

ГОУ ВПО УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Институт медицины, экологии и физической культуры

Экологический факультет

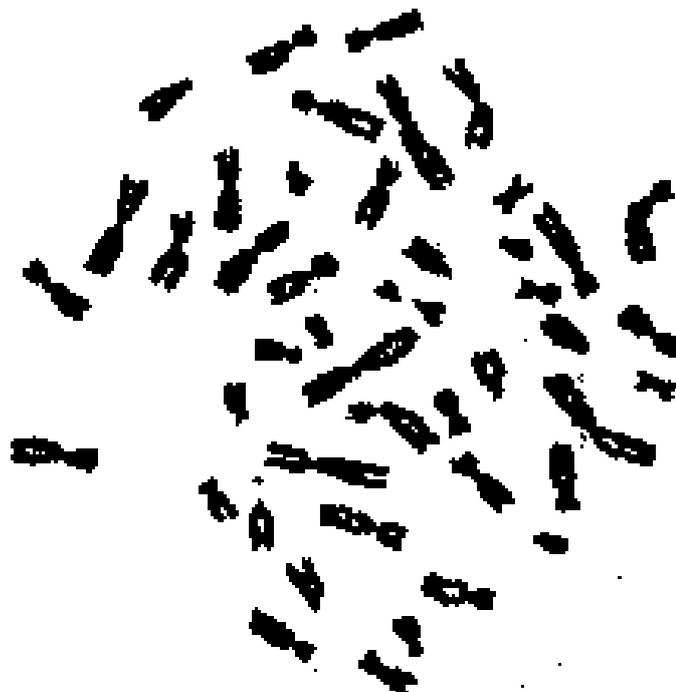
Кафедра общей биологии

Н.А. Курносова, О.В. Столбовская, В.Ф. Сыч

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ

Часть 1. Основы генетической инженерии

(учебно-методическое пособие для студентов экологического факультета специальности «Биология» и направления подготовки бакалавриата «Биология»)



Ульяновск 2007

ББК 28.070
Я 73
УДК 577.2 (075.8)
К 93

Молекулярно-генетические механизмы развития. Часть 1. Основы генетической инженерии: Учебно-методическое пособие / Курносова Н.А., Столбовская О.В. – Ульяновск: УлГУ. – 2007. - 42 с.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с учебным планом и программой спецкурса «Клеточная и генетическая инженерия» для студентов 4 курса экологического факультета специальности «Биология». В учебно-методическом пособии даются основные сведения по истории становления генетической инженерии, ее основных методах и практическом использовании достижений. Пособие может быть рекомендовано студентам экологических, биологических и медицинских специальностей вузов.

Печатается по решению ученого совета ИМЭиФК УлГУ.

Рецензент: кандидат биологических наук, доцент кафедры биоэкологии и генетики человека О.Ю. Шроль

Н.А. Курносова, О.В. Столбовская, В.Ф. Сыч
Ульяновский государственный университет, 2007

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность изучения данного курса обусловлена тем, что генетическая инженерия, как отрасль молекулярной биологии, является одной из наиболее стремительно развивающихся биологических наук. Ее методы и достижения позволили осуществить настоящий прорыв в исследованиях других областей биологии. Так, в области иммунологии удалось идентифицировать антигенраспознающие рецепторы иммунокомпетентных клеток и выяснить механизмы иммунологического распознавания, в области онкологии – изучить молекулярно-генетические аспекты патогенеза злокачественных опухолей и т.д. Наиболее впечатляющими не только для биологов, но и для ученых всего мира явились успехи Международной программы «Геном человека». Ее достижения индуцировали возникновение ряда новых научных направлений и методологий. Появилась возможность клонировать гены и переносить их (трансгенез) в другие организмы. В результате возникли новые биотехнологии.

Наибольшее развитие получили методы создания трансгенных микроорганизмов, синтезирующих труднодоступные биопрепараты для лечения различных заболеваний. Активно внедряются в сельскохозяйственную практику трансгенные растения, устойчивые к гербицидам и инсектицидам, а также обладающие ценными пищевыми качествами. Уже получены на их основе так называемые «съедобные вакцины». Трансгенные животные, продуцирующие человеческие белки для лечения заболеваний, также постепенно распространяются по свету. Успехи в клонировании животных явились настоящей сенсацией, причем не только для биологов, но и для ученых всех специальностей, а также людей, не связанных с наукой. В частности, была показана возможность репрограммирования генома млекопитающих. Так собственно и получена ставшая знаменитой овечка Долли и последующие клонированные другие животные. На основании этого подхода становится возможным репрограммирование любой дифференцированной клетки человека и ее развитие в необходимом направлении, например развитие нервной ткани, которую потом можно трансплантировать тому же пациенту для восстановления функции пострадавшего органа. При этом нет опасности отторжения пересаженной ткани, как это происходит при трансплантации донорских тканей.

Методы генетической инженерии индуцировали возникновение новейших методов лечения заболеваний человека, а именно метода генной терапии, направленного на исправление генетических механизмов заболевания. В настоящее время в мире 22 заболевания лечатся таким методом.

Студенты, освоившие курс генетической инженерии не только расширят свое общее образование, но могут использовать эти знания при последующем обучении и в дальнейшей работе с биоинформационными системами.

Программные вопросы:

1. Теоретические основы, история становления и основные задачи генетической инженерии.
2. Ферменты, используемые в различных методах генетической инженерии.
3. Общее понятие о гибридизации нуклеиновых кислот. Основные методы создания гибридной ДНК.
4. Полимеразная цепная реакция.
5. Клонирование гибридной ДНК.
6. Методы определения нуклеотидных последовательностей в ДНК.
7. История становления генетической инженерии растений.
8. Основные этапы создания трансгенных растений.
9. Области применения трансгенных растений.
10. Молекулярно-генетические механизмы агробактериальной трансформации.
11. Основные методы создания трансгенных животных.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК ОТРАСЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Теоретические основы и история становления генетической инженерии

Генетическая инженерия — ветвь молекулярной генетики, занимающаяся созданием (*in vitro*) искусственных генетических программ с последующим их введением в живой организм. Под искусственной генетической программой понимают рекомбинантную ДНК, представляющую собой соединенные в бесклеточной системе (т.е. вне живой клетки) два компонента: *вектор*, обеспечивающий механизм репликации и экспрессии, и *фрагмент клонируемой («чужеродной») ДНК*, содержащий интересующие исследователя гены.

Генетическая инженерия возникла на стыке многих биологических дисциплин: молекулярной генетики, энзимологии, биохимии нуклеиновых кислот и др.

Становлению генетической инженерии как науки способствовал ряд открытий:

- 1) в 1869 г. Ф. Мишером была выделена ДНК из ядер клеток гноя;
- 2) в 1953 г. Джеймсом Уотсоном и Френсисом Криком была расшифрована структура ДНК и установлен матричный механизм ее синтеза;
- 3) в начале 50-х гг. в бактериальных клетках были обнаружены плазмиды - внехромосомные молекулы ДНК. Важно, что, благодаря своим малым размерам, плазмиды могут быть выделены из клетки в неповрежденном виде.
- 4) в 1961 г. А. Мармуром и П. Доти открыто явление ренатурации ДНК и установлены механизмы гибридизации нуклеиновых кислот;
- 5) в 1962 г. В. Арбером получены первые сведения о рестриктазах ДНК;
- 6) в 1966 г. М. Ниренбергом, С. Очоа, Г. Корана расшифрован генетический код;
- 7) в 1967 г. М. Геллертом открыта ДНК-лигаза;
- 8) в 1968 г. М. Мезельсоном и Е. Юань выделена первая рестриктаза.

Таким образом, к началу 70-х годов были сформулированы основные принципы функционирования нуклеиновых кислот и белков в живом организме и созданы теоретические предпосылки генной инженерии.

Датой рождения генетической инженерии считают 1972 г., когда американским ученым Полом Бергом с сотрудниками впервые была получена *in vitro* рекомбинантная ДНК, состоящая из фрагментов разных молекул ДНК: вирусной, бактериальной и фаговой.

А.А. Баев был первым в нашей стране ученым, который поверил в перспективность генетической инженерии и возглавил исследования в этой области.

В 1975-1977 Ф. Сэнгер, Р. Баррел, А. Максам, В. Гилберт разработали методы быстрого определения нуклеотидных последовательностей ДНК.

В 1979 г. Г. Корана синтезирован ген тирозиновой супрессорной РНК.

В 1981-1982 г. Р. Пальмитером, Р. Бринстером, А. Спрэдлингом, Г. Рубином получена трансгенная мышь и трансгенные экземпляры дрозофилы.

В 1993 г. Л. К. Эрнстом, Г. Бремом, И. В. Прокофьевым получены трансгенные овцы с геном химозина.

После первых успешных экспериментов с рекомбинацией молекул ДНК в пробирке появились первые сомнения и опасения, не принесет ли генная инженерия вред природе и человечеству. В июле 1974 года несколько крупных ученых обратились к научной общественности с предложением наложить мораторий на работы с рекомбинантными ДНК *in vitro*. В феврале 1975 года в Калифорнии на Асиломарской конференции собрались 140 ученых разных стран, работающих в области генной инженерии. Всесторонне изучив результаты и возможные последствия, ученые пришли к выводу, что потенциальные опасности невелики, так как рекомбинантные штаммы в природных условиях нежизнеспособны и их бесконтрольное распространение маловероятно. Было решено прервать мораторий и продолжить исследования с соблюдением специально разработанных правил.

Основные задачи генетической инженерии

Генетическая инженерия ставит перед собой следующие задачи:

1. Изучение механизмов функционирования генетического аппарата эукариот, включая человека, что другими приемами сделать невозможно.
2. Получение путем бактериального синтеза ряда лекарственных средств, например инсулина, интерферонов, интерлейкинов.
3. Создание диагностических препаратов, в частности, для выявления такого опасного заболевания, как СПИД.
4. Разработка новых методов в селекции. Современные селекционеры при получении новых пород животных, сортов растений или активных рас практически ценных микроорганизмов сталкиваются с рядом проблем:
 - 1) нельзя скрещивать неродственные виды;
 - 2) нельзя извне управлять процессом рекомбинации в организме;
 - 3) нельзя предугадать, какое получится потомство.

Эти проблемы позволяет устранить генетическая инженерия, обеспечив получение так называемых трансгенных растений, устойчивых к экстремальным воздействиям и инфекционным поражениям, а также получение трансгенных животных.

Достижения генетической инженерии

Некоторые научные достижения

1. Открытие явления дискретности генов эукариот. Значимые части гена назвали экзонами, а удаляемые части - интронами. Последовательности РНК, соответствующие интронам, вырезаются и не транслируются, а последовательности, соответствующие экзонам, сшиваются специальными ферментами. Процесс получил название сплайсинг.

2. Установление структуры и механизма действия подвижных генетических элементов (транспозонов и др.), часто являющихся причиной негомологичной рекомбинации.

Наиболее впечатляющие практические свершения

1. Получение человеческого *инсулина* в промышленных масштабах. Клонированные гены человеческого инсулина были введены с плазмидой в бактериальную клетку, где начался синтез гормона, который природные микробные штаммы никогда не синтезировали. Начиная с 1982 года фирмы США, Японии, Великобритании и других стран производят генно-инженерный инсулин. Из 1000 литров бактериальной культуры получают приблизительно 200 г инсулина, что равно количеству, получаемому из 1600 кг поджелудочной железы животных.

2. Производство *интерферона* (разрабатывали более двадцати фирм Японии и несколько американских фирм), который эффективен при различных вирусных заболеваниях и злокачественных новообразованиях. Первым из этих соединений на рынок поступил альфа-интерферон, затем бета-интерферон.

3. Производство эффективного противоракового препарата - *интерлейкина* (производится в Японии и США).

4. Разработка диагностических препаратов, позволяющих обнаруживать генетические аномалии в период беременности.

5. Разработка методов генотерапии для лечения опасных наследственных заболеваний.

6. Разработка методов переноса в растения различных чужеродных генов, обуславливающих новые полезные свойства, в частности:

- получение растений, устойчивых к вирусам;
- защита растений от насекомых-вредителей;
- выведение трансгенных растений с удлиненным сроком созревания плодов.

Вопросы для контроля уровня усвоения материала:

1. Какие открытия предшествовали становлению генетической инженерии как науки?
2. Что собой представляет рекомбинантная ДНК?
3. Каковы основные задачи генетической инженерии?
4. Какова практическая значимость исследований по генетической инженерии?

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В НИХ ФЕРМЕНТЫ

Методы генетической инженерии

1. **Расщепление ДНК** (рестрикция), что необходимо для выделения генов и манипуляций с ними.
2. **Гибридизация нуклеиновых кислот**, которая, благодаря их способности связываться друг с другом по комплементарному принципу, позволяет выявлять специфические последовательности ДНК и РНК, а также совмещать различные генетические элементы что используется в цепной полимеразной реакции для амплификации ДНК *in vitro*.
3. **Клонирование ДНК**, осуществляемое путем введения фрагментов ДНК или их групп в быстро реплицирующиеся генетические элементы (плазмиды или вирусы), что дает возможность размножить гены в клетках бактерий, дрожжей или эукариот.
4. **Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование)** в клонируемом фрагменте ДНК, что позволяет определить структуру генов и аминокислотную последовательность кодируемых ими белков.
5. **Химико-ферментативный синтез полинуклеотидов**, часто необходимый для целенаправленной модификации генов и облегчения манипуляции с ними.

Основные группы ферментов

Возникновение генетической инженерии было напрямую связано с открытием целой серии ферментов, оказавшихся незаменимыми инструментами для манипулирования с генами, ввиду практически полного отсутствия соответствующих химических методов, позволяющих получать, модифицировать и амплифицировать рекомбинантные молекулы ДНК.

1. Рестриктазы. Обеспечивают процесс рестрикции ДНК, представляют собой эндонуклеазы бактериального происхождения, предназначенные для защиты клеток бактерий от чужеродной (вирусной) ДНК. Рестриктазы способны осуществлять разрывы межнуклеотидных (фосфодиэфирных) связей внутри полинуклеотидных цепей ДНК. Впервые были выявлены в клетках кишечной палочки (*E. coli*), зараженных бактериофагом. Сама клеточная ДНК защищается от рестриктаз метилированием части нуклеотидов, которое осуществляется особым ферментом - **ДНК-метиلاзой**.

Таким образом, присутствие в клетках бактерий двух ферментов (рестриктазы и ДНК-метилазы) обеспечивает комплексную защиту ее ДНК. Они препятствуют скрещиванию между разными видами и штаммами бактерий и, тем самым, обеспечивает сохранность их видов в эволюции.

В генетической инженерии рестриктазы используются для фрагментации молекул ДНК при создании рекомбинантных геномов.

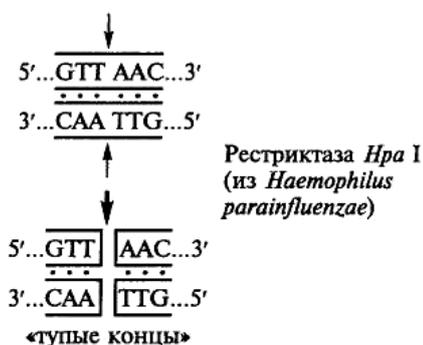
Среди нескольких тысяч известных к настоящему времени рестриктаз выделяют 3 класса (типа).

Рестриктазы типа I содержат три неидентичных субъединицы и специфичны к неметилированной двуцепочечной ДНК, в качестве кофакторов содержат S-аденозилметионин (донор метальных групп в реакции метилирования), АТФ и Mg^{2+} .

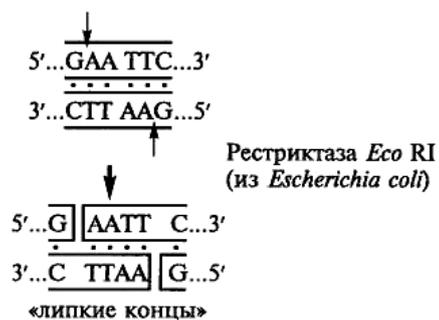
Субъединицы рестриктаз типа I имеют различные функции: альфа-субъединицы проводят расщепление ДНК, бета-субъединицы способны метилировать ДНК, гамма-субъединицы осуществляют узнавание специфических последовательностей ДНК.

Однако разрывы в цепях ДНК под действием этих рестриктаз происходят случайным образом на значительном расстоянии от участка узнавания, а продукты расщепления оказываются весьма гетерогенными, что затрудняет их использование в генетической инженерии.

Рестриктазы типа II состоят из двух субъединиц одного вида



Во втором случае действие рестриктаз приводит к образованию в ДНК так называемых «липких концов»:



палиндрома с образованием так называемых «тупых концов».

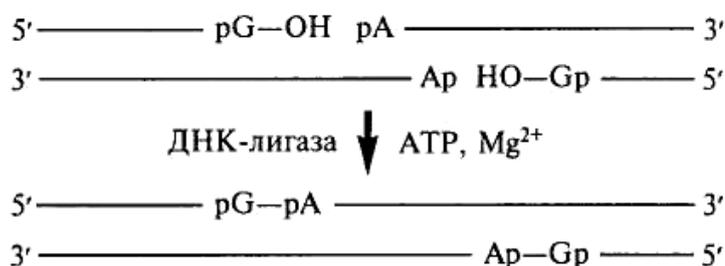
и нуждаются для осуществления нуклеазной активности только в ионах Mg^{2+} (метиلاзы этой системы являются самостоятельными ферментами). Рестриктазы этого типа узнают в ДНК последовательности из 4-8 нуклеотидов, имеющие ось симметрии второго порядка (палиндромы). Они гидролизуют фосфодиэфирные связи в двух цепях ДНК, осуществляя, например, симметричные разрывы в зоне

В последнее время среди рестриктаз типа II открыты ферменты, распознающие непалиндромные структуры и расщепляющие ДНК на строго фиксированном расстоянии от участка узнавания с образованием как тупых, так и «липких концов».

Рестриктазы типа III сходны с ферментами типа I. Для проявления активности они нуждаются в АТФ, Mg^{2+} и S-аденозилметионине. Эти рестриктазы состоят из 2 типов субъединиц (рестриктазы и метилазы). Они узнают непалиндромные последовательности длиной 5-6 н.п. и расщепляют ДНК в стороне от сайтов узнавания на расстоянии 24-25 н.п. Исчерпывающего гидролиза ДНК они не производят.

В генетической инженерии рестриктазы (особенно типа II) используют для получения библиотек, или банков геномной ДНК.

2. ДНК-лигаза. Способна катализировать синтез фосфодиэфирной связи в двуцепочечной ДНК, т.е сшивать между собой фрагменты ДНК.



Наиболее часто в генетической инженерии используется ДНК-лигаза фага T4,

способная в присутствии АТФ сшивать фрагменты ДНК как с липкими, так и с тупыми концами. Этот фермент состоит из одной полипептидной цепи (68 кДа) и ускоряет синтез фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатным (5'-р) и 3'-гидроксильными концами (3'-Н) цепей ДНК.

3. ДНК-полимераза E. coli. Была открыта А. Корнбергом и соавт. в 1958 г., в настоящее время называется ДНК-полимеразой I, состоит из одной полипептидной



цепи (103 кДа) и имеет трехдоменную структуру. Каждый домен обладает определенной ферментативной активностью: N-концевой домен 5'-3' - экзонуклеазной; С-концевой

домен 5'-3' - полимеразной (нуклеотидилтрансферазной); а средний домен 3'-5' - экзонуклеазной. N-концевой домен может быть отщеплен с использованием протеаз (трипсином, субтилизином и др.); остающаяся часть молекулы (68 кДа) - **фрагмент Кленова** - сохраняет присущие ей каталитические активности.

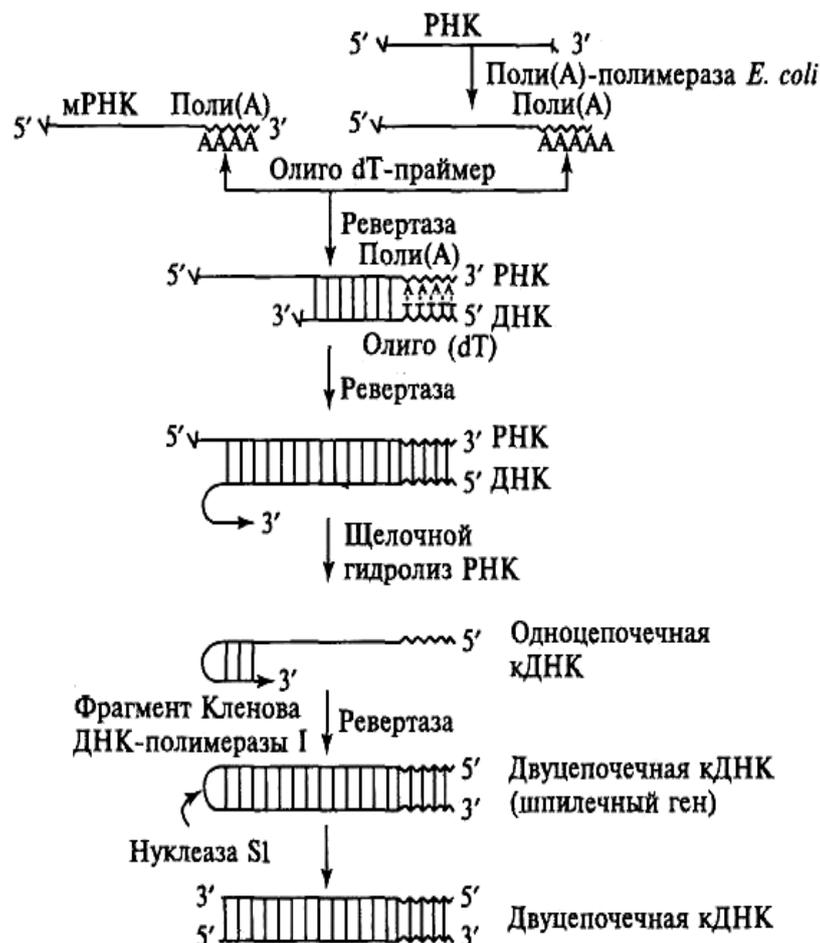
За счет 5'-3'- нуклеазной активности ДНК-полимераза I способна отщеплять нуклеотиды с 5'-конца одной цепи ДНК (в спаренных участках), что происходит в месте разрыва (ника). При этом одновременно идут две

реакции: 5'-3' экзонуклеазный гидролиз и 5'-3' полимеразная реакция. В этом случае происходит процесс «переноса» одноцепочечного разрыва вдоль цепи ДНК — ник-трансляция.

4. Нуклеазы, специфичные в отношении одноцепочечной ДНК, выделены из разных объектов: плесневого гриба *Aspergillus oryzae*, *Neurospora* и др. Нуклеаза SI, выделенная из *A. oryzae*, используется в генетической инженерии для удаления шпильки (одноцепочечного участка) ДНК при получении кДНК с помощью обратной транскриптазы.

5. РНКазы Н специфически расщепляют цепь РНК в дуплексе РНК:ДНК. РНКаза Н *E. coli* представляет собой эндорибонуклеазу, продуктами действия которой являются олигорибонуклеотиды. Она широко используется в ряде приемов генетической инженерии. Клетки эукариот также содержат эндонуклеазу такого типа. Эндонуклеазная активность РНКазы Н свойственна и обратным транскриптазам ретровирусов.

6. Обратная транскриптаза (ревертаза). В 1970 г. Г.Темин и С.Мизутани, а также независимо от них Д. Балтимор открыли фермент,



способный синтезировать ДНК на матрице РНК, у вируса саркомы Рауса. Эта РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название обратная транскриптаза, или ревертаза.

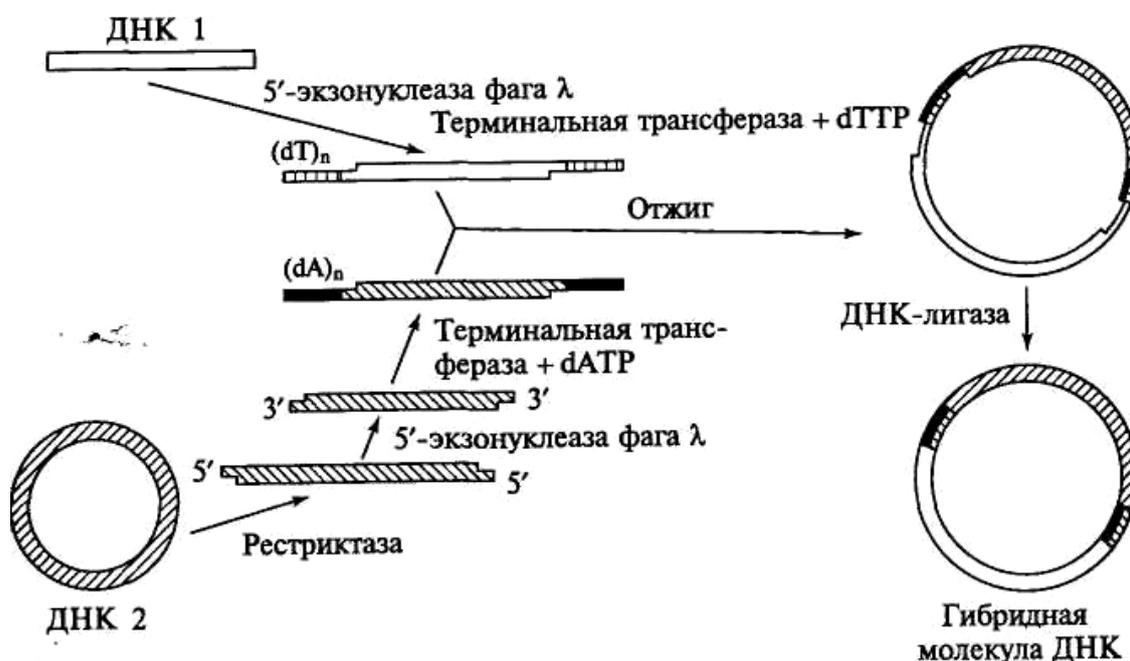
Наиболее изучена ревертаза вирусов птиц, которая состоит из 2 субъединиц и обладает по крайней мере тремя активностями: ДНК-

полимеразной (может использовать в качестве матрицы как РНК, так и ДНК); активностью РНКазы Н (гидролизует РНК в составе гибрида РНК:ДНК, но не атакует свободную РНК); ДНК-эндонуклеазной активностью. Первые две активности используются для синтеза ДНК, комплементарной вирусной РНК, которая затем интегрируется в геном клетки-хозяина. Эндонуклеазная активность, очевидно, используется для внесения разрывов в цепи ДНК-хозяина.

В генетической инженерии ревертаза очень широко используется для целенаправленного синтеза на матричных РНК комплементарных молекул ДНК (кДНК).

7. Нуклеаза Val 31. Выделена из псевдомонады *Alteromonas espejiana* и способна как экзонуклеаза удалять мононуклеотиды одновременно с 5'- и 3'-концов двуцепочечной ДНК, а также действовать как эндонуклеаза, специфичная к одноцепочечной ДНК. Таким образом, этот фермент позволяет «подтупить» несимметричные концы ДНК либо укоротить фрагменты ДНК, чтобы сблизить их функционально значимые элементы, а затем объединить их с помощью ДНК-лигазы.

8. Концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза (из тимуса теленка) наращивает нуклеотиды на 3'-ОН-конец одно- или двуцепочечной молеку-



лы ДНК. С ее помощью можно «подтупить» концы ДНК (если 3'-ОН-конец короче). Используя этот фермент, к фрагментам ДНК можно присоединять (наращивать) олигонуклеотидные «хвосты», состоящие из одного вида нуклеотидов. Если к другому фрагменту ДНК присоединить комплементарный ему другой хвост (конец), то они могут гибридизоваться и образовывать гибридные (рекомбинантные) молекулы ДНК

9. Поли(А)-полимераза E. coli. Катализирует присоединение к свободному 3'-концу одноцепочечной РНК поли(А)-последовательности. Этот фермент используется при подготовке молекул РНК, не содержащих поли(А)-хвоста, для синтеза на них кДНК с помощью ревертазы. Он может быть использован также для введения радиоактивной метки в 3'-конец РНК.

10. Полинуклеотидилкиназа Была выделена из *E. coli*, инфицированной бактериофагом Т4. Фермент кодируется геномом бактериофага и переносит фосфорные остатки на 5'-концевые гидроксильные группы молекул ДНК и РНК, используя в качестве донора фосфата АТР. Этот фермент применяют для мечения 5'-конца полинуклеотидной цепи с помощью радиоактивного ³²P, содержащегося в АТФ, меченной по гамма-фосфату. Содержащийся в исходной молекуле немеченый 5'-фосфат предварительно удаляют с помощью другого фермента фосфомоноэстеразы (фосфотазы).

ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Гибридизация нуклеиновых кислот - важнейший метод получения рекомбинантных ДНК - основан на способности нуклеиновых кислот быстро восстанавливать свою структуру после нагревания до 100 °С в сильно щелочной среде (рН 13).

При нагревании до 100 °С комплементарные пары оснований разрушаются и ДНК диссоциирует на две отдельные цепи. Этот процесс назван денатурацией ДНК («плавлением»). Выдерживание комплементарных цепей при температуре 65 °С приводит к их спариванию и восстановлению структуры двойной спирали (гибридизация, ренатурация, или «отжиг»). Скорость восстановления (ренатурации) двойной спирали зависит от вероятности столкновения двух комплементарных нуклеотидных последовательностей и их концентрации в растворе. Скорость реакции гибридизации можно использовать для определения концентрации любых последовательностей РНК или ДНК в смеси, содержащей и другие фрагменты нуклеиновых кислот. Для этого необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный к тому фрагменту, который надлежит выявить. Обычно фрагмент ДНК, полученный клонированием либо химическим путем, метят по ³²P в целях прослеживания включения фрагмента в состав дуплексов при гибридизации. Одноцепочечную молекулу ДНК, используемую в данном методе в качестве меченого индикатора, называют ДНК-зондом. Размеры его варьируют от нескольких десятков до нескольких сотен и тысяч нуклеотидов. Реакция гибридизации с использованием ДНК-зондов позволяет идентифицировать нуклеотидные последовательности в очень низкой концентрации и тем самым определять, какое количество копий последовательности ДНК, комплементарной ДНК-зонду, присутствует в геноме клетки.

При конструировании гибридных ДНК гибридизация нуклеиновых кислот реализуется, как правило, в двух основных стратегиях (методах) получения рекомбинантных ДНК: коннекторном и рестриктазно-лигазном.

Коннекторный метод создает условия для гибридизации продуктов рестрикции разных геномов путем наращивания на их концах комплементарных олигонуклеотидных участков. Гибридизация (отжиг) этих фрагментов ведет к образованию гибридных молекул ДНК. В этом методе используются 3 фермента: 5'-экзонуклеаза, терминальная нуклеотидилтрансфераза и ДНК-лигаза. Именно этим методом П. Берг и сотрудники получили в 1972 г. первую гибридную молекулу ДНК.

Рестриктазно-лигазный метод, разработанный Коэном и сотрудниками в 1973 г., наиболее прост и популярен в генетической инженерии. В этом методе с использованием одной рестриктазы типа II, дающей фрагменты рестрикции с «липкими концами», гибридизация между фрагментами хромосомной ДНК и ДНК-плазмидой осуществляется без дополнительной процедуры наращивания комплементарных концов. После окончания гибридизации остается только сшить полинуклеотидные фрагменты с помощью ДНК-лигазы.

Способность ДНК к денатурации-ренатурации используется и в одном из самых распространенных в настоящее время методов амплификации фрагментов ДНК *in vitro* — полимеразной цепной реакции.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это метод амплификации фрагментов нуклеиновых кислот *in vitro*, с помощью которого можно достаточно быстро (в течение нескольких часов) получить миллионы копий определенных нуклеотидных последовательностей (генов). Метод был предложен в 1985 г. К. Мюллисом (биотехнологическая корпорация «Cetus», США) и получил широкое распространение с 1988 г., когда Р. Сайки с соавт. была опубликована основополагающая работа по теории ПЦР и ее оптимизации.

В методе ПЦР для амплификации фрагментов ДНК используют термостойкую ДНК-полимеразу из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (Taq-полимеразу), которая в присутствии всех 4 видов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и коротких 20-30-членных затравок (праймеров) осуществляет синтез комплементарных последовательностей ДНК.

Вначале осуществляют термическую денатурацию (расплетание) двуцепочечной молекулы (фрагмента) ДНК при 93-95 °С, что приводит к разделению комплементарных цепей, а затем пробы охлаждают до 60 °С, что дает возможность связаться праймерам и одноцепочечным дезоксиолигонуклеотидам, а также запускает работу Taq-полимеразы.

Праймеры обычно получают методом химического синтеза, определив предварительно нуклеотидную последовательность пограничных с амплифицируемым геном участков ДНК. Они служат по существу для двух целей: во-первых, запускают работу ДНК-полимеразы, а во-вторых,

ограничивают ее действие, как бы застопоривают фермент в рамках нужного участка копирования ДНК.

Как видно из схемы, ПЦР имеет циклический характер. В первом и частично во втором циклах образующиеся копии {ампликоны} ДНК не соответствуют границам амплифицируемого гена (все ампликоны в первом цикле и часть ампликонов во втором цикле получаются более протяженными в тех участках, где еще не произошло связывание второго — «антисмыслового» праймера). Однако начиная уже с третьего цикла длина ампликонов становится стандартной, т.е. соответствует числу пар нуклеотидов фрагментов ДНК-матрицы между 3'-концами праймеров. Ампликоны накапливаются в геометрической прогрессии и начинают доминировать среди продуктов амплификации. Процесс имеет цепной характер, так как синтезированные фрагменты ДНК в дальнейшем сами служат матрицей, на которой идет синтез.

При многократном повторении циклов синтеза (включающих нагревание и охлаждение проб в вышеназванных пределах температур) число копий специфических фрагментов ДНК экспоненциально увеличивается, что позволяет из небольшого числа имеющихся фрагментов получить большое количество копий, которые можно идентифицировать методом электрофореза.

Вопросы для контроля уровня усвоения материала:

1. Каковы основные методы генетической инженерии?
2. Какие виды рестриктаз вам известны? Какова их функциональная роль?
3. Какова функция ДНК-лигазы?
4. Какую структуру имеет фермент ДНК-полимераза? Что такое Фрагмент Кленова?
5. С какой целью в генетической инженерии используется обратная транскриптаза?
6. Какова функциональная роль концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы?
7. Для чего в генетической инженерии применяют полинуклеотидилкиназу?
8. В чем состоит сущность коннекторного метода гибридизации нуклеиновых кислот?
9. На чем основан рестриктазно-лигазный метод гибридизации нуклеиновых кислот?
10. Что такое полимеразная цепная реакция?

КЛОНИРОВАНИЕ ДНК

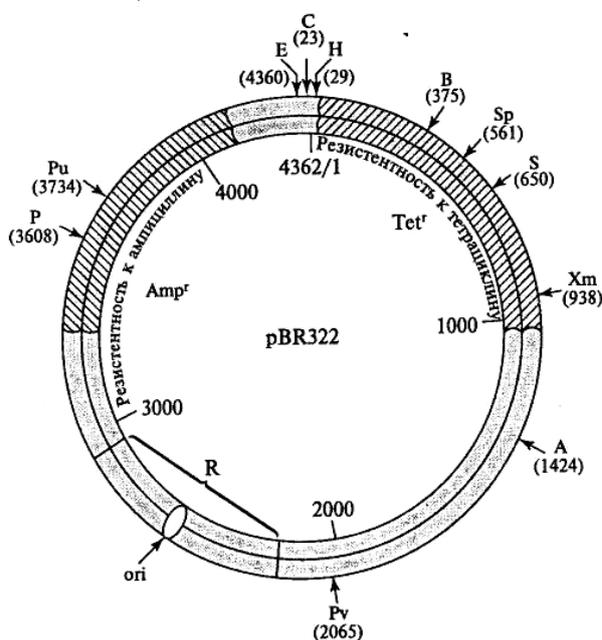
Методом клонирования фрагменты ДНК любого вида, полученные с помощью рестриктаз, можно ввести в плазмиду или в бактериофаг, получив, таким образом, вектор молекулярного клонирования, а затем размно-

жить эти генетические элементы в клетках бактерий или дрожжей, увеличивая их число в миллионы раз. Встраивание фрагмента ДНК в плазмиду осуществляется *in vitro*, а затем рекомбинантная ДНК вводится в клетки бактерии-хозяина. Наиболее часто в роли хозяина выступает детально изученный штамм *E. coli* K12, а в роли **вектора** — *плазмиды* или *фаги* этой бактерии.

В целом бактерии могут приобретать новый генетический материал тремя путями: трансформацией, конъюгацией или трансдукцией.

Вектор — молекула ДНК, которая способна переносить в клетку чужеродную ДНК и обеспечивать там ее амплификацию. В генетической инженерии процесс введения молекул ДНК в живые клетки бактерий называется трансфекция и обычно осуществляется после обработки клеток CaCl_2 , что делает их оболочки более проницаемыми, и введение ДНК занимает всего несколько минут. В роли вектора могут быть использованы:

- **Плазмиды**, представляющие собой кольцевые молекулы двуцепочечной ДНК, встречающиеся в клетках бактерий и дрожжей, где они реплицируются в процессе пролиферации клеток как самостоятельные единицы. Плазмиды обладают несколькими важными свойствами или функциями, к числу которых относятся: репликация, функция переноса и устойчивость к антибиотикам, что позволяет их использовать в качестве векторов клонирования.



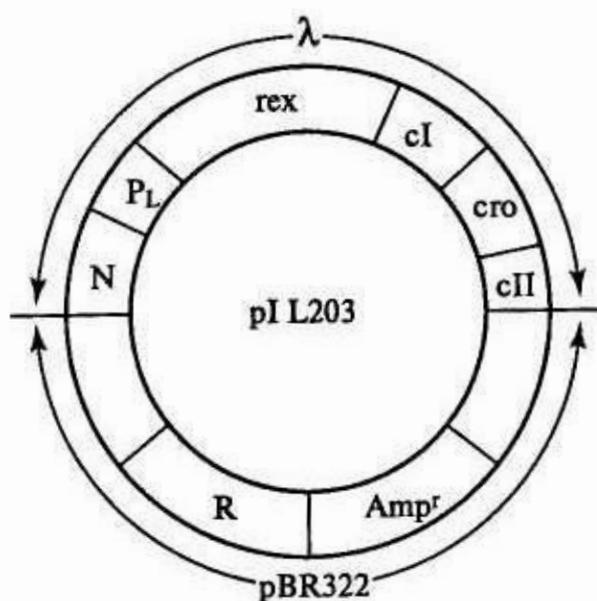
Бактериальные плазмиды имеют блочную организацию. При этом гены переноса могут объединяться с репликоном (участком, ответственным за репликацию). Это дает возможность методами генетической инженерии специально конструировать векторы, обладающие необходимыми качествами.

Одним из наиболее распространенных векторов является специально созданная плазмида pBR322. Нуклеотидная последовательность этого вектора (4362 н. п.) полностью изучена.

В нем имеются гены устойчивости к ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tetr). Репликон в этом векторе взят из плазмиды Col EI (эта природная плазмида *E. coli* содержит ген, кодирующий белок-токсин колицин). Репликон обеспечивает инициацию репликации, включая синтез особого вида РНК (так называемой РНК_I), которая контролирует интенсивность ре-

пликации (число копий) плазмиды в клетке. В норме в клетке *E. coli* может содержаться до 50 копий плазмиды pBR322. Клетки *E. coli*, содержащие данный вектор, выращивают в среде с ампициллином или тетрациклином, на которой клетки, не имеющие эту плазмиду, не растут, и таким образом на такой селективной среде накапливаются только те клетки, которые содержат рекомбинантную ДНК. Это свойство облегчает выделение больших количеств рекомбинантной плазмидной ДНК. Из-за своего небольшого размера плазмидная ДНК легко отделяется от хромосомной ДНК методом центрифугирования.

- **Бактериофаги**, используемые при необходимости клонирования крупных фрагменты ДНК (например, бактериофаг лямбда). Геном фага лямбда досконально изучен: он содержит область начала репликации (*ori*), гены белков головки и хвостового отростка, а также гены ферментов, необходимые для репликации фаговой ДНК, гены лизиса инфицируемых клеток и гены, детерминирующие лизогенный путь существования.



Упрощенная схема строения плазмидного вектора pI L203:

N, rex, cro, cI, cII – гены фага λ;
P_L – регулируемый промотор; Amp^r – ген устойчивости к ампицилину

обязательную центральную область и на ее место встраивают нужный фрагмент ДНК, получая, таким образом, конкамер — предшественник для упаковки фаговой ДНК в зрелые фаговые частицы. Фаг лямбда очень пластичен: без нарушения развития фага из него можно убрать до 25 % ДНК или пристроить до 6 % лишней ДНК. В этот фаговый вектор можно встраивать до 23 000 н.п.

- **Космиды** (крупные векторы, способные вместить фрагменты ДНК длиной до 45000 н. п.). В их состав входят: ген (маркер) резистентности к антибиотикам, репликон плазмиды и фрагмент ДНК фага лямбда (так называемый cos-участок). Этот фрагмент представляет собой односторонние комплементарные участки на концах фаговой ДНК, т.е. «липкие концы». Между ними удается встроить фрагменты ДНК длиной до 45 000 н. п.

- **Фазмиды** - искусственные гибриды между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК они в одних условиях могут размножаться как фаги, а в других - как плазмиды. Фазмиды имеют определенные преимущества перед векторами других типов. Их можно «упаковывать» в оболочки фаговых белков, и они будут существовать как фаги, при температуре 42 °С, либо, используя температурочувствительный белок - репрессор фага лямбда, заставляя их размножаться как плазмиды (при более низкой температуре 32 °С).

В настоящее время начинают развиваться **эукариотические системы клонирования**, использующие клетки дрожжей, растений и животных.

В клетках **растений** нет природных плазмид и в качестве векторов могут быть использованы различные растительные вирусы. В то же время векторы для растительных клеток наиболее успешно создают на основе особых бактериальных Ti-плазмид, которые обладают способностью переносить сегменты ДНК в геномы растений.

При введении ДНК в клетки **животных** часто используют вирусы, в которые предварительно вводят необходимый сегмент ДНК. После образования вирионов вирусы проникают в клетки путем инфицирования. Упаковка происходит обычно *in vivo*, так как *in vitro*, в отличие от бактериофагов, этот процесс пока не осуществим. Можно проводить и прямую инъекцию ДНК в клетки и их ядра, но при этом трансформируется только малая часть исследуемых клеток (не более 10 %). В ряде случаев используется электропорация — обработка смеси клеток и вводимой ДНК высоковольтным (2 - 4 тыс. В) электрическим разрядом, что приводит к образованию в мембранах клеток отверстий (пор), необходимых для проникновения ДНК. Векторы для трансформации клеток животных наиболее часто создают на основе вируса SV40 и вируса папилломы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Для выяснения структуры, функций, возможностей рекомбинации и клонирования молекул нуклеиновых кислот или их фрагментов необходимо установить их нуклеотидную последовательность. В середине 70-х г. были открыты ДНК-рестриктазы и усовершенствован метод гель-электрофореза, что дало возможность разделять достаточно протяженные фрагменты ДНК, отличающиеся размером всего на один нуклеотид. С помощью рестриктаз ДНК стали разрезать на определенные блоки и определять в них позиции нуклеотидов химическими или энзиматическими методами.

Химическое секвенирование основано на специфической химической модификации пуриновых и пиримидиновых оснований с последующим выщеплением модифицированных нуклеотидов из полимерной цепи и анализом образовавшихся продуктов методом гелеэлектрофореза. В этом методе, разработанном А. Максамом и У.Гилбертом в 1976 г., в 5'-конец

анализируемого участка ДНК вводят радиоактивный фосфат, используя фермент полинуклеотидкиназу из фага T₄ и гамма-³²Ф [АТФ]. Далее анализируемый образец разделяют на четыре порции, с каждой из которых проводят специфическую обработку, приводящую к выщеплению определенного вида нуклеотидов.

При этом используют диметилсульфат, который метилирует пуриновые основания (аденин по положению N³, гуанин по положению N⁷), а также гидразин, который расщепляет и модифицирует пиримидиновые основания. Далее, используя обработку пиперидином и гидролиз при различных значениях pH, осуществляют выщепление определенных модифицированных оснований, сопровождающееся разрывом соседних фосфодиэфирных связей. Таким образом, для каждой из 4 анализируемых проб получают набор небольших по размеру фрагментов ДНК, часть из которых несет радиоактивную метку. Все эти фрагменты (как меченые, так и немеченые ³²Ф) разделяют методом электрофореза, который позволяет разделять фрагменты, отличающиеся по длине на один нуклеотид.

Полученные электрофореграммы проявляют с помощью рентгеновской пленки. В результате на электрофореграммах выявляются только радиоактивные фрагменты, по которым и определяют нуклеотидную последовательность анализируемой ДНК. Например, если в пробе, где было проведено выщепление цитозина (-С), радиоактивность была выявлена в фрагментах химического расщепления длиной 3 и 6 нуклеотидов, то это означает, что в секвенируемом участке ДНК цитозин находится в позициях 4 и 7 соответственно. Аналогично если в пробе, где проводилось выщепление гуанина (-G), методом электрофореза были выявлены радиоактивные фрагменты размером 5 и 9 нуклеотидов, то это значит, что гуанин в секвенируемом участке располагается в положениях 6 и 10. Таким образом, фракционируя на одной гелевой пластине фрагменты, образовавшиеся после специфического выщепления каждого из 4 нуклеотидов (А, G, С и Т), можно непосредственно читать нуклеотидную последовательность секвенируемой ДНК по проявленной электрофореграмме.

Энзиматический метод был разработан Сангером и Коулсоном в 1975 г. В этом методе анализируемый фрагмент ДНК используют в качестве матрицы в реакции полимеразного копирования (синтеза комплементарной цепи ДНК) с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*. Этот метод получил название «плюс-минус-метод», поскольку реакцию полимеризации в нем изначально проводили либо в отсутствие одного из 4 типов нуклеотидов («минус»-система), либо в присутствии только одного нуклеотида («плюс»-система), что ограничивает возможность наращивания полинуклеотидной цепи, т.е. останавливает (терминирует) ее синтез из-за недостатка соответствующего нуклеотида. Затем для остановки синтеза стали использовать специальные молекулы — терминаторы, в качестве которых берут дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Для секвенирования этим методом используют одноцепочечную молекулу ДНК, а также короткий олигодезоксинуклеотидный праймер (затравку), комплементарный небольшому участку анали-

зируемой ДНК. Одиночная (секвенируемая) цепь ДНК служит матрицей для работы ДНК-полимеразы, а новая (комплементарная) цепь наращивается, начиная с 3'-гидроксильной группы праймера путем присоединения соответствующих дезоксирибонуклеозидфосфатов. При секвенировании проводят четыре разных реакции копирования, для чего комплекс «матрица-праймер» инкубируют в присутствии всех четырех обычных дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dTTP, dGTP и dCTP) и какого-то одного определенного дидезоксинуклеозидтрифосфата, который и служит терминатором синтеза, после своего встраивания в растущую цепь ДНК: присоединение дидезоксинуклеозидфосфата, у которого отсутствует 3'-гидроксильная группа, делает невозможным присоединение следующего нуклеотида. Поскольку терминация синтеза происходит в разных местах, то образуется набор цепей (фрагментов) различной длины, начиная с 5'-конца праймера до места расположения соответствующего присоединенного дидезоксинуклеотида. Новосинтезированные фрагменты являются радиоактивно мечеными, так как для их синтеза используют по крайней мере один меченый дидезоксинуклеозидтрифосфат. Продукты четырех реакций анализируют методом электрофореза, и секвенируемую последовательность считывают с радиоавтографа, так же как при анализе химического секвенирования. Длина выявленного при электрофорезе радиоактивного фрагмента указывает место расположения комплементарного нуклеотида в анализируемом фрагменте ДНК. Например, если при анализе на радиоавтографе пробы, полученной путем копирования в присутствии ddCTP, выявлены фрагменты длиной 3 и 4 нуклеотида, это значит, что в анализируемом фрагменте ДНК в соответствующих позициях расположен гуанин.

Работа по определению нуклеотидных последовательностей крупных геномов, состоящих из миллионов и более нуклеотидов, сильно облегчается использованием компьютерных программ, которые позволяют быстро находить перекрывающиеся последовательности в анализируемых фрагментах и затем составить полную карту генома.

Вопросы для контроля уровня усвоения материала:

1. Что собой представляет вектор молекулярного клонирования?
2. Перечислите важнейшие свойства плазмид, позволяющие их использовать в качестве вектора клонирования.
3. Какие векторы используются при необходимости клонирования крупных фрагментов ДНК?
4. Какие методы используют при определении нуклеотидных последовательностей ДНК?

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

Основные принципы генетической инженерии растений.

Генетическая инженерия растений – это система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Суть генетической инженерии сводится к переносу в растения чужеродных генов, которые могут сообщать растениям полезные свойства.

Растения имеют одно очень важное преимущество перед животными, а именно возможна их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных (способных завязывать семена) растений. Это свойство (тотипотентность) открывает для молекулярных биологов большие возможности в изучении функционирования генов, введенных в растения, а также используется в селекции растений.

Для конструирования растений необходимо решить следующие задачи:

- выделить конкретный ген,
- разработать методы, обеспечивающие включение его в наследственный аппарат растительной клетки,
- регенерировать из единичных клеток нормальное растение с измененным генотипом.

Формальной датой рождения генетической инженерии растений является полученное с помощью Ti-плазмидного вектора первое в мире химерное растение санбин (sunbeen) как результат переноса гена запасного белка бобовых (фазеолина) в геном подсолнечника (sunflower + been).

Агробактериальная трансформация растений.

В группе почвенных бактерий, известных под общим названием *Agrobacteria*, есть несколько видов, которые могут заражать растения и вызывать образование опухолей, называемых корончатыми галлами, состоящими из недифференцированной опухолевой ткани, растущей в месте заражения. Клетки корончатых галлов приобретают способность к неограниченному, нерегулируемому росту; в культуре способны расти при отсутствии специальных гормонов, которые необходимы при культивировании нормальных растительных клеток. Изучение индуктора опухолей *Agrobacterium tumefaciens* показало, что собственно опухолеродным агентом у этой бактерии является Ti-плазида, которая частично интегрируется в хромосомы растений.

Особенности Ti-плазмиды

Плазида содержит **T-ДНК** (transferred DNA), которая составляет 12-22 тыс. пар оснований и встраивается в ДНК растительной хромосомы. Она кодирует ферменты синтеза фитогормонов и опинов – производных аминокислот, которые используются бактерией как источник углерода, азота и энергии. Также в Ti-плазмиде содержатся **vir-область**, отвечающая за перенос T-ДНК в растение, **гены утилизации опинов**, а также **локусы, контроли-**

рующие размножение плазмиды в бактериальной клетке и ее **перенос** при бактериальной конъюгации.

В области **T-ДНК** картировано не менее шести генов, отвечающих за морфологию опухоли и синтез фитогормонов. Гены *iaaM*, *iaaH* и *ipt* представляют собой онкогены, так как продуктами этих генов являются фитогормоны ауксин и цитокинин, которые индуцируют деление клеток. Ген *5* отвечает за синтез индол-3-лактата, который является продуктом превращения ауксина и проявляет антиауксиновый эффект. Ген *tml 6* влияет на величину опухоли; транскрипт *ba* необходим для секреции нопалина и октопина, а ген *bb* изменяет чувствительность растительных тканей к цитокинину и сохраняет клетки в недифференцированном состоянии. Итак, четыре или, возможно, пять генов подавляют дифференцировку опухолевых клеток и переводят их в состояние деления, а еще один ген кодирует фермент, катализирующий синтез опинов.

Молекулярно-генетические механизмы агробактериальной трансформации

Процесс трансформации можно разделить на четыре этапа:

- прикрепление бактерии к стенке растительной клетки,
- проникновение T-ДНК внутрь клетки растения,
- интеграция T-ДНК в геном растения
- экспрессия T-ДНК.

Индукция начальных этапов трансформации может происходить только в месте раневого повреждения растения. Весь процесс вырезания и интеграции T-ДНК в растительную хромосому осуществляют продукты генов, локализованных в *vir*-области. Индукция *vir*-генов обратима, что очень важно для патогена: в случае, если хозяин – больной и нежизнеспособный организм, перенос T-ДНК не осуществляется. Перенос T-ДНК из бактерии в цитоплазму растительной клетки осуществляется за 30 мин.

Внедрение T-ДНК в растительный геном является многоступенчатым процессом. В геном растения могут встраиваться несколько копий T-ДНК. После встраивания в хромосому T-ДНК становится обычной частью генома растения. T-ДНК транскрибируется в растительных клетках РНК-полимеразой II растения-хозяина. Транскрипты имеют особенности эукариотических матриц. Сама бактерия в клетку не проникает, а остается в межклеточном пространстве и использует растительные клетки со встроенной T-ДНК как фабрику, продуцирующую опины – источник азота и углерода.

Генетическая инженерия растений с использованием Ti-плазмид

Ti-плазида как вектор. T-ДНК Ti-плазмид обладает двумя свойствами, делающими ее по существу идеальным вектором для введения чужеродных генов в клетки растений. *Во-первых*, круг хозяев агробактерий очень широк: они трансформируют клетки практически всех двудольных растений. *Во-вторых*, интегрированная в состав генома растения T-ДНК наследуется как

простой доминантный признак в соответствии с законами Менделя, а ее гены имеют собственные промоторы (регуляторная область гена, определяющая время и место его экспрессии), под контролем которых могут экспрессироваться вставленные в Т-ДНК чужеродные гены.

Простейший способ введения Т-ДНК в клетки растения состоит в том, чтобы заразить его *A. tumefaciens*, содержащей подходящую Ti-плазмиду, и предоставить дальнейшее естественному ходу событий. Это осуществляется следующим способом.

Т-сегмент вырезают из Ti-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в один из стандартных плазмидных векторов для размножения в клетках бактерий – *Escherichia coli*. *E. coli* содержит плазмиду pBR322, способную к саморепликации. После введения в нее участка Ti-плазмиды, плаزمида pBR322 может реплицироваться многократно, что приводит к увеличению числа копий участков Ti-плазмиды. Этот процесс называется клонированием. Бактерии, содержащие плазмиду pBR322 с участком Т-ДНК, размножают, после чего эту плазмиду выделяют и в Т-сегмент встраивают определенный ген. Этот молекулярный гибрид, теперь уже содержащий Т-ДНК со встроенным в нее геном, снова размножают в *E. coli*, а затем вводят в клетки *A. tumefaciens*, несущие соответствующую полную Ti-плазмиду. В результате обмена идентичными участками (гомологичная рекомбинация) между Т-сегментами нативной и сконструированной Ti-плазмид Т-ДНК со встроенным чужеродным геном включается в Ti-плазмиду, замещая нормальную Т-ДНК. Таким образом, мы получаем клетки *A. tumefaciens*, несущие Ti-плазмиду со встроенным в Т-сегмент нужным геном. Последний этап заключается в заражении растений этими модифицированными генно-инженерными методами агробактериями. Клетки полученных трансгенных растений будут содержать интегрированную Т-ДНК со встроенным чужеродным геном, то есть цель работы, состоявшая во введении данного гена в геном растения, будет достигнута.

В целом идеальная векторная система на основе Ti-плазмиды должна:

1) содержать все сигналы, необходимые для переноса и стабильной интеграции в ядерную ДНК растений; систему для экспрессии чужеродных генов в растениях (узнаваемый растительными полимеразы промотор), маркер, который необходим для селекции трансформированных клеток;

2) не содержать онкогенов, то есть генов, которые подавляют дифференцировку растительных клеток. Второй пункт достигается с помощью транспозонного мутагенеза (транспозон – последовательность ДНК, способная перемещаться по геному). В результате введения транспозона в Т-ДНК можно выключить гены, которые приводят к опухолеобразованию (iaaM, iaaH, ipt), что не отражается на механизме переноса Т-ДНК.

3) в векторе должны быть предусмотрены маркеры - репортерные гены, с помощью которых возможен отбор трансгенных растений. Например, репортерный ген – pgfp, который контролирует синтез GFP-белка (green fluorescent protein). Этот ген был выделен из ДНК медузы *Acquorea victoria*.

Трансгенные растения с этим геном светятся в ультрафиолете зеленым светом.

Практическое применение Ti-плазмид

1. Получение растений, устойчивых к вредителям сельского хозяйства. Например, часто используют ген *bt*, продуктом которого является бактериальный токсин *Bacillus thuringiensis*. Эта тюрингская бактерия продуцирует крупный белок (протоксин), контролируемый геном *bt*, который, попадая в кишечник личинок насекомых, разрушается под действием ферментов, а его фрагмент (эндотоксин) приводит к их гибели.

2. Получение растений с улучшенными качествами. Используют новый подход с "antisense RNA" (перевернутой или антисмысловой РНК), который позволяет управлять работой интересующего гена. В этом случае при конструировании вектора копию ДНК (к-ДНК) встраиваемого гена переворачивают на 180°. В результате в трансгенном растении образуется нормальная молекула мРНК и перевернутая, которая в силу комплементарности нормальной мРНК образует с ней комплекс и закодированный белок не синтезируется.

Например, данный подход используют для получения трансгенных растений томатов с улучшенным качеством плодов.

Вектор включал к-ДНК гена *PG*, контролирующего синтез полигалактуроназы (*polygalacturonase*) – фермента, участвующего в разрушении пектина, основного компонента межклеточного пространства растительных тканей. Продукт гена *PG* синтезируется в период созревания плодов томатов, а увеличение его количества приводит к тому, что томаты становятся более мягкими, что значительно сокращает срок их хранения. Отключение этого гена в трансгенах позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые не только значительно дольше сохранялись, но и сами растения были более устойчивы к грибным заболеваниям.

3. Изучение роли гормонов в развитии растений.

В частности, был внесен существенный вклад в доказательство роли ауксинов и цитокининов в дифференцировке растений.

4. Использование Ti-плазмиды агробактерии для получения мутаций. Этот метод носит название Т-ДНК-инсерционного мутагенеза. Т-ДНК, встраиваясь в геном растения, выключает ген, в который она встроилась, а по утрате функции можно легко отбирать мутанты. В нашей лаборатории М.А. Раменской на основе Т-ДНК мутагенеза получены растения томатов с неспецифической устойчивостью к фитофторозу.

5. Получение трансгенных растений с измененными декоративными свойствами. Например, получение растений петунии с разноцветными цветами. На очереди голубые розы с геном, контролирующим синтез голубого пигмента, клонированным из дельфиниума.

Безвекторные системы переноса чужеродной ДНК

Безвекторные системы дают возможность прямого переноса чужеродной ДНК в растительные протопласты. В этом случае используют методы электропорации, микроинъекции и баллистический метод.

Электропорация — кратковременные электрические разряды (1-100 мкс при напряжении 1000-10000 В/см) увеличивают проницаемость мембран протопластов, что облегчает проникновение чужеродной ДНК. Этим методом были получены трансгенные растения кукурузы, риса и сахарного тростника.

Микроинъекцию проводят под микроскопом с помощью стеклянной иглы, вводя через нее ДНК в ядро клетки. Таким способом были получены трансгенные растения ячменя и капусты.

Баллистический метод – один из самых эффективных для трансформации однодольных растений. В этом методе на частицы вольфрама диаметром 0,6-1,2 мкм напыляется ДНК вектора, содержащая необходимую для трансформации генетическую конструкцию. Затем эти частицы наносят на целлофановую подложку и помещают внутрь баллистической пушки, принцип действия которой состоит в изменении давления. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частицы с большой скоростью выбрасываются из баллистической пушки и проникают в цитоплазму и ядро трансформируемых клеток. Этим методом удалось получить растения-трансформанты риса, ячменя, пшеницы и кукурузы.

Прямой перенос ДНК в растительные протопласты может проводиться с использованием липосом - сферических частиц, мембраны которых содержат фосфолипиды. Частицы обволакивают трансформирующую ДНК и тем самым защищают ее от нуклеаз. Липосомы можно создать путем встряхивания или обработки ультразвуком водных эмульсий фосфолипидов: фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, лецитин и др. С помощью липосом в протопласты растений удается ввести ДНК Ti-плазмид, а также целые метафазные хромосомы.

Вопросы для контроля уровня усвоения материала:

1. Каковы предмет и задачи генетической инженерии растений?
2. Каковы молекулярно-генетические механизмы агробактериальной трансформации растений?
3. Как используют Ti-плазмиду в качестве вектора?
4. Какими свойствами должна обладать векторная система на основе Ti-плазмиды?
5. Каково практическое применение Ti-плазмид?
6. Какие вы знаете безвекторные системы переноса чужеродной ДНК?
7. В чем сущность баллистического метода переноса чужеродной ДНК?

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ЖИВОТНЫХ

Методы создания трансгенных животных

В современной биотехнологии к трансгенным относят не только животных, полученных путем микроинъекции чужеродной ДНК в зиготу и которые несут чужеродный ген в составе своего генома, но и животных, созданных при помощи эмбриональных стволовых клеток, животных с выключенными генами, так называемых нокаутов, а иногда и тех, которым чужеродный ген введен был непосредственно в определенный орган или ткань взрослого организма.

Существуют две основные схемы получения трансгенных животных:

1) **микроинъекция чужеродной ДНК** в оплодотворенную яйцеклетку – зиготу. Первый этап работы – создание генетической конструкции с заданными свойствами. На следующем этапе работы генетическую конструкцию инъецируют в одноклеточный эмбрион – зиготу. В зиготе генетический материал, полученный от отца и матери, находится в двух пузырьках, окруженных ядерной мембраной, – в мужском и женском пронуклеусах. Необходимое количество копий генетической конструкции вводят при помощи микропипетки в пронуклеус. Потом эмбрионы пересаживают самке-реципиенту, многие из них нормально имплантируются и развиваются до рождения. Однако далеко не все животные, родившиеся из инъецированных зигот, несут чужеродный ген. А те, которые все-таки являются трансгенными, обычно оказываются мозаичными по введенному гену, то есть несут его не во всех тканях организма. Так что для получения трансгенных животных большое значение имеет молекулярно-генетический анализ родившегося потомства. На этом этапе следует получить ответы на три вопроса: первый – встроился ли трансген в геном, второй – несут ли трансген половые клетки, третий – экспрессируется ли чужеродный ген. Лучше всего, когда получен трансгенный самец, половые клетки которого содержат чужеродный ген, в этом случае трансген будет передан его детям. Самца можно скрестить со многими самками, в том числе и при помощи искусственного оплодотворения, и быстро получить многочисленное потомство (поколение F1). Животные F1 будут нести трансген во всех клетках организма, но только в одной из двух гомологичных хромосом, то есть они будут гетерозиготны по введенному гену. Для основания трансгенной линии надо получить поколение F2, скрещивая животных F1 между собой. Остается последний этап работы – анализ гомозигот из поколения F2 на активность трансгена. На этом этапе определяют, экспрессируется ли трансген и является ли эта экспрессия специфической, то есть идет ли она в тех органах и тканях, где ее и предполагалось получить. Если конструкция несла промотор одного из белков молока и предполагалась экспрессия трансгена в клетках молочной железы, то встает еще один вопрос: выделяется ли трансгенный белок в молоко? Когда наконец в результате долгого и сложного пути получены животные, отвечающие всем этим требованиям, можно считать, что работа по созданию линии трансгенных животных

завершена. Теперь их можно размножать, скрещивая между собой – все их потомки наследуют чужеродный ген.

2) **использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК).** Метод позволяет еще на этапе работы с культурой ЭСК проанализировать как встраивание трансгена в геном клетки, так и количество встроившихся копий, а иногда и проверить экспрессию введенного трансгена, что дает возможность выбрать линию ЭСК с наилучшими свойствами. Часть этих клеток можно заморозить в жидком азоте и хранить многие годы для последующего создания трансгенных животных.

Впервые линия эмбриональных стволовых клеток была получена из бластоцист мыши Эвансом, Кауфманом и Мартином в 1981 году. Эти клетки являются полипотентными, то есть в культуре они могут дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков. У ЭСК не было обнаружено никаких хромосомных aberrаций – они сохраняли нормальный генотип соматических клеток. В 1984 году было показано, что ЭСК, введенные в полость бластоцисты, дают начало любым органам и тканям химерных мышей, включая и линию половых клеток, и наследуются потомками химерного животного. Наиболее трудоемким в этом методе является поддержание линии ЭСК в недифференцированном состоянии.

Линии ЭСК были получены из бластоцист многих млекопитающих: золотистый хомячок (1988), свинья (1990), овца (1990), корова (1992), кролик (1993), крыса (1994), норка (1992), обезьяна (1995) и даже человек (1994). Эта схема получения трансгенных животных выгодна еще и тем, что в этом случае используются не зиготы, как для микроинъекций, а бластоцисты, которые легко вымываются из половых путей самок крупных видов млекопитающих нехирургическим путем. Для всех видов сельскохозяйственных животных разработаны методики длительного хранения эмбрионов на стадии бластоцисты в жидком азоте и методы нехирургической трансплантации их суррогатным матерям.

Понятие о геном таргетинге. ЭСК открыли новые возможности для создания животных как с дополнительно введенными генами, так и с выключенными генами. Выключение у животного определенного гена называют геном нокаутом или геном таргетингом. В основе геном таргетинга лежит – гомологичная транслокация. Нормальный ген в ЭСК заменяется на "сломанную" копию, содержащую вставку – последовательность, кодирующую белок неоминотрансферазу. В результате такой транслокации в клетке происходят два события: во-первых, из-за вставки сдвигается рамка считывания и белок, который кодирует этим геном, не синтезируется, а во-вторых, экспрессия вставочного гена неоминотрансферазы делает клетку устойчивой к воздействию неоминина. При проведении нокаута в культуре ЭСК процент клеток с транслокацией очень низок, но только они выживают в селективной среде, содержащей антибиотик неоминин.

Практическое применение трансгенных животных

Трансгенные животные – биореакторы. Биореакторами называют организмы, продуценты лекарственных белков. Сегодня большая часть животных, выделяющих трансгенные продукты в молоко, – это мыши. Мыши с их коротким сроком беременности и роста – удобный объект для анализа экспрессии введенной генной конструкции, на них отработывают те методики, которые потом используют для получения крупных трансгенных животных. Вот далеко не полный список белков человека, уже полученных от трансгенных мышей, и их концентрация в молоке: $\alpha 1$ -антитрипсин (мг/мл), интерферон (нг/мл), фактор свертываемости крови IX (мкг/мл), сывороточный альбумин (мг/мл), трофобластин (мкг/мл), урокиназа (мг/мл), интерлейкин-2 (мкг/мл), супероксиддисмутаза (мг/мл), некоторые иммуноглобулины и многие другие белки. Список более крупных трансгенных млекопитающих, выделяющих продукт активности чужеродного белка в молоко, значительно короче: кролики – интерлейкин-2 (нг/мл) и тканевый активатор плазминогена (мкг/мл), овцы – $\alpha 1$ -антитрипсин (мг/мл) и фактор свертываемости крови IX (нг/мл), козы – тканевый активатор плазминогена (мкг/мл). Создание коров-биореакторов следует ожидать в ближайшие годы. В настоящее время активно ведутся работы по получению животных, продуцентов рекомбинантных иммуноглобулинов человека – они появятся в ближайшие годы, и область их применения почти безгранична.

Эффективность продукции трансгенных животных очень велика. При уровне продукции трансгена в 1 мг на мл молока (а сегодня это вполне реальный уровень) корова, производящая около 6 тыс. л молока в год, может произвести около 6 кг лекарственного белка. всю потребность в факторе VIII сможет обеспечить одна или две коровы-биореактора, а для получения фактора IX в количестве, достаточном для всех больных гемофилией в мире, необходимо всего лишь маленькое стадо из 15-20 трансгенных коров. Потребность медицины в других белках, получаемых из крови человека, больше. Так, для фибриногена это около 3 т. Такое количество сможет обеспечить стадо в 500 трансгенных коров – одна животноводческая ферма.

Создание животных – генетических моделей наследственных заболеваний человека. Многие болезни имеют наследственные причины. После того как обнаружен ген, предположительно ответственный за данное заболевание, могут быть созданы два типа модельных животных: мыши с функционирующим трансгеном и мыши с потерей функции данного гена. Первый тип – это классические трансгенные мыши, в геном которых введен ген человека, ответственный за конкретное заболевание. Если предрасположенность к заболеванию зависит от наличия в геноме одного из аллелей, то для проверки этой гипотезы создаются линии трансгенных мышей, несущих разные аллели данного гена. На этих моделях можно исследовать влияние количества копий гена и уровня его экспрессии на проявление заболевания, а также разрабатывать новые методы лечения. Второй тип модельных животных – это мыши, у которых выключен ген, аналогичный тому, который вызывает данное заболе-

вание у человека. На этой модели исследуют конкретные функции генов, что особенно важно для анализа причин мультигенных заболеваний.

Разработка методов генной терапии на основе изучения трансгенных животных. При этом используется соматическая трансфекция – метод, когда генетические конструкции вводятся в определенные клетки и ткани организма пациента. Как и все другие методы лечения, генотерапевтические методы разрабатываются и проходят испытания на модельных трансгенных животных.

Вопросы для контроля уровня усвоения материала:

1. Какие методы создания трансгенных животных вам известны?
2. Как осуществляют микроинъекцию чужеродной ДНК в оплодотворенную яйцеклетку?
3. В чем сущность метода использования эмбриональных стволовых клеток?
4. Что такое генный таргетинг?
5. Каково практическое применение трансгенных животных?

Задания для проверки уровня усвоения материала.

Ситуационные задачи

ЗАДАНИЕ 1. *Заполните пропуски в следующих утверждениях.*

А. Фермент, ответственный за синтез ДНК как при репликации, так и при репарации, называется – _____.

Б. Активный участок хромосомы, участвующий в репликации, представляет собой Y-образную структуру, называемую - ____.

В. У *E. coli* новосинтезированная ДНК кратковременно обнаруживается в молекулах длиной 1000-2000 нуклеотидов, называемых - ____.

Г. Фермент, который сшивает разрывы в ДНК во время синтеза ДНК или ее репарации, называется – _____.

Д. Та дочерняя цепь ДНК, которая при репликации синтезируется непрерывно, называется - ____, а та цепь, которая синтезируется с перерывами, - _____.

Е. Для ДНК-полимеразы в отличие от РНК-полимеразы совершенно необходим свободный 3'-ОН-конец - ____, спаренной с расплетенной ДНК, чтобы присоединять к нему новые нуклеотиды.

Ж. Если ДНК-полимераза ошибочно присоединит неправильный нуклеотид к 3'-концу, ее отдельный каталитически активный домен, обладающий (3' - 5')- _____ активностью, удалит неподходящее основание.

З. Для инициации синтеза ДНК на отстающей цепи нужны короткие праймеры, возникающие благодаря работе фермента ____, которая в качестве субстратов использует рибонуклеозидтрифосфаты.

И. Расплетание двойной спирали ДНК в зоне репликативной вилки катализируется ____, использующей для направленного движения по ДНК энергию гидролиза АТФ.

К. Способствующие расплетанию ДНК ____ связываются с одноцепочечной ДНК таким образом, что основания становятся доступными для реакции матричного синтеза.

Л. Если ДНК-полимераза ошибается при образовании пары оснований, соединенных друг с другом водородными связями, то ошибка исправляется специальной системой ____ (репарации повреждений), которая отличает новые цепи от старых по признаку метилирования.

М. Для бактерий и некоторых вирусов, инфицирующих эукариотические клетки, было показано, что репликационные глазки образуются в тех участках молекулы ДНК, где находятся специальные последовательности, называемые ____.

Н. ____ можно рассматривать как «обратимые нуклеазы», которые создают либо кратковременный одноцепочечный разрыв (тип I), либо кратковременный двухцепочечный разрыв (тип II).

ЗАДАНИЕ 2. Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

А. У *E. coli* репликативная вилка продвигается вперед со скоростью 500 п. н. в секунду, а цепи ДНК перед вилкой вращаются с круговой скоростью почти 3000 об/мин.

Б. Полуконсервативная репликация означает, что родительские цепи ДНК служат матрицами для синтеза новых, дочерних, цепей ДНК, так что новые двухцепочечные молекулы ДНК оказываются составленными из одной старой и одной новой цепи.

В. При считывании в том же направлении (от 5'- к 3'-концу) последовательность нуклеотидов новосинтезированной цепи ДНК получается такой же, как в родительской матричной цепи.

Г. Синтез ДНК в направлении от 5'- к 3'-концу означает, что удлинение цепи происходит за счет присоединения дезоксинуклеозидтрифосфатов к свободной 3'-ОН-группе (с отщеплением пирофосфата).

Д. Синтез ДНК происходит в направлении от 5'- к 3'-концу на ведущей цепи и в направлении от 3'- к 5'-концу на отстающей цепи.

Е. Если бы полимеризация ДНК происходила в направлении от 3'-5', то растущий конец цепи заканчивался бы 5'-трифосфатом или в качестве предшественников должны были бы использоваться 3'-дезоксинуклеозидтрифосфаты.

Ж. При утрате ДНК-полимеразой *E. coli* (3'-5')-экзонуклеазной активности должна уменьшиться скорость синтеза ДНК, но не его точность.

З. Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК в репликативной вилке, держат две цепи ДНК разделенными, закрывая собой основания и предотвращая тем самым их спаривание друг с другом.

И. У *E. coli* репаративная система, исправляющая неправильное спаривание оснований и зависящая от их метилирования, может различать родительскую и дочернюю цепи ДНК, когда одна или обе цепи метилированы, но не может этого делать, если обе цепи не метилированы.

К. У *E. coli* и у вирусов, инфицирующих эукариотические клетки, новые циклы репликации ДНК начинаются со специфического участка, часто содержащего несколько копий короткой последовательности, с которой связывается комплекс белков, участвующих в инициации процесса.

Л. Для разрыва и сшивки заново цепей ДНК ферментом топоизомеразой I не нужен АТФ, потому что энергия фосфодиэфирной связи временно накапливается в ковалентной связи фосфотиозина в активном центре фермента.

М. В клетках дрожжей, мутантных по топоизомеразе II, ДНК может реплицироваться, но хромосомы не могут разделяться в процессе митоза.

ЗАДАНИЕ 3. *Фрагмент ДНК, изображенный на рис. 1, является двухцепочечным на концах и одноцепочечным в середине. Для верхней цепи указана полярность.*

А.. На каком конце фрагмента, 5' или 3', находится указанный на нижней цепи остаток фосфата (Р)?

Б. Каким способом, по вашему мнению, будет заполняться с помощью репаративных внутриклеточных процессов разрыв в цепи ДНК?

В. Сколько фрагментов будет содержаться в нижней цепи (рис. 1), если разрыв в ней заполняется (в условиях реакции в пробирке) при наличии в среде только дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и ДНК-полимеразы?

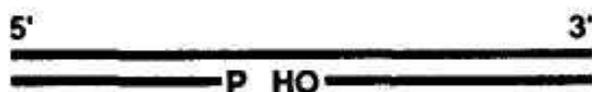


Рис. 1. Фрагмент ДНК с одноцепочечным участком, образовавшимся вследствие разрыва в нижней цепи.

ЗАДАНИЕ 4. *Важный подход к изучению репликации ДНК - это применение электронной микроскопии, благодаря которой можно непосред-*

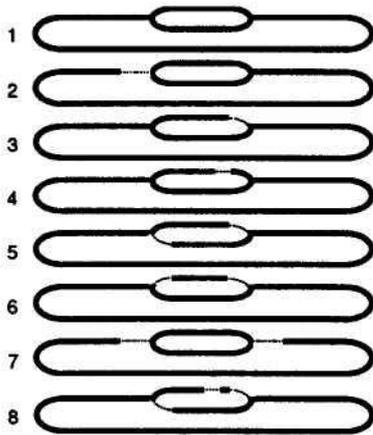


Рис. 2. Гипотетические структуры реплицирующихся молекул.

ственно наблюдать репликативную вилку, а на мелких молекулах ДНК можно видеть всю реплицирующуюся структуру. Кроме того, при использовании специальных методов приготовления образцов можно отличать двухцепочечную ДНК от одноцепочечной.

На рис. 2 изображен ряд гипотетических реплицирующихся молекул с участками одноцепочечной ДНК, показанными тонкими линиями. В одном раннем и очень важном электронно-микроскопическом исследовании репликации у бактериофага лямбда некоторые из этих структур были действительно обнаружены и встречались часто, а другие никогда не наблюдались.

А. Нарисуйте схематически репликационную структуру с двумя вилками, смещающимися в противоположных направлениях. Пометьте концы всех цепей (5' или 3') и укажите лидирующую и отстающую цепи в каждой репликативной вилке.

Б. На основе своих знаний по репликации ДНК укажите четыре структуры на рис. 2, которые наблюдались наиболее часто.

ЗАДАНИЕ 5. ДНК-полимераза I обладает кроме своей полимеразной активности еще и (3' - 5')-экзонуклеазной активностью. Эта активность проявляется во время коррекции для удаления неправильно спаренных оснований с конца новосинтезированной цепи ДНК. Чтобы определить эту активность, необходимо приготовить искусственный субстрат с одной поли(dA)-цепью и одной поли(dT)-цепью, который содержит на 3'-конце несколько остатков dT, меченных ^{32}P , за которыми следует несколько остатков dC, меченных ^3H , как показано на рис. 3. Вы измеряете потерю меченых остатков dT и dC в отсутствие dTTP, когда синтез ДНК невозможен, и в присутствии dTTP, когда синтез ДНК может происходить. Соответствующие результаты представлены на рис. 4.

- А. Для чего остатки Т и С поместили разными изотопами?
- Б. Почему отщепление Т-остатков в отсутствие dТТР требует больше времени, чем отщепление С-остатков?
- В. Почему в присутствии dТТР отщепления Т-остатков не происходит, а С-остатки отщепляются независимо от того, есть ли в реакционной смеси dТТР?
- Г. Можно ли ожидать изменения результатов, представленных на рис. 4, Б, если добавить dСТР и dТТР?



Рис. 3. Искусственный субстрат для изучения процесса коррекции, осуществляемого ДНК-полимеразой I у *E. coli*. Выделенными буквами обозначены нуклеотиды с радиоактивной меткой.

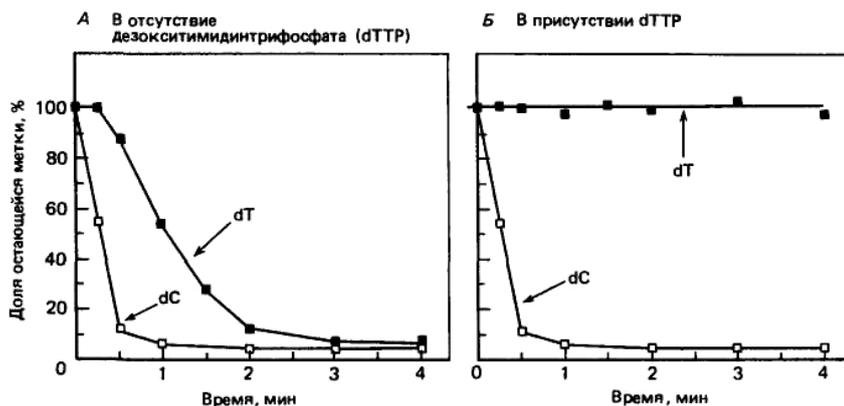


Рис. 4. Коррекция ДНК-полимеразой I в отсутствие (А) и в присутствии (Б) dТТР.

ЗАДАНИЕ 6. Где образуется РНК-затравка, на специфических или на случайных участках матрицы? Идеальной матрицей при изучении этого вопроса может служить ДНК вируса М13, потому что она не содержит 3'-ОН-группы.

Для ответа на данный вопрос кольцевую ДНК этого вируса полностью копировали в присутствии ДНК-полимеразы бактериофага Т4, праймосомы Т4 (комплекс геликазы и РНК-праймазы), различных rNTP (рибонуклеозидтрифосфатов) и dNTP (дезоксирибонуклеозидтрифосфатов). Затем двухцепочечные кольцевые продукты обрабатывали рестриктазой, которая расщепляет двойную цепь в специфическом участке. Продукты этого расщепления подвергали денатурации, после чего анализировали последо-

вательность нуклеотидов ДНК методом гель-электрофореза с высоким разрешением. Было обнаружено много отдельных полос. Если продукты расщепления до электрофореза обрабатывали РНКазой, то все они становились на пять нуклеотидов короче, о чем свидетельствовала более быстрая миграция их в секвенирующем геле.

Зная, что каждый продукт рестрикции заканчивается специфическим участком рестрикции, можно было по длине продукта установить матричную последовательность вблизи 5'-конца. (Полная последовательность M13 известна.) Некоторые из этих матричных последовательностей показаны на рис. 5 слева. Последовательность ДНК на каждом из соответствующих 5'-концов цепей продуктов была определена после удаления РНК-затравки. Эти последовательности показаны на рис. 5, справа, в той же строчке, что и комплементарная последовательность матричной ДНК.

Определите на основе этих данных стартовый участок для РНК-затравки на каждой матричной последовательности. Какой сигнал нужен для начала реакции, катализируемой РНК-праймазой?

| Сайт | Матричные последовательности M13 | | Последовательности ДНК, связанные с РНК-затравкой | |
|------|----------------------------------|----|---|----|
| | 5' | 3' | 5' | 3' |
| 1 | A T C C T T G C G T T G A A A T | | A G G A T | |
| 2 | T C T T G T T T G C T C C A G A | | C A A G A | |
| 3 | A T T C T C T T G T T T G C T C | | A G A A T | |
| 4 | A C A T G C T A G T T T T A C G | | C A T G T | |
| 5 | A T T G A C A T G C T A G T T T | | T C A A T | |
| 6 | A T C T T C C T G T T T T T G G | | A A G A T | |
| 7 | A A A T A T T T G C T T A T A C | | T A T T T | |
| 8 | C T A G A A C G G T T A C C C T | | T C T A G | |

Рис. 5. Матричные последовательности M13 (слева) и соответствующие последовательности ДНК, образуемые в каждом сайте (справа) во время синтеза РНК-затравки. РНК-затравки были отделены от этих цепей ДНК перед секвенированием.

ЗАДАНИЕ 7. Ген *dnaB* у *E. coli* кодирует геликазу, которая участвует в расплетании ДНК на участке репликативной вилки. Свойства этого фермента были изучены с использованием искусственных субстратов, подобных тем, которые изображены на рис. 7. Экспериментальный подход заключался в том, что субстраты инкубировали в разных условиях и затем исследовали образцы методом электрофореза в агарозных гелях. Короткая одиночная цепь будет двигаться медленно, если она еще соединена с длинной цепью ДНК, и будет двигаться гораздо быстрее, если она расплетена и отделена от длинной цепи. Введя в короткую одиночную цепь радиоактивную метку, можно избирательно следить за ее миграцией, определяя ее положение в геле методом радиоавтографии.

Результаты нескольких экспериментов показаны на рис. 8. Субстрат 1, представляющий собой гибридную ДНК без «хвостов», не расплетался с помощью *dnaB* (рис. 8, дорожки 1 и 2). Однако когда инкубировали субстраты с «хвостами» при + 37 °С в присутствии *dnaB* и АТФ, то за счет расплетания освобождалось значительное количество мелких фрагментов (дорожки 6 и 10). В случае субстрата 3 был раскручен только 3'-полуфрагмент (дорожка 10). Процесс расплетания во всех случаях полностью зависел от гидролиза АТФ.

Расплетание существенно увеличивалось при добавлении белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК, (*SSB*-белок) (сравните дорожки 5 и 6 с 9 и 10). Интересно, что этот белок нужно было добавлять приблизительно через 3 мин после *dnaB*, в противном случае он ингибировал расплетание.

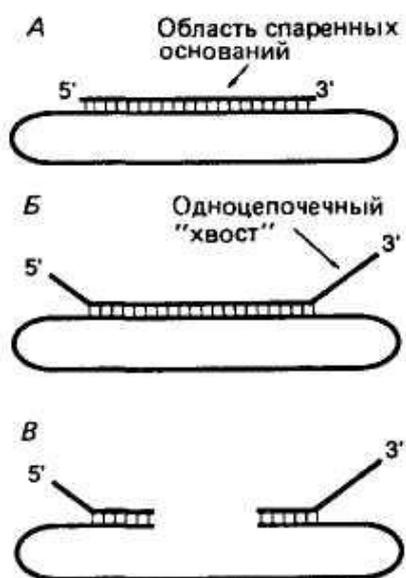


Рис. 7. Субстраты, использованные для определения свойств *dnaB*. А-субстрат 1, Б-субстрат 2, В-субстрат 3.

А. Почему для расплетания нужен гидролиз АТФ?

Б. В каком направлении движется *dnaB* по длинной одноцепочечной ДНК? С чем больше согласуется это направление, с движением по ведущей цепи или по отстающей цепи в репликативной вилке?

В. Почему белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (*SSB*), мог ингибировать расплетание, когда его добавляли до *dnaB*, но стимулировал расплетание, когда его добавляли после *dnaB*?

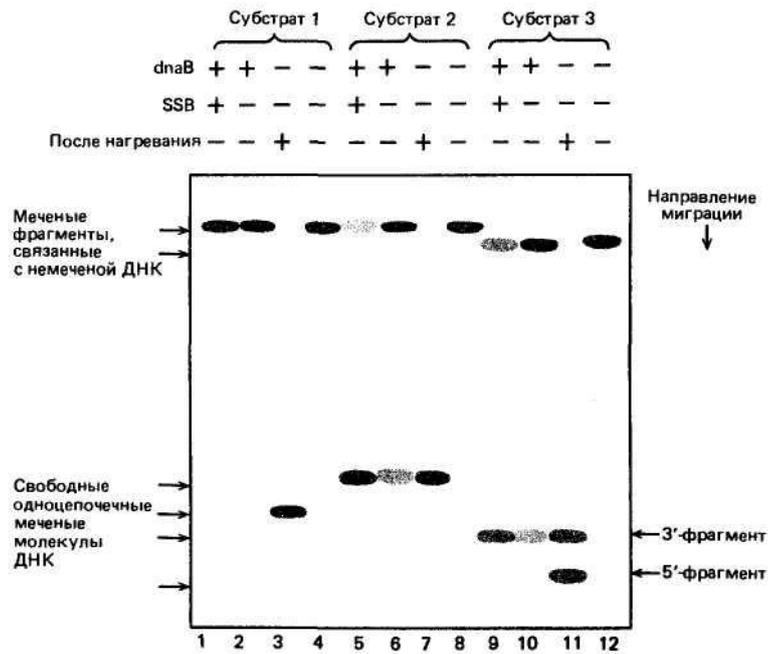


Рис. 8. Результаты нескольких экспериментов по измерению расплетания с участием dnaB. Радиоактивная метка содержалась только в одноцепочечных фрагментах, положение которых показано на схеме.

Литература:

1. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: Учеб. Пособие для высш. пед. учеб. Заведений. – М.: Изд. Центр «Академия», 2005. – 208 с.
2. Коницев А.С., Севостьянова Г.А. Молекулярная биология: Учеб. Для студ. пед. вузов. – М. : Изд. Центр «Академия», 2005. – 400 с.
3. Щелкунов С.М. Генетическая инженерия: Учеб.-справ. Пособие. – Новосибирск: Сиб. Унив. Изд-во, 2004. – 496 с.
4. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. – М.: Мир, 1993.