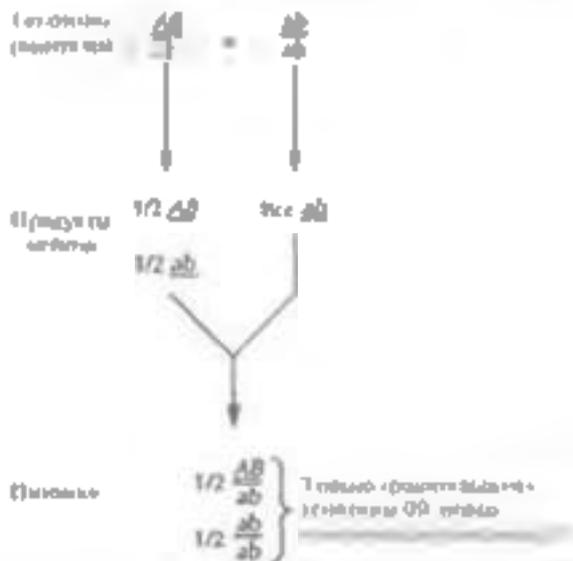


Рис. 20.6. Полное сцепление. Рассмотренные здесь дигетерозиготные родители,  $AaBb$ , участвуют в фазе сцепления (мкс), второй интеллект показанлен по двум рецессивным признакам, что (тотчас)  $ab/ab$ . В отсутствие рекомбинации между локусами А и В все потомки будут иметь родительские генотипы, гомозиготы (генотипы  $AB/ab$  и  $ab/ab$ ). Мейоз сцепления не всегда отменяет отсутствие новых комбинаций — кроссовер, все потомки от скрещивания  $AaBb$  в  $Ab/ab$  будут иметь новые генетические комбинации, а именно  $Ab/AB$ ,  $Ab/ab$ ,  $aB/AB$  и  $aB/ab$ . Однако в отсутствие рекомбинации гены одной и той же хромосомы будут идти сцепленными вместе. Для удобства генетическим исследователям используют одну ориентированную или другую пару хроматид для обозначения сцепленных локусов пары гомологичных (гомологичных) хромосом.

обычно рекомбинация происходит тем чаще, чем больше расстояние между двумя специфическими генами локусами, частоту рекомбинации можно использовать как меру расстояния (генетическое расстояние) между двумя локусами. Таким образом, анализируя частоты рекомбинации у потомков родителей, гетерозиготных по паре сцепленных генов, можно построить генетическую карту, на которой гены будут расположены в линейном порядке. Расстояние между локусами отражает длину частоты рекомбинации и не коррелирует точно с физическим расстоянием. Однако, сравнивая физическое и генетическое карты хромосом, удалось установить соответствие между частотой рекомбинации и

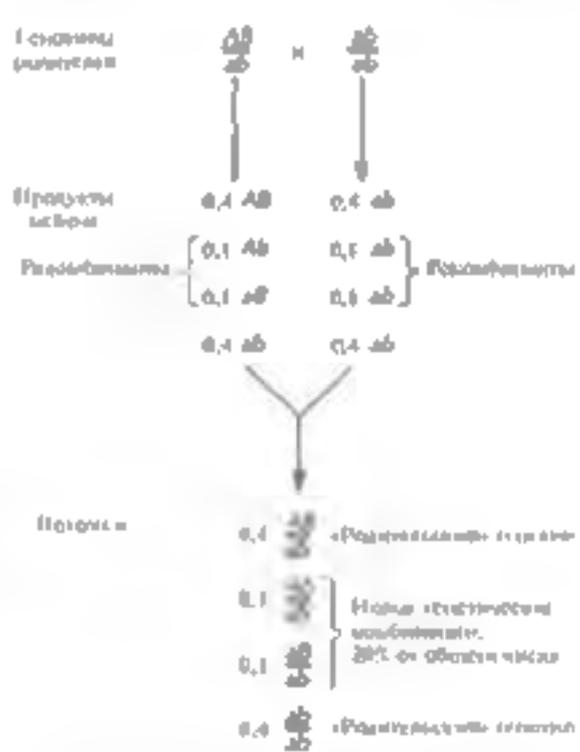


Рис. 20.7. Неполное сцепление. В данном примере 20% ( $0,1 + 0,1 = 0,2$ ) потомков имеют генотипы, сформировавшиеся в результате рекомбинации(а) между локусами А и В в процессе мейоза. Частота рекомбинации не зависит от генотипов родителей. Родители гомозиготны по двум рецессивным признакам, поэтому имеют только один тип гамет (даже 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 ( $Aa/bb$  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 (*cis*-фаза). Если же два сцепленных гена на каждой хромосоме представлены разными типами аллелей (т.е. один доминантный, а другой рецессивный,  $Ab$  или  $aB$ ), то конфигурацию называют фазой отщипывания (*trans*-фаза). В третьих, рекомбинация между двумя сцепленными лokusами не из фазы (т.е. там, где гены сцеплены рекомбинация между генами, называемая в аутосомном состоянии (т.е. с  $Aa/bb$  или  $Aa/bB$ ), не приводит к возникновению генетической комбинации, и поэтому, где если комбинация 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 музантифакторные (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. технологии рекомбинантных ДНК обнаружение и оценка генетического сцепления у человека представляли собой сложную и очень трудоемкую процедуру, которая к тому же обычно выполнялась безуспешно. При этом исследователи сталкивались с очень реальным problem. Во-первых, генетический статус родителей обычно бывает неизвестен, что затрудняет различение рекомбинантных и нерекомбинантных отцов. Во-вторых, изменчивость браков в семье 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. Синонимичными, дисперсионными по X-сцепленным лokusам, получают рекомбинантную или нерекомбинантную X-хромосому. Если фаза, а именно аллели двух генов лokusов известны у матери, известно, то среди синонимичных установили рекомбинантные и нерекомбинантные типы. Геномные отцы в данном случае не имеют значения, поскольку синонимично наследуют только материнскую X-хромосому. Иногда фоту 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 являясь (находясь в *cis*-фазе, т.е.  $Aa/bb$  или  $aB/bb$ ). Этот метод обнаружения сцепления основан на подсчете дочерних фенотипов у синонимичного большого числа дисперсионных женщин с известной фазой аллелей. В этом случае для каждого рекомбинантного по двум сцепленным генам лokusам (рекомбинантный являясь), будет равен сумме рекомбинантных хромосом (R), деленной на общее чис-

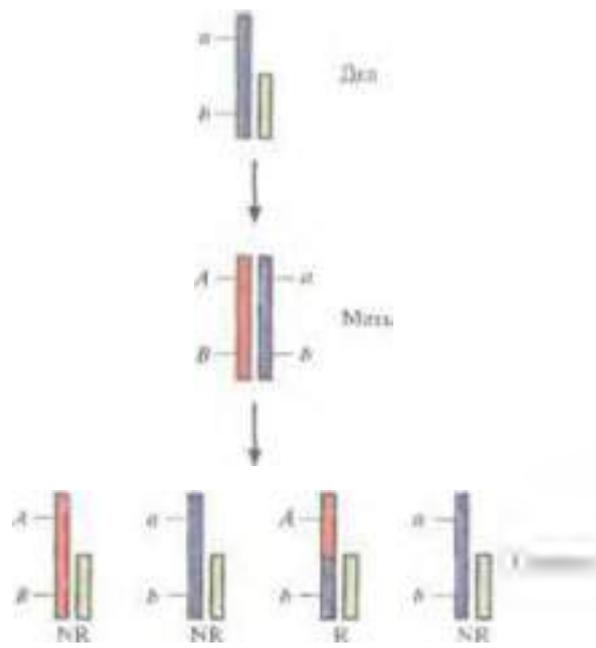


Рис. 20. В. Картирование X-хромосомы. В этом случае генетическая карта двух или большего числа X-хромосомных локусов у вичери (Мать) устанавливается на основании данных о X-структурных аномалиях ее отца (Дед). Эту информацию в свою очередь используют для определения, в каком из ее сыновей (Сыновья) получили рекомбинантную (R) и нерекombинантную (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 две фазы. Из X-хромосомы получены в семье локусов A и B. Y-хромосомы наследуются в отце более короткой полосой

лю хромосом — рекомбинантная и нерекombинантная (NR)

$$\Sigma(A)/\Sigma(B) + \Sigma(R)$$

Однako данный подход имеет ряд недостатков. Во-первых, не всегда можно определить генетическую фазу, в которой находятся аллели у предположительно дигетерозиготной матери, остается неизвестной. Во-вторых, не все сыновья в большой выборке семей будут гетерозиготны по аллелим в тех же двух локусах. Несмотря на все усилия, в 1980-х гг. не удалось построить достаточно притязательную единичную карту сцепления X-хромосомы человека, основанную на подсчете рекомбинантных и нерекombинантных хромосом. В то время было известно всего

несколько локусов и считалось маловероятным быстрое их картирование.

*Анализ сцепления методом максимальной правдоподобия. Алгоритм споманенни манго (1968 год.)*

Кроме методов, основанных на подсчете рекомбинантных между двумя локусами на основании прямого подсчета рекомбинантных и нерекombинантных хромосом, необходимо было разработать более сложные, точные методы, которые: 1) могут строит расчеты, не связанные с расщеплением и сцеплением; 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 рекомбинанционные частоты в том случае, когда сцепление обнаружено. Такой метод, впервые использованный в настоящее время, был создан в 1955 г. Мортеном.

При изучении сцепления рекомбинантных индексов обозначается трехбуквенной четкой (θ) в методе Мортена сравнивается вероятность I(θ) того, что у братьев и сестер (субсон) два локуса сцеплены (т.е. локализованы на одной хромосоме и находятся близко друг от друга), с вероятностью I(θ, NR) того, что два локуса не сцеплены (т.е. находятся на разных хромосомах или далеко друг от друга и пределах одной хромосомы), для любого рекомбинанционного индекса θ. В случае сцепления, поскольку рекомбинационный индекс неизвестен, он может принимать любое значение в интервале от 0 до 0,5 (0 < θ < 0,50). Если же два локуса распределены независимо по θ = 0,50 по определению. Другими словами, в том случае, когда половина потомства, полученного из 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 выделит так, будто они расположены на разных хромосомах. Следовательно, если I(θ) = 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-odds ratio), называемый лод-баллом (LOD). Лод-балл обозначается буквой Z, Z(θ) — но лод-балл для данного значения θ (где 0 < θ < 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  $\theta$ . Например, в семье с тремя детьми вероятность для каждого из них получить нерекомбинантную хромосому от дигетерозиготного родителя составляет  $\lambda(1-\theta)^3$ , где  $(1-\theta)$  – вероятность получения нерекомбинантной хромосомы, показатель степени  $3$  – число sibсов с нерекомбинантной хромосомой, точное число нерекомбинантных хромосом у sibсов,  $\lambda$  – коэффициент. Если все хромосомы одинаковы, т. е. все нерекомбинантные или все рекомбинантные, то  $\lambda = 1$  (т. е.  $5/54$ ), или  $n/n$  (где  $n$  – число sibсов в данной семье). В семье с четырьмя детьми вероятность того, что все они получат рекомбинантную хромосому от дигетерозиготного родителя, составляет  $\theta^4$ . 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.

Примеры рассмотрим по расчету под-баз по семье sibсов пятой 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 (окрашенные) или инцидент (NPS, *non-patella syndrome*). Основные признаки NPS – нарушение роста волос на пальцах рук и ног и редукция или отсутствие выжелевания. Ген NPS обозначается  $NPS1$ , а его рецессивный («нормальный») и доминантный («патологический») аллели –  $NPS1^*N$  и  $NPS1^*D$  соответственно. NPS 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 выжелеванием, незакрытыми – дети, у которых признака выжелевания шиблсвание отсутствует). Пункты под аллелими символом обозначают аллели группы крови системы ABO (используемые обозначения обозначены  $O$  соответствует  $ABO^*O$ ,  $B$  –  $ABO^*B$ ).

Отец 1-7 (рис. 20.9) гетерозиготен по локусу NPS, 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  $B$ , а генотип его группы крови 1-1)  $ABO^*O/ABO^*O$ . Следовательно, если дигетерозиготен по этим двум зутосомным локусам ( $NPS1^*N/NPS1^*D$ ;  $ABO^*B/ABO^*O$ ). Если локусы ABO и NPS1 сцеплены, то фаза, в которой находится их аллель у отца, неизвестна (сцепление с неизвестным фазой). Он может быть как  $ABO^*B$   $NPS1^*D/ABO^*O$   $NPS1^*N$  (фаза 1), так и  $ABO^*B$   $NPS1^*N/ABO^*O$   $NPS1^*D$  (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 NPS сцеплены и на аллели у отца находится в фазе 1 ( $ABO^*B$   $NPS1^*D/ABO^*O$   $NPS1^*N$ ), то дети 1-1, 11-2, 11-4, 11-6, 11-7, 11-8, 11-9 и 11-10 получили от него нерекомбинантную хромосому  $ABO^*B$   $NPS1^*D$  или  $ABO^*O$   $NPS1^*N$  (рис. 20.10). Все дети получили от матери (1-1) хромосому  $ABO^*O$   $NPS1^*N$ , поскольку они гомозиготны по двум локусам ( $ABO^*O$   $NPS1^*N/ABO^*O$   $NPS1^*N$ ). 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  $(1-\theta)^2(\theta)^3$ .

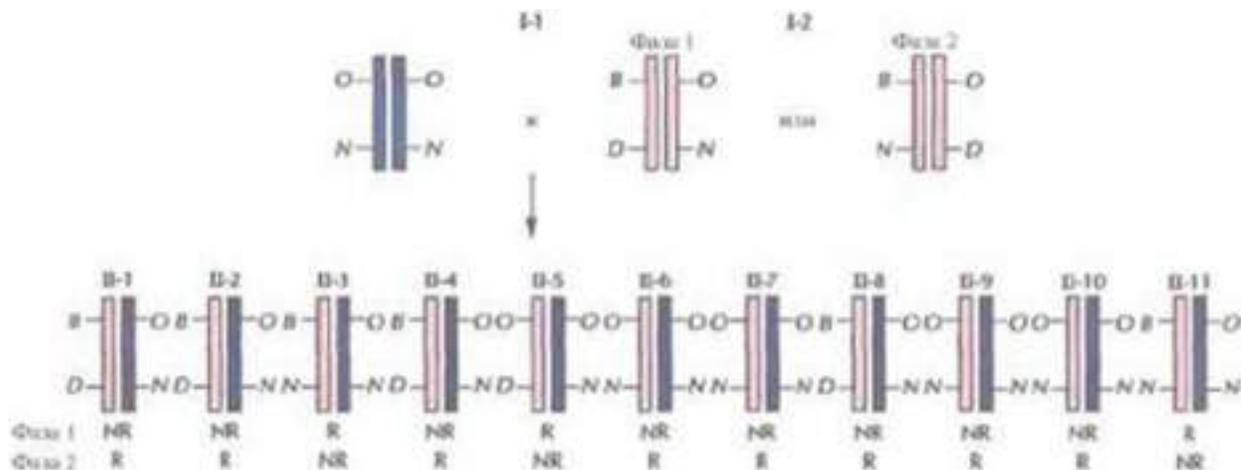


Рис. 26, 26. Генетическая организация хромосом ооцитогенеза и сперматозоидов у частых рецидивов, приведенная на рис. 26, 26, при условии сохранения того или иного варианта. Исходными структурами обозначены хромосомы группы крови системы ABO: O соответствует ABO<sup>0</sup>O, а B — ABO<sup>B</sup>B (гетерозиготы («инварианты») и рекомбинанты («варианты») даны в левом столбце (исходные) и антикопии в столбце A и B соответственно. Генотип отца (1-2) может измениться в любой из двух фаз (фаза 1, фаза 2). Хромосомы отца и хромосомы, полученные от него детьми, обозначены цветом (красный, синий, белый) и хромосомы, полученные от него, — цветом-оригиналом. Отмечено, какие из хромосом, полученных от отца являются рекомбинантными (NR) или рекомбинантными (R) для фазы 1 и фазы 2.

Рассмотримые аллели у отца с такой же вероятностью могут находиться в фазе 2, т.е. ABO<sup>B</sup>B NPSI<sup>N</sup>N/ABO<sup>0</sup>O NPSI<sup>0</sup>O. Тогда дети II-3, II-5 и II-11 (как и дети от него) не рекомбинанты (не хромосомы, а аллели из оставшихся детей) указывают 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  $f(\theta)$  повторной в родословной комбинации хромосом у его детей равна  $\frac{1}{2}(1-\theta)^2 + \frac{1}{2}(1-\theta)^2\theta^2$ . Также можно вывести аналогичное логичное выражение для разных  $\theta$  (обычно используют следующий набор значений  $\theta$ : 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  $\theta$  от 0 до 0,50). Затем вычисляют логарифм отношения вероятности для каждого  $\theta$ , кроме 0,50, к вероятности для  $\theta = 0,50$ . Например, для  $\theta = 0,10$  отношение  $f(0,10)/f(0,50)$  равно

$$\frac{1}{2}(1-0,10)^2(0,10)^2 + \frac{1}{2}(1-0,10)^2(0,10)^0}{\frac{1}{2}(1-0,50)^2(0,50)^2 + \frac{1}{2}(1-0,50)^2(0,50)^0} = \frac{2,152 \cdot 10^{-4}}{4,883 \cdot 10^{-4}} = 0,441$$

Логарифм логарифма 0,441 равен  $-0,356$ , т.е. и есть лог-вероятность для данного генотипа. Другими словами,  $Z(0,10) = -0,356$ .

Если фазы, в которых находится рассматриваемые аллели у отца, не известны, то и вероятность  $f(\theta)$  для данной семьи также будет известна. Например, если оба генотипа 1-2 имеют место фазы 1 (ABO<sup>B</sup>B NPSI<sup>0</sup>O/ABO<sup>0</sup>O NPSI<sup>N</sup>N), 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 имеет место фаза 2 (ABO<sup>B</sup>B NPSI<sup>N</sup>N/ABO<sup>0</sup>O NPSI<sup>0</sup>O), то  $Z(0,10)$  будет равен

$$\ln \frac{(1-0,10)^2(0,10)^0}{(1-0,50)^2(0,50)^0} = -4,826$$

Для соотношения с неизвестной фазой максим Z для родословной, приведенной на рис. 26, 26, варьирует от  $-5,993$  при  $\theta = 0,001$  до  $+0,029$  при

Таблица 20.1. Значения  $Z$  при разных  $\theta$  для сцепления, преобразованного на рис. 20.9, в случае соотношения частотности фемин

$\theta$	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
$Z$	1,973	1,825	1,671	1,514	1,359	1,209	1,055	0,920	0,794

$\theta = 0,45$  (табл. 20.1). Если бы мы получили хотя бы одну рекомбинационную хромосому с  $\theta = \theta$ , то  $Z \rightarrow \infty$ . Как видно из табл. 20.1, лим-бада максимална ( $Z_{\text{max}}$ ) при  $\theta$ , близком к 0,30. Прямые дополнительные расчеты для  $\theta$  от 0,20 до 0,40, показывают, что  $Z_{\text{max}} = +0,214$  при  $\theta = 0,274$ .

Значение  $Z = 10,214$  не позволяет с уверенностью говорить о сцеплении локусов  $ABO$  и  $NP51$ . Условимся, что два локусовых локуса могут считаться сцепленными только в том случае, если значение максимального лим-бада больше или равно 13,000, вероятность сцепления в этом случае составляет 100 к 1 или выше. В случае  $\lambda$ -сцепленных генов, сцеплено взаимодействуют на одной хромосоме, значение  $Z_{\text{max}}$  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  $Z$ -бады при разных  $\theta$  для разных семей и найти максимальное его значение. Преобразование отношения фреклоподобия для каждой из секций в десятичный логарифм позволяет суммировать логарифмы  $L$ -ов. Для определения сцепления локусов  $ABO$  и  $NP51$  было проведено примерно 25 расщеплений, в том числе несколько с большим количеством детей, и получены значения  $Z(0,10) = +31,235$  (табл. 20.2); это больше, чем +2,000, следовательно, два указанных локуса сцеплены.

Значение  $\theta$ , при котором  $Z$  достигает максимума, даст грубую оценку рекомбинационной

Таблица 20.2. Улучшенные значения  $Z$  при разных  $\theta$  для локусов  $ABO$  и  $NP51$ <sup>1)</sup>

$\theta$	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40
$Z$	26,199	31,235	30,405	27,746	22,963	14,435	9,046

<sup>1)</sup> *Proceedings of the 1st International Conference on Human Genetics*, III, 579-582, 1963, в печати.

мисией в  $n$  двух сцепленных локусах. В первом рабате по определению сцепления локусов  $ABO$  и  $NP51$  значение значения  $Z_{\text{max}}$  не представляло, но  $Z$ -бады при  $\theta = 0,10$  был наибольшим из всех  $Z$  посчитанных для разных  $\theta$ , из чего был сделан вывод, что, по-видимому, расстояние между этими двумя локусами составляет примерно 10 сМ. Необходимо подчеркнуть, что при аналогичных отношениях с  $NP51$  обнаружилось, что с локусом  $NP51$  сцеплены разные алели системы  $ABO$ . Другими словами, не существует специфического сцепления между конкретным алелем системы  $ABO$  и локусом  $NP51$ . Хотя не всегда наоборот, можно говорить только о фенотипическом сцеплении между локусами, а не между генотипическими алелями. Следует также отметить, что метод логарифма likelihood не позволяет определить лутосомную локализацию двух сцепленных локусов. Как мы увидим, для того чтобы установить, что локусы  $ABO$  и  $NP51$  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 идентифицированы. 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  $ABO$ - $NP51$ , 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 аллелей данного локуса в популяции. Например, для доминантного аллеля ( $A_1$ ,  $A_2$ ) 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 другими locus, поскольку большинство родословных будут гомозиготны по частому аллелю (или аллеля). Если же частоты двух аллелей данного locus составят 0,99 и 0,01, то гетерозиготными будут примерно 2% особей, и можно обнаружить сегрегацию или сцепление покрестами, поскольку в популяции много особей, гетерозиготных по данному locus (табл. 20.3). Таким образом, изучение сцепления у человека возможно только для locus с частотой встречающихся аллелей. 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 скрещиваниями<sup>1)</sup>

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

<sup>1)</sup> Частоты гетерозигот вычислены по формуле:  $2 \cdot p \cdot q$ , где  $p$  и  $q$  - частоты аллелей.

наклеточные гетерозиготы (гетерозиготы), и locus называют полиморфными. Поскольку гетерозиготы полиморфны, подобный полиморфизм аллелей системы АНЖ, встречается редко, для большинства генов (или локусов) характерно отсутствие гетерозиготы. Методы изучения сцепления с локусом (обнаружить) большое количество илиморфных 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 именованного гена и нормальным белком. Однако множество изменений нуклеотидов здесь не приводит к синтезу именованного белка продуктом, в отличие от, замены могут происходить в кодирующей области ДНК и не приводить ни к какому изменению. Такие безвредные замены, распространяющиеся на многие гены, представляют собой морфические сайты (маркерные locus, генетические маркеры), которые можно использовать для генетического картирования. Но иногда эти полиморфные сайты могут обнаруживаться.

В 1980 г. Д. Готтсфелл, Р. Уайт, М. Скотт и В. Дэвис (E. Gottschell, R. 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. Рестрицирующие нуклеотиды (рестриктазы) расщепляют ДНК в специфических сайтах. Когда однонуклеотидная замена приводит к отсутствию 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 рестриктазы можно установить, используя гибридизацию ДНК с зондами, строго специфичными к именованному участку хромосомы.

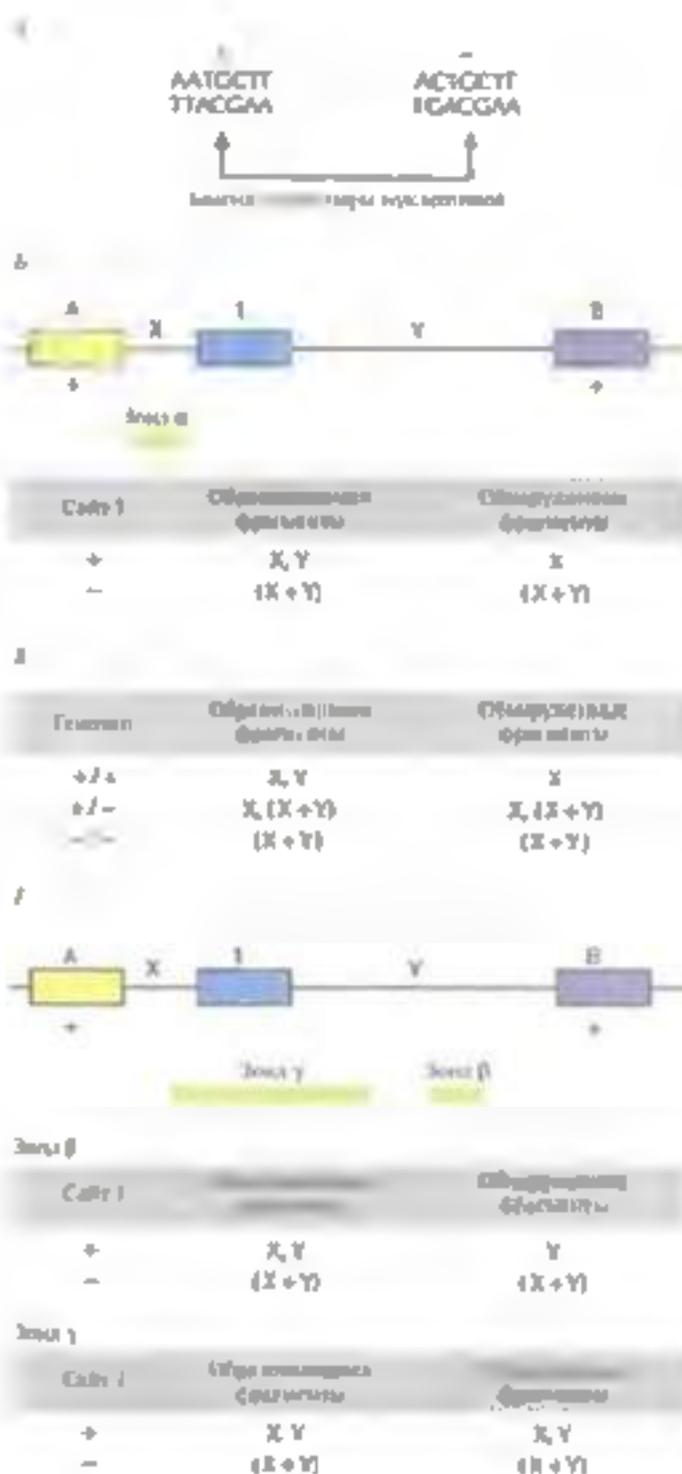


Рис. 20.11. Использование рестриктазы в качестве генетического маркера *A*. Зависит от того, какие условия в рестриктазы (сайте) (примечание к рис. 20.11), что рестриктаза не различает сайт и не рестриктирует ДНК (неактивный и инертный сайт), рестриктирует специфически сайты (+) и (-) соответственно. *B* Учитываем один триплет, содержащий три сайта (*A*, *I* и *B*), устоявшиеся одной и той же рестриктазой. *X* - расстояние между сайтами *A* и *I*, *Y* - расстояние между сайтами *I* и *B*, *X + Y* - расстояние между сайтами *A* и *B*. Сайты *A* и *B* могут быть как активными (оба +), а сайт *I* может быть как инертным (+), так и активным (-). Если сайт *I* инертный (+), то после обработки ДНК рестриктазой образуются фрагменты *X* и *Y*. Если же он активный (-), то образуется единственный фрагмент (*X + Y*). Если примеси были обработаны для Сьюэлла и условия *a*, то мы обнаруживаем фрагменты *X* и *Y* в том случае, если сайт *I* инертный (+), и фрагменты (*X + Y*), если он активный (-). Фрагменты, образующиеся после обработки рестриктазой, и фрагменты, выделяемые при электрофорезе по гелу (рис. с эталон *a*, для каждого из генотипов (+/+, +/-, -/-). *г* Фрагменты одной триплетной, образующиеся после обработки рестриктазой, и фрагменты, выделяемые при электрофорезе или с сайтом *I* или *B*.

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 устойчивым 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 прореагирует 20% и т. д. существует панмиксия, т. е. гибридизация с участками ДНК между сайтами А и 1 (рис. 20 11, б), то после бэот-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 гибридизируется 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 11, 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 11, 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 рестриктазными фрагментами (ПАРФ). Полиморфные сайты рестрикции образуют маркерные локусы на той хромосоме, где они присутствуют.

Генетический статус каждого ПАРФ-аллеля на одной хромосоме называется гаплотипом. В случае одного сайта существует два возможных

гаплотипа (+ или -), в случае двух разных сайтов четыре (+ +, + -, - + или - -); для n локусов число гаплотипов равно 2<sup>n</sup>. (Среднее число аллелей ПАРФ locus (или любых других полиморфных locus), 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 (--) сайты рестрикции в трех рассматриваемых locus отсутствуют. Генетический статус хромосомы, наследованной от отца каждым из детей, можно установить путем генотипирования. Сын 11-2 получил от отца хромосому, в которой произошла кроссинговер: остальные дети унаследовали от него нерекombинантные хромосомы.

На практике ДНК каждого индивидуума в отдельной пробе обрабатывают различными

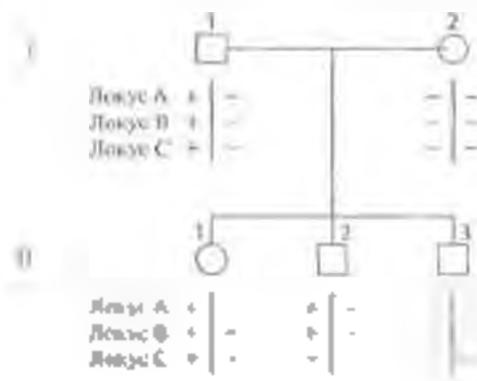
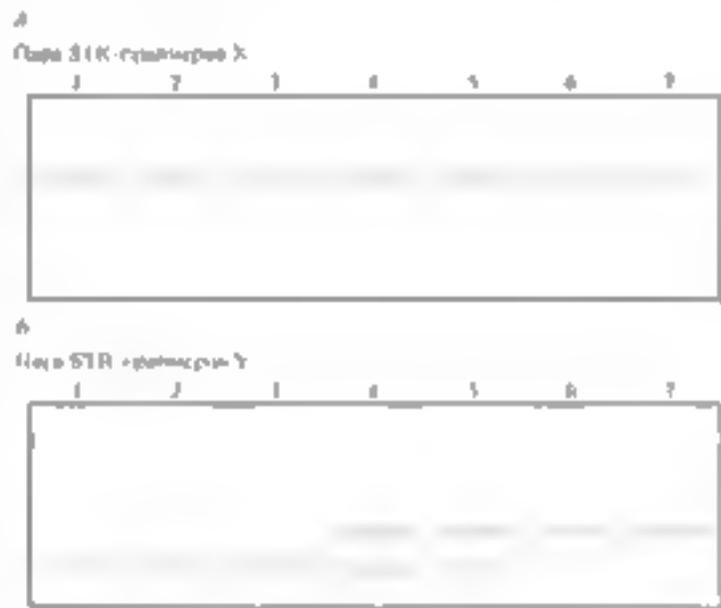


Рис. 20.12. Появление стрелки и рекомбинации ПАРФ-locus в родословии. Значками (+) и (-) обозначены аллели, соответствующие интактным и интактным сайтам рестрикции, при ПАРФ-locus (А, В, С), расположенных на одной хромосоме. Генетический статус 1-3 определен исходя из генотипов его родителей, + + / + + (не показано). (Среднее число аллелей у детей (примечание: что 11-2 получил от 1 рекомбинантную хромосому), а 11-3 нерекombинантную. Вертикальная черта (на показывающей набор ПАРФ аллелей) под символами, обозначает ген на этой хромосоме, наследованной от матери.



Рис. 20.14. Генетически STR-локус. А. ДНК, полимеризованная от разных индивидов (а-г), амплифицирована с помощью ПЦР, используя пару праймеров (X), фланкирующих (CA)<sub>n</sub> повтор. Размер всех образующихся ПЦР-продуктов одинаков (длина 17), если нет делеции, замены в длине STR. Если по какой-либо причине, STR-локус представлен только одним аллелем. Б. То же, что и на рис. 10.1, но с использованием другой пары праймеров (Y) для другого STR-локуса. Образующиеся две разные ПЦР-продукты имеют, что данные locus представлен двумя аллелями. Аллели 1-3 соответствуют амплифицированному фрагменту ДНК индивидов, гомозиготных по одному STR-аллелю, аллели 4 и 5 амплифицированному фрагменту ДНК гетерозиготных индивидов, несущих два разных STR-аллеля. Аллели 6 и 7 амплифицированы рекомбинантному фрагменту ДНК индивидов, гомозиготных по другому STR-аллелю.



ни, проводили амплификацию с использованием этих пар праймеров, и если обнаруживается, что эти последовательности встречаются реже, чем один раз, то синтезируют пару комплементарных праймеров и проводят амплификацию CA-повтора. Далее, используя эту пару праймеров, проводят ПЦР-тестирование ДНК, полученной от большого числа индивидов, ПЦР-продукты, длина которых для удобства электрофорезиса по разделению варьируется примерно 20 п. н., разделяют в поднапряженном геле. Если длина амплифицированного фрагмента образцов семейства ДНК одинакова для всех образцов ДНК, значит, повтор не полиморфен (рис. 20.14. А), и наоборот, если образуются

ПЦР-продукты разной длины, это указывает на полиморфизм по данному STR (STR-поллиморфизм, STRPI) (рис. 20.14. А). Различиями по длине CA-повтора данного локуса представляют собой аллели (рис. 20.15). Такие аллели нередко встречаются с частотой 0,20 и даже больше.

К настоящему времени уже обнаружены тысячи STR-локусов. Если мы обратимся к правилам, что и для ПЦР-локусов. В то же время наличие STR-праймеров часто отличает от наличия локусов. Многие STR-локусы были идентифицированы французскими исследователями при финансовой поддержке со стороны Французской ассоциации по замещению аутрофиям (Association Française contre les

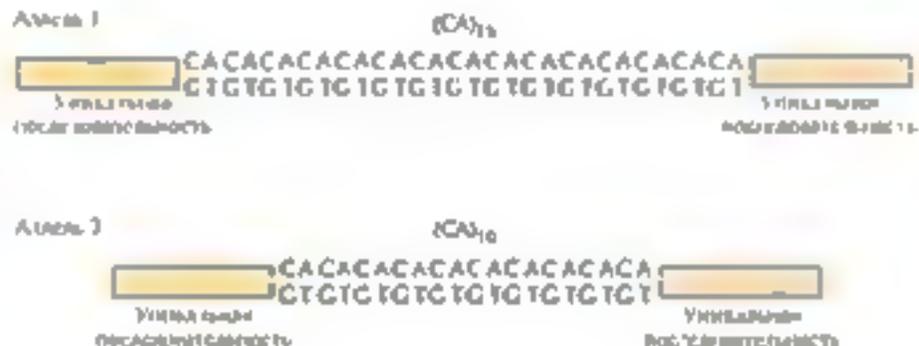


Рис. 20.15. Два STR-аллеля. Один из них (аллель 1) содержит повтор (CA)<sub>12</sub>, другой (аллель 2) – (CA)<sub>10</sub>. Повторы в обоих случаях фланкированы одинаковыми уникальными последовательностями.

Myra (Hies), и это имеет смысл оправдание в том, что обозначения митохондрии для STRP примеров начинаются с аббревиатуры 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 полиморфизма, которая может быть введена в компьютерную базу 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 связи между геном данного заболевания и полиморфизмом ПЦРФ или STRP-локусов, идентифицируя наследие с помощью сплайс-структур. Этот подход дает наилучшие результаты в том случае, когда заболевание имеет четкие симптомы, его наследование имеет однозначный характер и известны степени его penetrantности.

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 дальнейшего анализа 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 вычисляют двутетрастный (two-locusный) лод-балл. Если  $Z \geq +3.00$ , то имеет место сцепление, при  $Z < -2.00$  сцепление исключается.

Для определения хромосомной локализации гена, ответственного за доброкачественные семейные синдромы продроксенитиз (BFGS, benign familial neonatal convulsions), была изучена большая семья, представленная несколькими поколениями, члены которой страдают данным заболеванием (рис. 20, 16). Это состояние проявляется приступами неконтролируемых движений мышц лица, туловища, рук и ног в первые шесть месяцев жизни. Примерно в 90% случаев симптомы исчезают после 1 года. По-видимому, припадки не влияют на качество интеллектуальной и интеллектуальный статус BFGS – редкое заболевание, которое имеет четкие клинические признаки, наследуется по аутозному доминантному типу и имеет высокую penetrantность.

В исследовании родословной, отличающейся несколькими поколениями, для всех протестированных полиморфных маркеров, D20S19 и D20S20, были сделаны с локусом BFGS (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 рядом с ним. 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.

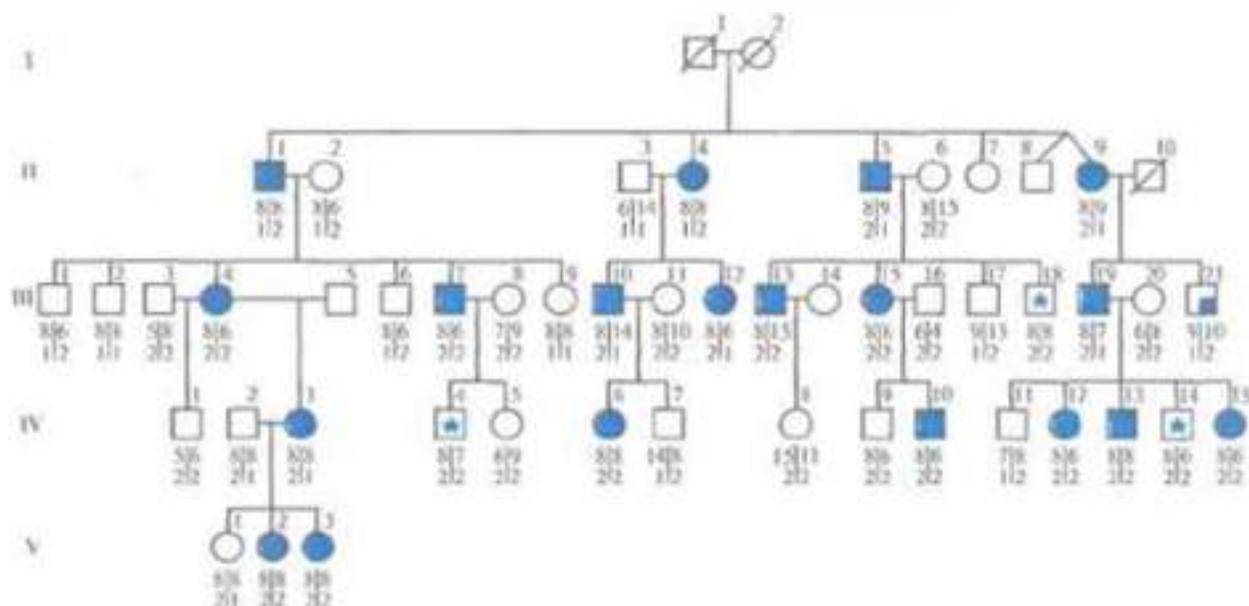


Рис. 20.16. Анализ непатитных двух хромосом по 20 полиморфным аллелям в родословии, члены которой больны ВФНС. Числа под символами – аллели двух полиморфных локусов,  $D_{1S}S_{17}V$  и  $D_{1S}S_{20}$  (верхние и нижние числа соответственно). Галочками обозначены хромосомы индивидуумов родственного партияльного типа с одним из генов. Перечеркнутые символы соответствуют умершим индивидуумам, неимевшим потомства. Квадратик в квадрате отвечает сыну, у которого «материнский» фенотип индивидуума отличался от фенотипа других больных членов семьи II-4 и III-9 (идентичные (р-тип) гены) братства. Символами со звездочкой отмечены случаи патологической трансформации генов при гомозиготности (III-18, IV-4, IV-14). У больных членов семьи обнаруживается коэgregation гена (8,2) с заболеванием, все они несут эту хромосому, унаследованную от общего предка (по данным работы Скарлати *et al.*, Ломба [Lombardi] 1991: 647–648, 1989.)

Среди членов представленной на рис. 20.16 родословной в большинстве случаев наблюдается коэgregation гена (8,2) с заболеванием; это позволяет предположить, что в данной семье locus ВФНС находится именно на хромосоме 8,2. Можно было ожидать, что и индивидуумы III-18, IV-4 и IV-14, получившие от больного родственника хромосому (8,2), также будут больны, однако это предположение не подтвердилось. Возможно, для некоторых случаев с патологией

патентности заболевания. Другими словами, у индивидуумов 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 диагностике или тем, что у некоторых индивидуумов, 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, индивидуум IV-7 унаследовал хромосому (14,1) от больной матери, а хромосому (8,2) с нормальным геном ВФНС от здоровой матери. Сложнее объяснить генотип индивидуумов IV-9 и V-1. С одной стороны, они могли получить хромосому (8,2) с нормальным геном ВФНС от здоровых родителей

Таблица 20.4 Двухместный тест-скрининг для анализа ВФНС и двух полиморфных локусов хромосомы 20\*

Дети	Родительские хромосомы от отца, A					
	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
$D_{1S}S_{17}V$	1,13	1,09	1,06	1,10	1,07	0,60
$D_{1S}S_{20}$	2,03	2,03	2,03	2,36	1,61	0,76

\* По данным работы Скарлати *et al.*, Ломба [Lombardi] 1991: 648

## ВАЖНАЯ ВЕЩА

## Посредством генетической карты сцепленной черт 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: 265-266 (1984)

Впервые рандомно идентифицированные генетически человек, идентифицированные в 1980-х гг., стали анонимными близнецами по авторскому имени Д. Боннен, К. Л. Уайт, М. Здзиенicka и С. Дэвис. Они обратили внимание, что полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) человека поровалел с полиморфизмом аллели (маркерные локусы), подлинность которых была подтверждена. Как только автор и свои коллеги, «мы хотим предложить новый способ идентификации генетической карты сцепленной черт человека. В его основе лежит сравнение при помощи генетически рекомбинантных ДНК сцепленных аномальных ДНК типов, способных выявить полиморфизм в определенных наследственных при гибридном с индивидуальными ДНК, образующими рестрикцию». Кроме того, «они отмечают, что, не пользуясь специальным тестом или иного заболевания с маркерным локусом, можно определить хро-

мосомы дождлившие люди. Если эта идея не была высказана, то она не была бы раскрыта. Это было сделано и на конференции Боннен и др. привели в эксплуатацию первую машину. «Применение метода зондов, специфичных в отношении полиморфных участков ДНК, для анализа ДНК четкой родословной с большим числом (около 100) образцов истинных форманты в течение человека».

В 1987 г. на разных хромосомах человека были идентифицированы локусы и картированы сотни ПДРФ маркеров. С их помощью были идентифицированы сотни тысяч наследственных заболеваний, при помощи генов Дженетик и музикальной К. особенно, высокополиморфные локусы расположены на разных хромосомах человека независимо и не всегда (иногда) связаны друг от друга. Кроме того, ПДРФ эти (т.е. генетически не гибридные) люди с

рестрицированными ДНК, неслучайно и часто имеют аналогичные результаты. Все эти проблемы удалось решить, когда Вебер и Май обнаружили, что во всем геноме человека существуют различные участки, которые имеют высокую частоту рестрикции для трех и четырех нуклеотидных повторов (каротиды таковых интронов STS, от них ДНК будет переносить каротиды интронов дождлившие при помощи ПДРФ). Как писали авторы, «данный тип полиморфизма первоначально, вероятно, найден широкое применение при изучении наследственной наследственности до идентификации и идентификации увеличивающиеся генетически человек при черт человека STS, особенно для хромосомных типичных повторов «фосфорилируемые маркеры», в этом случае они уже выделены ПДРФ локусы и в настоящее время они используются для идентификации индивидуальных генетически 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, генетически у IV-9 и V-1 родственники «близнецами» будет объяснено «полной идентичностью» в том случае, если они установили хромосому (8,2) с веткой  $DFX^{*}D$  от большого родителя. Необходимо подчеркнуть, что с другой стороны с III-15 может не наблюдаться сцепления аллели  $D2S19^{*}A$  и  $D2S20^{*}2$  с аллелем длинного шпалец. Так получается, что в рассмотренном нами случае именно эти полиморфные аллели находятся на

той же хромосоме, которая несет аллель  $DFX^{*}D$  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  $DFX$  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 (вплоть хромосомы или внутри нее). К ней переходим обратно 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 разброшенных 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, вторые фланкируют вариант гена.

Используя для картирования полиморфных локусов являются семьи, 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 членов 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, функционируя как референс. В действительности он состоит из культур лимфобластных клеток (или линий большинства клеток CEPH-семей) и служит готовым источником ДНК для картирования новых полиморфных локусов по мере их обнаружения.

Построение мультилокусной генетической карты (карты сцепления) хромосомы человека является задачей, для ее решения необходимыми являются компьютеризированная программа, позволяющая установить порядок расположения локусов, наилучшим образом согласующийся с данными по рекомбинациям. Приблизительно равными локусы упорядочиваются по мере возрастания числа локусов, которые наследуются совместно. 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 из них являются реальными вариантами, все же число возможных вариантов остается очень большим. Обычно сначала находят наиболее вероятные расположения нескольких сцепленных локусов, а затем комбинируют их «наилучшим» образом и строят статистически достоверную карту сцепления всех локусов. Критерием того, расположили 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 полиморфным маркерам необходимо провести примерно 10 000 анализов. Генотип каждого индивида по каждому локусу тратит в быд данные. 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 возникнуть и неправильным выделением рестриктазы локусов и расстояния между ними. Ошибочные данные по возможности исключаются из анализа. Для генотипирования CEP1-семей определяют все «автоматические» локусы и рекомбинационные участки (R), а исходя из этих данных конкретная компьютерная программа строит генетическую карту (карту сцепления).

Карты сцепления хромосомы человека постоянно обновляются по мере идентификации локализаций полиморфных локусов. С увеличением числ локусов повышается разрешение карты и уменьшается расстояние между локусами. К 1994 г были определены геномы члена CEP1-семей примерно по 6000 полиморфным маркерам (с помощью мультилокусного картирования установленно положение примерно 1000 локусов по всему геному человека со средним расстоянием между локусами около 4 сМ. Задача первоначально разработанных карт 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 определением (идентификацией) заболевания 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 вычислять 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 четырек полиморфных локусов обусловлено тем, что при большем числе 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 радиационных гибридов*

Для картирования с использованием радиационных гибридов (РГ картирование) не нужно собирать рецессивные и генотипировать члена семьи CEP1 семей. В основе метода лежит работа с соматическими клетками с хромосомами человека. РГ-картирование клеток хромосомы кариотипа то же обычно выполняется с помощью гибридной (человек/грызун) клеточной линии, содержащей одну хромосому человека. Клетки такой микромощности гибридной клеточной линии поддерживают радиационно летальным доз ионизирующей радиации (реплетивная или гамма лучей), в результате чего разрушаются клеточные мембраны, инициализируется ферменты, происходит фрагментация хромосом. Для выделен порции лозы ионизирующей радиации, положенной биологическим объектом, является раз (год, от пяти миллионов до миллиардов). Один раз равен 0,01 Дж на 1 кг массы или 100 эрг на 1 г массы. Обычно клетки в кариотипе гибнут при 3000 раз. Чем больше доза, тем более мелкие фрагменты выживают и тем меньше размер образующихся 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, приходится сшивать облученных (донорских) клеток с необлученными (реципиентными) клетками трупачами. Облученные клетки, сливаясь друг с другом или оставшиеся неподвижными, не способны расти в культуре вследствие радиационных повреждений. В свою очередь, реципиентные клетки, как сливаются друг с другом, так и не сливаясь, лишены селективного маркера, который присутствует в донорских клетках и обеспечивает их рост в культуральной среде, используемой для скрининга. 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 отдельные клеточные линии — 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 хромосомоспецифичных 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 хромосомоспецифичные 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 выщелаченной РГ-картированию<sup>1)</sup>

РГ-линия	Наличие селективных маркеров						
	A	B	C	D	E	F	
1	+	+	+	+	+	+	
2	+	+	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	+	+	
5	+	+	+	+	+	+	
6	+	+	+	+	+	+	
7	+	+	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	+	+	
9	+	+	+	+	+	+	
10	+	+	+	+	+	+	

<sup>1)</sup> Фрагменты ДНК выщелачиваются из РГ-клеток с помощью селективного выщелачивания. В таблице показаны данные по радиационному картированию.

ДНК которых не амплифицируется, образуются ввиду неэффективного PF-картирования необлученных панелей 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-выделены как линейные отрезки вероятности получения конкретной паттерны сохранения двух сайтов с вероятностью того, что при облучении эти сайты всегда разделяются разрывом. В отличие от мейотической рекомбинации, в для частоты радиационных разрывов учитывается наличие от 0 до 1; 0 —

означает, что два маркерных сайта находятся на расстоянии  $n$  при определенном поле облучения. Т.е. они тесно сцеплены. При  $n = 1$  маркеры сцепляса разделяются при определенной доле облучения, т.е. вообще не сцеплены. Если  $n$  больше 1,00, можно с уверенностью говорить о сцеплении двух маркеров. Разработаны компьютерные программы, позволяющие упорядочивать сайты и определять расстояния между ними на  $R^2$ -карте.

Расстояние между сайтами на  $R^1$ -карте определяется так на основе карт сцепления (СР). Последний параметр (параметр сцепления) пропорционален доле облучения, необходимо указать дозу, при которой была получена данная  $R^1$ -шкала и построена  $R^1$ -карта. Например, расстояние в  $1 \text{ cP}_{1000}$  означает, что при дозе 1000 рад между двумя маркерами произошло разрыв в 1% случаев.

Прямая связь между сцеплением и числом пар нуклеотидов не существует. Можно лишь сказать, что чем выше доля в парах, тем меньше физическое расстояние для конкретной величины в сцеплениях. Например, расстояния в  $1 \text{ cP}_{1000}$ ,  $1 \text{ cP}_{10000}$ ,  $1 \text{ cP}_{100000}$  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  $1 \text{ cM}$ , т.е. 1000 п. и т.  $R^1$ -карты не только имеют более высокое разрешение, но и являются более полными, чем генетические. Кроме того,  $R^1$ -картирование проще методическое и техническим плане, и новые сайты можно быстро включать в ранее построенную  $R^1$ -карту. К сожалению,  $R^1$ -картирование не позволяет локализовать зоны тех или иных заболеваний в специфических районах хромосомы. Несмотря на это при построении мультилокусных карт хромосом человека  $R^1$ -картирование, вероятно, является картирование по сцеплению, основным в генотипировании членов С.Р.Н-семей.

### Физическое картирование генома человека

Генетические и  $R^1$  карты указывают на определенные расположения маркерных сайтов. Расстояния между сайтами измеряются в условиях сцепле-

ния, которые отражают частоту рекомбинации (СМ) или вероятность сохрания пары 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 — это хромосома или ее область, имеет 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 секционки ДНК клоны, содержащие сверхкрупномасштабные сегменты. Поскольку на клонках в перекрывающихся участках и другой информации о положении клонов, можно реконструировать непрерывный ряд клонированных сегментов какого-то района хромосомы, неопределенно или всего генома были получены упорядоченные наборы смешанных (суперклоны) клонов (копий) на основе YAC- (yeast artificial chromosome, искусственный хромосом дрожжей), BAC- (bacterial artificial chromosome, искусственный хромосом бактерий), PAC- (pacifirophage P1 artificial chromosome, искусственный хромосом бактериофага P1) и космидных библиотек ДНК человека. Отметим, что стратегия построения копий из крупных фрагментов ДНК человека, содержащихся в YAC-, BAC или PAC-библиотеках, не имеет отношения к той, какой для P1 или космидных 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 перекрывающихся STS. STS — это короткий однокопийный участок ДНК (примеры IN1, MDT1 и т.), который можно выявить при помощи ПЦР с не-полиморфным заданным шаблоном (примеры). Для получения приближенного копий, клонны выбраного участка имеют участок хромосомы, требуется большое число STS, находящихся на расстоянии 50–100 п. и т. 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 30 000.

Для создания STS библиографически различные подходы. В основном эти ДНК изолированы из генов одной хромосомы человека, поликлональной при помощи протокальной агглютинации, образуются рестриктазой и клонируются в векторе, способном амплифицировать небольшие (< 1000 п. н.) фрагменты ДНК. Затем секвенируют вставки из клонов, выбранных случайным образом, и идентифицируют те клонны, в которых вставка короче (100 п. н.) те, которые содержат последовательности из повторяющихся элементов ДНК человека. Наличие инвертов определены при помощи компьютерных программ, сравнивая нуклеотидную последовательность вставки с последовательностями всех известных повторов ДНК человека. Затем для каждого идентифицированного клонна 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 черотный набор перекрывающихся клонов и оптимальное размещение их относительно STS (рис. 20.18). С разработкой методов Р-картирования появились возможности 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 свитчирующей 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, состоявшие из 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 $\lambda$ -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 темной дактилоскопии. Для этого из каждого клонна эстрагируют ДНК и обрабатывают ее рестриктазой. Полученные фрагменты метят, разделяют при помощи электрофореза и анализируют радиоавтографическими методами. Каждый клон порождает специфический набор фрагментов (уникальный отпечаток от ДНК); перекрывающиеся клоны или несколько фрагментов совпадают.

Для конченого мечения ДНК-фрагментов — независимо от характера обрабатываемых нуклеиновых кислот (обычно ДНК) — можно использовать реакцию замещения, катализируемую ДНК-полимеразой T4. В этом случае в препарате или меченой ДНК, обработанной рестриктазой, добавляя ДНК-полимеразу и один меченый дезоксирибонуклеотид (рис. 20.20). Под действием 3' концевой метки вблизи ДНК-полимеразы происходит последовательное озонирование 3' концевых нуклеотидов. Процесс продолжается до тех пор, пока в приближающийся центр не включается нуклеотид, долго симметрично меченому дезоксирибонуклеотиду, добавляемому в реакцию смесь. Далее в качестве индикатора активности ДНК-полимеразы, в 3' концы присоединяется свободный меченый нуклеотид. Поскольку другие нуклеотиды в реакционной смеси отсутствуют, дальнейшее реагирование не происходит.

Для мечения индивидуальных фрагментов существуют и другие способы. Усеченный 3' концевой фрагмент можно удлинить (растормозить) при помощи фрагмента Кленова используемого ингибиторной 5' концевой в качестве матрицы, дисстриантинге (вместо матрицы 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							+	+		+						

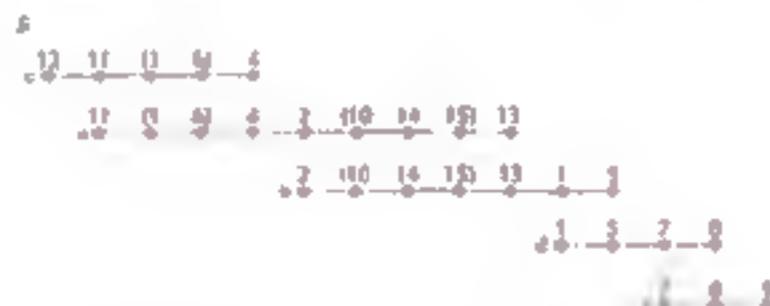


Рис. 20.18. STS-картирование. А STS с 1 по 15), обнаруженные с помощью HHP-скрининга в клонной библиотеке зондов (число "+"). Буквами L и R указаны STS, размещенные на 1'- и 2'-концах вставки (та же левая и правая концы соответствовали). Б. Идентифицированные перекрывающиеся участки, можно построить адитив из пяти клонов и карту расположения STS. Полученные данные не позволяют установить порядок расположения маркеров в скобках. Интервалы между STS представлены символами, в соответствии с которыми неизвестны.

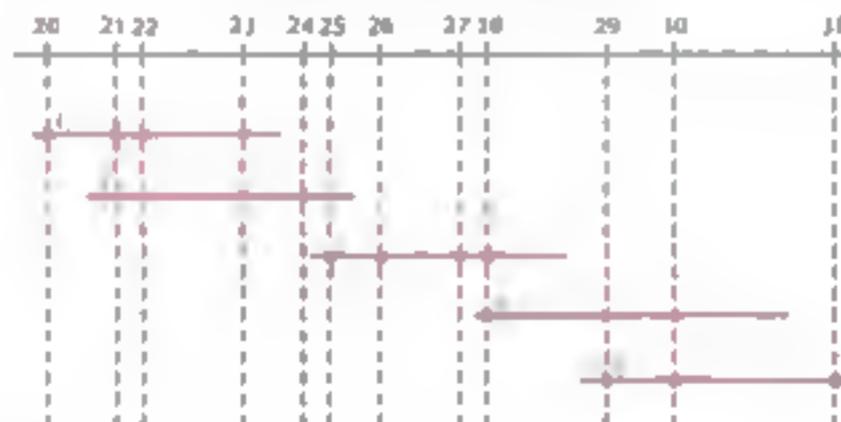


Рис. 20.19. Картирование с помощью упорядоченных STS (числа с 20 по 31 над горизонтальной линией). Точками указаны STS-состав клонов (—). STS идентифицированы что только мет без труда идентифицировать перекрывающиеся участки

структурной информации рестрикционных фрагментов можно прикоснуться меченые зонды.

Для выявления перекрывающихся участков необходимо проанализировать 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 организуют 141-клеточный континг. Наличие перекрывающихся участков в клонной коллекции подтверждается построением подробных рестрикционных карт вставок. Проблемы между контингами возникают, выбирая зоны из близлежащих клонов соседних



Рис. 20.20. Концевое метение шестнадцатилетней ДНК с помощью ДНК-полимеразы  $\beta$ . 3'-излучающая активность ДНК-полимеразы связывается с 3'-концами (а), с выступающими 3'-концами (б) или с выступающими 5'-концами (в). Стимуляция происходит от тех пер. пока не противостоит какой-либо неэкономичной остановке, когда метируется метильная группа. Метильная группа присоединяется свободной метильной группой динуклеотида. Метильная группа в оба конца фрагментов ДНК (на рисунке это не показано). Для метения можно использовать любой из динуклеотидов.

клеточной и провела сравнительный анализ, содержащий крупные вставки, для поиска невосстанавливаемых участков ДНК.

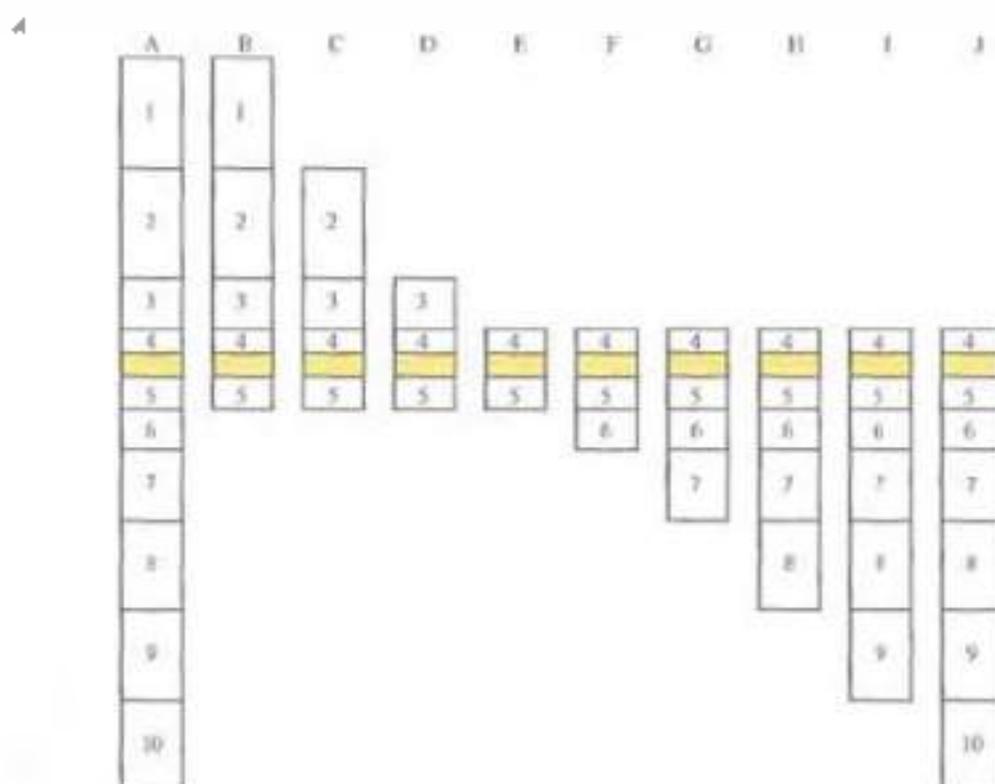
### Транскрипционные ассоциации

Клетки кДНК-библиотеки представляют собой ДНК-копии тех транскриптов экспрессирующихся генов, которые присутствуют в конкретной ткани в момент экспрессии их мРНК. «Прилипки» идентифицируются кДНК в хромосомном районе соответствующим к выделению возможных ассоциаций на месте генов тех или иных заболеваний. Если выявлен генетический дефект, то ген данной ассоциации находится в той же области хромосомы, что и кДНК-последовательность(и), то можно проверить, не принадлежат ли типичные копии кДНК из генов этого заболевания.

Прилипки кДНК-клеточной и других типов нуклеотидных экспрессируемых последовательностей в специфическом хромосомном районе являются транскрипционными ассоциациями. Для построения транскрипционных карт используются различные методы. Одним из этих ча-

стично определяют отдельные кДНК-клетки и идентифицируют транскрипционную часть генов кДНК-клетки, получая STS. Другим типом STS являются экспрессируемые STS (eSTS). Для определения хромосомной локализации eSTS используют явные симпатические гибридные клетки, которые содержат единственную хромосому человека (монохромосомные гибриды) или фрагменты конкретной хромосомы человека (делеционные панели). Для этого ДНК каждого из монохромосомных 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, внутригенные STS можно нанести на существующие Р-карты. К 1996 г. на всех аутосомных X хромосомах было картировано около 20 000 внутригенных STS человека.

Помимо экспериментов по картированию кДНК-клеточной и хромосомных районов, в Институте исследования генов в Роквилле, Мэриленд (The Institute for Genome Research) и других



Маркер	По наличию или отсутствию										Рейтин	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
STS a	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3
STS b	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	0
STS c	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3
STS d	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	7
STS e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	10

Рис. 20.21. Примеры а) цифры и специфическому хромосомному району с не повторяющимся делегацией планки гибридных клеток. А) Связанность представителем районов хромосомы, присутствующим в кариотипом гибридных клеток (A) и в хромосоме хромосома B) делегацией хромосом гибридных клеток. Районы (с 1 по 10) обозначены в гибридных клетках в порядке убывания длины. В) результаты ПЦР-анализа ДНК гибридных клеток на наличие маркера STS маркера (с STS a по STS e). На наличие или отсутствие ПЦР-продукта указывают наличие или отсутствие соответствующего маркера. Данные о наличии или отсутствии ПЦР-продукта в хромосоме хромосомы гибридных клеток STS маркера. Например, STS d (на риске в районе 7, вследствие соответствующий ПЦР-продукт образуется при амплификации каждой хромосомой хромосомы гибридных клеток, в которой присутствует район 7.

лабораторных животных к реализации проекта по частичному секвенированию клонов  $\lambda$ ДНК-библиотеки тела ургана 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 называются маркерными экспрессируемыми последовательностями (EST, от англ. expressed sequence tags). С их помощью можно изучить размеры, рибозимные и транскрипционные активности 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  $\lambda$ ДНК-клонов и обработка полученных данных позволила определить, каковы по сути EST соотносятся с теми, которые уже были секвенированы, и если последовательность действительно является новой, то она не была данна по JSG. 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  $\lambda$ ДНК-библиотек 37 органов и тканей. Примерно 90 000 EST представляют собой рибозимы экспрессирующиеся последовательности человека, из них примерно 10 000 соответствуют генам, для которых в клетке известны, а остальные 80 000 еще не открыты гены.

### Клонирующие гены заблуждений человека

Как правило, ген однозначно ассоциирован с конкретным клонированием, руководствуясь как клиническими составленными наборами экспериментальных протоколов. Выбор генов и их распространения исследователи делают в зависимости от конкретных условий. Начало поиска генов заблуждений определялось наличием информации о природе данной геном. В других случаях геном продукт бывает хорошо известен, в других можно лишь догадываться, что он собой представляет. Наконец, для многих из-

следственных заболеваний ирригии геномного продукта мыслить неясно. 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 встречавшиеся 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 (PTI, 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 ирригии. 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 участков, содержащих тапы сплайсинга.

ПЦР продукты каждой реакции денатурируют, быстро охлаждают и разделяют с помощью электрофореза. Гетеродуплексные структуры (сформированные при смешивании оснований и образовании других связей неидентифицируемых одностранных молекул ДНК) образуют специфические конформации, зависящие от ее нуклеотидной последовательности. Следовательно комплементарности две цепи одной молекулы ДНК имеют разную нуклеотидную после-

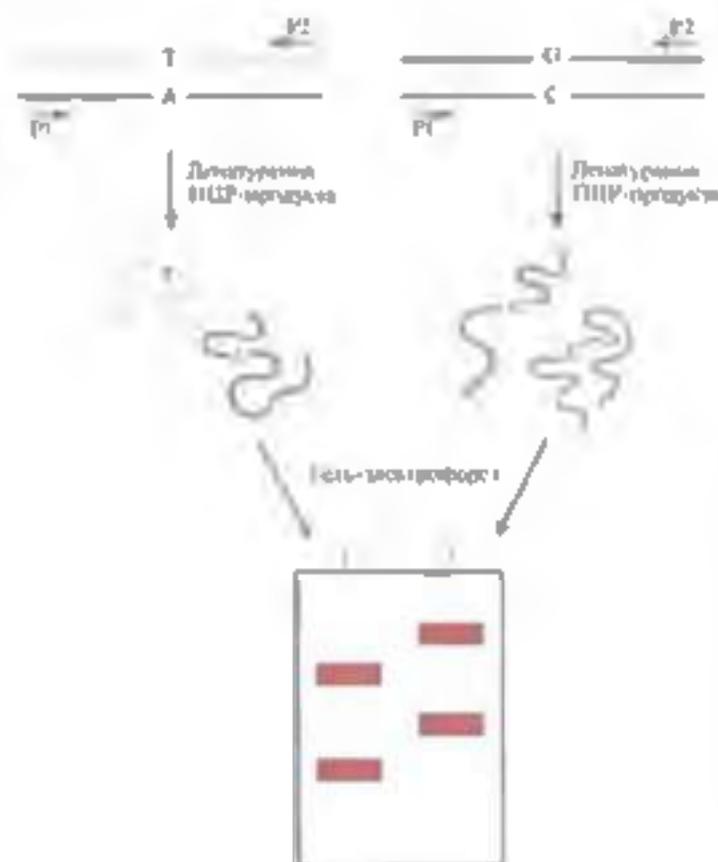


Рис. 20.22 Анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP) (цепочки ДНК, разрыхленные одной из праймерных окрасочных (A-T) или (C-G) амплификацией (P1/P2) и восстановившиеся конформации праймеров (P1, P2). ПЦР-фрагменты денатурируют и ренатурируют с помощью геля, здесь праймеры на двух сторонах (1, 2). Расстояние, на которое перемещается одноцепочечная молекула ДНК, зависит от ее конформации, в частности, в своей среде, — ее трехмерной конфигурации. Две цепи ДНК различаются определенным количеством сайтов, различные цепи могут иметь разные конформации, в соответствии, ПЦР-продукты образуют в геле не две, а четыре полосы.

ловительность, в итоге принимает разную трехмерную конформацию и мигрирует при геле-электрофорезе с разной скоростью. В результате после разделения в геле наблюдаются две полосы, соответствующие разным конформационным цепям. Если две молекулы ДНК, представляющие одну и ту же участок гена, по какой-либо из reasons не идентичны, различаются одной парой нуклеотидов, то с большей вероятностью конформации одноцепочечных цепей таких молекул ДНК будут различаться. Другими словами, каждая из четырех цепей будет перемещаться при геле-электрофорезе со своей скоростью (рис. 20.22). С помощью метода SSCP можно лишь наблюдать нуклеотидные изменения и определить наличие или отсутствия мутации в определенной области гена, но не определить природу мутации; такую информацию может дать лишь секвенирование. Метод SSCP имеет свои ограничения: он выявляет около 90% однонуклеотидных заменений в ПЦР-продуктах длиной не более 200 п. н.

### Функциональное картирование

Функциональное картирование гена заключается с определением амплитудной последовательности белка с известной функцией, что позволяет реконструировать нуклеотидную последовательность кодирующей области соответствующего гена (гена-матрицы). Схожим образом это можно сделать, синтезируя плавильную конформационную зону и проводя скрининг cДНК-библиотеки, используемой для гена, в которой каждый белок присутствует в большом количестве. Если можно выделить синтетическую cДНК, с которой взаимодействует данный белок, то так же как на мышь можно синтезировать полипептиды cДНК и скринировать ее. Правильность выбора этих сайтов cДНК можно проверить с помощью скрининга генов.

Хромосомную локализацию генов можно определить методом гибридизации in situ с cДНК в юном или эмбриональном с его геномным материалом клонированием. Для более точной локализации

ген-мишень можно также провести сравнительный анализ митохондриальной ДНК. Гибриды, в целом и сывороточной жидкостью (сыворотка при наличии ДНК-зон и/или отобранных репродуктивных клонов).

Затем для определения клонов, гибридогенных с данными кДНК-зон, проводят скрининг амплификационного продукта (АМП) в соответствующем районе, в котором локализован ген-мишень. Отобранные генетические клоны секвенируют в соответствии с данными о нуклеотидной последовательности (вектор кДНК, идентифицируют участки нитриды и 5' ) флуоресцирующие последовательности гена. В отсутствие последовательности, соответствующей району нуклеотидной хромосомы, который содержит ген-мишень, идентифицируют клоны с критичной секвенцией. Сывороточной жидкостью (сыворотка при наличии кДНК- или генетического зон). Из клонов с критичной секвенцией получают субклоны с соответствующими остатками, и анализируют сыворотку при наличии кДНК-зон. Полученные клоны секвенируют и характеризуют ген-мишень (рис. 20.23).

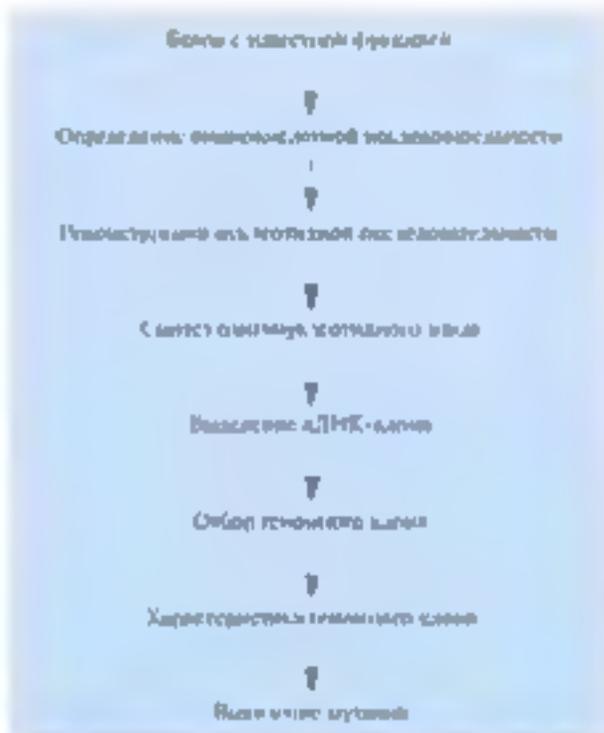


Рис. 20.23. Функциональный картирование. Идентификация генов для случаев, когда известна эмбриональная локализация эмбриональной ДНК-зон и/или отобранных репродуктивных клонов.

### Анализ генов картирования

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, в которых выявлено заболевание. Затем просматривают соответствующие последовательности всех клонов, полученных на последнем этапе (ген и выделенный ген(ы)-кандидат(ы)). Сравниваются на нуклеотидном уровне последовательности ген-кандидата, выявляются структурные особенности мутаций и с их 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.

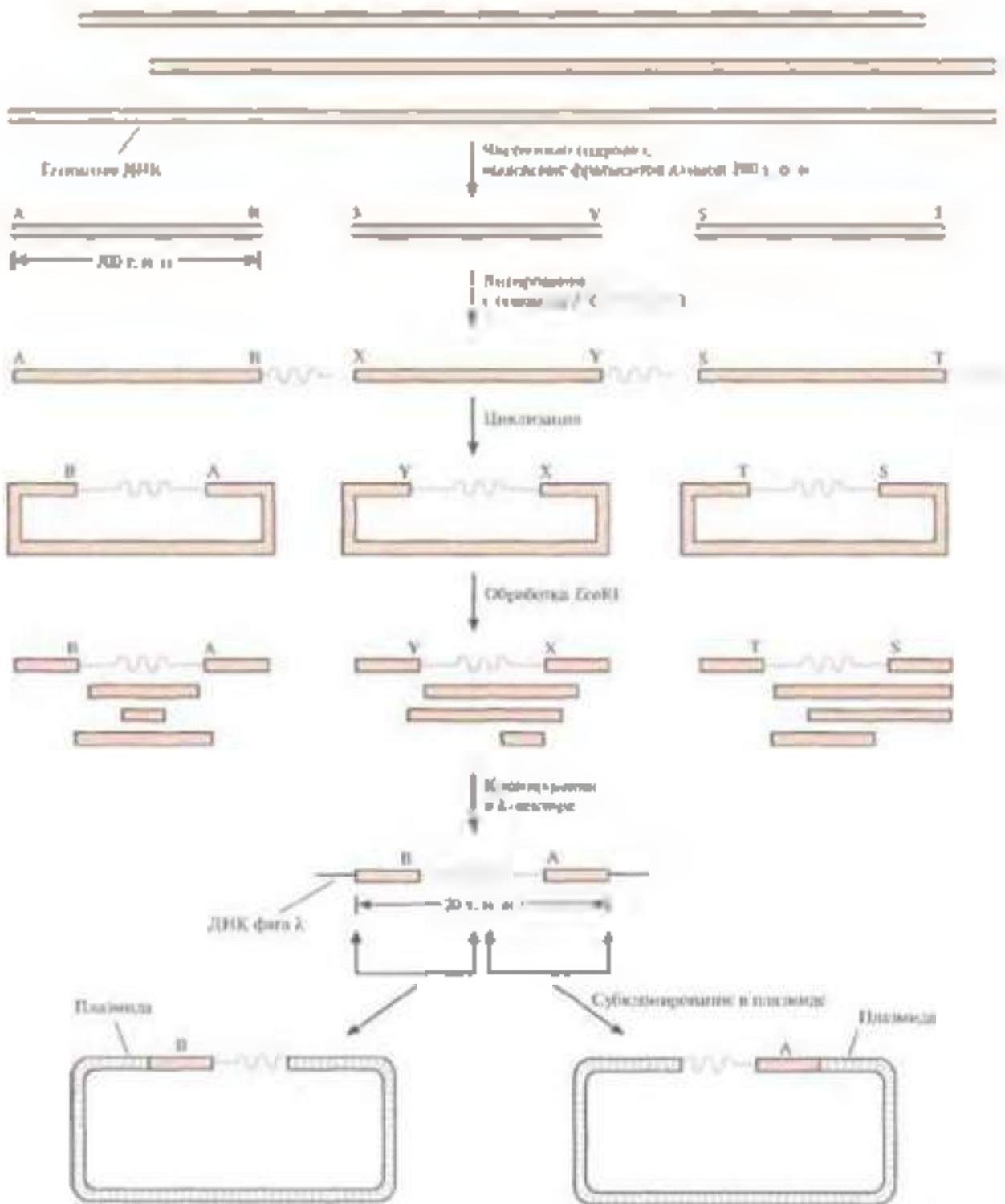
### Позиционное картирование

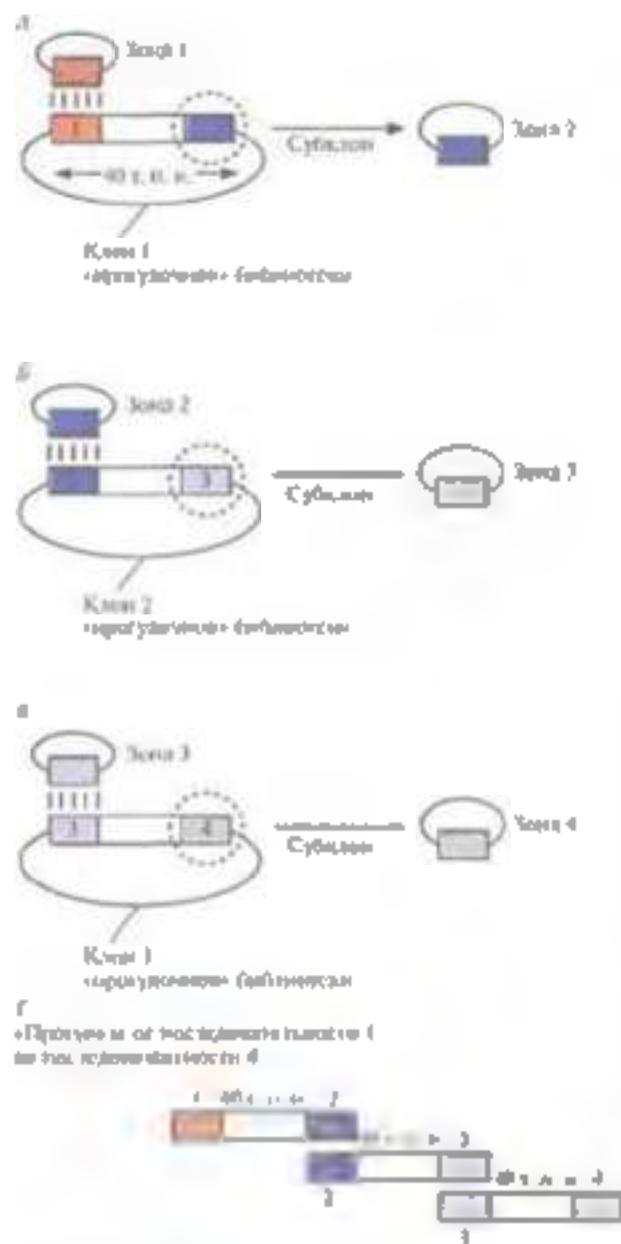
Стратегия позиционного картирования применяется в тех случаях, когда ничего не известно о продукте гена, ответственном за наследственное



Рис. 20.24. Кандидатное картирование. Идентификация генов, локализованных на известной хромосоме. Анализ соответствующих последовательностей эмбриональной ДНК-зон и отобранных репродуктивных клонов может идентифицировать по ряду признаков генов.







иногда эти участки содержат «каны». Для этого можно использовать целый ряд прямых и обратных методов, таких как идентификация CrI-островков, межвидовой Southern-блоттинги, гибридизация, ультрафиолетовое скрининг, секвенирование ДНК, компьютерный поиск.

Транскрибируемые участки геномов позвоночных часто представляют кластеры нуклеотидов, богатых петлями С и G (CrI-остров-

Fig. 20.27. «Приставка» или «хвостик». А Зона 1 гибридуется с «минимальным» фрагментом ДНК длиной 40 т. н. н. После субкλωνирования и тщательной рестрикционной карты последовательности, устанавливается оптимально с гибридуемостью, используется для создания банка 2. Б При создании банка 2 из библиотеки выбраны другие «каны» (длиннее от «каны 1») и используются последовательности, отличающиеся по структуре и гибридуемостью с «каны» для создания банка 3. Клоны 1 и 2 вместе с «каны» примерно 30 т. н. н. (до вычисления перекрестиваются участки – зона 2 – между ними). В Приходит «каны» от банка 2, анализируются А и Б. «каны» от банка 3. Третий «каны» «приставка» библиотеки повышает привлекательность «каны» с «каны» от 40 т. н. н. Г При перекрестивании фрагментов ДНК от «каны» примерно 120 т. н. н. «каны» ДНК «приставка» или «хвостик» можно содержать в двух направлениях, руководствуясь при этом рестрикционной картой.

ки) Группы CrI-островков можно идентифицировать по скоплениям на рестрикционной карте сайтов для рестрицирующих эндонуклеаз EcoRI, KpnI и SacII Если для минимума для таких сайтов отмечены 5–10 т. н. н. друг от друга, значит, они находятся в пределах CrI-островка Это не гарантирует, что именно здесь находится «каны», но указывает на наличие (даже поблизости) транскрибируемого гена

Темные клоны или субклоны можно получить по Селстеру с рестрицированными геномной ДНК различных позвоночных, например с ДНК мыши, крысы, кролика, обезьяны, коровы, человека, рыбы (зобоват, жемчужной бычкинг, бычкинг «Босп лавчел»). Положительная перверсия гибридных азимет, что доминирует с высокой вероятностью со держит кодирующие последовательности, поскольку многие экзоны в том же направлении не изменяются, в то время как повторяющиеся и некодирующие последовательности ДНК, в том числе и интроны, существенно изменяются. Положительный зобоват означает, что экзон содержит экзон, однако не показывает, есть ли в нем или исключено за исключением.

Выбор гибридов позволяет быстро и с высокой эффективностью идентифицировать геномный экзон, содержащий экзон, и одновременно идентифицировать соответствующую cДНК. Выбор можно проводить разными способами (включая ДНК геномного экзона из той области хромосомы, которая содержит ген заболевания, фиксируют на твердой подложке, проводят прегибридизацию с повторяющимися последовательностями ДНК, а затем гибридируют с линейными векторными молекулами со вставками из cДНК-библиотеки, транскрибируя из тканей, вероятнее всего экспрессирующей ген-экзон). Прегибридизация векторных молекул с фрагментами, и гибридоматическая манипуляция и амплификация методом ПЦР, используя два праймера из векторных последовательностей, фиксирующая cДНК-вставку (рис. 20.28). Если точно неизвестно, в какой ткани экспрессируется ген-экзон, то cДНК библиотеки разных тканей оптимизируют и проводят гибридоматическую с отдельными тканевыми клонами ПЦР продукт можно затем клонировать и тестировать, с тем чтобы проверить, содержит ли он кодирующую часть гена данной за исключением. Для этого можно секвенировать cДНК 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 cДНК, и если этот белок известен, что его с высокой вероятностью можно считать кандидатом на

то-то-то, то данный(ие) экзон(ы) секвенируют и идентифицируют экзон, интрон и 5'-, 3'-фланкирующие области. Альтернативный подход состоит в поиске мутаций с целью выявления нуклеотидных различий между ДНК

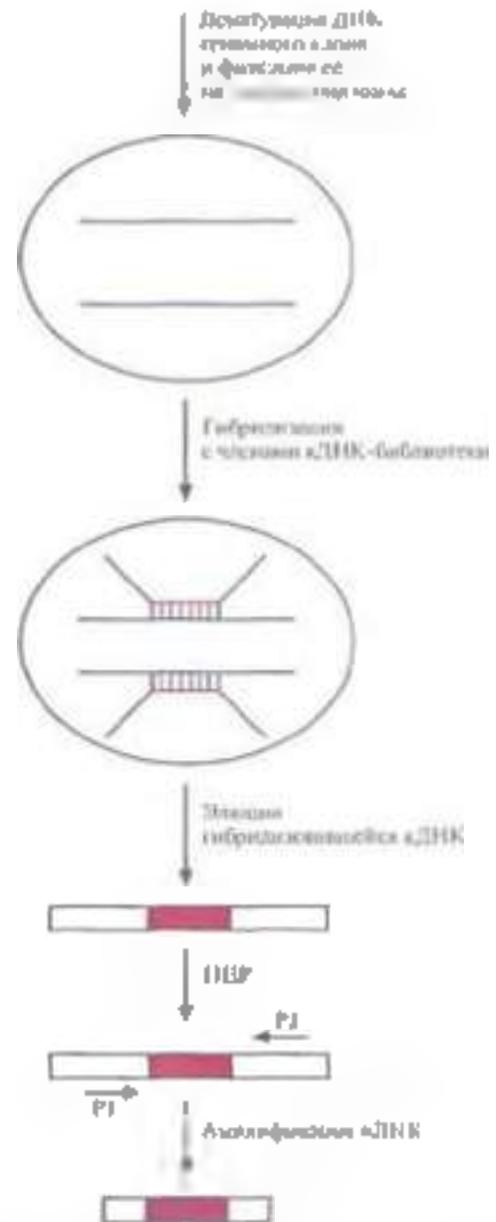


Рис. 20.28. Выбор гибридов (гибридов) тканей с ДНК (с помощью вставки) cДНК-библиотеки. Экзон, содержащий кодирующую часть гена, копируют и тестируют.

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-мишени для удаления времени и средне характеризуется в первую приближении срыву экспоненциально, пока не найдут наиболее

встроенный ген-кандидат, который исключают действие, 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

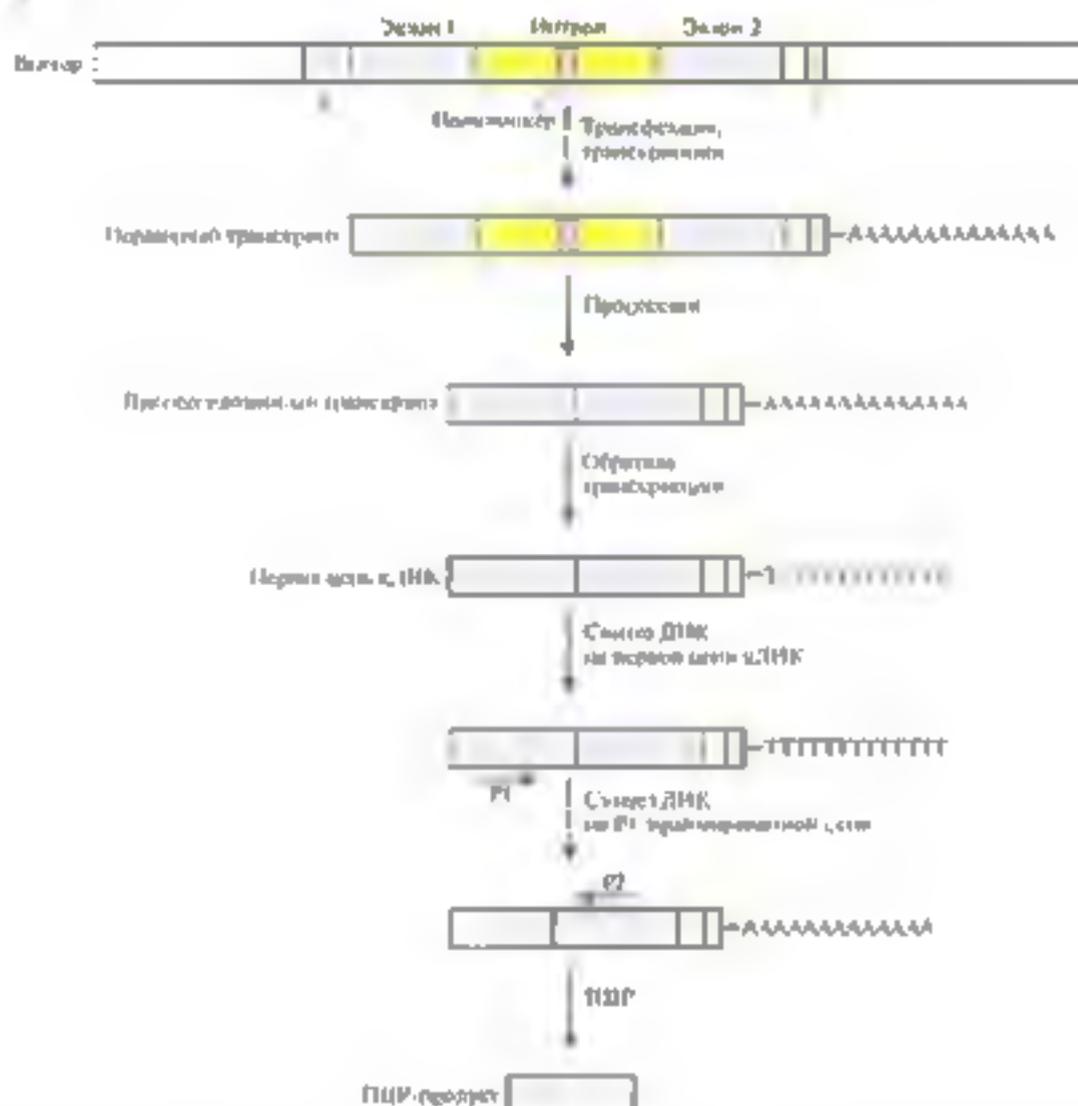
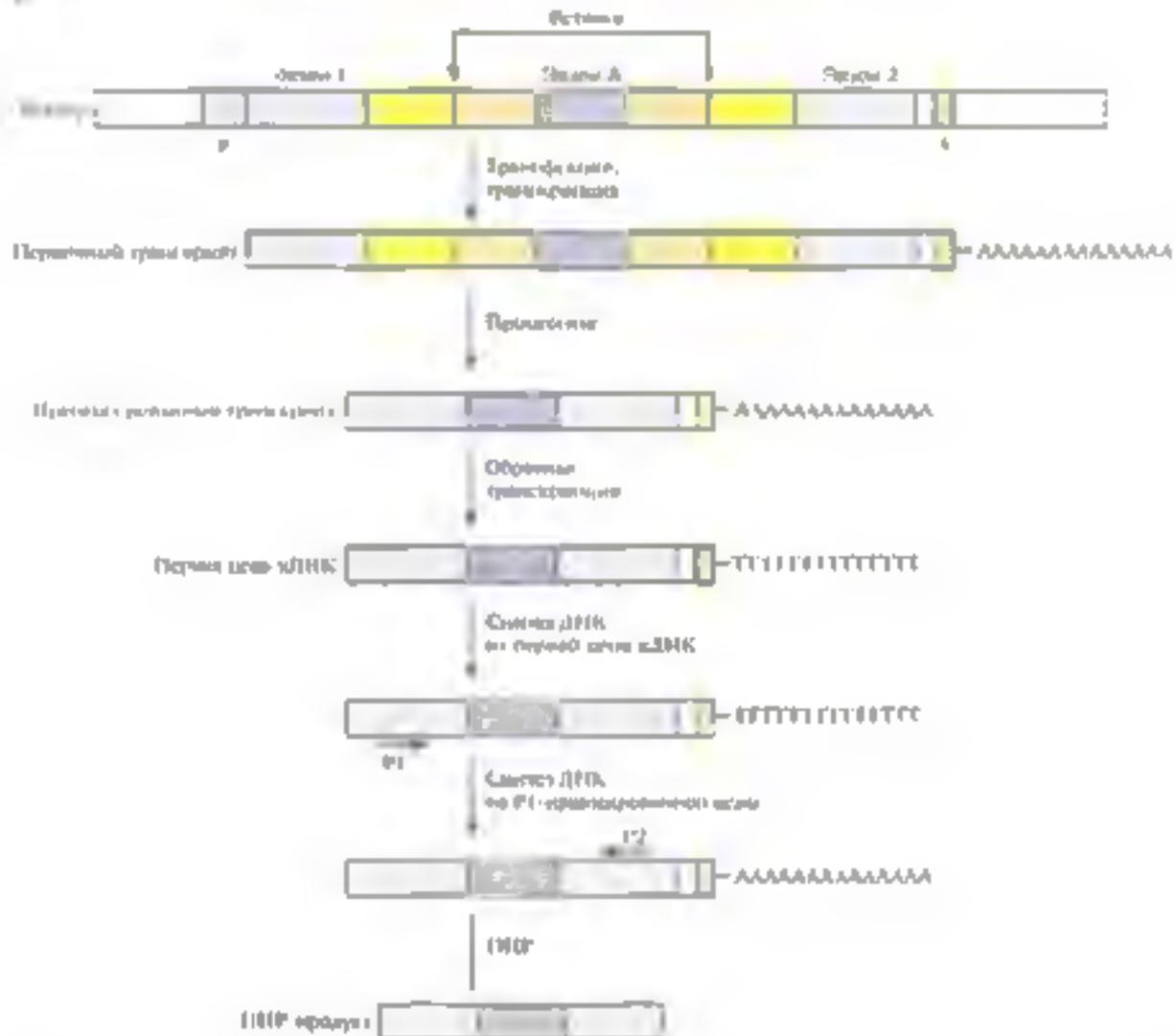


Рис. 20 29 Удлинение экзона. А Вектор для удлинения экзона содержит встроенный ген, состоящий из фрагмента Р<sub>1</sub> двух экзона, разделенных интроном, который несет полициклонер, и сайт терминиции транскрипции. После введения вектора в эукариотическую клетку исходный ген транскрибируется и из первичного транскрипта удаляется интрон. Для получения ПЦР-продукта определенной длины, который содержит члн и обиде-источник, используется ПЦР-метод на основе обратной транскрипции.

следующим ДНК геномного клонировании разделяют так, чтобы получить фрагменты длиной 1–6 к.п., и клонируют эти фрагменты в специально сконструированном векторе. Сайт множественного клонирования (polylinker) вектора размещают внутри штампа, фланкированного двумя жонгами (жонги 1 и жонги 2). Этот искусствен-

ный ген (жонги 1 и штамп жонги 2) функционирует под контролем сильного эукариотического промотора и может экспрессироваться *in vivo* или в культуре клеток млекопитающих. После введения (трансфекции) вектора в клетку эукариотического происхождения транскрипция искусственного гена и удаление штампа из век-



**Упр. 20.29. (Продвинутое)** В данном примере векторы для замещения в лямбда-вектор фрагмент ДНК человека, и их конструирование описаны в эукариотической клетке (протокол 20.29). В принципе случаи жонги содержат функциональные сайты и дивергентные сайты сн-рибонуклеазы. При промышленном производстве транскрипция уже возможна *in vivo*, функциональные сайты А, и они уже являются векторными жонгами 1 и 2. Для cDNA требуется обратный транскрипционный фермент, а также для включения в вектор сайта сн-рибонуклеазы, содержащий сайт для замены штампа.

интимо трансципта. Процессорнанию 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 процессорными транскриптами 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 вставке присутствует более одного экзона, каждый из которых имеет функциональные сайты сплайсинга, то процессорный транскрипт будет содержать все эти экзоны.

В том случае, если в каждом праймере содержатся рестрикционные сайты, клонируют ПЦР-продукт, несущий «попымяный» экзон, и производят последний в качестве зонда для скрининга ДНК-библиотеки. Зная нуклеотидную последовательность «попымяного» экзона, предпринимают поиск гомологичных ему последовательностей в базе данных. Если есть основания полагать, что «попымяный» экзон с большой вероятностью является частью гена данного заболевания, то характеризуют и секвенируют геномные клонны, охватывающие место расположения данного гена, и исследуют образцы ДНК больных и здоровых индивидов с целью выявления мутаций. Поскольку мутации, ответственные за патологию, не всегда бывают равномерно распределены по всем эксонам, 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 удобным и неспецифичным инструментом для поиска особенностей. Стоит отметить, что охватываемая нуклеотидная последовательность кодирующей области. Если лаборатория оснащена оборудованная для широкомасштабного секвенирования, можно секвенировать те же самые клонны, охватывающие область интересующего 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 ГДН синтезировать на ее основе олигонуклеотидный зонд для скрининга ДНК-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 г.) с помощью геномного подхода удалось обнаружить более 50 генов, связанных с болезнью Крейтцфельда-Якоба, 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 требуется 10 лет. Отметим, что с клонированием все новизна и новизна в построении транскрипционных карт с высокой разрешением позиционное картирование постепенно уступает место позиционному клонированию.

#### *Позиционно-кандидатное картирование*

Позиционно-кандидатное картирование состоит в обнаружении гомологичных локализации гена болезни, продукт которого неизвестен, и последующем анализе структурных генетических и транскрипционных карт, с тем чтобы выявить кодирующие последовательности (гены, интронные EST), находящиеся в этом же регионе (рис. 20.20). Вероятно, что одна из тех последовательностей и окажется геном данного заболевания. Если какой-либо из генов кандидатом характеризуется, можно провести его мутационный анализ. Как альтернативу можно использовать «интернативные» EST в качестве зондов, отобрать с их помощью геномные клонны и секвенировать его, а затем также провести му-



нечаянность маркерами размером 0,7 сМ (4000 сМ/ST26 допусков), что было ожидаемой в 1995 г. плотности карты 2-3 сМ. В 1996 г. было выявлено три нестрессовые финишской карты основанные на STS с разрешением 100 г. п. н., то есть один STS-сайт должен был находиться 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 интенсификации технологий секвенирования ДНК вполне очевидны, но не стали эффективными с точки зрения снижения цены секвенирования (снизились с 5 долларов США в 1990 г. до 0,3 долл. в 1996 г. Стоимость секвенирования попросил 10 000 секвенираций 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 секвентаторов, работающих круглосуточно, и полного набора финишских карт клонированных клавов можно будет секвенировать примерно 100 м п. н. ДНК в в год, 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 секвентаторов, в которых используется метод Сингера. 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 анализом данных о генетических и физических картах генома. В результате молекулярно-генетически исследованный геном человека пишется огромные количества новых данных о полиморфных локах, 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 участие в обработке данных по геному человека. Страны-участницы охотно предоставляют ресурсы и ответственность могут получить информацию 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/genome.html>) содержит информацию о программах «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 эв-

информации будет использоваться при работе с ДНК-аналитическими тестами.

Здесь возникает множество вопросов для беспородности. 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 приватности, чтобы сохранить конфиденциальность персональной генетической информации? Как найти баланс между нуждами личности и общества? Обладают ли частнопредприниматели правом и правом, работающие в клиниках, доступными знаниями по черепичной генетике, чтобы они могли решить, какие препараты использовать конкретного генетического теста? Смогут ли генетические консультации уменьшить беспородность, обратившись? Не приведет ли ограниченный доступ к генетической информации к семейным спорушкам? Можно ли надеяться на то, что удастся получить согласие на проведение плегиотического теста у достаточно беспородного 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 науками 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 пациент в достаточной степени информирован, тестирование должно проводиться этично, относясь к группе риска, тестирование должно сами решать, будут ли они взаимодействовать с результатами теста. Консультанты должны быть хорошо подготовлены и всег беспородность теста: его генетической ценности, медицинский эффект, характер терапии, если она возможна.

Обычно считается, что генетическая информация отличается от других видов личной информации, потому что она более предсказуема. особые меры предосторожности, гарантирующие ее конфиденциальность. Справедливость и беспристрастность это особенно важные понятия. Несмотря на это считается, что генетическое консультирование должно быть доступно всем, кто в нем нуждается. Как и в случае социальных и медицинских программ, необходимо защитить право уважения индивидуальных пациентов и детей. Что касается качества, то тестирование должно проводиться высококачественными специалистами, используя при этом наилучшие методы и средства: все шаги должны соответствующим образом контролироваться, чтобы гарантировать достоверность и конфиденциальность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучая родословные семьи, представляемые несколькими поколениями, члены которых имеют часто выходящую патологию, можно определить эти наследования или из генетических заболеваний. Эти данные наследования в семьях, можно установить, является ли данное генетическое заболевание аутозомно-доминантным, аутозомно рецессивным, X сцеп-

ментным доминантным или X-сцепленным рецессивным. В случае X-сцепленного доминирования его ген расположен на X-хромосоме. Для выявления болезни хромосомная локализация гена неизвестна. Чтобы картировать ген в сцепленном районе хромосомы, можно идентифицировать сцепленные с ним маркерные сайты, используя для этого метод ПДРФ и STRP картирование. Для выявления сцепления между маркерным сайтом и геном заболевания используют метод максимального сцепления. Порядок расположения ПДРФ- и STRP-сайтов на хромосоме определяют при помощи анализа наследования гаплотипов в группе семей, представляющих три поколения и имеющая большое количество детей (STRP-семей). Кроме того, порядок расположения на хромосоме определенных сайтов, идентифицируемых при помощи ППР (STS), можно проверить, сравнивая их с использованием различных гибридов. Физические карты хромосом (контини) строят на основе геномных библиотек, содержащих крупные (LAC, BAC и PAC) и небольшие (космиды, P1 и  $\lambda$ ) фрагменты ДНК человека, используя STS-картирование или праймер-микробы. В том числе геномную лентоскопию. Трехкритериальные карты состоят из участков ДНК и маркерных экспрессируемых последовательностей (EST), расположенных вдоль хромосомы. Построение генетических, физических и транскрипционных карт облегчает идентификацию и характеристику генов заболевания.

Аутентичность обнаруженного гена человека можно считать доказанной, если у больных инциподом и нем найдены (или отсутствуют) в генах здоровых лиц. Для выявления мутаций часто используют анализ конформационной полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP).

Для идентификации генов гена человека используют четыре метода. В первом из них, функциональным картированием, на основе данных о геномном продукте синтезируют зонды для скрининга cДНК-библиотеки. Положительным cДНК-клом, содержащим кодирующую область гена-кандидата, используют для отбора геномных клонов с характеристиками гена в целом. Второй метод, кандидатное картирование, основывается на выборе генов, которые по имеющимся

данными могут отвечать за данное генетическое заболевание. В этом случае проводят поиск мутаций в генах-кандидатах у больных и здоровых инциподом и по результатам поиска делают вывод, какой из них является геном заболевания. Третий подход, позиционный картирование, применяют в тех случаях, когда ничего не известно ни о возможном гене заболевания, ни о его продукте. Этот метод весьма трудоемок и имеет множество модификаций. Сначала, используя ПДРФ или STRP-зонды и данные о семьях с наследуемым наследственным заболеванием, определяют район хромосомы, в котором локализован искомым ген. Затем с помощью зондов, специфичных в отношении тесно сцепленного с этим маркером, выявляют клоны, содержащие район локализации гена заболевания. Проверили различные клоны или полученные из них субклоны инциподом и нем жадном. Используя данные о нулевотипных последовательностях различных эялов, в той или иной степени сцепленности с изучаемой последовательности гена заболевания, разработывают стратегию поиска мутаций. Четвертый подход, позиционный кандидатное картирование, состоит в картировании гена заболевания в определенном районе хромосомы, просмотре функциональных генов в маркерных экспрессируемых последовательностях, локализованных в том же хромосомном районе, и выборе тех из них, которые могут являться искомым геном. Чтобы определить, какой именно из генов-кандидатов является искомым за данным геном, используют мутационный анализ.

«Геном человека» – это широкомасштабная исследовательская программа, конечной целью которой является полное секвенирование генома человека. Различные ее направления включают построение генетических и физических карт всех хромосом человека с высоким разрешением; секвенирование геномов различных модельных организмов типа *E. coli*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *M. musculus* и *A. thaliana*; создание компьютерных технологий для обработки и анализа данных по генетическому и физическому картированию и секвенированию ДНК; информирование 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. Nussel, J. Colant, P. Gessoulin, S. Pouch, G. Vayssels, J. In Kim, F. Ried, D. Ward, I. Chumakov, H. Le Paslier, E. Barlier, H. Cohen. 1992. Mapping the whole human genome by fingerprinting yeast artificial chromosomes. *Cell* 70: 1099-1088.
- 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. Gussone, 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. Behoumyan, A. Cohen-Akenzie, F. Barlier, 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. Stele, 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. Scherphlied-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. Durrant, H. Cohen, H. Cann. 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. Stele, 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. Zemtseva, J. Tam, B. Deshae, D. F. Courtney, M. I. Renard, H. Nguyen, T. O'Connor, C. Fizames, S. Faure, G. Gyapay, C. Dib, J. Morissette, J. B. Olla, R. W. Birren, N. Goodnum, J. Weissbach, T. L. Hartzler, 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
- Lippert 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
- Oh 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. Gynter, K. Rice, R. E. White, P. Rodriguez-Tamir, A. Aggarwal, E. Rajnai, S. Benoit, H. B. Bliven, A. Butler, A. B. Castle, N. Chankhachal, 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. McIninch, J. Merrette, A. Mungall, B. Mueller, H. C. Nardiman, 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. Slamon, 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. E. Ide, K. R. Iwto, W. Y. Lee, N. Noll, T. Nupse, K. Ishikawa, N. Nomura, C. Phillips, M. H. Patsenkovskaya, M. Samokly, K. Schmitt, R. Berry, J. Seaman, R. Torres, J. C. Venter, J. M. Sibley, J. S. Beckmann, J. Weibach, 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. Oh. 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 наследование пенетрантности 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 STR-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 область геномного кластера содержит координатную область гена?
10. Каковы теоретические абстракции по отношению к интрон картированию гена?

## Генная терапия

Длгое время медицинская генетика была исключительно проблемой: установлением генетического статуса наследственных заболеваний человека. Были разработаны диагностические тесты для выявления ряда типов заболеваний у носорожденных или будущих, и так же результатом проводимых генетических мультиспровайских семей, относящихся к группе риска. Это позволяло предотвращать мультиспровайских к возможности проведения данного заболевания у их потомков. Кроме того, иногда удавалось избежать негативные последствия генетического дефекта с помощью мультиспровайских терапии, например, в случае мультиспровайских диеты.

Нормальная работа организма обеспечивается функциями множества взаимодействующих генов, и мутации даже в одном из них могут иметь серьезные последствия. Так, мутации, в результате которых изменяется активность того или иного фермента, может приводить к накоплению токсичных субстрата или дефициту специфичных, необходимых для нормальной функционирования клеток, в мутации в гене, кодирующем структурный белок, — в серьезных нарушениях на уровне клеток, тканей или органов. Кроме того, мутации в генах, кодирующих структурные белки в печени, может сыграть важную роль в развитии болезни. Например, мутации в гене переносчика фермента ферментации, ферментации, в результате которой происходит превращение ферментации в глюкозу, оказывает серьезное влияние на уровень сахара в крови. У пациентов с мутацией в гене фермента, этот фермент не производится вообще и не производится в очень небольшом количестве; это приводит к повышению уровня сахара в крови, в мультиспровайских форме.

запрещенные продукты питания могут вызвать серьезные нарушения клеток, центральной нервной системы и как следствие к тяжелой умственной отсталости. Это заболевание встречается у европейцев с частотой 1 из 10 000 новорожденных. В каждой семье с этим заболеванием встречается свой набор из всей совокупности генов, но есть мутации, которые приводят к болезни, затрагивающим буквально все органы и ткани: мышцы, глаза, нервы, кости, почки, сердце, нервную систему, кожу, уши, желудок, кишечник, систему кровообращения.

Конечной целью мультиспровайских исследований является создание методов лечения наследственных заболеваний. В табл. 21.1 перечислены продукты некоторых генов, которые описаны симптомами заболеваний, которые обуславливаются мутациями в этих генах, указаны способы их лечения. Наследственные заболевания имеют сложную клиническую картину, и их лечение имеет во многом симптоматический характер. Некоторые нарушения метаболизма корректируют назначением специальной диеты, что приводит к снижению уровня токсичных веществ в организме, накопление которых обуславливается мутациями в определенных генах. Так, при ферментации, которую выявляют у новорожденных с тяжелой специфической биохимической мутацией крови, назначают безбелковую диету. Для облегчения симптомов наследственных заболеваний, связанных с дефектами определенных белков, иногда искусственно его функциональную форму, не вызывающую иммунной реакции. Также «заместительная» терапия мультиспровайских, например, для лечения гемофилии, тяжелой комбинации





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 контролирующих организациях. 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: предположаемое исследование должно быть направлено на разработку методов лечения однозначно диагностируемой болезни, соответствовать существующим правилам проведения медико-биологических экспериментов и осуществляться с минимальным этапом риска.

Почечную болезнь терапия представляет собой иное направление, а заболевания, которые требуют лечения с ее помощью, столь различны, рассматривают множество разных заболеваний. В настоящее время все исследования по генной терапии направлены на коррекцию генетических дефектов соматически, а не половых (мозаицизм) клеток. Это объясняется этиологией и чисто технологическими причинами, а так-

Таблица 21.2 Некоторые заболевания, терапия которых находится в стадии испытаний с 1990 г.

Заболевание	Исследования/препараты	Степень успеха
Тяжелая миелодисплазия	Аллогенная трансплантация	Полная ремиссия, длительная выживаемость
Муковисцидоз	Ферментозная терапия	Внебронхиальная инфекция, улучшение качества жизни
Наследственный глаукома (редкая форма)	Низергидин-1	Длительное снижение внутриглазного давления
Выведение из организма холестерина	Фивастат (2)	Длительное снижение холестерина
Снижение уровня холестерина	Резивастат (интермиттентная терапия)	Длительное снижение холестерина
Наследственный порфиризм (редкая форма)	Аллогенная трансплантация костного мозга	Безопасно
Снижение уровня холестерина (СНН) редкая форма	Тинидат (интермиттентная терапия)	Клинически значимое снижение холестерина
Муковисцидоз	Трансплантация легких (редкая форма)	Длительное выживание, улучшение качества жизни
Редкая форма порфирии	Фивастат (интермиттентная терапия)	СНН, снижение холестерина
Муковисцидоз	Ферментозная терапия	Безопасно
Алкоголь	Аллогенная трансплантация костного мозга	Длительное выживание, улучшение качества жизни
Выведение холестерина из организма	Цинтарин (интермиттентная терапия)	Полное выведение холестерина из организма
Повышение уровня холестерина (редкая форма)	Р5	Безопасно
Алкоголь (редкая форма)	Фивастат (интермиттентная терапия)	Безопасно

но соображениями безопасности: вода ДНК, введенная в полные клетки человека, нежелательна бы последующими поколениями.

В широком общем смысле под геном терапией соматических клеток человека понимают коррекцию специфического наследственного заболевания путем введения в клетку-мишень функции, позволяющей экспрессироваться гена. Однако за этим простым определением скрывается целый ряд проблем. Например, как получить доступ в клетку, предназначенную для коррекции? Как осуществить доставку генетического гена? Каким для клеток-мишеней должна получить такая гена, чтобы болезнь отсутствовала? Необходим ли постоянный контроль экспрессии 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 геном терапия соматических клеток делает только свои первые шаги, на ряд вопросов, касающихся некоторых важнейших аспектов, уже получены ответы. Планируются все новые подходы к геном терапии соматических клеток, которые можно разделить на две большие категории: геном терапия *in vivo* и *ex vivo*. Разработывают и специфические лекарственные препараты на основе мултимерных кислот: зинксывозимые олигонуклеотиды; РНК-ферменты, модифицированные с помощью геном инженерии; олигонуклеотиды, корректирующие геном музими *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 музими 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 геном терапии *ex vivo*,

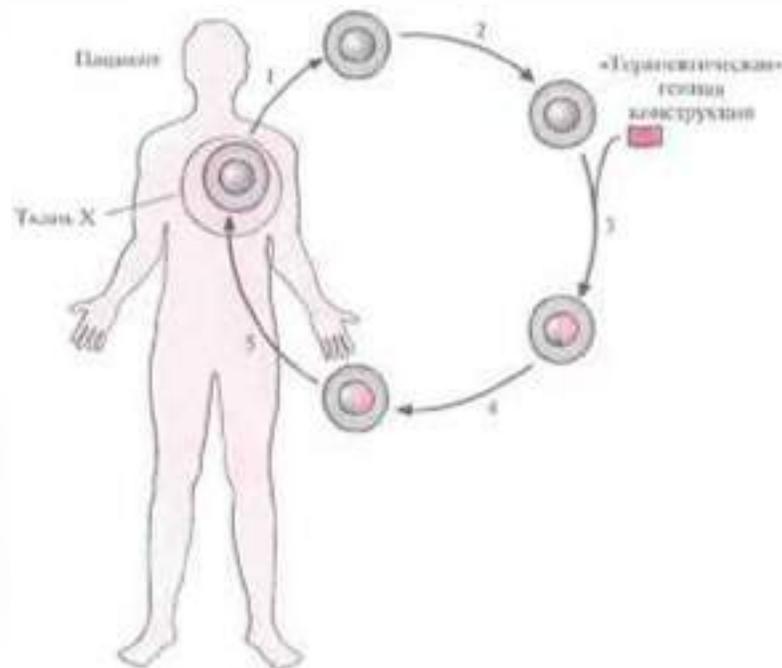


Рис. 21.1. Схематическое представление геном терапии *ex vivo*. Последовательно: 1) выделение из пациента клеток с геном дефектом; 2) культивирование модифицированных клеток; 3) трансплантация «генетически исправленных» геном конструкций в культивируемые клетки; 4) выбор, выращивание и тестирование трансформированных клеток; 5) трансплантация или трансфер трансформированных клеток пациенту.

было эффективной, а «герметической» ген стабильно поддерживался и непрерывно экспрессировался. Этим условием обеспечены векторы, используемые на основе мышиных ретровирусов. Но ретровирусы имеют существенный недостаток – они могут приводить к эпичесентезной 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* ( $\psi'$ ), необходимой для упаковки РНК в вирусную частицу; *gag* гена, кодирующего структурные белки вирусного ядра (*gag*), белок, обладающий функциями обратной транскриптазы и интегразы (*pol*), и белок оболочки (*env*); 3'-LTR-последовательности (рис. 21.2). Живительный цикл ретровируса включает следующие стадии.

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.



Рис. 21.2. Генетическая карта генома ретровируса.  $\psi'$  – последовательность, ответственная за упаковку, *gag*, *pol* и *env* – области, кодирующие соответственно белок оболочки, белок, обладающий функциями обратной транскриптазы и интегразы, и белок оболочки. 5'-LTR содержит сайты инициальной транскрипции, причем весь геном транскрибируется как одна молекула РНК. 3'-LTR содержит сайты промоторизации



Рис. 21.3. Генетическая карта ретровирусного вектора, несущего для гена Транскрипция-ингибиторской цепи (Gen X) контрольный 5'-LTR-промотор, транскрипции селективного маркерного гена (Neo<sup>R</sup>) – внутренним промотором (pI) 3'-LTR содержит сайты промоторизации  $\psi'$  – последовательность, ответственная за упаковку.

5. Транскрипцию мРНК с вирусной ДНК под контролем сильного промотора локализованного в 5'-LTR.
6. Трансляцию белков Gag, Pol и Env в цитоплазме.
7. «Кристинин» вирусного капсиды и упаковку в него двух РНК-цепей и молекул обратной транскриптазы.
8. Высвобождение вирусом (в) клеток.

Для получения ретровирусного вектора полноразмерную ДНК ретровируса встраивают в плазмиду, с помощью эластолизового расщепления 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  $\psi'$ -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 кодируемых 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-

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 содержится  $\Delta\psi$ -сегмент 5'-LTR gag 3'-LTR (т. е. сегмент, ответственный функционально за «набухаемость»), а в другом —  $\Delta\psi$ -сегмент 5'-LTR  $\Delta\psi$ -env-3'-LTR. Оба этих сегмента транскрибируются, и из-за отсутствия  $\psi$ -последовательности и образования вирусных молекул РНК меньше, чем в норме, 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  $\psi$ -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 образуются от чувствительных частицми утративших

рестроинфекцию вектора либо (приводит из локального культивирования с производящей его клеточной линии), а затем осуществляют дифференциальную селекцию для выделения клеток-мишеней и «набухающих» клеток. Трансдукционные клетки-мишени (т. е. в которые при помощи вируса была перенесена неинфекционная ДНК) тестируют, чтобы удостовериться, что: 1) в них синтезируется продукт терминаторного 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 трансдукционные 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) зрелыми миелоидными клетками, некоторые из которых имеют трансдукционные капсулы. Терапевтический эффект трансдукции таких клеток может быть многократно усилен, если клетки смешать с миелоидом в том соотношении, при котором в костном мозге обитает большинство стволовых клеток, которые способны к частоте  $10^{-4}-10^{-5}$ , 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 постановку зрелых компетентных макрофагов, происходящих из популяции плюрипотентных стволовых клеток.

Генноинженерная модификация гемопоэтических стволовых клеток с их последующей инфузией или трансплантацией костного мозга является утратившего типа клеток или (еще) (о продукте) 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 которых приводит к гибели В- и Т-лимфоцитов и в результате тяжелого иммунодефицита (Поскольку В- и Т-лимфоциты происходят из тотипотентных стволовых клеток, перенос в последние функционального гена ADA с последующим выделением

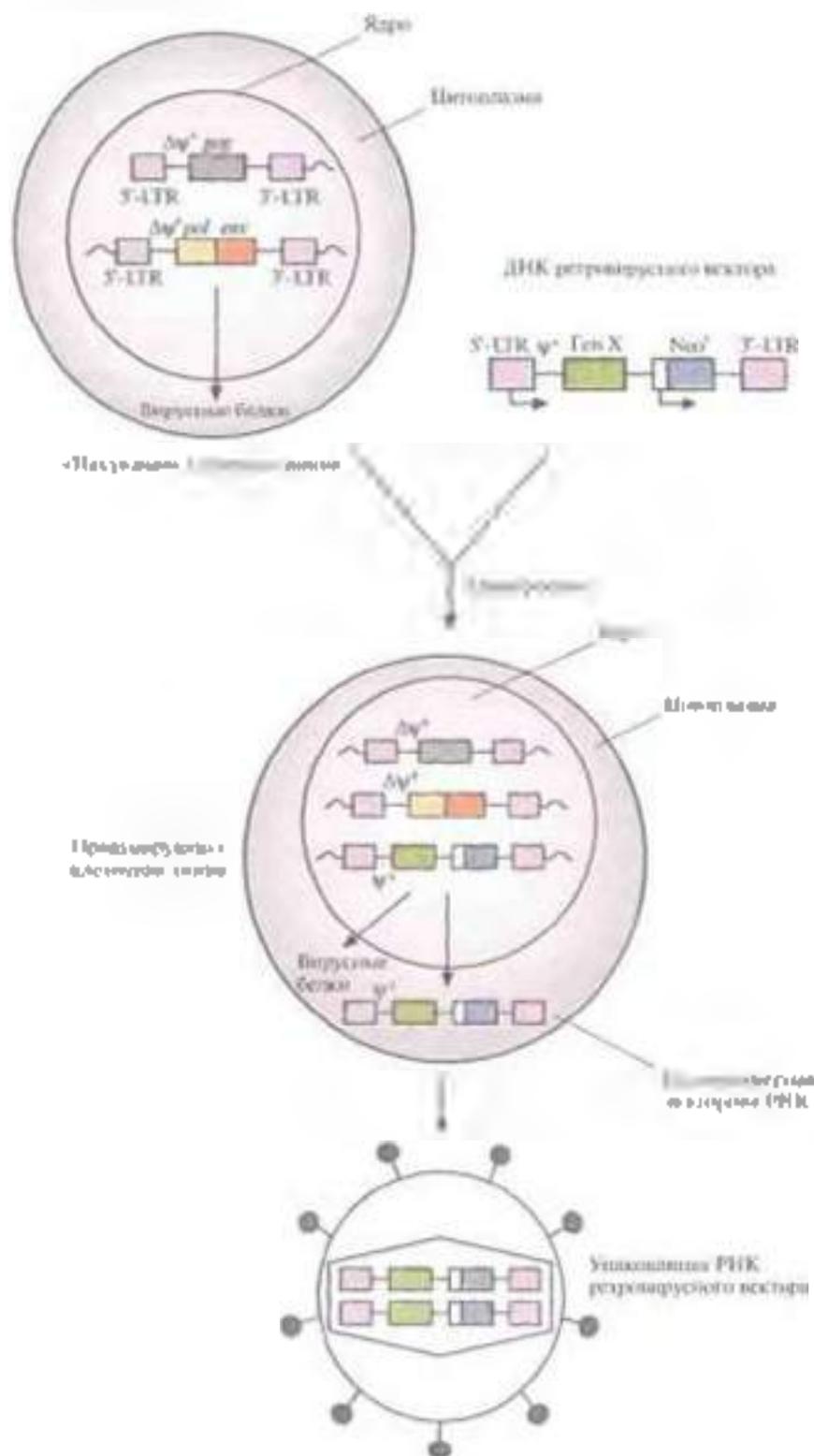


Рис. 21.4. Получение ультраминиорного ретровирусного вектора. В данную клетку вводят хромосомный «интегрированный» элемент вирусной ДНК и другой вектор, содержащий ретровирусные белки и антибиотический резистентный ген *neo<sup>r</sup>* и ген  $\psi'$  и ген  $\psi$ . Транскрипция контролируется 5' LTR-элементами; оба участка имеют повышенную эффективность, особенно для участка ( $\Delta\psi'$ ). «Защитный» элемент является частью вирусной структуры, но из-за отсутствия  $\psi$  удален из ретровирусной ДНК. Интегрированный элемент специфичен к упаковке, обеспечивая вирусные функции. После трансфекции «матричного» вектора производится ультраминиорный РНК. Ультраминиорный РНК ретровирусного вектора.



## ВАЖНАЯ ВЕХА

## Создание «наукотем» — ключевой линии и ее использование для производства хелпер-неинфекционного дефектного ретровируса

В. Манн, К. С. Мейерс, С. Саймонс  
(См. стр. 133-139, 1983)

Вопрос о применении генной терапии всегда пытался решить на биологическом уровне с участием У. Фрайманом и Р. Фабриканты, которые еще в 1972 г. *Science* (175: 940-954) писали: «Мы считаем, что теперь термин следует объявлять слепыми некоторыми или частично слепыми членами общества, пытаясь использовать исследование, направленные на их развитие». Ключевые моменты генной терапии — вирусная доставка генетического материала и обеспечение его экспрессии в определенных клетках или тканях. Сначала в качестве основного средства доставки «генетического» генной рассматривали векторы, полученные из клеток млекопитающих. Это было связано с наличием у них механизмов пролиферации и естественным образом. Наиболее многообещающими считали векторы на основе ретровирусов. 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 впервые стала разработка системы для упаковки «сретенческих» генов в неинфекционные вирусные частицы, сохранившие способность прикрепляться к клеткам-мишеням.

Мэнн и др. сконструировали первую в истории линию для упаковки ретровирусов. Для этого они выбрали вирусную линию с предвзвешенно удачной упаковочной способностью, отсутствием в упаковке вирусной ДНК-копировки, которая содержит инклюзивность, инклюзивность или тоновым и транскрипционным, но не со-вершила ретровирусные гены,

она убавонилась в вирусные частицы, которые могут быть использованы для доставки «генетического» гена в нужные клетки. Этот подход был применен на опыте при попытке лечения слепоты, связанной с генной терапией. Спустя несколько лет исследователи «наукотем» в качестве альтернативы для доставки вирусных векторов.

В 1985 г. Мэнн и др., У. Ашерсон сообщили об успешном применении «инфекционных» систем доставки генетического материала. Это позволило сделать первую попытку доставки «генетического» А. 22 мая 1985 г. Ашерсон и его коллеги начали первую клиническую попытку по лечению слепоты. Предварительные результаты показали, что попытки генной терапии не отличались особым успехом. Но дальнейшая информация свидетельствует о том, что в будущем она станет важным средством лечения многих заболеваний.

Мэнн и Индикатик выискивают «генетический» белок.

Неудовлетворительные результаты в области генной терапии с помощью вирусных векторов привели к развитию в культуре эмбриональных стволовых клеток (эмбриональных стволовых клеток), и их генетическую модификацию с помощью «генетического» гена. Рекомбинантные клетки экспрессируют искусственно синтезированные (синтетические) мембраны, через которую выделены рекомбинантные белки и интродуцируют в клетки питательные вещества. Мембраны животного происхождения и не являются клетками животного происхождения и отторгнуты питательными клетками. В качестве источника животного материала используют различные источники

клетчатый — поли-1-лиганд-лиганд, поли-фосфориллиан, поли-фосфориллиан-лиганд (лиганд).

Докладываемые результаты, приведенные в Мэнн и др. (1985) показали, что рекомбинантные рекомбинантные клетки могут продуцировать и доставлять в клетки животных большие количества рекомбинантного белка. Чтобы попытаться предотвратить гибель животных, применяющих мембраны животного происхождения, была проведена 1 фаза клинического испытания с использованием рекомбинантных клеток, вырабатывающих рекомбинантный 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 CN(F-примитивных) клеток и чужд вводимых с ними вирус индуцированных трансдженсов, модифицированных другими факторами нейротрофическими факторами, через Ген-ин-ин, клетки могут их размножаться. Методы введения клеток, имплантации с помощью генной инженерии позволяют на ранней стадии развития, но может стать эффективным способом доставки генетически измененных клеток 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 адгезируют клетки и доставляют в клетки вирусные, плазмиды и мРНК.

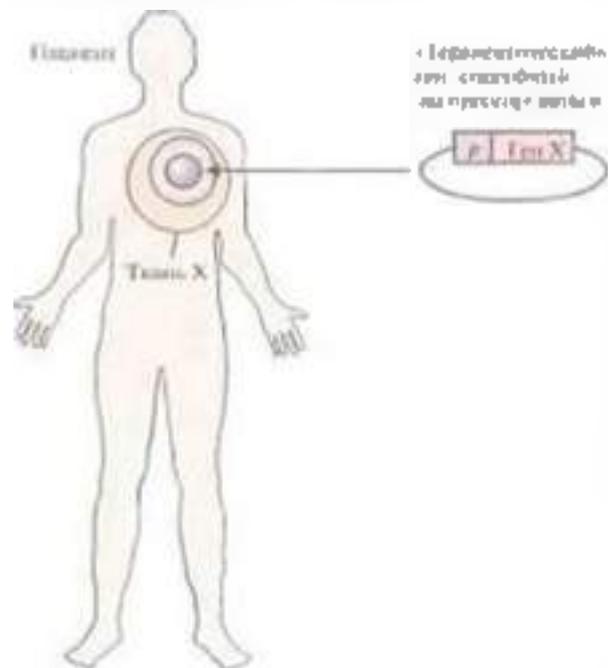


Рис. 21.6. Схематическое представление генной терапии *in vivo*. Клонированный «терапевтический» ген (Ген X) кодирует белок, ингибирующий генетический дефект. Этот ген вводится в клетки определенной ткани пациента с использованием вирусных векторов и экспрессируется *in vivo*. Примапур р, модифицирует вирусную структуру, обеспечивая специфичность.

Для доставки впровадены в организм человека, большинство клеток не делится. Поэтому были разработаны различные вирусные и невирусные векторные системы доставки «терапевтически» генов, позволяющие обеспечить доставку и экспрессию генов в определенных тканях организма. «Ферментативная» система доставки должна обеспечивать высокую эффективность проникновения «терапевтического» гена клетками-мишенями, минимизировать его иммуногенность и разрушение при транскрипции и трансляции на уровне экспрессии, доставляющих для обеспечения сопоставимых функций.

## 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 определяет ретровирусные векторы *in vivo* и *in vitro* или контролирует 5' и 3' TR-примитивы, а также «структурные» ген и ген *env*, управляемые цитомегаловирусным промотором. После трансфекции или трансдукции вирусная частица, при этом вероятность рекомбинации с образующим конкурентная по репликации ретровирусной очень высока. Все может передаваться не более 3.5 п. н. ДНК, но и длины большинства плазмидных «терапевтических» ДНК и генов структурной единицы составляет 0.5–2 п. н.

В ретровирусную векторную систему внесены модифицированные усовершенствования: увеличен размер обратных транскрипционных, повышена эффективность транскрипции, осуществлена генноинженерная модификация, обеспечивающая их транскрипцию в неспециализированных клетках, повышена специфичность инфекции. В последнем случае гены рекомбинантных ретровирусных векторов упаковываются в оболочку других вирусных белков, кодируемых и определяют специфичность связывания ретровируса с клеткой.

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 вируса. 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 непосредственно 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 несливающие 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 проведи трансфекцию клеточной линии, синтезирующей продукты 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, кодируя последнюю 5'-концевую область, включающую F1-область, и имеет перекрывающийся участок с несущим терминаторного гена плазмидой. Рекомбинация между двумя трансформированными фрагментами ДНК в области их перекрывания приводит к образованию полноразмерного аденовирусного гена, в котором последняя F1-область кодируется терминаторного гена. 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 молекулы 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 селекционной скрининга с использованием аденовирусных векторов необходимо учитывать их с определенной периодичностью.

Аденовирусные векторы использовались в клинических испытаниях по генной терапии мышечных дистрофий. Первые результаты не обнадеживали: при трансформации регуляторного белка, кодируемого в клетках припадков к мутантной *CFTR*, от отца, сына *Alton* *Chapman* *trichin*, был перенесен вирус в небольшое число клеток печени *enfa*, в миллиардных шведские рекомбинантно аденовируса и инъекции увеличили экспрессию некоторый аденовирусных генов (привести к созданию у пациента выраженной функциональной *CFTR* и стабилизированным клеткам).

Эту проблему решить разными путями. Например, сконструировать «активируемую» аденовирусную линию, содержащую F1-область и ряд аденовирусных генов, которые не вошли в состав трансформированной ДНК и не попадают в клетку-мишень. Затем удалось добиться того, чтобы ни один из аденовирусных генов не включался в трансформирующую ДНК. Для этого линейно вырезали плазмиду *F. col* (28 т. п. н.), которая обеспечивает экспрессию одной или большего числа терминаторных генов и не содержит аденовирусных генов, и привели в ее концы фрагменты ДНК (по 4 т. п. н.), содержащие точку репликации аденовирусной ДНК, последовательность, ответственную за ее упаковку, и сигнал терминатора. Для получения аденовируса (36 т. п. н.) соответствует длине генома аденовируса. Затем полученным продуктом и аденовирусным гено-

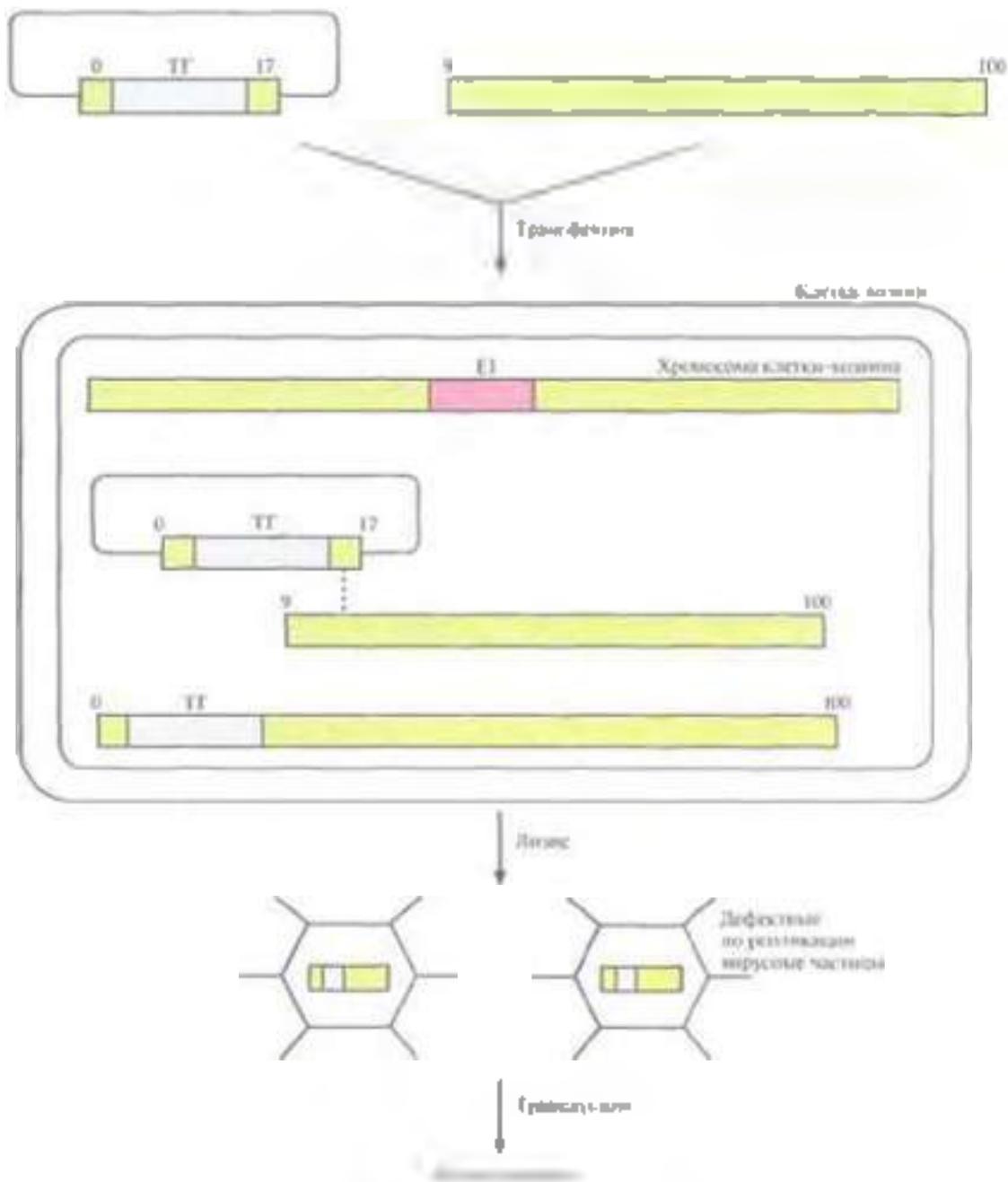


Рис. 23.7. Аденювирусный вектор. В клетку хромиды, несущую интегрированный в геномную ДНК флуоресцентный ген (Г) встроившую, ноцил встроившую в сегмент хромидной генома (0–17 единицы карты) плазмиду с «первичным» геном (ГГ) и участком геномной ДНК (длина 100 единиц карты). Другим геном для вектора (геном 100 единиц). В результате рекомбинации (стрелочками помечен) между перекрывающимися участками плазмиды и ДНК вектора образуется молекула ДНК, содержащая интегрированный ген, участок генома и плазмиды. После лизиса (разрушения) вирусные частицы дефектны по упаковке. Напоминание (ПН) флуоресцентного участка хромидной геномной конструкции, не являясь на участке рекомбинантной ДНК (Г + плазмиды)

мы без E1-области и последовательности, ответственной за утилизацию, применяли экстрасекционно клетки-кошки, экспрессирующие G1-гены. Матрицы ДНК аденовируса, дефектные по репликационному утилизатору, поставляют гены для синтеза компонентов вируса, а продукт репликационной реинициации утилизатором и упаковывается 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 п. н.

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 п. н.), который может интегрироваться в специфический сайт 19-й хромосомы. Такое название они получили потому, что для продуктивной инфекции им необходимы белки другого вируса (вируса-помощника), например аденовируса. После того как ААВ проникает в ядро, его геном с помощью полимеразы клетки-хозяина преобразуется в двуцепочечную ДНК и транскрибируется.

Отсутствие патогенности делает ААВ весьма перспективным вектором для доставки в организм человека «терапевтических» генов. Рекомбинантный ААВ получают с помощью экстрасекции клеток-кошки, инфицированных каким-нибудь аденовирусом (вирусом-помощником), двумя плазмидами (рис. 21.8). Одна из них несет «терапевтический» ген, донорский или интегрированный ранее конкретными повторами (длиной от 125 п. н.) ААВ, а вторая – два его гена, *л1* и *л2*, ответственные за репликацию генома и синтез капсида соответственно. После

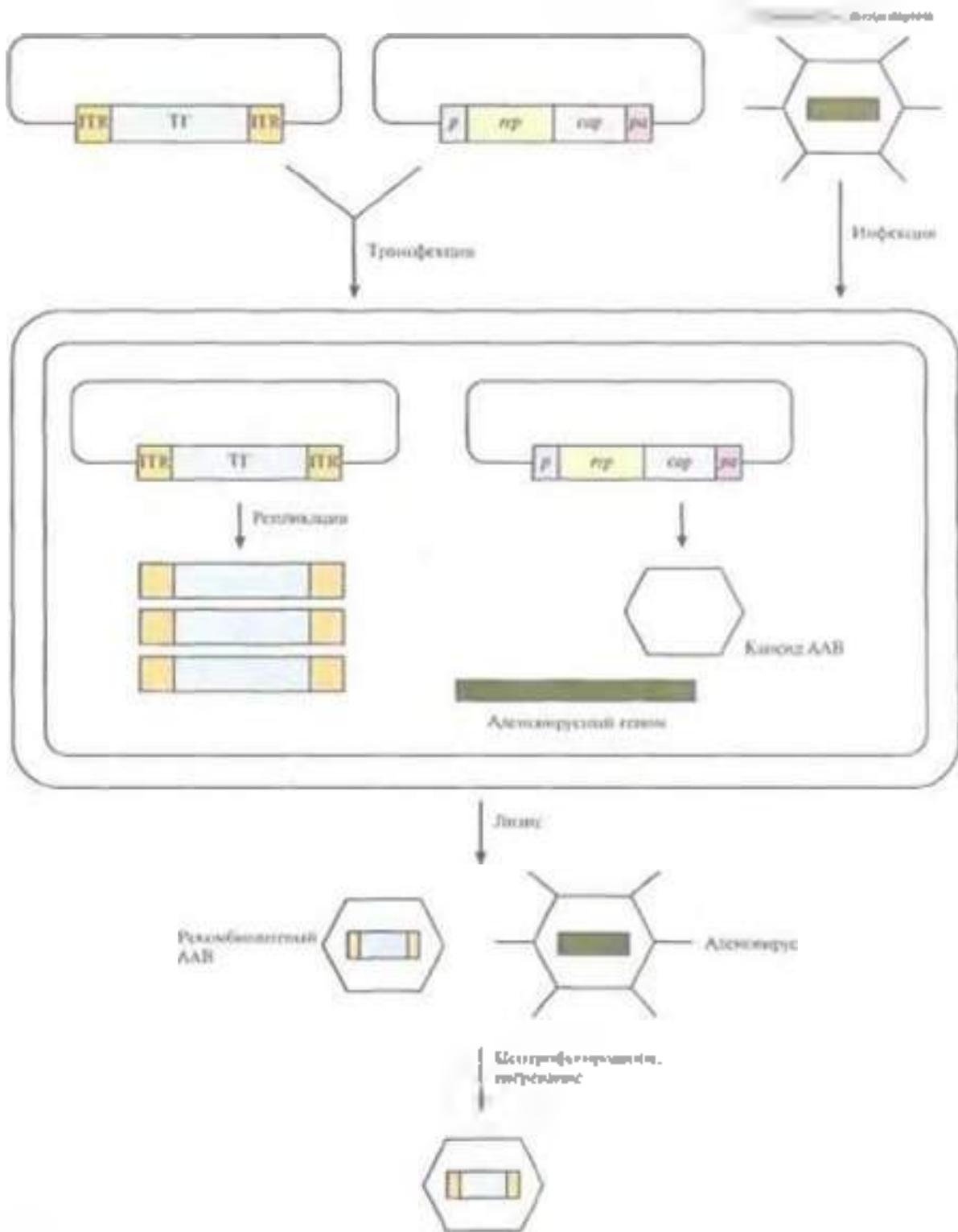
этих же инфицированных клеток рекомбинантные ААВ отделяют от аденовируса с помощью центрифугирования и дигестии, а оставшимся в образце аденовирусом (вирусом герпеса) инкубируют нагреванием. Рекомбинантный ААВ может нести ДНК-вставку размером до 4,5 г. п. н. не выдает реакции иммунного ответа, поскольку не содержит ААВ-генов, ни и не может интегрироваться в 19-ю хромосому из-за отсутствия *л1* и *л2*.

В отличие от аденовирусных векторов эффективность в этих трансдукциях реинициации мыши (рекомбинантный ААВ вводили интравенно) была снижена в 900 раз с помощью предопределенного обучения рецепта истовосческими дозами и введения перекрестноингибитора (лизоцида) ААВ. В том случае ДНК-фрагмент IX системы склеивания *л1* или «терминальные» гены экстракирировались в течение как минимум 3 мес на уровне, достаточном для коррекции дефекта при герминии. В I фазе клонировали неинфицированный по генной терапии млекопитающего в клетке животного *С178*-ААВ-вектор; при этом не принималась никакая специальная реакция, а вектор сохранялся до 20 сут. Чтобы определить, образуется ли продукт гена *С178* в количестве, достаточном для достижения терапевтического эффекта, нужны дальнейшие количественные испытания.

#### *Векторы на основе вируса простого герпеса*

Для того чтобы репродуцироваться в клетках инфицированных специфическими генами клеток, нужно модифицировать не с помощью генов неинтерно, синтаксиса и природы существующих вирус-ов, уже известных средств к определению

Рис. 21.8. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (ААВ). Приведены экстрасекция клеток кошки, инфицированных аденовирусом-помощником, двумя плазмидами, одна из которых несет «терапевтический» ген (ТГ). Функциональный вирус ассоциируется с матрицей помощника (ПР) ААВ, а другая – с геном ААВ, ответственным за репликацию (*л1*) и формирование капсида (*л2*), которые кодирует пол-геном и промотор (*л3*). Последовательность ингибиторирования (*л4*) инкапсулируется после этого частицей рекомбинантного ААВ и аденовируса разделяет центрифугированием, а оставшийся аденовирусный материал инактивируют нагреванием.



ную клетку. Так, вирус простого герпеса 1 типа (HSV) инфицирует нейроны и перемещивается в них, часто вызывая у человека так называемые «простушные» высыпания, а иногда — герпетические язвочки на губах. 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 (прямоторий) фаз).

Задача создания генома для генов HSV, т. е. ДНК-вставки не осложняет заметно процесс репликации HSV, его широко или широко используют спонсоры. С другой стороны, большой размер генома HSV затрудняет генетические манипуляции с ним. Для решения этой проблемы в плазмиде *E. coli*, которая может переносить до 10 т. п. н. чужеродной ДНК, встроили «условительный» ген HSV, состоящий из точки инициации репликации и последовательности, ответственной за упаковку. Полученная HSV-примитивная наживка является эффективным элементом.

Большинство систем доставки генов на основе HSV представляет собой вирус-помощника, который доставляет белок, необходимый для репликации и сборки вируса, но не образует инфекционные вирусные частицы, поскольку его геном инактивирован и не способен упаковываться. Для получения рекомбинантного HSV осуществляют трансфекцию амфиокон-подобными и инфицированными вирусом помощниками клетку-хозяина. ДНК ампли-

коны реплицируется (по типу «защиты» кольцевой (суперспирализованная цепь) (ряд митохондрий, а во внешней окружении — ряд митохондрий) 3' концевой ДНК генома конденсация присоединяется к нуклеотиду. Репликация цепи представляет собой линейную тандемную последовательность сегментов, концевых нуклеотидов внутренней цепи, и, отсоединяясь от нее, сама становится матрицей для синтеза концевых нуклеотидов. В результате образуется линейная дуплетная молекула — множественная копия амфиокон ДНК: каждая ампликация составляет 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-хозяев, в которых вирус может реплицироваться, с плазмидой ДНК HSV другого типа и амфиокон, который содержит «терапевтический» ген. Флавопротеинный нуклеокапсидный ДНК не является частью HSV-генома. ДНК HSV другого типа реплицируется в ядре клетки-хозяина, 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 размножают, а затем с помощью ПЦР или гибридизации выявляют «терапевтический» ген в образцах вируса. Рекомбинантный вирус вводят в условия, не допускающие его прикрепления HSV другого типа (рис. 21.10).

Лабораторные опыты на экспериментальных животных показали, что гены, доставляемые с помощью HSV-векторов в клетки мозга и периферической нервной системы, экспрессируются и поддерживаются длительное время. Однако до начала 1-й формы клинических испытаний HSV-векторов необходимо провести дополнительные исследования.

## Невирусные системы доставки генов

В одноцепочечной вирусной упаковке генов участвуют клеточные рецепторы, с которыми амфиокон вирус прикрепляется к клетке-хозяину, не разрушаясь лигандными ферментами, и мембранным



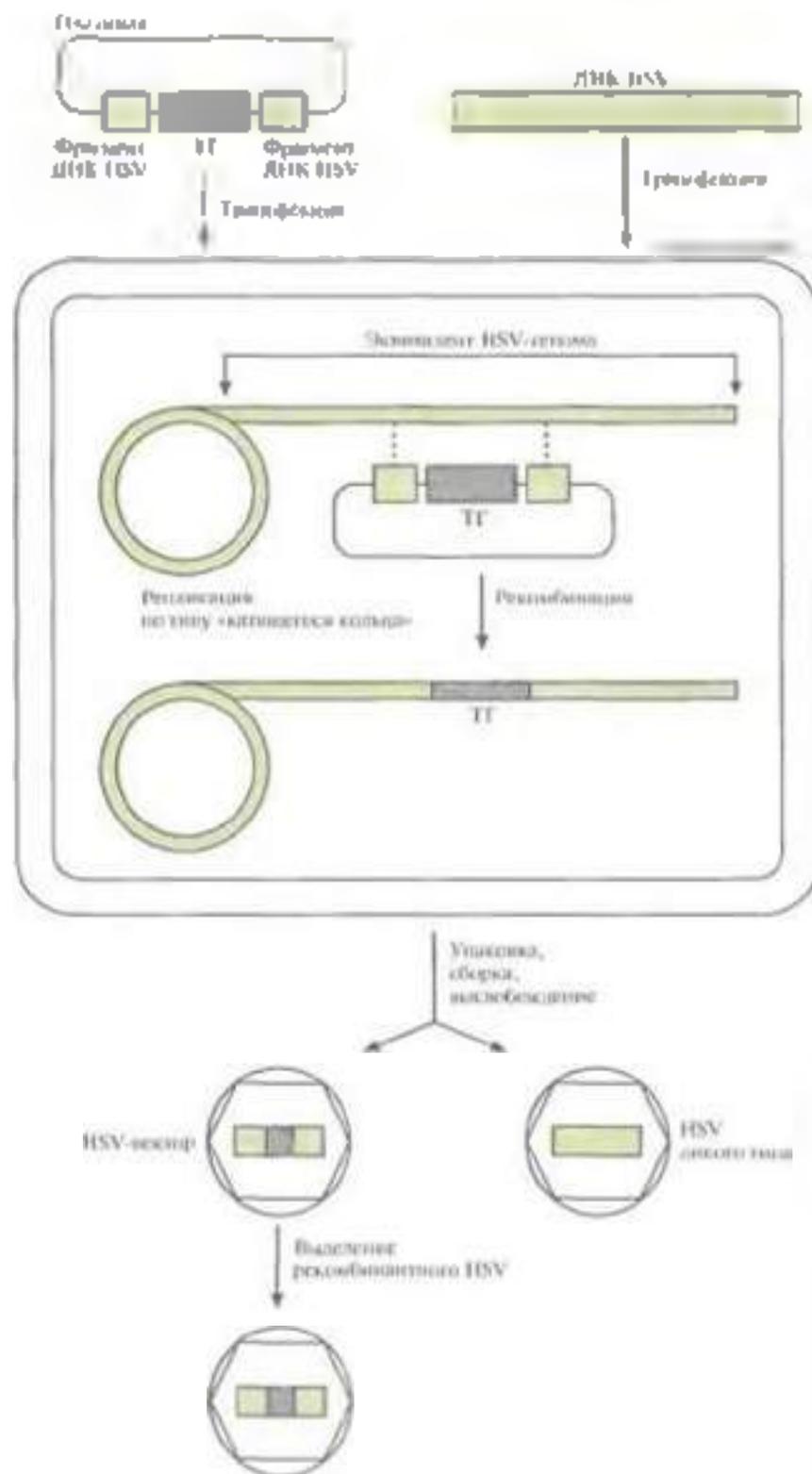


Рис. 21.18 Образование HSV-вектора с помощью рекомбинации. Проводит интранфекцию клетку-хозяина плазмидой, которая содержит «генетический» ген, фланкированный последовательностями ДНК из истинногенетической области HSV-гена, и ДНК HSV-инколы типа HSV-гена реплицируется в клеточном ядре по типу «клеточного кольца», при этом между фрагментами ДНК HSV, расположенными в составе ДНК HSV, любого типа может произойти рекомбинация (формирование димера). Молекулы ДНК HSV инколы типа и реконструированного HSV укладываются в герпетический капсид, выделяются из клетки после выхода вируса из цитоплазмы и приобретают способность проникать для инфицирования реконструированных HSV. Индуцированные HSV-векторы проявляют в условиях, исключивших их образование HSV-инколы типа



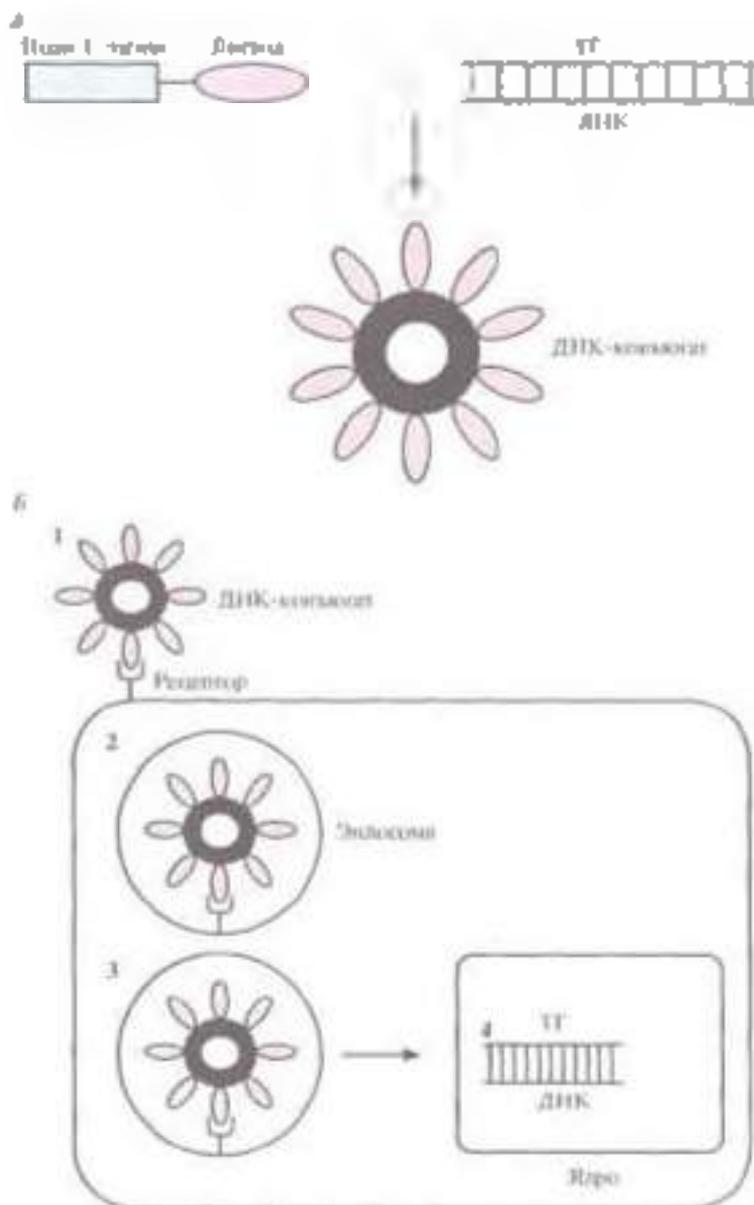


Рис. 21.18. Система доставки «генетической» информации с использованием ДНК-вируса. А. К. вирус ДНК-вирус (генетическая информация) соединяется с рецепторными клеточными рецепторами, и добавляет ДНК «генетический» код. В результате образуется комплексный структура, на поверхности которой располагаются выходы. Б. ДНК-комплекс соединяется со специфическим клеточным рецептором (1) и образует мембрану (2) с образованием эндосомы (3). Вирус проникает в цитоплазму. В цитоплазме часть молекул ДНК высвобождается и транскрибируется в мРНК (4), где и происходит «исполнение» генетической информации.

ДНК-элементов. Если, что создание искусственной системы человека, содержащей «генетический» ген, является проблемой, то доставка этой информации молекулы ДНК в ядро клетки-мишени. Кроме того, доставка генов, находящихся в области ДНК-блоков, на которых построена искусственная система, может оказаться трудной задачей на клетку-мишень. Для начала в ткани мишени можно попытаться идентифици-

ровать инкапсулирующие клетки с искусственными вирусами.

### Активация трехместных лекарственных веществ («трикаретив»)

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 ганцикловира [GCV: 9 (1,3-дигидро-2-гидроксиметил)гуанин], активированного продуктом гена тимидинкиназы вирусом простого герпеса (HSV1). Для этого проводят in vivo трансдукцию или трансфекцию опухолевых клеток геном HSV1, нацеленным под контролем активного промотора, а через несколько дней вводят ганциклоvir. Вирусная тимидинкиназа фосфорилирует ганциклоvir с образованием ганциклоvirмонофосфата. Клетки, экспонируемые ганциклоvir, не фосфорилируют ганциклоvir, зато активно присоединяют фосфорные группы к его монофосфату с образованием ганциклоvir трифосфата, который ингибирует ДНК-полимеразу и останавливает синтез ДНК, вызывая гибель пролиферирующих клеток. Кроме того, через медь-ионные контакты ганциклоvirтрифосфат может проникать в нетрансфицированные опухолевые клетки, приводя к их гибели. Одна экспрессирующая ген HSV1 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 «апоптоз» относится к неактивной форме лекарственного вещества, которое активируется с помощью другого компонента терапевтической системы. Разработаны и другие комбинации «лекарство» – ген активатор, но система GCV - HSV1 исследуется чаще других.

Эффективность системы GCV - HSV1 доказана рядом доклинических испытаний. Однако I фаза ее клинических испытаний, в которых участвовали больные с терминальной стадией рака, не показала результатов. Возможно, ген HSV1 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 обеспечить частоту трансдукции и доставить ген HSV1 в клетки по всему объему опухоли.

Для генной терапии рака разработаны также комбинированные подходы. Используются две разные системы генов. В одном из них сочетаются GCV - HSV1-терапия и генная иммунизация (рис. 21.12). Одну часть опухолевых клеток трансдуцируют геном HSV1, вторую – клирингованной cДНК (или геном) одного из цитокинов. Цитокины (интерлейкин 2, интерлейкин 12 и другие) играют роль сигнала, мобилизуя клетки иммунной системы и стимулируя его иммунный ответ. Показано, что опухолевые белки, которые высвобождаются из клеток, уничтоженных 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 двенадцати мышиных (оральных) клеток рака толстой кишки, рожденных трансдуцированными геном HSV1 одним из цитокинов. Введение ганцикловира оставалось раст опухоли в печени. Опухоль не возникла и при введении нетрансдуцированных опухолевых клеток в другие ткани 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 генов терапии, необходимо установить, какие эффекты будут наблюдаться таким лечением и не вызовет ли оно побочных эффектов.

### Лекарственные средства на основе олигонуклеотидов

В большинстве традиционной геновой 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



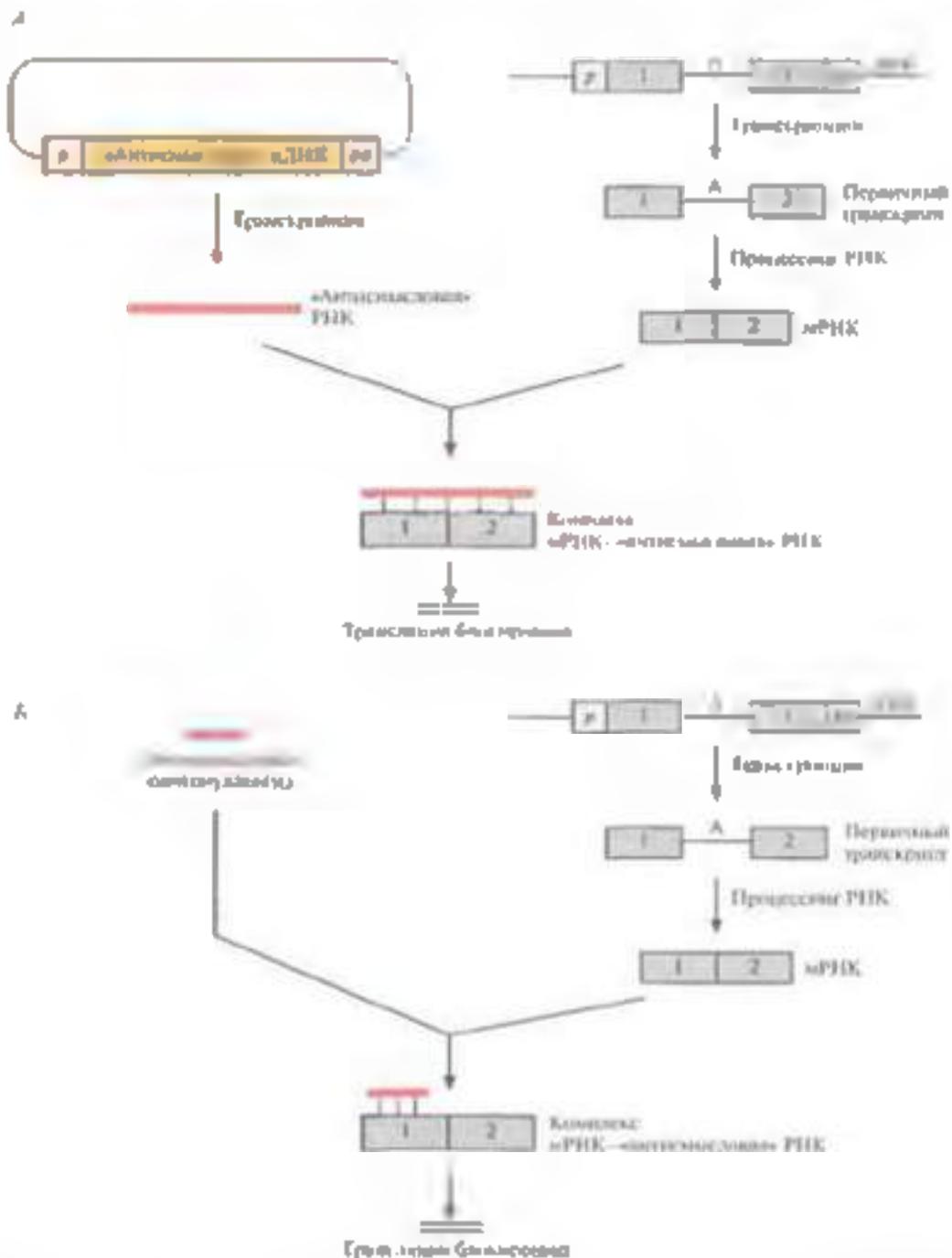


Рис. 24.13. Изготовление транскрипционных специфических мРНК с помощью «антисмысловых» матричных ДНК. **А** мДНК транскрибирует в эпитранскрипционный вектор в «обратной ориентации» и производит «антисмысловую» мРНК с помощью матрицы  $\rho$  в клетке. Эта транскрипция синтезирует «антисмысловый» мРНК. Эта мРНК гибридуется с мРНК-мишенью и блокирует трансляцию. **Б** в клетку добавят «антисмысловый» матричный вектор, который транскрибируется с мРНК-матрицы и блокирует трансляцию. (Исходично  $\rho$  - промотор,  $\Delta$  - сайт терминального разрыва, А - антиром. 1 и 2 - экзоны.)

(IGF-1R), «находящиеся в обратной ориентации для минимального метаэпитопического взаимодействия», в присутствии  $ZnSO_4$  IGF-1 «наблизывается» в избыточной концентрации клетками значительными глотками, наиболее распространенными опухолями головного мозга, в IGF-1R-клетками карциномы предстательной железы.

Вектор, обуславливающий синтез «антисмысловой» мРНК IGF-1, трансфицировался в культуру клеток глиомы. Если  $ZnSO_4$  в культуральной среде отсутствовало, 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 равном объеме. По ширине, в обоих случаях «антисмысловая» РНК гибридизуется с комплементарной мРНК и ингибирует трансляцию IGF-1 в IGF-1R, «предотвращая» пролиферацию опухоли клеток.

#### «Антисмысловые» олигонуклеотиды как лекарственные средства

Гербицидический 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 от армян трансляции, и с помощью

радиоанализа устанавливают, в присутствии или отсутствия «антисмысловых» олигонуклеотидов снижается синтез определенного белка. Никаких общих 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 двучленочным 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 ионософитная связь. Модифицированные таким образом олигонуклеотиды растворяются в воде, несут отрицательный заряд и не расщепляются под действием эндонуклеаз. При гибридизации с сайтом-мишенью они образуют РНК-ДНК-дуплексы, которые активируют рибонуклеазу (РНКазу) II, действующую фермент, расщепляющий мРНК в гибридной молекуле. Приведены первые клинические испытания в виде олигонуклеотидов – лекарственного средства «первого поколения». Мишенями являются РНК виллометалопрофура, пептида минимифацин-то чешуека, в том же мРНК-генном, ответственных за развитие рака, болезни кишечника и вирусной инфекции.

Синтезированы «антисмысловые» олигонуклеотиды с фосфорамидной и фосфоридной (пептидной) группами (рис. 21.14, В и Д). 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 облегчают их связывание с сайтом-мишенью (рис. 21.14, А и Е). Все преимущества этих и других модификаций сочетают интеллектуально и изучают.

Проникновение «антисмысловых» олигонуклеотидов в клетку можно значительно облегчить, привнеся их в клетку с помощью плазм

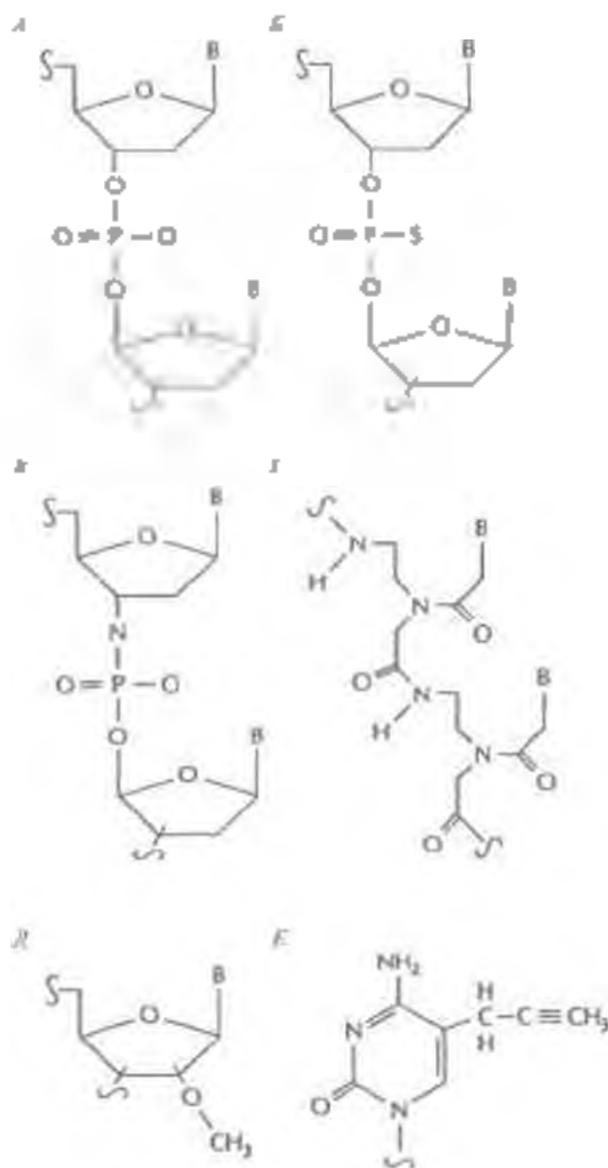


Рис. 21.14. Модифицированные «антимысленные» олигонуклеотиды. А. Фосфатно-фосфатный мостик. Б. Фосфатно-метильный мостик. В. Фосфатно-метильный мостик. Г. Тимидиловый мостик (основываясь на циклопентановых кислотах). Д. 2'-O-метилрибозид. Е. C-5'-дифосфатидинитозин.

«Антимысленная» система доставки позволяет исследовать «антимысленные» олигонуклеотиды в небольших концентрациях. Если же контролировать дозировку с помощью специальных систем, то можно будет осуществлять адресную доставку олигонуклеотидов.

Приведенные доклинические эксперименты показали, что «антимысленные» 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 «антимысленные» олигонуклеотиды с тимидиловыми мостиками, комплементарные мРНК, которые кодируют важные для клеточного цикла млекопитающих белки; в результате частота повторных стенозов уменьшилась на 90%. Проллиферация гладкомышечных клеток происходит также при атеросклерозе, сахарном диабете, осложненном после коронарного шунтирования. Вероятно, все эти состояния можно будет контролировать антимисленными средствами.

«Антимысленные» олигонуклеотиды можно применять и для лечения вирусных инфекций и малярии. Кроме того, результаты I фазы клинической испытаний лечения болезни Крона с помощью оральной введения «антимысленного» олигонуклеотида противостригнинда чело показали терапевтический эффект без заметных побочных эффектов. В этом случае мРНК-мишень культивата мезэнхимальных аденоцитов I, который вырабатывается в избытке у пациентов с болезнью Крона. Предполагается исследовать эффективность этого же олигонуклеотида для терапии других воспалительных заболеваний, например ревматоидного артрита, псориаза и язвенного колита.

В принципе «антимысленные» олигонуклеотиды могут образовывать триplex с хромосомами ДНК и инициировать транскрипцию. Однако пока специфичность «антимысленных» олигонуклеотидов не соответствует стандартам, принятым для лекарственных средств.

### Олигонуклеотиды, связывающиеся с белками, антитромбинный аптамер

Блокировать экспрессию гена-мишени можно не только с помощью «антисмысловых» теробин, 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 эмболии 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 возможных 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 пропущен через колонку, содержащую связывающие молекулы тромбина, присоединившиеся к тромбину олигонуклеотиды элюированы и повторно пропущены через колонку со связанным тромбином. Эту процедуру повторили не менее трех раз. Конечный набор тромбиновых аптамеров амплифицирован с помощью ПЦР и клонирован, после чего определены функциональные и биологические свойства каждого из них. Те аптамеры, которые обладают высоким специфичностью и анти-тромбиновой активностью, отбирали для более детального анализа.

Таким образом был получен эффективный анти-тромбинный аптамер К. Следовательно, несомненно можно говорить жизни (и это его можно использовать только для временного ингибирования функции тромбина (например, при кардиологическом (гипертонии)). В то же время, когда экзосомы длительно взаимодействуют с периферическими клетками (например, при эмболиозах), он ингибирует (Умояшио, 2000, с. 111).

Самую простую процедуру идентификации аптамеров 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 и, возможно, других связей, в 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, который содержит каталитический домен (примерно 20 нуклеотидов). Фланкирующий выбранной мишенью с мРНК-мишенью последовательности (они не поступают в роли примеров), амплифицированы его, встроили в плазмидный вектор экспрессирующей пектор и трансформации полученной конструкции клетки (образовались после транскрипции рибозим расщепили мРНК ми-

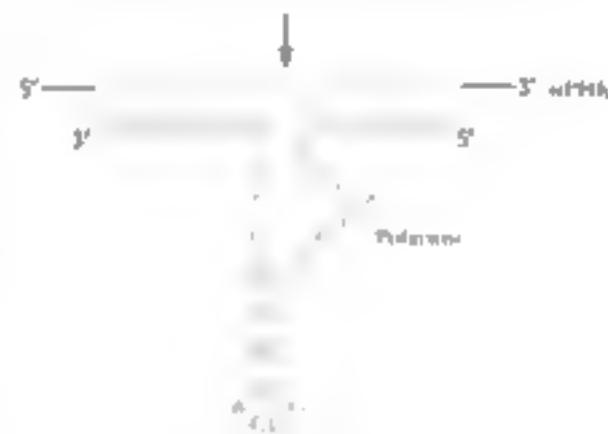


Рис. 21.15. Принцип действия мРНК-мишеней рибозима. Рибозим, субстратом является один из присоединенных к комплементарной РНК-мишени с помощью водородных и, возможно, других связей, в каталитическом сайте (показаны стрелками). (Из работы Giese et al., in *Gene* 7: 471–476, 1993, с использованием.)

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 сегодняшний день можно использовать экспрессирующий вектор ДНК-фермента можно унаследовать в митохондрию и доставить в клетку-мишень. Однако создание эффективных ДНК-ферментов на данный момент 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-члениый эшерихий (ДНК-РНК) олигонуклеотид, который образует структуру с двумя головками и содержит метилированный кислород (или 2' углеродным 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 участвуют в спаривании, защищая олигонуклеотиды от экзонуклеаз; 3) 2'-O-метилирование предотвращает разрушение молекулы РНК-олиго. 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-топилла, 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 развивается системной процессии РНК как мутантный сайт сплайсинга, то в процессированную мРНК включается часть интрона (рис. 21.17, А). Это приводит к снижению скорости образования укороченного белка. При этом количество нормального белка снижается, что может стать причиной заболевания. Разумно предположить, что если «антисмысловый» олигонуклеотид, комплементарный мутантному интрону, гибридизуется с ним, то сплайсинг блокируется, что повышает вероятность сплайсинга в нормальном сайте. Это предположение проверяли на  $\beta$ -глобулиновом гене с мутацией на



Рис. 21.16. Исправление генетического дефекта, связанного с изменением пары нуклеотидов, с помощью кимерной олиго (5'-голова) (красный указание мутантный сайт) и последовательности-хвоста и нормальная пара нуклеотидов в кимерной олигонуклеотиде. Соответствующим нуклеотидам подсвечивают. Препараты были обнаружены дезоксирибозимой (голова), и странными — рибонуклеотидами. Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, «блокирующие» процесс сплайсинга. Вертикальная черта указывает 3' и 5' концы кимерного олигонуклеотида (Из работы Yoon et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 2071–2076, 1996, с изменениями)

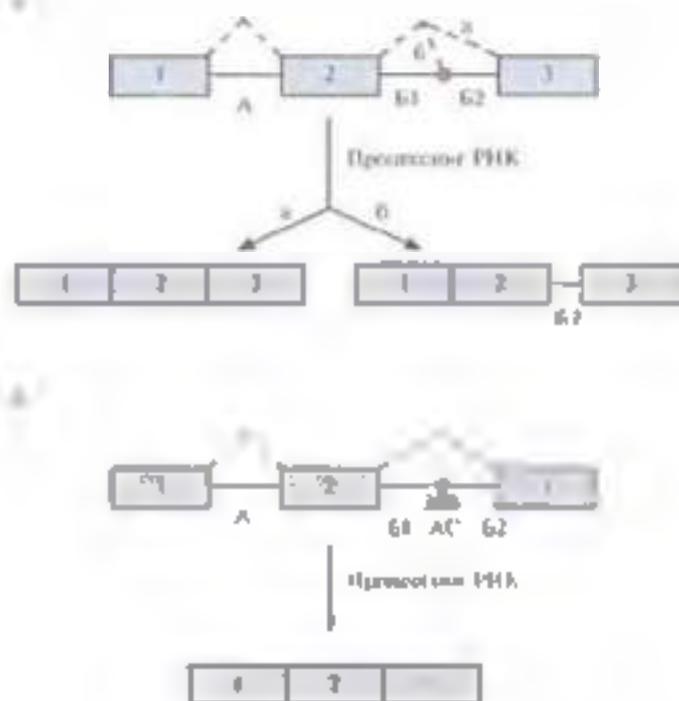


Рис. 21.17. Коррекция дефекта, приводящего к измененному сплайсингу, с помощью «анти-смысловых» интронных инверсий. А. Результат мутации, приводящий к ошибочному сплайсингу (обозначены интроны – заглавные А – первая интрон, В – вторая интрон), содержащий интрон (красный артефакт), расположенный в две части (B1 и B2). Штриховые линии показывают участки РНК, определяемые при сплайсинге. Возможны два варианта сплайсинга: вариант А приводит к образованию функциональной мРНК, вариант В – к образованию РНК, в которой часть интрона интрона (B2) Δ. «Антисмысловая» инверсия (АС), соединяющаяся с мутантным участком сплайсинга, предотвращает это расхождение интронов при сплайсинге, в результате образуется только функциональная мРНК.

вторым интроном (рис. 21.17. б), обуславливающий одну из форм β-талассемии, наследуемое юного заболевания «рети», которое приводит к разрушению эритроцитов (анемия). В клетке, содержащей не мутантный ген (IVS2-654), пептиды содержат фосфатные связи «анти-смысловой» Δ. О метаболитическом, компонентном мутантному сайту сплайсинга. В результате число нормальных β-глобиновых цепей увеличилось на 50%. Дальнейшие исследования показывают, является ли этот подход достаточно эффективным для лечения талассемии и других состояний, 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 генная терапия 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-



- 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.
- Ellington A. D., R. Comrad. 1995. Aptamers as potential nucleic acid pharmaceuticals. *Biochem. Annu. 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 C. 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. L., G. V. Bakken, R. W. Mays, K. Gystachan, H. F. Willard. 1997. Formation of *de novo* centromeres and construction of first generation human artificial microchromosomes. *Am. Genet.* 15: 345-355.
- Ishii-Morita H., R. Aguirre, C. A. Mullen, H. Hiram, D. A. Kupka, 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  $\beta$  galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5731-5736.
- Korber D. D., J. E. Alexander, C. L. Hubert, 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., Al J. Szustade, S. Agrawal, R. Kale. 1996. Repate of thalassemic human  $\beta$  globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12840–12844.
- Sam W. H., J. K. Duckbolder, J. Sun, J. Culp, J. Turner, X. G. Fu, T. P. Fugh, W. B. Erdler, 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.
- Tope T., M. Kasbani-Sabet, T. Furoto, 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 злокачественных опухолей животных с помощью гена HSV $\theta$ .
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

**В**се 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 новые технологии — единственное средство «зрелищ» — «еще и зрелище» и считают, 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 удерживают существующие методы контроля, уменьшающие риск, и эффект от новой технологии неизбежно вытеснит, как только она встанет на ноги.

Появление молекулярной биотехнологии 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.

Разрешалась ситуация и в отношении безопасности проведения генетических экспериментов на человеке. Цель ее заключалась в том, чтобы погасить желание расширить то, что совершенно недопустимо, и то, что широко приемлемо. К сожалению, нельзя дать однозначного ответа на все этические, правовые и социальные вопросы, включенные в связи с развитием 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 «ввели тревогу по поводу безопасности этой новой науки и возможных технических исследований его применения. Такие выражения, как «чужеродные с выном», «интродуцирование антигена», «самые опасные из проводимых исследований в научных исследованиях», «творения человека великим изобретением» и «искусство». 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 молекулярной биологии, 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 помещениях, 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 работах 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 принята 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 характеристик были сформулированы, 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 контролирурующие 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 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 считали, что эти сертификации ставятся под углом зрения промышленности и не являются связаны жестко с действующими собственными нормативными актами. 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 и разработка 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 селекцией или использованием самой технологии рекомбинантных ДНК) состав утвержденных

FDA видевшая продукты или биопевых ингредиентов изменяется, то компаниям-производителям, производящим такие продукты на безрисковой, должна сообщить их специальным образом, уже до введения в том, 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 фирменную химию, полученную с помощью технологии рекомбинантного ДНК и предназначенный для приготовления сырок, если соответствует следующие испытания не были проведены в полном объеме. Химизм, один из ключевых ферментов сычужа животного, является сброженным сырко протеолитическим ферментом, который гидролизует казеин. В результате такого гидролиза в молоке образуется сырок, который в свою очередь ферментируется с брожением сыро. Обычно сброженный сыро молоко вент, используемый при производстве сыра, получают из четвертой части желудка животного (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 химизм, 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 телескоп, и совпадающей 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

Привычным, занимающиеся контролем производства и поступлением на рынок пищевых продуктов и пищевых ингредиентов, полученных с помощью технологии рекомбинантного ДНК, часто руководствуется в своей работе так называемым принципом «каше-бу-каше» (cash-for-cash). 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 непринятые 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 локтевофаланг-миэлигии (СЭМ). Это в общем-то редкое заболевание характеризуется тяжелыми, мучительными мышечными болями и может закончиться смертью больного в результате сложившихся путей биохимического пути синтеза аминокислоты триптофан, причем в больших количествах. Каждый раз, когда пытались установить фактическое происхождение, выходя на одну и ту же биохимическую комбинацию. Обнаруживались корреляции между потреблением триптофана и развитием СЭМ обескураживала, 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 остались 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 (ЭБТ). Сначала образующие ЭБТ были связаны с нарушением метаболизма триптофана у новорожденных. Наряду с основным исследованием, целью которого было установить, способен ли ЭБТ вызывать СЭМ, проводились другие эксперименты, в ходе которых выяснилось, что ЭБТ продуцирует и штаммы другого

вида. Анализ на токсичность выявил способность ЭБТ 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 чем было связано повышение ЭБТ в составе прежде безопасного продукта, так и осталось неизвестным. Большинство сошлось на мнение, что причиной было изменение в методе очистки. Возможно, при старом способе очистки ЭБТ 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 непригодность».

#### *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 инновации, уже принятой, однако, обществом с распространяемыми опасениями, может служить получение рекомбинантного бычьего соматотропина (БСТ), и особенно также под его влиянием возникла проблема 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 накапливается в организме человека, и все тесты на токсичность не выявили никаких побочных эффектов. Используя все доступные результаты исследования, FDA привела к выводу, что как мясо, так и молоко коров, получавших рекомбинантный БСТ, безопасны 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 усилит 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 возникнем 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 рассевались 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 тот 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 генов, 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 *Rhizodotoplas tulipae*, представляло определить, 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.

#### *Rhizodotoplas tulipae*, не образующие кристаллов льда

Генетическое модифицирование *R. tulipae* 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. tulipae* дикоим типом, обычно обитающий на

листьях, секретирует белок, который при низких температурах вызывает образование кристаллов льда. Это и является причиной повреждений. Стратегия опытов состояла в нанесении модифицированных бактерий на листья еще до их колонизации бактериями дикоим типом. Это мероприятие вполне было зато 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 предприняли также те действия, как и для тестирования экспериментов с рекомбинантными ДНК, а именно:

1. Заявки включались в Федеральный реестр США.
2. Информации 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. tulipae* 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

мнение NIH-RAC и заявлениям работающих в нем экспертов, существующие нормы, регулирующие полевые испытания ГМО, 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 их 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 (хотя и непредвиденным путем) экологически опасные организмы. Конечно, все эти аргументы отчасти неизбежны в крайне маловероятных случаях воздействия ГМО на окружающую среду, однако несомненно, что при проведении регулирующих полевых испытаний ГМО, должны были предусматривать достаточно оценку возможного риска.

В последние время за оценку рисков, предусматривающих неконтролируемое высвобождение ГМО в окружающую среду, в США отвечают 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 токсина, как стандарт для разработки правил, регламентирующих полевые испытания всех ГМО. Каждое предложение подверглось 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 токсичных 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 токсина) в обычных случаях, несмотря на различия в условиях испытаний, местным жителям, 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 различных 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 «иницированы» 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 указанных бактерий. 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 полях при температуре, на 1 °C более низкой по сравнению с обычной температурой. Сеть «инфицированных» бактерий практически не использовалась для защиты сельхозокультурных растений от вредителей при выращивании.

#### 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 использованием характерных для трансгенных растений признаков, относившихся к вкусу, относились не так строго. Преобладало мнение, что большинство важных признаков 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 очень дорогостоящих культур. В противовестительность этому, попытки использовать гены этих растений на Филиппинах были блокированы международным объединением неправительственных организаций, а во Франции было запрещено выращивание (но не потребление) трансгенной Я.д.-кукурузы. Очень много людей по различным 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. Hayes,  
H. Kubli, J. D. Watson, S. Weinberg, and N. D. Zinder

Science 183: 303 (1974)

После того как Коэн и др. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1240-1244, 1973) сообщили о создании экспериментальной суперкаждой ДНК в лаборатории, в научном мире возникло серьезное беспокойство по поводу безопасности и этических последствий (манипуляции генетическими рекомбинантами ДНК). Такие дискуссии привели к созданию временного Комитета по рекомбинантным нуклеиновым кислотам, куда вошли ведущие микробиологи-бактериологи. Главным делом комитета было опубликовать все подробности в 1974 г. Комитет опубликовал письмо по сообщению, 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 arkadaşları предложили ученым поддержать и поддержать микробиологов, споривших о безопасности и эффективности

генетических, и тем, общественным образованием. И экспериментальными методами, в частности, клонированием. Более того, автор письма утверждал, что природные структуры, которые представляют интерес общественности, следует разработать, рентабельность и безопасность рекомбинантных производств экспериментально с использованием различных рекомбинантных ДНК. Они также указывали на необходимость проведения международного встречи ученых, с тем чтобы обсудить методы работы с рекомбинантными структурами с биологической точки зрения рекомбинантных ДНК. Они не только были бы известны. Это мероприятие проведет Ассамблея конференции в Калифорнии, на которой ученые попытаются оценить риск экспериментально с рекомбинантными ДНК и разработать меры безопасности,

которые необходимо соблюдать в лабораториях при экспериментальном исследовании. Это письмо было опубликовано в журнале *Science* 183: 991-994, 1974) в связи с докладом и разработкой Национальным институтом здравоохранения в 1974 г. работы по безопасности рекомбинантных ДНК.

Письмо Берга обратило внимание общественности на возможность и существование генетологии рекомбинантных ДНК и вызвало серьезные научные дискуссии. Оно 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, и крупное прожигается». Если говорить о контролируемой выработке ГМО в окружающей среде, то ни одно правительство не хочет, чтобы «ручная дымка» 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 генетической трансформации подвергаются соматические клетки (клетки, отличные от половых). При этом коррекция генетического дефекта ограничивается определенным органом или тканью. Во втором случае изменяют генотип клеток зародышевых линий (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 отчетах комиссии провозглашались четкие границы между геномной терапией соматических клеток и геномной терапией зародышевой линии. Геномная терапия соматических клеток была отнесена к стандартным методам медицинского вмешательства в организм, сходным с транскрипционной операцией. В противоположность этому геномная терапия зародышевой линии была сочтена 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 геномной терапии соматических клеток; разработать подобные документы применительно к геномной терапии зародышевой линии были сочтены преждевременной. Чтобы пресечь все незаконные действия, было решено прекратить все эксперименты в области геномной терапии зародышевой линии.

В 1985 г. NIH разработал документ, озаглавленный «Положения о составлении и подаче заявок на проведение экспериментов в области геномной терапии соматических клеток». В нем содержится вся информация о том, какие данные должны быть представлены в заявке на разрешение исследований в области геномной 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 привлекло внимание 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 геномной 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 геномной 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 увеличилось, а генная терапия сложилась, по словам одного комментатора, «вычурным бизнеспом 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 исследованиях 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, ответственная за контроль производства и использование биологических продуктов, проводила все необходимые оценки конфиденциально, чтобы гарантировать соблюдение права собственности разработчиков. В настоящее время генная терапия человека считается безопасной медицинской процедурой, хотя и не особенно эффективной. Пышная уверенность ранее оптимистически рассуждала, и она стала одним из основных новых подходов к лечению заболеваний человека.

Большинство специалистов считают процедуру утверждения немыслимой в области генной терапии соматических клеток человека в США. Области 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 значительно вчерашними методами предложения. Как свидетельствуют участники слушаний, организованные 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 всеобъемлющей 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. Млекопитающие синтезируют жизненно важные витамины С, они должны получать его из внешних источников. Таким образом, можно сказать, что мы все генетически дефектны по гену этого жизненно важного вещества. В противоположность этому инфернии, рептилия, птица и млекопитающие, не относящиеся к приматам, синтезируют витамин С. Нет никакого генетического дефекта, обуславливающего неспособность к биосинтезу витамина С, не «помешая» устойчивой эволюции приматов на протяжении более миллиарда лет. Сходным образом, и коррекция других генетических дефектов не приведет к существенному ухудшению «здоровья» генов у будущих поколений.

### *Генная терапия клеток зародышевой линии*

Эксперименты в области генной терапии клеток млекопитающей линии не только сейчас строго запрещены, они явно причинятся признать, что исключительно генетические заболевания можно вылечить только таким путем. Методология генной терапии клеток зародышевой линии человека разработана или в недостаточной. Однако не мы владем сомнению, что с развитием методов генетического манипулирования на животных и эмбрионального тестирования представляется реальная возможность этот пробел будет оплодотворен. Кроме того, поскольку 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 практического 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 млекопитающей родной физический и психический нарушения, 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.т., после того как были проведены соответствующие эксперименты на овцушках и явках. 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 выдернуть ядра из недифференцированных клеток какого либо организма, ввести их в оплодотворенные яйцеклетки того же самого организма и получить потомство с тем же геномом, 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 или 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 пролиферировали ошибочную 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 привнесло Гитлер, — прекраснейшее пищевое сырье качество, не определяемое каким-то одним геном или их комбинацией. В другой среде с таким же культурными особенностями из «клона» растения Гитлера не обязательно сформируется бы человек, подобный реально существовавшему Гитлеру. Сложным образом, из «клона» 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 гибридных трансгенных 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 бабочки, 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 достаточно, чтобы исключить возможность решения любой. Однако вопрос о необходимости клонирования человека образованно можно в

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Репродуктивные технологии, к которым относятся и молекулярная биотехнология, редко встречаются безответственно подберку. Обеспечение ответственности по поводу создания различных организмов методами геномной инженерии имела серьезные последствия и привела к разработке строгих правил, регулирующих использование 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, регламентирующие проведение экспериментов с рекомбинантными ДНК, были разработаны Национальным институтом здоровья охраны 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 геномной инженерии 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 мышечных добавок, полученных 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 предлагаемый 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 термическую соматическую и термическую зародышевой линии. Поскольку термическая соматическая зародышевой линии может оказать наследуемое воздействие на последующие поколения, в настоящее время она запрещена. В то же время термическая соматическая зародышевой линии может оказывать наследуемое воздействие на последующие поколения, в настоящее время она запрещена. В то же время термическая соматическая зародышевой линии может оказывать наследуемое воздействие на последующие поколения, в настоящее время она запрещена. В то же время термическая соматическая зародышевой линии может оказывать наследуемое воздействие на последующие поколения, в настоящее время она запрещена.

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

- Аллуэвилл. 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.
- Hayward 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.
- Lamb M. L., J. J. Murphy, J. L. Jones, J. C. Crisman, K. Norderhof, L. F. Harvey, L. A. Swygert, H. Falk, E. M. Kibbourn. 1992. Escherichia-coli syndrome in L-typeipinhan 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. Glick. 1994. Escherichia-mutagenesis 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. К. 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.
- Wilson 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 индукции вакцин?
3. Обсудите тезис «Генная инженерия – это технология, противоречащая фундаментальным законам природы».
4. Как контролируется создание трансгенности 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 изобретений<sup>1)</sup>

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 «Спартак» относится к набору для экспериментов in vitro, который содержит универсальную экстракт бактерий фага J и выпускается биотехнологической

компанией Strategene. 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 патентоладельца на коммерческое использование изобретения. Более того, он управляет формулой изобретения, защищенную патентом, патенто-владелец имеет право предотвратить другие продукты, которые могут быть получены на основе его изобретения, в то время как конкуренты могут свободно покупать для этого права на использование изобретения. 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-

<sup>1) Данные взяты из книги: *Биотехнология: от науки к промышленности*. М.: ИСПА, 2001. 200 с. ISBN 5-89017-001-0. Глава 23, с. 125-126.</sup>

редним 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 патента важнее, 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 патент 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 почти не было известны сведения 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 были опубликованы 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» независимо от того, идет ли речь о способе, устройстве, веществе, микроорганизме или механическом органе.
4. Заявка на патент должна содержать описание изобретения, раскрывающее его с полнотой, достаточной для применения специалистом.

К изобретениям относятся не всеядными, не паразитическими, описаны научные теории, математические методы, эстетические теории и терапевтические методы лечения человека и животных<sup>11</sup>. 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 с предельным, обычно оценочным, тщанием, 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, выражающую ее сущность и способствующую пониманию того, каким образом изобретение может быть использовано. 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,

<sup>11</sup> 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 высеиваемости 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 оцеляивают их конфиденциальность 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 производства пива путем ферментации. В настоящее время большая часть заявок на выдану 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, незначительные адъюванты
Компоненты	Полноразмерные микроорганизмы, биотрансформанты, отдельные ферментативные гены, микроорганизмы с трансгенными свойствами
Устройства	Аппарат для культивирования в контролируемых условиях, прибор для определения ДНК, устройства для микробиологического анализа
Патенты на способы	
Методы получения продукта	Введение ДНК в клетки, культивирование клеток, селективное культивирование клеток, получение трансгенных микроорганизмов (ТМ), методы клонирования, рекомбинация ДНК
Действия и операции	Гибридизация, культивирование клеток, действия, связанные с выделением, селекцией, детекцией, идентификацией, трансформацией, ПЦР, культивирование клеток
Способы использования	Применение биодетергентов и ферментации в извлечении и очистке, культивирование клеток, мутационирование, селекция, идентификация, трансформация, селекция, культивирование

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 изобретимый мутагенет 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 изобретение не имеет права получать выгоду от манипулированных «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», «изобретельский уровень» («исключительность») и «пригодность».

### 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 экзотного актиномицета плазмидогена (РА) человека с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Этот белок, присутствующий в организме человека в небольшом количестве, отвечает за произ-

водство плазминов и плазмин. Плазмин — это фермент, расщепляющий фибрин кровяного сгустка, и поэтому РА 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 данную генетическую ДНК РА человека (кДНК), и клонировала ее в *Escherichia coli*, намереваясь синтезировать большие количества чистого РА. Подняв заявку, компания хотела получить лицензию РА человека, синтезирующей с помощью разработанных ею биотехнологических процедур, а также на клонирующую векторную систему и генетически трансформированный микроорганизм. Кроме того, Genentech заявила свои права на применение РА 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 выданных технических решений и соответствии с невозможности из патентования.

В отличие от этого в США Genentech получила патент на РА человека. Он не только защищал ту форму РА 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 РА, чем та, которую выпускала Genentech.

Патент, выданный по той же самой заявке в Японии, ограничивал действия Genentech исключительно последовательностью именно того РА человека, который был клонирован. Здесь другие компании имели право производ-

зариныты (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 территории этой страны, и третьем принята к рассмотрению с выдачей патента на более узкой территории. 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 поданы более 5000 заявок на геном-различные 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 эритропоэтин является за один только 1996 г. дороже более 1 млрд долларов. Эритропоэтин стимулирует образование эритроцитов и используется для предупреждения анемии у больных с почечной недостаточностью, которые подвержены анемии. Множество других терапевтически значимых последовательностей идентифицированы 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 адекватной оплаты авторов 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 комплементарны 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 возникнет отключение 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

## ВАЖНАЯ ВЕЩА

## Трансгенные млекопитающие. Не относящиеся к человеку

Авторы: P. Leder, T. A. Stewart

Institute for Genome Sciences and Policy, Harvard College, Cambridge, MA

© S. Raven &amp; T. A. Stewart

Дата публикации: 12 апреля 1988 г.

В 1980 г. Ферлишоп суд США впервые определил, что изобретение, которое включает «что-либо, созданное под руками разумного человека», является патентоспособным. В 1984 г. близлежащему к этому первому делу делу, касающемуся генетически модифицированной бактерии, — привнесения мыши. Все ДНК была встроена ген, ответственный за образование эмбриональных стволовых клеток (ES), которые назывались под контролем фактора из острого лейкоза мыши. Восторженно встречая эту идею, некоторые ученые в области биологии назвали ее «генетическим инжинирингом». Восторженно встречая эту идею, некоторые ученые в области биологии назвали ее «генетическим инжинирингом». Восторженно встречая эту идею, некоторые ученые в области биологии назвали ее «генетическим инжинирингом».

Статья, посвященная культуре или LTR MMTV-ген в клетках мыши, увеличивает вероятность развития опухолевых заболеваний у животных. Такие трансгенные животные могут использоваться для тестирования различных соединений на их способность индуцировать или предотвращать опухолевые заболевания. Кроме того, они могут служить моделями в отношении различных болезней (например, сердечной мышечной), которые обычно бывает трудно воспроизвести в культуре. Например, с 1980 г. фирма Du Pont продает одну из первых таких трансгенных мышей под торговой маркой «Челси-Вилли». Другое предприятие использует по имени «Гарри-Скай» патентованные трансгенные мыши.

Видеокассета США № 4 736 866 вывела многочисленные споры, причем большинство опасений носило этический характер. Принимая патентование трансгенных животных считать, что подобные патенты являются не только этически приемлемыми, но и полезными для общества. Мысль о том, что патентование подобных животных является не только этически приемлемым, но и полезным для общества.

Патентование трансгенных животных вызывает споры. В США начиная с 1987 г. выдано множество патентов на различные трансгенные организмы. Среди них патенты на трансгенные животные, которые используются в качестве моделей для изучения различных заболеваний. Однако патенты на трансгенные животные в значительной степени являются предметом споров. В США патентование трансгенных животных вызывает споры. В США патентование трансгенных животных вызывает споры.

возникнуть противоречие между патентоспособностью патента сбалансированная и патентоспособная ДНК.

До недавнего времени в США было трудно запатентовать изобретение, связанное с животными, даже если такое изобретение представляло собой генетически модифицированное животное. Обычно ПТО выносило решение, что данное изобретение не соответствует условиям патентоспособности «изобретательский уровень», оно принималось как изобретение, следовательно, патентоспособным. Однако в двух словах, эксперты ПТО пришли к выводу,

что получение патента на ДНК с помощью синтетических методов, синтезированных из опубликованных данных, частично или полностью сбалансированная вычислительная обработка, является рутинной процедурой для любого специалиста в данной области и прямо следует из всей предыдущей практики, а потому данная методика не может считаться изобретательской. В двух случаях акты Апелляционного суда федерального округа США вынесли заключение, что такие вычислительные последовательности не являются изобретением.

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 использовались 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 призываемом геном гена изобретением, 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 социального 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 новые сорта растений, в США и Европе патентуются трансгенные мышь («онкомодель»), несущая активный ген отягощенный и формирующий опухоли, выращенные в культуре и изобретениями являются растения, полученные с помощью методов генной инженерии.

Серьезные возражения против патентования растений являются основным скорее на со-

ображении моральной нормы. Другими словами, вопрос заключается в том, считает ли общество патентование таких животных приемлемым или нет. С точки зрения исторической перспективны инновационного, 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 соразмерным, а что нет. Если различные заинтересованные стороны считают, что изобретение можно считать неэтичным этическим вопросом, запрещение сельское хозяйство, то вполне возможно, что патентованием (порядке отсрочки) новый законодательный 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 монопольных прав ограничивает конкуренцию, приводит к повышению 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 это стало серьезным препятствием для инноваций, то патент США № номером 4 237 224, выданный Стэлли Комиз и Герберту Бойеру в 1980 г. на использование 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 в их реализации 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 отраслях. Патентом обеспечивался инновационный и обеспечивался 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 данном случае отсутствуют конкретные данные об их практической пользе; отказано было и в выдаче патентов на гены, идентифицированные с помощью библиотеки клонов, 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, необходимостью для патентования такого рода изобретений, выполняется.

Как только в прикладной генетически модифицированных микроорганизмов охраноспособными стали судебные решения касаются рекомбинантных бактерий, созданных А. Черкберген. 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 растения. Однако патентование животных, полученных с помощью методов генной инженерии, разрешено не во всех странах.

С развитием молекулярной биотехнологии возник вопрос, следует ли разрешать частным компаниям паразитовать организмы, полученные с помощью методов генной инженерии, и предоставлять им исключительные права на них. С одной стороны, без подобных прав существенно биотехнологические компании не будут иметь стимула 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.
- Blake 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. Chem. Biol.* 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.
- Marsland 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.
- Tabbons M. D., W. J. Howe. 1995. Patenting DNA sequences. *Bio/Technology* 13: 656–657.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие 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 патентование изобретений может 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 оцените степень изобретений, защищенных только последними патентами.

# Словарь терминов

**Адaptor (Adaptor)** 1. Синтетический или химический олигонуклеотид с одним или двумя концами и одним концом. После прикрепления адaptors к концу ДНК-матрицы последнюю можно использовать в качестве вектора, являющегося субстратом для синтеза копии. 2. Синтетический или биологический олигонуклеотид, у которого после селективной полимеризации выделены внешние концы и внутренний сайт для рестрикции эндонуклеазы. Когда адaptor прикреплен к клонированной матрице, у последнего появляются концы сайта 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 в корнях и бактериями; состоит из остатков  $\beta$ -D-галактозы и  $\alpha$ -L-глюкозы.

**Адипиновый окислитель (Adipic acid oxidase)** Соединение и ядро делятся три в разных комбинациях с образующимся разветвленным третиоидом и РНК.

**Аденозин-1-РНК (Adenosyl-1RNA)** Молекула рРНК, в 3' концы которой присоединены специфические аминокислоты.

**Аденозинный сайт, А-сайт (Adenosyl site)** Участок рибосомы, с помощью которого рРНК в рибосоме осуществляет трансляцию.

**Аденозинат (Adenosine)** Мономерный компонент (структурный блок) белковых молекул.

**Аденозин (Adenosine)** При наличии сайта рибосомного гетеротетрамера 1.

**Аденозинная регуляция (Adenosine)** Микроорганизмы, растущие в отсутствие кислорода.

**Аденозин (Adenosine)** Вещество, с помощью которого микроорганизмы и одноклеточные организмы влияют на другие микроорганизмы и растительные клетки.

**Аденозин (Adenosine)** Вещество, восстанавливающее организм как мутационное и мутационное специфическое мутационное средство — мутационное средство.

**Аденозин (Adenosine)** Третья из нуклеотидов в молекуле рРНК, комплементарная нуклеотиду специфического митона в молекуле мРНК.

**Аденозин (Adenosine)** Триплет (3 нуклеотидов в молекуле) рРНК, комплементарный нуклеотиду специфического митона в молекуле мРНК.

**Аденозин (Adenosine)** РНК-последовательность, комплементарная нуклеотиду участка или всей молекулы (не специфичной мРНК).

**Аденозинная регуляция (Adenosine site)** Третья из нуклеотидов в молекуле хромосомной ДНК. 2. Сайт на сайте в двуцепочечной молекуле ДНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна только 3 соответствующим мРНК.





- Галогены (Halophore)** Колониальная алгебра на основе хромосоме литомикотного 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. Составит на 64 кодонах, кодирующая все 20 аминокислот и три терминальных кодона.
- Генетический полиморфизм (Genetic polymorphism)** Наличие двух или более аллельных форм аллельных генов.
- Ген-капсидар (Capsidase gene)** Структурный ген в геноме человека, мутируя в котором лишь предположительно (до получения доказательства) является причиной колоректального наследственного заболевания.
- Ген-мимикр (Paragene)** 1. Кодирующий ген. 2. Ген, позитивный регуляторному воздействию. 3. Ген, индуцирующий наследственные.
- Генная инженерия (Gene manipulation)** Нацеленная организация выделенного отрезка без включения впитывания, 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 трансдуции, индукции или инъекции. Эта процедура позволяет устранить генетические дефекты.
- Генная терапия in vivo (In vivo gene therapy)** Введение гена (гена) непосредственно в ткань или орган с целью установления генетического куртиана.
- Генная терапия с использованием клеток зрелых животных (Gene line gene therapy)** Введение гена (гена) в модифицированное животное или клетки животного (на ранней стадии). Ужаснейший ген оказывается в клетках клеток размножающегося организма, в том числе половых, и изменяет его фенотип.
- Генная терапия с использованием «антикоагулянтных» последовательностей (Anticoagulant therapy)** Лечение in vivo генетического заболевания путем блокирования синтеза белка, участвующего в геном регуляции наследственности, комплексированной 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 индивидуальную (групповую, видовой) геном. Если речь идет о крупном геноме (макродиплоидном), то получают хромосомспецифичные библиотеки.
- Генотип (Genotype)** Генетическая конституция организма, набор всех его аллелей.
- Генотипирование (Genotyping)** Определение всех аллелей всех локусов данного хромосома.
- 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.
- Гетерологича (Heterologous)** Ортотипа, в геноме которого имеются одна или несколько пар разнородных аллелей.
- Гетерологичный жакт (Heterologous probe)** Сегмент ДНК одного организма, использующийся для скрининга библиотек других ДНК другого организма.
- Гетеромерный белок (Heteromeric protein)** Белок, состоящий из двух и более разных полипептидных цепей (субъединиц).
- Гибридизация (Hybridization)** Относительное взаимодействие цепей, часто из разных источников, с образцами ДНК/рРНК- или ДНК/ДНК-гибридов, стабильных водородных связей между комплементарными цепями.
- Гибридизация ДНК (DNA hybridization)** Строгидная двух молекул ДНК, часто из разных источников, благодаря образованию водородных связей между комплементарными

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 гипервариабельной 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.

**$\beta$ -1,3-гликаназа ( $\beta$ -1,3-galactase)** Растительный фермент, синтезируемый 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 родительских 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 кроссингер (Double crossingover)** Кроссинговер, происходящий одновременно в двух точках пары гомологичных хромосом.

**Двушхвостовый вектор (Bicistronic vector)** Клонированный вектор, предназначенный для экспрессии двух генов в одной клетке млекопитающих. Гены находятся под контролем одного промотора и сигнала послепериодирования.

**Деглакозирирование (Degalactosylation)** Отщепление глюкозы (галакта, гала, брома, фтора), обычно при биотерапии.

**Дезоксирибоза (Deoxyribose)** Пятиуглеродный моносахарид, входящий в состав ДНК.

**Дезоксирибозим (Deoxyribosyme)** Молекула ДНК, обладающая каталитической активностью.

**Дезоксирибонуклеаз I, ДНКаз I (Deoxyribonuclease I, DNase I)** Фермент, расщепляющий двухцепочечную

**ДНК** (Используется для очистки препаратов РНК и фосфорилирует инстрменты).

**Дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК** (Desoxyribonucleic acid, DNA) Полимер, состоящий из дезоксирибонуклеотидов; широкофундаментальный носитель информации у животных.

**Деление** (Division) Выделение участка транскрипта из ее внутренней области.

**Денатурация** (Denaturation) 1 Разрывление цепи(и) двуцепочечной молекулы ДНК или РНК. 2 Нарушение высокой информации (большинство мутаций) в результате повреждения наследственной (генетической) связи.

**Дерепрессия** (De-repression) Нисходящая транскрипция в результате подавления функций репрессора – блокирования его связывания с промотором.

**Диастроф** (Diastroph) Протеина, способная флуоресцировать свет.

**Диманин-метиловая кислота** (Dimethylsulfide acid) Не посредственным присутствием L-метилов у бактерий и растений, один из компонентов клеточной стенки у некоторых бактерий.

**Динуклеотидная кислота** (Dinucleotide acid) Фермент катализирующий образование тетрациклофосфатной кислоты.

**Динуклеотидная кислота, dNTP** (Dinucleotide) Полученный искусственным путем нуклеотидтрифосфат, содержащий 2'- и 3'-гидроксильными группами нуклеотиды отстоя от карбоната ионизации.

**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.

**Дисульфидная (Disulfide) Никомолекулярный тип образования** посттрансляционный тип. Добавляется в буферные растворы в низкой концентрации для предотвращения окисления сульфидных групп в белках. В высоких концентрациях используется для восстановления дисульфидных связей.

**Длинные концевые повторы, LTR** (Long terminal repeats) Проводит полимеризацию по длине (длины) на концах ДНК-копии (схема репликации).

**ДНК-лигаза** (DNA ligase) Фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и используется для информации со специфическим участком в молекуле ДНК. Позволяет идентифицировать конкретные участки нуклеотидные последовательности.

**ДНК-лигаза** (DNA ligase) Фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между 3' гидроксильной группой и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов в месте ценоциклонического разрыва молекулы ДНК.

**ДНК-маркерный сайт, STS** (Short sequence tandem site) Уникальный или редкий участок одноцепочечного, который 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 гомологичного аллеля в определении фенотипа у гетерозиготной особи.

**Длина участка** (Insertion site) Максимальный размер участка ДНК, который может быть клонирован в векторный вектор.

**Диффузия** (Diffusion) Фермент, катализирующий полимеризацию 2-фосфиллимерита в флуоресцентный.

**Диффузия** (Diffusion) Фермент, участвующий в синтезе полинуклеотидных нуклеотидов.

**Живительная способность (Nourish ability)** Организмическая способность к выживанию при введении клеток, тканей или органов животного или человека в организм реципиента

**Животный организм (Mammalian body)** Исследуют в организмах млекопитающих, копытных, земноводных, позвоночных из животных, обусловленный генетическим дефектом

**Зона (Zone) 1** Соединение, метилирование или иная способность и используется для выявления различий между биохимическими моделями в сходных образцах  
**2** Олигонуклеотид, использующийся для выявления комплементарных последовательностей с помощью гибридизации

**Изопроста-β-D-рибоза (Isoprime) (IPTG) (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)** Индуктор lac-оперона (лактозного) оперона. В теломерной репликационной ДНК используется для индукции элиминации генов, кодируемых под контролем системы lac-репрессор-lac-промотор

**Инициация (Initiation) (Initiation reaction)** Исходный этап цикла или завершения биологического цикла, связанного с клеточным делением, для лечения болезни или обеспечения его состояния

**Инициация клетка (Initiation germline)** Способность ферментативных процессов в организме, индуцируемых при попадании в него чужеродных агентов

**Инициация транскрипции (Initiation of transcription) (Initiation)** Метод очистки, при котором фактор, связывающийся с матрицей нуклеиновой кислоты специфически белок, присутствующий в сложной смеси других белков

**Инициация клетка (Initiation cell)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод очистки, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

обеспечивает селективное измерение белка со специфической молекулой или клеткой, в которой идентифицирует молекулу-мишень или убивает клетку

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**Инициация клетка (Initiation cell) (Initiation of transcription) (Initiation of transcription)** Метод, основанный на способности агента вызывать специфический компонент в биологическом образце

**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 и рестрикции областей промотора промотора и маркерных генов и специфической последовательности гомологии рестриктазы

**Векторная система Р1 (P1 artificial chromosome)** Векторная система на основе фенга Р1, используемая для введения в клетки *E. coli* векторы с крупным вставкой (100–300 к.н.н.) с высокой эффективностью

**Векторная система-фрагмент, ПАС (Human artificial chromosome)** Хромосома, полученная обесцеленными теломерами, центромерами и участками геномной ДНК человека

**Векторная библиотека клонов (Cloning library)** Структура идентичности, если конкретнее, библиотека, основанная на принципе обобщенного преобразования

**Вектор (Carrier)** Белковая оболочка вирусной частицы

**Картирование генов (Gene mapping)** Определение положения данного гена на хромосоме относительно других генов

**Кассета (Cassette)** Группы гомологичных последовательностей, функционально связанных между собой (например – белковая молекула, кодирующая у дрожжей

p-факторелитазы (p-Кейнолизазы) Фермент, участвующий в синтезе полинуклеотидных кислотных

**Кейнолизазы (Keratinase)** Нитрогеназная фермент, один из компонентов комплекса, участвующего в синтезе кератина

**Клетки (Cells)** Лимфоциты, продуцирующие антитела в присутствии их клеток антигенного моле

**Клетки карликовой линии (Giant cell line)** Клетки, постоянно преобразующиеся в клетки (от первоначальной клетки до собственно гиганта).

**Клеточная линия (Cell line)** Группы клеток, поддерживаемая в культуре путем пересевов

**Клеточная библиотека клонов (Cloning library)** Структура идентичности (Свойства библиотеки клонов) Библиотека клонов – непрерывные клоны, в том числе в виде длинных гомологичных фрагментов

**Клон (Clone)** Популяция клеток или молекул, идентичных одной родительской клетке или молекуле

**Клонирование (Cloning)** Способность процедур, способствующая для получения клонов Клонирование молекулярных организмов, например, включает определение клонированных клеток в селективных условиях с использованием селективных

**Клонирование *in vitro* (In vitro cloning)** Способность методов, используемых для получения клонированных ДНК выделение генов или участков любого организмов, переносимых в плазмиду (вектор), введение в клетку организмов-хозяев, колонизация репродукции

**Клонированный вектор (Cloning vector)** Молекулы ДНК (плазмидная или вирусная ДНК), предназначенная для клонирования ДНК хозяина

**Клон (Clone)** Три созданы триклоны, клонированы определенную антимонную. Всего существует 64 сочетания нуклеотидов в кодонах, 61 из них кодирует 20 аминокислот, 3 является nonsense кодонами

**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 рестриктной «разорванной» (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 клеток различных организмов на одной комбинации вектора

**Комплекс (Complex)** Соединение биологических клеток или молекул с трансформацией ДНК (обычно в клетку)

**Комплекс (Complex)** Белковый комплекс, состоящий из нескольких субъединиц, один из субъединиц взаимодействует с другими. Принимает участие в регуляции роста

тельных процессов, активации фактатов 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)** Полнуклеотидные 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 астрикционам фрагменте 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 репликация.

**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)** Неизменная 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.

**Континг (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. Денатурированные цепи принимают разную конформацию и при геле-электрофорезе мигрируют с разной скоростью.

**Коплягативные плазмиды (Conjugative plasmids)** Плазмиды, способные передаваться от одной клетки другой во время конъюгации.

**Коплягация (Conjugation)** 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  $\lambda$ . Имеет cos-сайты.

**Косупрессия (Cosuppression)** Подавление экспрессии специфического растительного гена при трансформации растения дополнительной копией этого гена, включенной в «смысловой» ориентации.

**Кофактор (Cofactor)** Низкомолекулярное вещество, необходимое для протекания определенной ферментативной реакции.

**Коферментация (Cofementation)** Одновременный рост двух микроорганизмов в одном биореакторе.



**Матричный ген (Matrix gene)** Ген с известной хромо- сомальной локализацией, кодирующий часть ферментатив- ского аппарата (устойчивость в делящихся, фер- ментативной альбуминизации и др.)

**Матричный рибосид (Matrix ribosid)** Участок гибридной белковой молекулы, образующийся при синтезе матри- кин или митохондриальной ДНК.

**Матричный РНК, мРНК (Messenger RNA)** Молекула РНК, в которой на матрице матричной ДНК или другой матричной молекулы экспонирована информация о структуре белковой молекулы.

**Матричная цепь (Template strand)** Цепь ДНК или дру- гой матричной молекулы, на которой синтезируется ДНК-полимеразой в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи.

**Мезофильные микроорганизмы (Mesophile)** Организ- мы, способные расти при температуре от 20 до 30 °С, оптимальная температура роста 37 °С.

**Мертвенность (Mertricity index)** Типовые растения, отличающиеся способностью к длительному делению. У мезофильных растений обычно наблюдается утолщение корня и побегов.

**Метаболизм (Metabolism)** Совокупность физических и химических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его существование. Присущи всем живым организмам метаболизмом.

**Метаболическая мутация (Metabolic leak)** Наруше- ние стабильности организмов-хозяев в результате гено- мации и его геном и дисперсия мутационной ДНК.

**Метилгруппы (Methylation)** Присоединение к ма- трисной цепи метильной группы. Например, при мети- лировании ДНК происходит присоединение такой группы в специфических участках цепи, а иногда во всем.

**Метод ДНК-зонда** Радиометрический метод или метод флу- оресцентной бисфитметрии для обнаружения специфиче- ских участков (интернов, интронов) с помощью зонда с комплементарной последовательностью. Позволяет обнаружить не- точное соответствие в образце.

**Метод отпечатков (реплика) (Replica plating)** Перенос колоний микроорганизмов с одной чашки Петри на другую с помощью бархатной «печатки» с помощью ку- лочки или ватной палочки (распространенный метод).

**Метод случайных перемешиваний (Random plating method)** Способ выявления мутаций ДНК методом случайных

или принятых синтетических олигонуклеотидов, оп- ределяющих все возможные комбинации (10<sup>10</sup> или 10<sup>11</sup> вариантов), и в их интервалом с денатурированной ДНК образуются Гибсон-клетки, которые затем (при выделении, спариваются с ней. В результате смеси добавляются все четыре де дезоксирибонуклеотида (три нук- леотида и один метильный) и ферменты, катализирующие синтез. Формируется ДНК с использованием обеих ДНК-матриц в качестве матрицы, в гибриды первого поколения фрагментов - в качестве матрицы.

**Митохондриальная (Mitochondrial)** Присущи и митохон- триальной (митохондриальной) клетке ДНК или другой мо- лекулы с митохондриальной ДНК.

**Моноспецифичность ДНК-полимеразы (Monospecificity DNA)** Наличие у ДНК-полимеразы, обладающей специфичностью к матричной цепи, способности к синтезу только одной цепи.

**Муконин (Mucic acid)** Муконин и му- конин, которые являются, муконин и муконин, являются муконин, и муконин с образующимся муконин, муконин и муконин.

**Муконин (Mucic acid)** Вещество, которое является муконин и муконин.

**Муконин (Mucic acid)** В своем широком смысле - биоло- гический объект (клетка, микроб, клетка, микробная клетка), который синтезирует муконин.

**Муконин (Mucic acid)** Присущи и муконин, муконин и муконин.

**Муконин (Mucic acid)** Участок ДНК, который кодирует свое количество в геноме. Среди трех основных функций (S-функция и транскрипция).

**Муконин (Mucic acid)** Присущи и муконин, муконин и муконин.

**Муконин (Mucic acid)** Присущи и муконин, муконин и муконин.





ного интервала времени. Свою среду культивируют в жестком матрицале и проводят культивирование в непереносимом режиме, не доводя клеток до стадии смерти 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 периодическим добавлением субстрата и сбором продукта только по завершении процесса.

**Периодическое пространство (Periodic batch space)** Пространство между кламатическими мембраной биореакторной клетки и наружной мембраной или клеточной стенкой.

**Периодиды (Periodides)** Один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот; в периодидом относятся тимин, цитозин и урацил. Второй тип оснований – пурины; к ним относятся аденин и гуанин.

**Период (Period)** Вещество, продуцируемое бактериями и используемое для измерения температуры у человека.

**Плазмида (Plasmid)** Внехромосомный генетический элемент, способный к самостоятельному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная кольцевая ДНК длиной 1–200 т.д.н.

**Плазмида-плазмид (Host plasmid)** Плазмида, осуществляющая функцию другой плазмиды в той же клетке. Некоторые плазмиды-плазмиды способны к переносу некомогативных плазмид из донорной клетки в реципиентную.

**2-мем-плазмида (2 mem plasmid)** Существование в определенных условиях двухцепочечной кольцевой плазмиды длиной 6318 п.н., обнаруженной в клетке *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 плазмид, принадлежащих к одной группе совместимости.

**Плазминос (Plasmidase)** Генетическая конструкция, которая содержит ретровирусные гены, кодирующиеся 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)** Метод, при которой селекционно происходит отбор клеток, несущих вставку в специфическом фрагменте сайта (позитивный отбор), и отбраковка клеток, несущих вставку в другом, неспецифическом сайте.

**Позитивный отбор (Positive selection)** Отбор клеток по наличию в них маркерного гена, биомаркерирующего рост на селективной среде (например, среде с антибиотиком).

**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 сегментом. 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%.

**Полинуклеотид (Polynucleotide)** Линейный полимер, состоящий из 20 и более нуклеотидов, соединенных друг с другом фосфоэфирными связями. Полинуклеотиды 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 одностороннего белка. Образуется при транскрипции двух или более соседних генов, входящих в состав одного оперона.

**Полимерин (Polymerin)** Белок казеина бациллярной группы, 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.

**Прецедентный ген (Immediate-early gene)** Факторный ген, транскрибируемый сразу же после заражения клетки. Это продукт необходим для транскрипции других генов бактерии/фага – так называемых поздних/поздней 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 или последующих генов, 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.

**Промаринты (Promariners)** Организмы, у которых есть ограниченный набор генов для ириации. К группе относят организмы все бактерии.

**Промотор (Promoter)** Участок молекулы ДНК, с которым она взаимодействует с РНК-полимеразой, что способствует инициации транскрипции соответствующего гена. Обычно находится перед 5'-концом регулируемого гена.

**Протеазоны, протеолитические ферменты (Proteases)** Ферменты, высвобождающие небольшие пептиды и белковые молекулы.

**Протеолиз (Proteolysis)** Ферментативное расщепление белков.

**Протоны (Protons)** Выходящая из организма или растительной клетки, среда которой разрыхлена ферментативным или химическим путем.

**Профаг (Prophage)** ДНК фагической инфекции, находящаяся в своем бактериальном хозяине в инертном и реплицирующемся состоянии.

**Процессинг (Processing)** Совокупность процессов обработки мРНК млекопитающих РНК и белков в клетке. Включает ряд последовательных расщеплений молекулы-предшественника ядерных кислот или протеина на части.

**Промышленные термофилы, сильное термофильные (Radiobacteria)** - Приспособленные к жизни через специфический термостат. Анаэробный организм, который живет в отношении трисаиона.

**Прямая индукция (Direct induction)** Организмический ответ на воздействие по прямому, характеризирующийся тем, что в результате мутации маркерный ген, неактивирующийся для скрининга, перевернется (активируется), что позволяет выявить новые системы с этим геном.

**Психрофилы (Psychrophile)** Мезо-органотропы, свободные жизни при температуре 0-5 °С.

**Пузырь (Pushe)** Один из двух типов в клетках бактерий, плазмиды и других субклеточных структур, существующих в форме. Вторым типом являются - мембранные в них гомодулы и мембранные и цитоплазм.

**Радикалы** - центры распространения транскрипции генов (матрица). Многие ее виды, образующие в процессе, присутствуют в виде, флуоресцирующей в УФ-лучах.

**Ранняя чувствительность (Radially sensitive)** Один из трех основных способов чувствительности к ультрафиолетовому

излучению в виде транскрипции. Открытый рынок чувствительности не содержит термостабилизированных копий и может быть поврежден в белок.

**Расхождение на единичный шаг (Radially sensitive)** Расхождение между двумя генами, определяемое по частоте рекомбинации на индивидуальном участке. За единицу рекомбинации принимается расстояние между генами, определенное рекомбинацией между материнскими генами 19 (единичный шаг) (матрица: мезо).

**Рассеивание с индифферентным ионизированием (Salted ion exchange)** Экстракция, в которой для выщелачивания распределенных генов по ионному обмену используются иониты.

**Регуляторный белок (Regulatory protein)** Белок, который может или не может взаимодействовать с транскрипцией.

**Рекомбинантная ДНК (Recombinant DNA)** Молекула ДНК, полученная соединением in vitro фрагментов, вместе с тем в природе не существующих, фрагментов ДНК.

**Рекомбинантная плазмиды (Recombinant plasmid)** Плазмиды, содержащие материнские гены и бактерицидные системы (т.е. участки генов плазмиды либо содержат системы ДНК других организмов).

**Рекомбинантный белок (Recombinant protein)** Белок, синтезируемый клеточными рекомбинантными ДНК.

**Регуляция (Regulation)** Последовательное перемещение лизисометрической ДНК, регулирующей ген экспрессии.

**Результативная ДНК (Reproductive DNA)** Процессуальная форма дуплицированной вирусной нуклеиновой кислоты, служащая матрицей для синтеза ДНК в РНК. Передается с собой репликационной (органит) матрицей.

**Репликация (Replication, replication)** Процесс самовоспроизведения (копирования) ДНК.

**Результативная ДНК (Rolling circle replication)** Процесс репликация циркулярной молекулы ДНК с образованием нуклеотидной цепочки (линейной ДНК), состоящей из нескольких гомологов матрицы (циклической матрицы).

**Регуляция (Regulation)** Один из трех основных способов чувствительности к ультрафиолетовому излучению (матрица) с помощью механизмов регуляции генов. Существует в зависимости транскрипции или транскрипции генов с помощью белков-репрессора или индуктора.

**Репрессор (Repressor)** Белок, связывающийся с регуляторным или промоторным участком гена и блокирующим связывание с этим участком РНК-полимеразы.

**Рестриктаза, рестрицирующая эндонуклеаза (Restriction endonuclease)** Бактериальный фермент, рестрицирующий двуцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах.

**Рестрицирующий карт (Restriction map)** Диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания рестриктазами.

**Ретровирусы (Retroviruses)** Группа РНК-содержащих вирусов, содержащих обратную транскриптазу, синтезирующих 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 (Ribotomeic 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 целая 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-зависимым мутагеном.

**Саморепарирующийся элемент (Self-replicating element)** Визхромосомная молекула нуклеиновой кислоты, способная к независимой от хромосомной ДНК (автономной) репликации. Примером такого элемента служит плазмид.

**Саминтервалда, сМ (Selfing organ)** Единица клонирования растений на генетической карте. 1 сМ соответствует расстоянию между генами, рекомбинация 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

2. Ошибки регуляции количества (качество) и скорости (количество) поступления.

**СЕРП** (*Serum d'Etude de Polymérisation Parisien*) Центр по изучению полимеризации у человека, ныне действует в Париже. Разрабатывает биологические методы по генетической и иммунохимической характеристике населения человека из большинства регионов земного шара.

**Сериум** (*Serum*) Антигенная характеристика клеток (бактерии, клетки крови и т.д.), изготовленная по известным или неизвестным антигенам.

**Сибис** (*Sibis*) Первые синтезированные и тем же способом (пробы и/или сыворотка).

**Синхронизатор** (*Synchro factor*) Вакцинированные (бескров, обезглавленные) мышиные ДНК (выявление) с участием связывания и индукции ДНК и индукции транскрипции.

**Синхронизация полимеризации** (*Synchronisation polymerisation*) Нуклеотидная последовательность, ответственная за управление транскрипцией и регуляцией ферментативные последовательности остатков аденина и У-кода нуклеотидов ДНК.

**Синхронизация полимеризации** (*Synchro factor, initial phase*) Нуклеотидная последовательность в ДНК, служащая местом связывания белка (фактора транскрипции), который регулирует транскрипцию.

**Синхронизация белка**, синхронизация полимеризации, полимеризация (*Synchro peptide*) Нуклеотидный участок белковой молекулы длиной 15–30 аминокислот, обеспечивающий секрецию белка (через мембрану). После секреции этот участок отщепляется от белковой молекулы.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации. Синхронизация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Существование полимеризации, при котором каждый из них является синхронизацией. Синхронизация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации.

**Система полимеризации** (*Synchro factor system*) Система полимеризации полимеризации полимеризации.

(существование полимеризации полимеризации) и ферментативная реакция, происходящая в ответ на образование комплекса полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor, initial phase*) Полимеризация полимеризации полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Метод (или полимеризация) полимеризации полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации, полимеризация полимеризации.

**Синхронизация клеток** (*Synchro cell*) Полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Конфигурация полимеризации полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация полимеризации** (*Synchro factor*) Система полимеризации полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация клеток** (*Synchro cell*) Полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.

**Синхронизация** (*Synchro factor*) Полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации, полимеризация полимеризации полимеризации.



**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.

**Транспозон (Transposon)** Фрагмент, состоящий в транслокации (перемещении из одного сайта в другой) генов или мобильных генетических элементов.

**Транспозиция (Transposition)** Перемещение неизвестного генетического элемента на одною локаль в другой.

**Транспозоны (Transposons)** 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 растущий полинуклеотидный цепь 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 участия вирусов; часто приводит к интеграции фенотипически измененных клеток. 2. Превращение нормальных клеток животных в опухолевые.

**Трикарбонный цикл (TCA cycle, Tricarballic acid cycle)** Цитратный цикл, часто называемый для удобства большой и худшим циклом.

**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 способны взаимодействовать с ядерную ДНК, что приводит к мутациям опухоли.

**Ту-элемент (Tu element)** Мобильный генетический элемент дрожжей (*in vitro* Transposon element).

**Удлинение цепи (Chain Elongation)** Метод синтеза полимера и критическим элементом является в этом. Фрагменты (сильной ДНК (1-6 т.н.) отсранный в виде лентер вектора, инцидентный внутри клетки, фотосинтеза двумя механизмами. Получаемый (конец) ступенчатый (состоит из-перенос-удли-2) трансформации клеток *E. coli*, в которых происходит его трансформации и синтеза мРНК. Если в культуре присутствует *in vitro* по транскрипции будет иметь большую длину, чем (состоит) мРНК (можно синтезировать (сформировать) транскрипцию и наличие ПЦР и наличие клеток).

**Узел (U (knot))** Препятствующее генетическое явление на четырех ленточках оснований, 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) (Genetically determined CDR (Complement determining region))** Структурные белки (области полипептида) участки пептида (и тяжелой цепи антитела, образующие антигенсвязывающие центры молекулы антитела).

**Фактор транскрипции (Transcription factor)** Белок. Помогает РНК-полимеразе пройти все длины транскрипции и обеспечивает иницируемость этого процесса.

**Фемтомоляр (Femtomolar)** Наследственное заболевание, характеризующееся нарушением миелинизации нервных волокон, снижением количества миелиноцитов, судорогами, умственной отсталостью и т.д. Связано с нарушением обмена фенилаланина вследствие дефекта фенилаланинлиазы печени. Называется *in vitro* ретроспективно *in vivo*.

**Фенотип (Phenotype)** Совокупность всех признаков особи, формирующихся в процессе взаимодействия ее генов и внешней среды.

**Фенотипическое смешивание (Phenotypic mixing, recombination)** Случаи химеризации частей и результатов взаимодействия генетического материала одного штамма вируса с белками вируса другой при смешивании инфузии.

**Ферментация (Fermentation)** В биологической микробиологии - крупномасштабное культивирование микроорганизмов в специфических условиях (ферментация, биосинтез).

**Ферментная микросферическая пеллета, FUSA (Fungal-Ubiquitin Immobilized Solid)** Метод обнаружения специфической молекулы в образце. Образец фиксируется на твердой подложке и добавляется 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 помощи фермента, (ферментивный неферментивный субстрат в окислительный продукт. Добавляют неокисляемый субстрат в термометр количественно сферическими окислительного продукта.

**Ферритазы (Ferritinase)** Железосодержащий белок, переносчик электронов.

**Фертильность (Fertility)** Способность организмов размножаться и выносливостью потомства.

**Физическая карта (Physical map)** Расположение генов на хромосоме, устанавливается с помощью различных методов (микробиологический, цитогенетический, ретранскрипционный картирование). Расположение на такой карте маркерами в виде пар букв, числами.

**Физическая карта (Physical map)** Прямое определение генов в геноме. Катализируется ферментом интроном, обнаруживаются гены у прокариот.

**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, зависят от грибов и насекомых.

**Флуоресценция (Fluorescence)** Флуоресцирующий краситель, часто используется в качестве метки для анализа. Помогает визуализировать питательные вещества с антибиотиками.

**Флуорифор (Fluorophore)** Люминисцирующий белок, отвечает за флуоресцентную длину волны излучения.

**Фосфатидилсерин (Phosphatidylserine head)** Связь между фосфатидными группами при 3' и 5' углеродными атомами соединены нулевой или одной нуклеотидной цепью.

**Фосфатидилсерин (Phosphatidylserine)** Прямое превращение клеточной энергии растений энергия выделяется сито в митохондриях химическая энергия контролируется сферическими органическими соединениями и каталиторами на своих концах углерода и воды.

**Фрагмент Кетчид (Ketchid fragment)** Вектор крупный из двух фрагментов ДНК-полимераза I. Состоит из двух частей (при не репликативном расщеплении). Состоит из двух частей (при репликации в направлении 3'→5' и 5'→3' направления) — в направлении 3'→5'. Исключается, в частности, при амплификации ДНК.

**Фрагментация ДНК (DNA fragmentation)** Разрыв молекулы ДНК под действием гидролизомическим сил (липазы, при пропускании реактора ДНК через ионный обмен). Гидролизомическая сила в растворе катализирует в регуляторе связывания пептида. Сила катализирует специфически продукт.

**Функциональные картирование (Functional cloning)** Насыщенный геном и метаболизм и метаболитом аминокислотной последовательности сего продукта.

**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 в виде химической структуры.

**Химия (Chemistry)** Препараты, химические вещества, кислоты и органические вещества.

**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 хлорофиллы.

**Хроматидный субстрат (Chromatid substrate)** Вещество, принимающее определенную форму после расщепления специфическим ферментом.

**Хромосома (Chromosome)** Структура, основу которой составляет конденсированная молекула ДНК, несущая генетическую информацию. Состоит из хроматидов, связанных с соединением структурно-функциональной информации (плотности и ряда нуклеотидов). У эукариот локализуется 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, 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 животных митохондриях и содержащий все ферменты, обеспечивающие полное расщепление углеводов

**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 цепь** (Circ. strand) ДНК-связывающие элементы, которые не имеют свободных концов (сильно метилированный ДНК-лигандаза и в том же направлении с концами цепи, в результате взаимодействия цепи между ними образует петли в форме «шпильки»

**Цистин** (Cysteine) Генетическая аминокислота, участвующая в образовании отдельных белков

**Цитозин** (Cytosine) Одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК

**Цитокинины** (Cytokinins) Растительные гормоны, стимулирующие деление клеток

**Частота аллеля** (Allele frequency) Отношение встречаемости одного из аллелей данного гена в суммарной встречаемости всех аллелей у представителей данной популяции в данный момент

**Частота мутагенеза** (Mutation rate) Средняя частота появления новых аллелей в популяции, получаемая при большом выборе структурных локусов

**Частота рекомбинаций, рекомбинационная ценность** (Recombination frequency, recombination index) Число рекомбинаций (или рекомбинационных 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-Дальман недостаточность, синдром Шиндлера** (Shiner-Dalgarno syndrome, Shiner-Dalgarno) Нуклеотидная последовательность на 5'-конце мРНК (обычно ACCAACG), кодирующаяся с комплементарной последовательностью РНК-компонента (рРНК) митохондриальной рибосомы

**Штамм** (Strain) Культура генетически однородных микроорганизмов

**Экзотическая ДНК** (Exogenous DNA) ДНК, введенная из организма-донора и встроенная в вектор или хромосому хозяина ДНК-ориентации. Например, только чужеродный (foreign) и гетерологичный (heterologous) ДНК

**Экзон** (Exon) Участок гена, входящий в состав первичного транскрипта, который остается в нем после процесса (вырезания интронов). Вместе с другими экзонами образует цепь мРНК

**Экзотический III** (Exogenous III) Чужеродная E. coli, опосредованная включенная с 5'-концом аутохтонной ДНК

**Экзон-интрон** (Exon-intron) Высокомолекулярное соединение, состоящее из остатков сахаров и секретируемое в среду клетки средой некоторых микроорганизмов

**Экспрессивность** (Expressivity) Степень формирования выразительных признаков наследственного признака, варьируемого данным геном. Различают полную экспрессивность (в отсутствие изменчивости гена) и частичную

**Экстремальный вектор** (Extreme vector) Плазмидный вектор, способный реплицироваться в клетках, чья фаза размножения при дисперсии является высокой и индукционной — экстремного типа в отличие от типичного промежуточного типа в плазмидно-опосредованной системе регуляторной промотор

**Экстрон** (Extron) Транскриптом и транслативный ген

**Экстремальный (Extrapolation)** Обращение к порогам в клеточных популяциях (или действиях) экстраполировано. Через эти пороги в клетке происходит 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 рекомбинации, репарации и рестрикции: в последнем случае их называют рестриктазами (рестрицирующими эндонуклеазами).

**Экзотоксин (Exotoxin)** Токсины, не выделяемые клеткой в окружающую среду, а выделяемые в составе клеточной слизи; многие экзотоксины вырабатываются (симбиотическими бактериями и имитируя микробами.

**Эпигеномика (Epigenetics)** Бактериальный белок, который, попадая в организм, вызывает эпигено

**Эпигенез (Epigenesis)** Специфический участок ДНК, многократно увеличивающий уровень транскрипции гена, распознающий начало каждой молекулы ДНК

**Эпитоп, антигенная детерминанта (Epitope, antigenic determinant)** Часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигенспецифичным центром антигена или Т-клеточного рецептора.

**Экзифильный белок (Exophilic protein)** Цитоплазматический белок-вак, в котором переменынные осуществляются потоком (или, индивидуального слюны

**Этанол (Ethanol)** 1) Ал, действующий как растительный гормон Способствует образованию водород, соединению шельов, прорастанию семян, образованию корней, участвует в ответе растений на стрессовые воздействия

**Эукариоты (Eukaryotes)** Организмы, у которых 1) имеется 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 мембранной проницаемости митохондрий, митохондриальных превращений, стимулируемых системными веществами трансформированными клетками

**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 инактивированию или активации

**Эффекторные клетки (Effector cells)** Клетки иммунной системы, дифференцированные клетки

**Ядро в эукариоты (Nuclear staining)** Получение зонной ориентации и/или безысленной информации с помощью ДНК-зонными соединениями ядрами

# Предметный указатель<sup>1)</sup>

- Автомат 190, 191р  
Авторские права/патент 311  
Аграрии 376, 376р  
Аграрии 321  
Адаптеры 26, 26р  
– системные/системные/системные 118  
– драйверы/драйверы 86, 86р  
Административное право, право 268–270, 269р  
Адвокат 29–30р, 30  
Административное право 242  
Административное право 494–498, 495р  
Административное право 484г, 483, 486г, 489–491  
Административное право/административное право 205г  
Административное право 42, 44–45  
Административное право 213–214, 214р  
Административное право/административное право (ИРА) 174, 175г, 205–206г, 336–337  
Административное право, право/административное право 261–262, 263–264р  
Административное право 259–260, 261г, 262–264  
Административное право 256г  
Административное право 442  
Административное право 209–211, 210р  
Административное право 49, 124, 123г, 168г, 186, 190  
Административное право/административное право 290  
– административное право/административное право 294  
– административное право/административное право 290  
Административное право 288
- Административное право 286, 287р  
Административное право 430  
Административное право 268, 267р  
Административное право 668г  
Административное право/административное право 127  
Административное право, административное право/административное право 203  
– административное право/административное право 34, 34г  
– административное право/административное право 255–257  
Административное право/административное право 251, 251г  
Административное право 34, 34р  
Административное право/административное право (ТАСА) 265, 266р  
Административное право/административное право 326–327, 327р  
Административное право/административное право (АДК) 403–406, 405р  
Административное право, административное право/административное право 507  
Административное право 436г  
Административное право/административное право/административное право 480г  
Административное право, административное право/административное право 257–258  
Административное право/административное право 259, 261г, 262р  
– административное право/административное право 259, 260р  
– административное право/административное право 259, 261г, 262р
- административное право/административное право 260–263, 263–264р  
– административное право/административное право 261–263, 263–264р  
– административное право/административное право 261, 263р  
– административное право/административное право 253–265, 266р  
– административное право/административное право/административное право 322–323, 323г  
– административное право/административное право 323  
Административное право/административное право 206г  
Административное право/административное право 304  
Административное право 34, 34р  
Административное право/административное право 396–398  
– административное право 304–306  
Административное право/административное право 504, 506–508  
Административное право/административное право 506–507  
Административное право/административное право 506–508, 507р  
– административное право/административное право 507  
– административное право/административное право 506, 507р  
Административное право/административное право 211  
Административное право/административное право 211  
– административное право/административное право 211, 215–217, 216р, 218р  
– административное право/административное право 211, 429, 429г  
– административное право/административное право 211, 212р, 429, 430р  
– административное право/административное право 201–221, 221р





- жесткошерстные (08, 133, 136, 149–154)
- Восточн-Блютши 65
- Вымя естественн. ингибитор транскрипции 393, 393р
- Вяло, соматическое название прионозавица 300–301
- Вирус ветряной оспы 247
- ветряной В. герпетика (ветряночного агента) 141–143, 141–143р
- иммунодефицита человека (ВИЧ) 221–223, 223р
- марбургский (MBO), использованное для создания вакцины 238–242
- малодетский вирус кори (MORV) *Adenovirus glycoprotein* (AdMORV) 144–145
- мозжечковая, белковая оболочка 396–398, 397р
- – клеточной капсулы 395–протокол 394, 384г
- простого герпеса (HSV) 230, 230р
- – ген толкучки 478, 486г, 503
- – типа I 230, 230р, 248, 496–501, 499–500р
- табличной мозжечка, 11 (сильно ослабленность) 384
- фетальный вирус (создаваемый) 494
- SV40 140, 190
- Вирусные системы доставки генов 493–501
- Вирусы, белковая оболочка 396–398, 396г, 397р
- животные, строгие 230р
- Внутриклеточный сайт связывания рибосом (IRES) 153, 154р
- Воспалит, метаболиты 313–315, 314р, 314г
- асимметричные белковые 314–316, 315–316а
- В Галактике (21, 121р, 382)
- Галактические 795
- Галактические эволюционные события 276
- Галактика 503, 504р
- Галактика 453
- Галактические семьи 453–454
- Генетический 149
- Гель-электрофорез 54
- в электрофорезе 54
- поликристаллический белок (ПААГ) 54
- маркеры с известными молекулярными массами 54
- Гемидефекты, структура 295
- Гемоглобин 205г
- А. получение в системе *Neisseria rubrocyanea* 142
- человека, получение с помощью трансгенных свиней 435–436
- Геморрагия 483, 486, 496
- А. 484г
- В. 486г
- Гемобактериология 326
- белок (M1) бактериофага M10 116
- интерактивные-2 241
- «структурный» («структурный») 62, 503
- рН 129
- рН 323г
- рН 240, 240р
- рН 282–283, 283–283р
- Генетика человека, соматическая проблема 478–479
- Генетическая генеративность 442
- информация, пром. – конф. – активность 479
- – рН 33–38
- Генетическая модификация генов, контроль генов в окружающей среде 523–526
- – – патентование 533–541
- Генетическая информация 139, 195–201
- – клеточные ресурсы в промышленности 456–459, 457р, 457г
- – клеточные ресурсы на клеточном уровне 460
- – клеточные ресурсы (BFC) 456–459, 457р, 457г
- – клеточные ресурсы 442–444, 443р
- – клетки 444
- – хромосом человека, генетический полиморфизм 450–453, 451г
- Генетическая информация 40, 41г**
- Генетическое консультирование 478–479
- – – 444–451р, 444–445р
- – – 446–448, 447р
- – – 479
- Гены млекопитающих 503, 504р
- – – белки 158–159, 168–175, 169г, 171р, 173г, 174р, 175г
- – – способность к образованию фибриновых соединений в окружающей среде 317
- – – растений 373, 374
- – – прилипания 389–413
- – – термостабильности 483–511
- – – вирусные системы доставки генов 493–501, 495–500р, гены «рыбы» 501
- – – клеточные ресурсы 486, 486р
- – – строгие генетические маркеры с помощью компьютеров 504–510, 509р
- – – искусственные системы доставки генов 490–500, 502р
- – – клеточные ресурсы (суммарная клетка) 485–487, 526–529
- – – эволюция и оптимизация проблем 527–530
- – – клетка 487–493, 487–491р
- – – клетка 493, 493р
- – – маркеры, оптимальные 208, 209г
- Гены человека 314, 444, 446–451, 447–448, 466р
- проект 477–479
- – биологические ресурсы 462–464, 464–466р
- – личные ресурсы 478–479
- Генетика фибринов, скрининг с помощью компьютеров 62, 63р, 64–70 (64р, 66р, 68р)
- дальности, прикладные при установлении оптимальных 193, 193р
- Генетическая информация, структура информации методом «пробного» по сравнению со временем 470, 472р
- – – «пробное» по сравнению 470, 472р
- Генетический препарат р53 486г
- Генетический рН5, 106р, 381–382, 387г
- Генетический полимер (GSP) 99–102



- сенсибилизация 20–93  
 – с поликлональной фазой 91–93, 93р  
 синтез с помощью ПИР 94  
 структура 20–33, 29–33р, 45  
 эмбриональный синтез 80–88, 81–84р, 83р, 89
- Т-ДНК 374р, 376–377, 383
- ДНК-зонды 286р, 309
- ДНК-гиперметилиция 64р, 65, 66р, 68р, 187–195
- ДНК-изменчивость 187–195
- ДНК-зонды 64–66, 64р, 66р, 68р, 187–189
- гетерологичные 67  
 – метиляция 65, 66р, 194, 191р  
 «молекулярные зонды» 191–192р  
 некадомовые гетерологичные метиляция детекция 190–194, 191–192р
- ДНК-лигатаза 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, сайт-специфичность 437–439
- ДНК-сигналы 30, 33
- ДНК-фрагменты, патентованные 337
- Восприимчивые к метилации 486
- Продление светимости экспрессии 140–143  
 – естественные искусственные (YAC) 27, 137
- Дрожжи, продуктивность 336  
 – радиационные кисточной сетью 365  
 трансформация 136  
 – электрофорез 136
- ДНК-модификация 486
- ДЛР-интерфосфатаза 160
- Бактериальные карманы 446
- 3-клеточный эмбриональный 3-фазный фетальный 382, 410
- Железо, ситероформы 321–323
- Животные клетки, трансформация 136
- трансгенные, гетерологичные 537
- Жиры, кислотные 409, 410п
- Диссоциация клеток 411
- Земельные белки 408, 409р
- Зонды генетически-информационные мембраны плазмиды, малые 67
- Зонды для барьерных элементов библиотек 47, 83р
- Иммунохимия, применение 236
- Иммунохимия N-связанная 239, 240р
- Иммуноинтерференция 375р, 376
- Индукция 401
- Иммуноцитохимия 231–236, 234р, 434–435  
 гены 434–435
- Иммуногенез ССМ 233
- Искусственный хромотидиформ 114, 115р
- Искусственная клетка 182–183, 183р
- Искусственный скрининг 67, 69р
- Искусственный скрининг 212
- Искусство 168
- Инцибутор с антителами обычной фазой 394, 395р  
 скрининг препаратов 394  
 – трансгенные антитела 391, 393р
- Инцибуторы (элементы) 436  
 – препараты 393, 402
- Индукция, синтез 252–255, 254–255р
- Индукция 3-фазный скрининг 373р, 376
- Индукция 3-фазный скрининг (ИФУК) 326–327, 327р
- Индукционная гРНК 34, 36р
- Индукция, синтез 38р
- Индукция, синтез, скрининг 493
- Индукция, синтез 321–323, 320р
- Искусство 205–206
- Искусственный фактор роста (ИФР-3) 205р, 363, 435, 304, 306
- Индукция, синтез, скрининг 493
- Индукция, синтез, скрининг 493
- Интерферон-1, рецептор 205
- Интерферон-2 (14, 13р, 126, 206р, 435р, 436р  
 – ген 343
- Интерферон-3 208, 209р
- Интерфероны 205
- Интерферон 215  
 клеточный рецептор 205–206р  
 – скрининг 377  
 уровень экспрессии генов 118  
 – α 207  
 – β<sub>1</sub> 206р  
 – γ 206р  
 γ<sub>2</sub> 206р
- Интерфероны 170, 171р, 204–207, 206р
- гетерологичные 207–208, 207р
- Интрон 36, 37р, 150
- Искусственная хромосома человека (ИИАС) 504
- Искусственные хромосомы промиссии (YAC) 27, 137  
 – – – искусственные хромосомы человека 429
- Канцерогены 205
- Канцер, деградация канцерогенов 276р, 281р, 289
- Кандидатное карманы 460, 460р
- Канцер 408–411, 409р, 410р
- Карта сцепления 444
- Картирование генов 444–446, 444–445р  
 – мультиаллельное 469, 469р  
 – мультиаллельное хромосомы человека 459–462, 461р  
 – позиционное 469–477, 470–473р  
 – позиционное канцерогенное 476–477, 477р  
 – специализированное (разнообразие) гибридов 460–462, 461р  
 – специализированное 55, 55р  
 – трансформационное, клонирование ДНК 465–468, 477р  
 – функциональное 468–470, 468р  
 – X-хромосомы человека 446–448, 447р
- Картефель, введение генов ингибитора II протеиназы в растения 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
- Каталог 166г
- Каталог 277г, 279-280г
- Каталог 2,3-диоксибензоил 282-283, 285г
- Качество, стандартизация и сертификация 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
  - патентованная, выделение рибозим-матрицы белка 149
- на крыльях при аэрировании в лаборатории производства *Boehringer* 365-367
- G-418 150
- Клеточные линии 28, 63
  - - - - - устойчивые 28
  - - - - - отходы грибов, разрушение 363
  - - - - - дрожжевые клетки, разрушение 365
  - - - - - препараты 24-25, 25г
  - - - - - культуры 24-25, 25г
- Клеточный рост 343
- Клонирующие векторы 486
- Клонирование генов 123-126, 124-125г
  - - - - - абомедиан человека 467-470
  - - - - - с помощью переноса генов 426, 477г
  - - - - - человека 529-530
- Клонирование генов, микротрансформация у дрожжей 105-130
- Клонирование векторы 54-65
- Клонирование векторы системы слепки 113г
- Клонирующие векторы 306-318-320
- Кожные 40-41
  - частота мутаций 41, 41г, 121, 129
- Код транскрипции 433-436
- Комплекс на рибозим-матрице и аминокислоты 526
- Коммерческие секреты 533
- Комплекты клеток 76
- Компьютеризация ДНК (с ДНК) 70, 71г
  - библиотека 70
  - выделение интерферона 204-207, 206г
  - - - - - на клеточном уровне 208-209, 209г
- Компьютеризация данных генов и нуклеотидных последовательностей 29-30, 29-30г, 31, 32-33г, 45
- Компьютерная программа (IRAD) 476
- Консультативный комитет Национального института здоровья (США по рибозим-матрице ДНК (NIN-RAC) 318-319, 321-324, 323
- Контейнеры 464, 462-467, 464г
  - на основе клеток, P1 и L-библиотека 463-467, 463г
  - VAC-, PAC-, и PAC-библиотека 462-463, 464г
- Контроль в промышленности и потребности в новых продуктах и процессах работы 519-522
  - промышленная биотехнология с использованием 517-521
  - - - - - сыворотки и этанолы 517-521
- Контрпродуктивный полиморфизм специфичный ДНК (SSCP) 467-468, 468г
- Контрагентные бактерии и 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, 207-208г
- Кристаллы, выделение 436
  - этанол 491
- Кристаллографические препараты белков, выделение клеток 365-367
- Кристаллографические системы ферментации 359-363
- Кристаллы белков, выделение из культур клеток дрожжевых клеток 426
  - - - - - трансформации 431-435, 434г
- Кристаллы белков 266-268, 267г, 267г
- Кристаллы белков, выделение с помощью микротрансформации 275-276, 276г, 277-280г
- Кристаллы 169-170
- Кристаллы 795
- Кристаллы 276г, 281г
- Кристаллы белков 254
- Культуры 460
- Культивирование клеток растений 28
  - интерферон и его свойства 250, 252г
  - F. coli 24-25
- Культуры с высокой плотностью 156-157
  - культивирование клеток 27-28
- Культивирование 42, 44г
- Дактил 166г
- Лактоферрин 433г
- Лактоферрин 308
- Лейцин, производные 250г
- Лекарственные препараты, выделение с ДНК интерферона 204-207, 206г
  - - - - - интерфероны, получение методом прямой индукции 207-208, 207г











- Страны 356r  
 Структурные элементы ДНК 195, 196r, 485r  
 — — сортировки для биологической информации 195, 196r  
 Сигналы факторы 107, 336  
 Сигнальные последовательности 35  
 Сигнальные белки 126–127, 140  
 Сигналы терминации транскрипции 304  
 Сидерофорины 306, 326  
 — — биоконтроль патогенных микроорганизмов 321–323  
 — — структура 323r  
 — — *Yersinia enterocolitica* 322  
 Синапс, получение 294, 296r  
 Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) 222–223, 227r  
 — — взаимодействие *HIV* со специфическими иммунными структурами 241  
 — — эволюция — аллотипы (СЭМ) 321  
 Синтаза дитиолдисульфидоизомеразы 408, 409r  
 Синтез белка 86–89, 87r  
 — — ДНК, факторизованный метод 88–89, 87–88r  
 — — эффективность — присоединение нуклеотидов 85, 83r, 86  
 Скорость азотурения в высшем сераразном ферменте 188  
 Система регуляции выработки 140, 140r  
 — — хромосома 213  
 — — слюны, специфичность шестер 68r  
 Системы ДНК-репарации 187–195  
 — — рестрицирующая функция векторов 137–138, 138r  
 Структурная биология 62, 70, 64r, 69r  
 — — ДНК, специализированные системы склеивания 115–117, 117r  
 — — на основе фактора 74  
 — — клеток, неструктурная — голландия со вставкой 60  
 Случайный мутагенез 163–168, 165–167r  
 — — специализированный анализ мутационности 166, 167r  
 Схематические азотуреры 26  
 «Синтез» РНК (мРНК) 396–398  
 — — супрессии (интерференция) 406  
 Содержание плазмид 405–406  
 — — инцидент — экспрессия генов эукариот 405  
 Слабительные белки 367  
 Сладкие фрукты, лучшие — естественный механизм 405–407, 526–529  
 Соматилеберин 205r  
 Соматостатин С 205r  
 Соматостатин 206r  
 Сорбитолдегидрогеназа 251r  
 Сон 307–308, 408, 409r  
 Спайсин 36–37  
 — — альтернативный 37r  
 Среды ГАТ (гетеродиплоиды, диморфизм, типичны) 185  
 Старт-кодон 18r, 120–121, 189r  
 Стабилизаторы температуры 48r  
 — — лаборатория 422–426, 423–425r  
 Стартагоступная *Artemis* 410–411  
 Стартовая кислота 410, 410r  
 Стабилизатор токена 243  
 Стан валам 48–42, 42r  
 Стратегиями 129, 190, 191r  
 Стратегиями нуклеотидов 38r  
 Структурные гены 29, 33–35, 36r  
 Субстраты 172–174, 173r  
 Субстративные белки 228–236  
 «Суперматрица» белка 62  
 — — ген (ген — способность) 62  
 Сульфиды 279r  
 Сульфидидальные группы 170, 171r  
 Сульфидуровые 408r  
 Супербиология 276, 289  
 Суперокси-ионизация 138–139, 138r, 404, 404r  
 Супергенетическое 445, 445r  
 — — только 445, 445r  
 Х-сцепленный тип наследования 447, 447r  
 Химическая структура белка 266–268, 257r, 300–303  
 Химический анализ 205r
- Сырье, производство 520  
 Сырье, использование обработки как сырья для биотехнологических процессов 17, 17r  
 Сычуаньский фермент 520  
 Табак, синтез супрематизации — титры 404  
 — — транскрипция растения 404  
 Ф-Талоксим 300, 510  
 Талоксим повторные гены 117, 118r  
 Температура 33  
 Таликсы 301  
 Таликсы включения 114, 347  
 Термостабильные средства, вещества и методы действия 217  
 — — взаимодействие с мембранными липидными структурами 212–213, 213–214r  
 Тестирование 483–511  
 Термофильные 25–27, 168  
 Тетрациклины 263–264r  
 Тетрациклины рекомбинантных ДНК 15–16, 50–78  
 — — — расширение решетки — клетки ДНК-матрицы 36, 60  
 — — — система экспрессии 50, 51r  
 — — — специализированные концы ДНК-матрицы 14–55  
 — — — фрагментация ДНК рестрицирующими ферментами 53–55  
 — — — экспрессия — кодируемые гены 405–130, 135–155  
 Тимотины 428, 486r, 503–504  
 Тимин 29–30, 29–30r  
 Тимин наследования 447–448, 447r  
 Тирозинный гормон 205r  
 Тирозин-связанный белок 171–172, 172r  
 Тирозин 256r, 269, 269r  
 Тирозин 268, 268r  
 Тирозин (матрица) 53r  
 Тимин *Artemis* — белок, белок — генетический анализ в экспрессии ДНК 397  
 — — — специализированность 337–339, 338r

- — — — — взаимодействие с другими факторами
    - — — — — с другими факторами 340–341
    - — — — — с другими факторами (или факторами) 340
    - — — — — с другими факторами 333–334
    - — — — — с другими факторами в К. 340
    - — — — — с другими факторами 337–338
    - — — — — с другими факторами 332, 332а
    - — — — — с другими факторами 343
    - — — — — с другими факторами 343, 343т
    - — — — — с другими факторами 343, 343т, 344, 344а
    - — — — — с другими факторами 343
  - Температура
    - — — — — 275, 276, 276а, 277, 280а
  - Температура
    - — — — — 276а, 277а
  - Температура
    - — — — — 285, 286а
  - Температура
    - — — — — 485
  - — — — — защита от воздействия
    - — — — — с другими факторами 390т, 391–392, 391а, 391а
  - Температура
    - — — — — 31, 52, 136, 501
  - Температура
    - — — — — 418–439
    - — — — — 325
    - — — — — 315–316, 428–430
    - — — — — 436, 436, 437а
    - — — — — 386–387, 386а
    - — — — — 438–439, 525
    - — — — — 436–438, 417а
  - Температура 418
  - — — — — 434–434
  - Температура 376
  - Температура
    - — — — — 485–488, 473а
  - Температура 29, 35–37, 35–36
  - — — — — 33, 36а
  - — — — — 41–47, 43–46а
  - — — — — 33, 36а
  - — — — — 34а
  - Температура 29, 38–41, 38–42а
  - — — — — 38–39, 38–39а, 118–121
  - — — — — 129
  - — — — — 38–42, 42а
  - — — — — 38, 39а
  - — — — — 38, 39а
  - — — — — 118–121, 119а, 120а
- — — — — 29–40, 40а
- — — — — эффективность 118–121, 119а
- Температура
  - — — — — 412–413, 413а, 435а, 444а, 486а, 494, 501
- Температура
  - — — — — 212, 436
  - — — — — 212
- Температура 111–112, 112а
- Температура
  - — — — — 33, 39–42а, 41
  - — — — — 38, 39а
- Температура
  - — — — — 376
- Температура 136, 158
- Температура
  - — — — — 76–77
  - — — — — 76
  - — — — — 76
  - — — — — 171–177, 334–336
  - — — — — 384–386, 385а
  - — — — — 428
  - — — — — 124–126, 125а, 125а
  - — — — — 256
  - — — — — 58–60, 76
  - — — — — 257–258, 258а
- Температура
  - — — — — 50
- Температура 256а
- Температура 187а
- Температура 401а
- Температура
  - — — — — 170, 170а
- Температура 252–255, 254а
- — — — — 256–257, 256–257а
- — — — — 256, 320
- Температура
  - — — — — 373а, 376
- Температура
  - — — — — 401а
- Температура 283, 285–286
- Температура
  - — — — — 213–214, 214а
- Температура 131
- Температура
  - — — — — 398–399а
- Температура
  - — — — — 485
  - — — — — 484–485а, 491
- Температура 222–223, 227а
- Увеличение
  - — — — — 251–253
- Увеличение
  - — — — — 207
  - — — — — 207
- Увеличение
  - — — — — 474–476, 474–476а
- Увеличение
  - — — — — 299, 299а
- Увеличение
  - — — — — 319–320, 320
- Увеличение 34
- Увеличение
  - — — — — 161, 161а
- Увеличение 205а
- Увеличение 205а, 435а
- Увеличение
  - — — — — 275–276, 276а, 277–280а
- Факторы 116
- Факторы
  - — — — — 446
  - — — — — 446
  - — — — — 405
- Факторы
  - — — — — 395а
  - — — — — 205а, 485а
  - — — — — 40
  - — — — — 205а
  - — — — — 205а
  - — — — — 205а
- Факторы
  - — — — — 486а
- VIII факторы
  - — — — — 205а, 484а
- IX факторы
  - — — — — 205а, 435а, 486а, 494а
- X факторы
  - — — — — 112, 113а
- Factor I
  - — — — — 320, 320а
- Factor I
  - — — — — 47
  - — — — — 321
- Факторы
  - — — — — 205а
  - — — — — 46–47
- Факторы
  - — — — — 20, 204–212
  - — — — — 419



- Центрифугирование высвобожде-  
тисом: методология для вы-  
деления клеток 363-364
- Центримеры 511
- Цифровизация 369
- Цифровизация данных 261
- Циркуляция 401т
- Циклический АМГ (сАМГ) 107р,  
108
- Циклотоксидины 401т
- Циклический интерферонотип  
фактор (СНТТ) человека  
404т, 492
- Цистины 256п
- Цитохром 29-30, 28-30р
- Цитохромы 176р, 176
- Цитохромные белки 436-438,  
437р
- Частота вращений 450-451, 451п
- Челюстные векторы 62, 126, 147,  
148р
- Шампи-Ван-дер-Ваальс-взаимодействие  
11
- Штамм-продукты, совершенство-  
вание 17, 213
- Экзоплазматическая мембрана 297-299, 297р,  
300
- Экзонные сайты 111, 166
- Экзонны 26, 37р, 472-476,  
473, 475р
- удаление 474-476,  
474-475р
- Экзотоксин А 223, 223р
- Экзотоксины 223
- Экспрессивность культуры клеток 44
- Экспрессивность STS (сСТS)  
465, 466р, 517
- Экспрессивность векторы 107
- для работы с клетками млеко-  
питающих 149-154,  
150-151р
- на основе безвирусных  
144-145, 145р, 156п
- геномными 118-121, 119р,  
121р
- - эукариотические 135-136,  
136р
- 5' сегментов 136-137
- системы с использованием  
клеточных векторов (сВКВ)  
147-149
- Экспрессия генов 109
- - в трансформированных клетках  
111
- - регуляторных систем  
109-110, 110р
- при участии системы регули-  
рования промотора 105, 112
- млекопитающих 208, 209п
- чужеродных генов в растении  
302-306
- Экспрессия генов 76, 77, 126,  
300п
- Экзонны 176, 306, 369р
- Эффекты 404т
- Экспрессивность 69, 297-299,  
297р, 300
- Экспрессия генов 174
- Экспрессия генов в растении, крупном  
масштабное производство  
207-249, 249р
- клеточные 207т
- Экспрессивность ресурсов клеток,  
их использование 133,  
137, 190, 120п
- Экспрессия 205т
- Экспрессивность векторы 235-236,  
237р
- Экспрессивность последовательность 40,  
304
- Экспрессивность векторы 137
- Экспрессивность 261, 263р
- Экспрессивность 206т, 517
- Экспрессивность системы 357, 357р,  
358, 360
- Экспрессия 341
- Эффект, эффективность эффектно-  
сти приращивания 289-292,  
291-292п
- взаимодействие с трансформацией  
клеток 310
- - - 2. модальности 292-294, 292п,  
293р
- при использовании трансформации  
287-289, 289р
- 4-модальности 282-283, 284, 285р
- Эффект роста клеток (сРК)  
126, 327, 327р
- состоит в результате 405-406,  
405р
1. для клеток (сРК)  
(сРК) 531
- Эукариотические экспрессивные  
системы 136, 136р
- Эукариотический естественный  
маркерный ген 135, 382т
- Эукариоты, выделение клеточных  
линий генов 298-300, 299р
- использование в векторных  
биотехнологиях 24
- клеточные системы 24-25, 25р
- клонирование структурных ге-  
нов 70, 71
- культуры клеток 27-28
- модификация белков 27
- рекомбинация 31-34
- структурные особенности кле-  
ток 24-25, 25р
- трансформация 33-36, 36р,  
45-47, 46р
- трансляция 38-39, 39р
- экспрессивные векторы  
135-136
- «Эффект трансформации» 501
- Эффекты 42, 43-44р
- Юнкерман, Д. стрессовые условия  
343-344, 392т
- Ядро как источник биологической  
информации 410

## Указатель латинских названий

- Ascocharis subglobosa* 231p  
*Asciptium chrysosporium* 274, 265, 266p  
*Aspidocarpum radiforme* 323, 314p  
 - *umbellatum* 63, 173, 379, 379p  
*Atractodes* 118  
 - *subglobosa* 270-272, 271p  
*Atractodes thalictori* 413  
*Atractodes thalictori* 290  
*chylitica* 127  
 - 219-290  
*Atractodes thalictori* 340  
*Atractodes thalictori* 144, 144-145p, 344  
*Atractodes thalictori* 307
- Banisteria argentea* 174, 172, 173p, 204-290  
 - *brevis* 271, 291, 292r  
 - *reticulata* 160  
*benzoinifera* 200, 209r  
*myrmecophila* 307  
 - *benzoinifera* 171-172, 172r, 290  
 - *subglobosa* 62, 124-125, 125r, 125p, 140, 210p, 290  
 - 274, 274, 132-142, 142p, 343r, 335p, 337p, 338r, 341p, 389-393, 390r, 325  
*Banisteria thalictori* 307, 308r, 314-315, 315r, 320  
*Banisteria* 410  
*Banisteria thalictori* 253-256
- Campylodiscus thalictori* 169  
*Campylodiscus thalictori* 301r  
*Campylodiscus thalictori* 340
- Cellulomonas* 300  
*Chloromonas cellulolytica* 301r  
*Clostridium* 346, 347  
*Clostridium thalictori* 291, 292r  
*Corynebacterium albidum* 211  
 - *globosum* 27, 27r, 123, 240, 252p, 255-257, 256r, 257p
- Enterococcus thalictori* 125  
*thalictori* 311  
*Epistula thalictori* 402  
*thalictori* 27r, 251-253p  
*Fachonella* 34-29, 29p, 41, 50, 51, 58, 76-77, 105, 115-116, 122-123, 126-127, 146-147, 149p, 160-162, 163p, 169, 215, 218-221, 219-221p, 247, 340, 340p, 254-255, 254, 255p, 267-268, 268p, 271, 271p, 285-286, 286p, 291, 292r, 330, 325-336, 360-363, 361p, 367, 379, 379p, 400, 520, 522
- Fachonella thalictori* 174  
*Fachonella thalictori* 265
- Heterodiscus thalictori* 53  
*Heterodiscus thalictori* 27, 141-142  
*Heterodiscus thalictori* 343
- Klebsiella thalictori* 401, 401p  
*parvula* 111, 110, 110r, 312, 312p  
*Klebsiella thalictori* 301r  
 - *thalictori* 27, 140
- Lactobacillus thalictori* 294, 295p  
*Lactobacillus thalictori* 189  
*Lactobacillus thalictori* 193  
*Lactobacillus thalictori* 237, 238, 238p
- Adelphocorymbium* 301-300, 301r  
*thalictori* 260, 260p
- Penicillium thalictori* 259, 260p  
*Penicillium thalictori* 27, 141, 142, 142-143p  
*Penicillium thalictori* 240, 240p  
*Penicillium thalictori* 27r, 223, 223p, 252, 254-255p, 275-276, 276r, 282-286, 283p, 286r  
*penicillium* 116  
 - *thalictori* 121  
*thalictori* 263  
*thalictori* 111, 122, 122p, 323r, 340, 341p  
 - *thalictori* 291, 282r, 322, 322p  
 - *thalictori* 111  
 - *thalictori* 325, 523  
*thalictori thalictori* 123, 123r
- Rhizoglyphus thalictori* 27r, 300-308, 308r, 314-315, 315-316r, 316-320, 118  
 - *thalictori* 315, 316r  
 - *thalictori* 313, 314, 320, 347p, 125  
*Rhizoglyphus thalictori* 323, 325  
*Rhizoglyphus thalictori* 243
- Sarcodon thalictori* 27, 236-140, 139p, 170, 170r, 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
- *coelicolor* 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

# Оглавление

От редактора перевода.....	5	Другие плазмидные векторы.....	60
Предисловие.....	7	Создание и скрининг библиотек.....	62
Предисловие к первому изданию.....	9	Скрининг с помощью гибридации.....	62
		Скрининг с помощью титризации.....	64
		Иммунологический скрининг.....	67
		Скрининг по активности белка.....	69
		Клонирование структурных генов эукариот.....	70
		Векторы для клонирования крупных фрагментов ДНК.....	71
		Векторы на основе бактериофага $\lambda$ .....	71
		Космиды.....	74
		Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК.....	76
		Генетическая трансформация прокариот.....	76
		Перенос ДНК в <i>E. coli</i> .....	76
		Электротрансфекция.....	76
		Кольмиды.....	77
		Заключение.....	77
		Литература.....	78
		Контрольные вопросы.....	79
Глава 2. Биологические системы, используемые в молекулярной биотехнологии.....	24	Глава 5. Химический синтез, определение функции и последовательности и амплификация ДНК.....	80
Прокариоты и эукариоты.....	24	Химический синтез ДНК.....	80
<i>Escherichia coli</i> .....	24	Фосфорамидитный метод.....	80
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27	Применение синтезированных олигонуклеотидов.....	85
Культуры эукариотических клеток.....	27	Синтез генов.....	86
Заклочение.....	28	Методы секвенирования ДНК.....	88
Литература.....	29	Длительноконтингентный метод секвенирования ДНК.....	89
Контрольные вопросы.....	29	Секстирование ДНК с помощью вектора на основе фага M13.....	91
		Праймер-опосредованный прогулка.....	93
Глава 3. ДНК, РНК и синтез белка.....	29	Получение с помощью ПЦР кДНК, от-печатанных концы молекул мРНК.....	98
Структура ДНК.....	29	Синтез генов с помощью ПЦР.....	102
Репликация.....	32	Заклочение.....	102
Расшифровка генетической информации: РНК и белок.....	33	Литература.....	103
Транспланты.....	38	Контрольные вопросы.....	104
Переносная трансскрипция у бактерий.....	41		
Переносная трансскрипция у эукариот.....	45	Глава 6. Оптимизация экспрессии генов, кодируемых в прокариотических системах.....	105
Заклочение.....	47	Экспрессия генов при участии склонируемых промоторов.....	105
Литература.....	49		
Контрольные вопросы.....	49		
Глава 4. Технологии рекомбинантных ДНК.....	55		
Рестриктазные эндонуклеазы.....	55		
Плазмидные векторы.....	56		
Панмеллиный вектор pBR322.....	56		
Трансформация и отбор.....	59		

Регулируемые промоторы .....	107
Получение больших количества белковых продуктов .....	108
Крупномасштабные системы .....	109
Использование для экспрессии других микрорганализмов .....	111
Химерные белки .....	112
Фиксирование химерных белков .....	112
Применение химерных белков .....	113
Выявление белков в люциферозных структурах .....	115
Однонаправленное тащущее расположение генов .....	117
Гранулированные экспрессирующие векторы .....	118
Стабилизация белков .....	121
Рост в условиях недостатка кислорода .....	122
Применение микробных плазмид с дефинитом протенина .....	122
Бактериальная «теплолюбивость» .....	122
Инициация хвостовой ДНК в хромосоме дрожжей .....	123
Повышение эффективности секреции .....	126
Метаболическая перегрузка .....	127
Заключение .....	130
Литература .....	131
Контрольные вопросы .....	133
<b>Глава 7. Получение рекомбинантных белков с помощью тупиковых систем .....</b>	<b>135</b>
Системы экспрессии <i>Xenopus laevis</i> oocytes .....	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 насекомых .....	143
Система экспрессирующая вектор на основе бациллофусов .....	144
Получение рекомбинантных бациллофусов .....	145
Создание членичного вектора на основе бациллофусов для <i>F. coli</i> и клеток насекомых .....	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 пауз клонированных генов в одной клетке млекопитающих .....	151
Заключение .....	154
Литература .....	155
Контрольные вопросы .....	156

## Глава 8. Новые типы мутагенов и методы направленного мутагенеза .....

Направленный мутагенез: методика .....	158
Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ДНК фига M13 .....	159
Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием тащущей 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 диагностика .....	181
Методы иммуноаффинности .....	182
Ферментный иммуносорбентный анализ .....	182
Моноклональные антитела .....	184
Образование и сбор гибридных клеток .....	185
Идентификация гибридных клеток и получение секреторующих 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>Typhlocyba oaxi</i> .....	189	Противирусные вакцины .....	235
Исрациклоксимные металлы доставки .....	190	Противосальмонеллезные вакцины .....	236
Геномная таксономия .....	192	Противосифилизные вакцины .....	237
Использование геномных ДНК-маркеров ..	194	«Векторные» вакцины .....	238
Молекулярная динамика генетических		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		
		<b>Глава 12. Использование рецидивизма</b>	
		<b>интерферонов для лечения иммуноде-</b>	
		<b>фицитных заболеваний .....</b>	<b>247</b>
<b>Глава 10. Минимальное количество</b>		<b>Эндонуклеазы рестрикции .....</b>	<b>247</b>
<b>лекарственных средств .....</b>	<b>204</b>	<b>Малые биологические молекулы .....</b>	<b>250</b>
<b>Лекарственные препараты .....</b>	<b>204</b>	Синтез L-аскорбиновой кислоты .....	250
Выделение cДНК интерферона .....	204	Синтез нуклео .....	252
Интерфероны человека, полученные ме-		Синтез аминокислот .....	253
тодом генной инженерии .....	207	<b>Антибиотики .....</b>	<b>253</b>
Гормон роста человека, полученный ме-		Классификация геномных антибио-	
тодом генной инженерии .....	208	тиков .....	259
Оптимизация генной экспрессии .....	208	Синтез новых антибиотиков .....	259
<b>Ферменты .....</b>	<b>209</b>	Разработка новых методов получения по-	
ДНКазы I .....	209	ликетных антибиотиков .....	260
Алимент-дигестив .....	209	Усовершенствование генной экспрессии ан-	
<b>Множественные рецепторы (в лекарствен-</b>		<b>ных биотехнологиях .....</b>	<b>263</b>
<b>ные средства) .....</b>	<b>210</b>	<b>Биополимеры .....</b>	<b>266</b>
Структура и функции антигенов .....	211	Создание рекомбинантных бактерий	
Профилактика отравления транса-мем-		Хлорофилл с целью получения	
бральной энергии .....	212	каштановой слизи .....	266
Лекарственные вещества, связанные с му-		Выделение генов биосинтеза меланина .....	267
ноклональными антителами .....	212	Микробиоинженерный синтез длинных	
Моноклональные антитела человека .....	214	белков, рибосом с другими белками .....	268
Гибридные моноклональные антитела че-		Микробиологический синтез коучуна .....	270
ловека и мыши .....	215	Микробиологический синтез полицикло-	
Производство антигенов с помощью <i>E. coli</i> .....	218	сидкалбонина .....	270
Лекарственные средства против ВИЧ .....	222	Заключение .....	272
Заключение .....	224	Литература .....	272
Литература .....	224	Контрольные вопросы .....	274
Контрольные вопросы .....	226		
		<b>Глава 13. Биодegradация химических соеди-</b>	
<b>Глава 11. Вакцины .....</b>	<b>227</b>	<b>нений и их влияние на биосферу .....</b>	<b>275</b>
Субединичные вакцины .....	228	Деградация микроорганизмов с помощью	
Противокератитические вакцины .....	230	микробиологической .....	275
Противирусные вакцины .....	230	Метаболические пути биодegradации все-	
Противотуберкулезные вакцины .....	231	лющих бактерий, созданные методами генной	

Перенос плазмиды.....	276
И тесные связи.....	281
Утилизация крахмала и сахаров.....	286
Промышленное производство фруктозы и глюкозы.....	287
Повышенные эффективности производства фруктозы и глюкозы.....	289
Заквашивание пива.....	292
Получение сычужка.....	294
Утилизация целлюлозы.....	294
Компоненты для определения.....	298
Выделение прокаротиновых ферментов из пива.....	298
Выделение эукариотических клеточных генов.....	300
Манипуляции с целлюлозными генами.....	300
Белок одноцепочечных полинуклеотидов.....	301
Заквашивание.....	302
Литература.....	303
Контрольные вопросы.....	305
<b>Глава 14. Факторы, стимулирующие рост растений.....</b>	<b>306</b>
Фиксация азота.....	306
Нитрогеназа.....	308
Классификация.....	308
Гены нитрогеназы кластера генов нитро- геназы.....	310
Гликолиз.....	313
Метаболизм кислорода.....	313
Модификация 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
<b>Глава 15. Микробы как источники токсинов, синтезируемый <i>Barbitur</i> <i>Mythridin</i>.....</b>	<b>332</b>
Механизм действия и использование.....	332
И спецификация генов токсинов.....	335

Гены нитрогеназы генов токсинов.....	335
<i>A. dactyloides</i> .....	335
Бактериофаги как инструменты биокон- троля.....	342
Механизм действия.....	342
Усиление биоконтроля с помощью пивной токсиногена.....	343
Заквашивание.....	344
Литература.....	345
Контрольные вопросы.....	347

<b>Глава 16. Промышленный синтез белков при участии реконструированных микроорганизмов.....</b>	<b>349</b>
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
Гипнотические крупномасштабные системы ферментации.....	359
Двухступенчатая ферментация в непрерыв- ных эрленмейеровских биореакторах.....	360
Двухступенчатая ферментация в одной ре- акторе с механическим перемешиванием.....	362
Нерасширенная ферментация и непрерыв- ная ферментация с добавлением суб- страта.....	363
Сбор клеток.....	363
Разрушение клеток.....	365
Дальнейшая обработка.....	366
Солюбилизация белков.....	367
Заквашивание.....	367
Литература.....	368
Контрольные вопросы.....	369

### ЧАСТЬ III ЗУКАРИОТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ.....371

<b>Глава 17. Гены нитрогеназы растений: ме- тодика.....</b>	<b>373</b>
Трансформация растений Ti-плазмой из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	373
Векторные системы на основе Ti-плазмиды.....	377
Физические методы переноса генов в рас- тительные 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

<b>Глава 18. Генная инженерия растений: применение</b>	<b>389</b>
Выявление 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 запаха	411
Растения как биореакторы	412
Аптеки	412
Примеры	412
Чужеродные белки, вырабатываемые в семенах	413
Заключение	413
Литература	413
Контрольные вопросы	416

<b>Глава 19. Трансгенные животные</b>	<b>418</b>
Трансгенные мыши: методология	419
Использование ретровирусных векторов	419
Метод микродекции ДНК	420
Использование мидифицированных эмбриональных стволовых клеток	422
Клонирование с целью переноса шкур	

Перенос генов с помощью искусственных вирусных векторов	426
Трансгенные мыши: применение	430
Трансгенный вирусный векторный сайт	433
Трансгенные овцы, козы и свиньи	435
Трансгенные птицы	436
Трансгенные рыбы	438
Заключение	439
Литература	439
Контрольные вопросы	441

<b>Глава 20. Молекулярная генетика человека</b>	<b>442</b>
Генетическое сцепление и картирование генов	444
Обнаружение и оценка генетического сцепления у человека	446
Анализ сцепления методом множественного кроссинговера: метод соотношения шпиксов (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	

<b>Построение мультилокусной хромосомной карты человека</b>	<b>459</b>
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 $\lambda$ -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 ex vivo.....	487	Белки соматотропина.....	521
Генная терапия in vivo.....	493	Контролируемое высвобождение генети- чески модифицированных организмов в окружающую среду.....	523
Вирусные системы доставки генов.....	493	Результаты эпидемиологических исследо- ваний.....	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	Клютилка в области генной терапии сом- атических клеток.....	527
Векторы на основе вируса простого герпеса.....	496	Наследование дефектных генов в будущем.....	528
Невирусные системы доставки генов.....	498	Генная терапия: путь к успешной линии.....	529
Активация преддискретивных лекарственных ного вещества («пролекарства»).....	502	Клонирование человека.....	530
Лекарственные средства на основе олиго- нуклеотидов.....	503	Заклучение.....	530
Синтез «липидомиметических» мРНК in vivo.....	504	Литература.....	531
«Липидомиметический» олигонуклеотид как лекарственное средство.....	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	Словарь терминов.....	543
Химозин.....	520	Предметный указатель.....	564
		Указатель латинских названий.....	577

Учебные издания

Бернхард Глик, Джек Пастерник

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Зем редакционен ыдно, бнод наук М. Р. Поповбеком

Всдупоний редактор Н. Н. Шифрановскан

Редактор Р. Ф. Куликов

Художник Н. В. Зорев

Техническый редактор Е. В. Денисова

Корректор Р. Ф. Куликов

Оригинал макет подготовлен Л. К. Васильевий

График-дизайнер С. В. Машин

Переводчик П. Е. Кизилова

Лицензия ПР № 010174 от 20.05.97 г.

Пашлонд : ысшт (00901 Формат 84 х 108Уд. Ызунко офсетной

Печать офсетной Гарнитуря НевольС. Объем 18,50 бум. л

Усл. ысч. 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