## Конструирование, клонирование и отбор рекомбинантных молекул ДНК

Рассмотрим процесс получения клонированных ДНК. На первом этапе готовят фрагменты ДНК, пригодные для последующего лигирования с векторной молекулой. Следующий этап состоит в самом лигировании. Эти процессы осуществляются in vitro. Далее рекомбинантные молекулы вводят в клетки, где они амплифицируются путем репликации. Затем проводят клонирование, отбор и дальнейшую амплификацию.

## Вставки

а. Общие положения

При конструировании рекомбинантных молекул обычно используют сложные смеси потенциальных вставок, и в результате образуется целый набор клонов, из которого путем скрининга и отбора получают нужные рекомбинантные молекулы. Скрининг и отбор можно значительно упростить, если обогатить исходную смесь нужным сегментом; в этом случае для выявления искомого рекомбинанта приходится проверять значительно меньше рекомбинантных клонов. С одной стороны, для конструирования рекомбинантных ДНК можно использовать очищенные фрагменты ДНК, а с другой - само молекулярное клонирование является наиболее простым и эффективным способом очистки фрагментов. Клонирование представляет собой также наиболее эффективный способ получения большинства фрагментов геномной ДНК в значительных количествах.

Существует три источника вставок для клонирования:

1) геномная ДНК, фрагментированная либо с помощью рестриктирующих эндонуклеаз, либо физическими методами, например с помощью ультразвука;

2) синтетические фрагменты ДНК, полученные химическим или ферментативным методом либо путем объединения этих двух методов;

3) сегменты ДНК, полученные с помощью ферментативного копирования РНК-матрицы in vitro. При расщеплении ДНК эндонуклеазами часто образуются фрагменты, способные к непосредственному лигированию с подходящими липкими или тупыми концами вектора. В других случаях соответствующие концы присоединяют к фрагментам перед лигированием.

б. Вставки геномной ДНК

Эндонуклеазное расщепление. Наиболее прямой способ получения вставок состоит в расщеплении суммарной геномной ДНК какого-либо организма или вируса с помощью рестриктирующей эндонуклеазы. Метод отличается высокой воспроизводимостью: специфический фермент разрезает данную ДНК с образованием уникального набора фрагментов. Если при эндонуклеазном расщеплении образуются липкие концы, соответствующие концам векторной молекулы, то клонирование осуществляют сразу или после обогащения популяции фрагментами для получения нужной вставки.

Обогащение смеси нужными фрагментами. Для эффективного разделения сложных смесей фрагментов используют два метода: электрофорез в полужидкой среде и жидкостную хроматографию высокого разрешения с обращенной фазой. Однако ни один из этих методов не позволяет получить фрагменты в чистом виде. Обычно препараты содержат примеси других фрагментов, имеющих близкую длину или обладающих такой же способностью к элюции. Тем не менее можно получить значительное обогащение смеси в отношении нужного фрагмента, что облегчает его выявление в большой коллекции клонов.

При электрофорезе и хроматографии разделение фрагментов ДНК основывается на их различии по размеру и нуклеотидному составу. Если размер генома невелик, то образуется относительно небольшое число хорошо разделяющихся фрагментов; их легко выделить, собрав нужные фракции элюата с хроматографической колонки или вырезав кусочки агарозного геля. Однако если расщепляется крупный геном, то хорошо отделяются лишь некоторые фрагменты. Чаще получается непрерывный набор фрагментов всевозможных размеров. Чтобы понять, в чем тут дело, проведем простой расчет. Типичный гаплоидный геном млекопитающих содержит примерно 3\*109 п. н. Грубую оценку числа фрагментов, образующихся при исчерпывающем расщеплении эндонуклеазой, можно получить, разделив размер генома на предполагаемое среднее расстояние между двумя соседними сайтами для данной рестриктирующей эндонуклеазы. Для фермента, узнающего участок из шести пар оснований, среднее расстояние между сайтами будет равно 46 п. н. Если размер сайта узнавания равен четырем парам нуклеотидов, то он будет встречаться примерно один раз на каждые 44 п. н. При расщеплении ДНК млекопитающих ферментами, которые разрезают молекулу по сайтам узнавания длиной шесть пар нуклеотидов, образуется примерно 7\*105 уникальных фрагментов, а ферментом, сайт узнавания которого составляет четыре пары нуклеотидов, - 12\*106 фрагментов. В результате получается непрерывное распределение фрагментов по длинам. При этом некоторые фрагменты вообще невозможно выявить, поскольку они представлены в очень малом количестве.

Идентификация специфических фрагментов. Проблемы, возникающие при идентификации фрагментов. При расщеплении примерно 50 мкг геномной ДНК и последующем электрофорезе препарата масса сегмента ДНК длиной 1000 п. н., встречающегося в геноме лишь один раз, составляет всего 17\*10-6 мкг, или 17 пг. Как идентифицировать этот специфический фрагмент? Если имеется гомологичная ДНК или препарат комплементарной РНК, которые можно использовать в качестве зонда при гибридизации, то интересующий нас фрагмент можно обнаружить при отжиге зонда с фрагментами после их денатурации. Так, в качестве зонда можно использовать очищенную мРНК, соответствующую гену, который мы хотим клонировать. Иногда в роли зонда выступает гомологичный ген, клонированный в другом организме и имеющий достаточно близкую структуру. Чтобы выявить гибрид, нужно использовать меченый зонд. Чаще всего его метят радиоактивным изотопом.

Определив примерный размер интересующего нас фрагмента, можно элюировать материал соответствующей области другого геля, не прошедшего гибридизацию, и использовать этот материал для клонирования. Аналогичным образом можно тестировать фракции после хроматографического разделения фрагментов на колонке.

Блоттинг. Почти во всех случаях, подобных описанным выше, ДНК перед гибридизацией переносят с геля на более подходящую подложку. Этот метод широко используется, например, для идентификации специфических РНК и белков после их электрофоретического разделения. Блоттинг ДНК назван по имени его изобретателя блоттингом по Саузерну; соответствующие методики для РНК и белков получили название нозерн-блоттинга и вестерн-блоттинга.

Гибридизация меченого зонда с фрагментами ДНК, находящимися в геле, происходит очень неэффективно. Поэтому перед отжигом фрагменты переносят из геля на более подходящую твердую подложку, обычно на нитроцеллюлозный фильтр или нейлон. Сначала гель обрабатывают щелочью, чтобы произошла денатурация ДНК. Затем на него накладывают твердую подложку и пропускают через гель буферный раствор. В результате фрагменты ДНК переходят на подложку с сохранением их взаимного расположения. Далее инкубируют подложку в растворе, содержащем 32Р-зонд, при такой ионной силе и температуре, которые обеспечивают образование водородных связей между зондом и комплементарным фрагментом ДНК. Чувствительность метода зависит от удельной радиоактивности зонда и позволяет зарегистрировать фрагменты, когда их количество измеряется пикограммами. Например, 32Р-меченные зонды, полученные с помощью ник-трансляции, имеют удельную радиоактивность более 100 имп. /мин на 1 пг, что достаточно для визуализации радиоавтографов.

Случайная фрагментация геномной ДНК. Длинные молекулы ДНК легко ломаются даже при незначительных гидродинамических напряжениях, и их можно подвергнуть случайной фрагментации с помощью ультразвука, путем быстрого перемешивания раствора или пропускания его через небольшое отверстие. Для получения случайного набора перекрывающихся фрагментов можно использовать и рестриктирующие эндонуклеазы, если проводить опыт в таких условиях, когда расщепление происходит лишь в небольшом числе имеющихся сайтов. Средний размер образующихся фрагментов зависит от величины прикладываемого усилия и от концентрации эндонуклеазы. Обычно ДНК выделяют из большой популяции клеток, поэтому исходные ее препараты всегда представлены большим числом идентичных геномов. Каждый сегмент ДНК присутствует в конечном наборе во фрагментах разных размеров, что не позволяет очистить его перед клонированием. Тем не менее, случайные наборы фрагментов имеют преимущество перед наборами, получаемыми в результате полного гидролиза рестриктирующей эндонуклеазой, поскольку вероятность нахождения хотя бы одной копии нужного сегмента целиком в одном фрагменте у них значительно выше.

Вырезание определенных сегментов хромосом. Если положение данного гена в хромосоме известно и хромосома достаточно велика, чтобы проводить с ней различные манипуляции, можно выщепить ее часть, которая содержит нужный ген. Этим требованиям удовлетворяют политенные хромосомы слюнных желез Drosophila. Каждая такая хромосома содержит более 1000 копий ДНК, расположенных параллельно друг другу, так что небольшой сегмент может включать 1000 копий определенного гена. Генетические и цитогенетические исследования позволили более или менее точно установить положение многих генов Drosophila. Используя фазово-контрастную микроскопию, можно локализовать область хромосомы, содержащую определенный ген, и вырезать ее тонкой иглой. Таким методом получают сегменты генома длиной около 200 т.п. н., которые далее разрезают рестриктирующими эндонуклеазами и включают в векторные молекулы. Достигаемое при этом обогащение весьма значительно, поскольку на долю 200 т.п. н. приходится лишь около 0,1% от 1,8\*108 п. н., составляющих весь геном.

в. Синтетические вставки

Успехи, достигнутые в создании методов химического синтеза, позволили синтезировать из простых нуклеозидов молекулы ДНК длиной до 50 остатков. Такие молекулы, которые трудно получить другим путем, можно затем клонировать и выделить в больших количествах. Например, скрининг определенного гена может оказаться невозможным в отсутствие соответствующего зонда. Однако такой ген можно синтезировать in vitro, если исходя из аминокислотной последовательности соответствующего полипептида установить нуклеотидную последовательность. Именно таким способом были впервые клонированы в клетках Е. coli сегменты, кодирующие гормоны соматостатин и инсулин. Эти сегменты получали, синтезируя отдельные олигонуклеотидные блоки и объединяя их затем при помощи ДНК-лигазы. Было синтезировано восемь коротких одноцепочечных фрагментов ДНК. Их отжигали и получали двухцепочечные молекулы, стабилизированные водородными связями, образующимися между комплементарными концевыми последовательностями. Поскольку все синтетические продукты имели на 5'-концах гидроксильные группы, перед лигированием концы фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы и АТР. Соответствующие фосфатные группы окрашены. Впоследствии из 66 коротких синтетических фрагментов был воссоздан ген инсулина длиной 514 п. н. Следует отметить, что в связи с вырожденностью генетического кода установление истинной нуклеотидной последовательности гена исходя из известной последовательности аминокислотных остатков в соответствующем полипептиде оказывается невозможным. Тем не менее, удалось определить и синтезировать функциональную кодирующую последовательность.

Синтезировать нуклеотидную последовательность целого гена очень трудно. Однако большую ценность представляет синтез даже коротких участков кодирующей последовательности, поскольку в отсутствие других зондов участки длиной 15-20 нуклеотидов можно использовать в качестве специфических зондов при гибридизации. Синтетические зонды используются при саузерн - и нозерн-гибридизации, а также для скрининга рекомбинантных клонов. Кроме того, короткие синтетические последовательности применяются в качестве праймеров при определении нуклеотидных последовательностей длинных сегментов ДНК, а также при ферментативном синтезе ДНК на молекулах РНК с помощью обратной транскриптазы. Другой важной областью применения описанной технологии синтеза является получение коротких сегментов ДНК, содержащих сайты узнавания для известных рестриктирующих эндонуклеаз. Такие сегменты-линкеры лигируют с тупыми концами фрагментов ДНК, встраиваемых в векторные молекулы.

Химический синтез полидезоксинуклеотидов. Для химического синтеза полидезоксинуклеотидов широко применяют два метода. В обоих случаях исходными строительными блоками являются дезоксирибонуклеозиды, и оба метода включают этап связывания мононуклеотидов и олигонуклеотидов. Методы полностью автоматизированы; при этом используется установка "Синтезатор ДНК".

Независимо от метода первым условием является защита тех реакционноспособных групп дезоксинуклеозидов, которые не участвуют в связывании. Так, аминогруппы дезоксиаденозина и дезоксицитозина обычно бензоилируют, а к аминогруппе гуанозина присоединяют остаток изомасляной кислоты. Тимидин, у которого аминогруппа отсутствует, используется немодифицированным.5'-гидроксильные группы обычно защищают путем образования эфирной связи с 4,4'-диметокситрифе-нилметильным соединением, которое называют диметокситритилом, или сокращенно 2Тг. По завершении синтеза все присоединенные группы должны быть удалены. Свободные аминогруппы восстанавливаются при мягком щелочном гидролизе аминоацильных единиц, а диметокситритильные группы удаляются с помощью мягкого кислотного гидролиза.

Фосфаттриэфирный метод. Нуклеозид с присоединенной диметокситритильной группой можно без каких-либо дополнительных модификаций использовать для синтеза фосфодиэфира путем присоединения к З'-ОН-группе, например, и-хлорфенилфосфордихлоридата. Этот диэфир может служить прямым предшественником 5'-конца новой цепи. Далее такой диэфир превращается в триэфир с помощью, например, р-цианоэтанола. Затем 5'-диметокситритиль-ная группа удаляется путем мягкого кислотного гидролиза, в результате чего образуется реакционноспособная 5'-гидроксильная группа. Диэфир и триэфир смешивают в присутствии реагентов, стимулирующих их связывание, обычно арилсульфониловых соединений, например триизопропилбензолсульфонилхлорида. Точный механизм связывания неизвестен. Продуктом реакции является полностью защищенный динуклеотид. При удалении всех защищающих групп образуется простой динуклеозидмонофосфат. Существенно, что полностью защищенный динуклеотид является хорошим исходным продуктом для создания более крупных молекул. При обработке кислотой или ZnBr2 диметокситритиловая группа удаляется и динуклеотид может играть роль З'-конца растущей цепи. При обработке же триэтиламином преимущественно гидролизуется цианоэтиловый эфир, в результате чего динуклеотид приобретает реакционноспособный 3'-конец, который может служить 5'-концом удлиняющейся цепи. Связывание двух динуклеотидов дает тетрануклео-тид. Аналогично соответствующим образом защищенные мононуклеотиды и олигонуклеотиды могут соединяться в длинные блоки. В зависимости от выбора исходного материала синтез цепей ДНК идет в направлении 3'->5' или 5'->3'.

Фосфаттриэфирный метод можно упростить и процесс синтеза ускорить, если фиксировать один из концевых нуклеотидов с помощью гидроксильной группы на твердом носителе. В принципе фиксирована может быть любая гидроксильная группа, но обычно реакция идет лучше, если закреплен 3'-гидроксил. Обычно фиксация осуществляется путем образования эфирной связи между 3'-ОН-группой и карбоксильной группой на носителе, например на пористом стеклянном шарике. В этом случае первый нуклеотид оказывается фиксированным, а 3'-ОН-группа - защищенной. Далее последовательно добавляются нуклеотиды или олигонуклеотиды с 5'-ОН-группами, защищенными диметокситритилом. Перед каждым следующим этапом присоединения диметокситритил удаляется, в результате чего образуется свободная 5'-ОН-группа, по которой может происходить дальнейшее наращивание цепи. По окончании синтеза полидезоксинуклеотид отсоединяют от носителя с помощью щелочного гидролиза. При такой процедуре синтеза не нужно проводить дополнительную очистку после каждого акта наращивания цепи, как при других способах. Метод с использованием фиксации на носителе был автоматизирован, при этом синтез полимера длиной 10-20 нуклеотид занимал несколько суток.

Фосфиттриэфирный метод. Основным исходным продуктом в этом случае тоже являются дезоксинуклеозиды с защищенными аминогруппами и 5'-диметокситритило-вой группой.3'-гидроксильная группа концевого нуклеозида защищена путем фиксации ее на твердом носителе с помощью эфирной связи. Предшественником следующего остатка является защищенный дезоксинуклеозид-З'-фосфорамидит, который активируется с помощью тетразола. Скорость процесса и его эффективность зависят от фосфорамидитов, стабильных и эффективно связывающихся, легко синтезируемых агентов. Промежуточным продуктом реакции связывания является фосфит. Он окисляется до фосфата с помощью йода. Как и в предыдущем случае, триэфир защищает новую межнуклеотидную связь от гидролиза во время последующих этапов синтеза. По завершении синтеза цепи удаляют различные защищающие группы и освобождают полидезоксинуклеотид от твердого носителя с помощью щелочного гидролиза. Фосфитный метод с твердыми носителями, полученными на основе силикагелей, применяют при автоматизированном последовательном синтезе олигодезоксири-бонуклеотидов. Присоединение каждого нуклеотидного остатка занимает менее 15 мин, при этом могут синтезироваться цепи длиной до 50 остатков с хорошим выходом.

Ферментативные методы. Ферментативный синтез коротких полидезоксирибонуклеотидов с заданной последовательностью представляется менее сложным, чем химический синтез, и соответствующие процедуры более просты в исполнении. Для ферментативного синтеза не нужно использовать защитные соединения. Однако реакции имеют свои ограничения и с трудом поддаются контролю. При синтезе используется бактериальный фермент полинуклеотидфосфорилаза, специфичный в отношении рибонуклеотидов, но способный катализировать и полимеризацию дезоксирибонуклеотидов, если вместо Mg2+ использовать Мп2+. Субстратами всегда служат дезоксирибонуклеозидфосфаты, при этом никакой матрицы не требуется. К праймерам длиной не менее трех остатков присоединяются за один раз один или два дезоксирибонуклеотидных остатка. Химический и ферментативный методы: могут применяться совместно. При этом используется либо ДНК-полимераза I, либо обратная транскриптаза.

г. Копирование РНК с образованием ДНК

Методы, использующиеся для анализа РНК, менее совершенны, чем аналогичные методы исследования ДНК. Чтобы определить первичную структуру молекулы РНК, проще всего получить с нее ДНК-копию, клонировать эту копию и определить ее нуклеотидную последовательность. Молекулы ДНК, синтезируемые путем ферментативного копирования РНК-матрицы, получили название кДНК. В качестве матриц могут использоваться очищенные РНК или смесь молекул РНК, например мРНК из какой-либо ткани или популяции клеток.

Хорошим источником РНК являются высоко дифференцированные ткани и клетки, продуцирующие в большом количестве определенные мРНК. Например, в первых успешных работах по исследованию семейства овальбуминовых генов, в которых была применена техника работы с рекомбинантными молекулами ДНК, использовали мРНК, выделенную из специализированных клеток, синтезирующих в большом количестве определенные белки. Клонированные кДНК использовались в качестве зондов для выделения соответствующих генов.

Копирование эукариотической мРНК. На первом этапе последовательность мРНК копируют с помощью обратной транскриптазы и получают комплементарную одноцепочечную ДНК. РНК служит матрицей, а в качестве праймера используется короткая последовательность oligo, комплементарно спаренная с oligo на конце РНК. На втором этапе осуществляют деградацию РНК-матрицы либо с помощью рибонуклеазы, либо путем щелочного гидролиза. Затем используют одноцепочечную кДНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы I или обратной транскриптазы. На этом этапе праймер не нужен, поскольку на 3'-конце первой структуры временно образуется шпилька варьирующей длины, которая и служит праймером. На последнем этапе эту шпильку разрезают с помощью нуклеазы, специфичной в отношении одноцепочечной ДНК, и получают дуплексную кДНК.

Копирование других РНК. Для получения кДНК на основе геномов некоторых РНК-содержащих вирусов или других молекул РНК, не имеющих на конце oligo, необходимы некоторые ухищрения. В частности, к 3'-ОН-концу РНК можно присоединить участок poly, используя ро1у-полимеразу и АТР. Далее всю последовательность реакций можно проводить так же, как и раньше. Альтернативный подход состоит в отжиге с данной

РНК олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного какому-либо участку молекулы, для образования праймера.

Осложнения. На практике же на каждом этапе, начиная с приготовления очищенного препарата мРНК, возникают сложности, в результате чего конечный продукт обычно представляет собой смесь молекул кДНК, большинство из которых оказываются более короткими, чем полноразмерная РНК. Перечислим некоторые из возникающих проблем.

1. мРНК может частично деградировать при выделении под действием рибонуклеаз.

2. мРНК может копироваться неполностью, в результате чего на 5'-конце кДНК будет недоставать каких-то последовательностей. Чем длиннее молекула РНК, тем больше вероятность, что эта проблема возникнет.

3. Синтез второй цепи ДНК может остановиться прежде, чем кончится матрица, так что З'-конец РНК будет пропущен. Оставшийся конец первой цепи будет удален с помощью нуклеазы, специфичной в отношении одноцепочечных молекул.

4. Нуклеаза может отщепить не только шпильку, но и концы дуплекса.

Все это, а также тот факт, что даже высоко очищенные препараты РНК никогда не бывают абсолютно гомогенными, приводит к тому, что препараты двухцепочечных молекул кДНК всегда представляют собой смесь разных молекул. Разделить такие смеси невозможно ни физическими, ни химическими методами. Однако с помощью молекулярного клонирования кДНК удается получить абсолютно чистые сегменты ДНК.

Серьезные проблемы, возникшие при синтезе полноразмерных копий кДНК на РНК-матрицах с помощью стандартных методов, определили неудачу многих экспериментов. Чтобы решить эти проблемы, пришлось затратить много усилий. Один из путей состоял в отказе от использования нуклеа-зы. В этом случае к З'-концу первой цепи ДНК с помощью терминальной дезоксинуклеотидил-трансферазы присоединяли poly и использовали о%о-праймер для синтеза второй цепи.

Метод, в котором устранен главный недостаток, свойственный стандартному методу, - синтез неполных копий РНК. Во-первых, oligo-праймер включается в состав плазмидного вектора Е. coli, так что кДНК может синтезироваться непосредственно на векторе. В результате исключаются этапы выделения и лигирования. Во-вторых, не применяется специфичная к одноцепочечной ДНК нуклеаза, благодаря чему последовательности, соответствующие З'-концу мРНК, не утрачиваются. В-третьих, молекулы ДНК, синтез которых не доходит до конца РНК-матрицы, содержат заглубленный З'-конец, который является неэффективным субстратом для терминирующей трансферазы. При таком подходе получают популяцию рекомбинантных ДНК, обогащенную полноразмерными копиями РНК в виде кДНК, способными осуществлять трансфекцию клеток-хозяев.

Немного модифицировав этот метод, можно получить плазмиды, содержащие молекулы кДНК в форме, способной экспрессироваться в клетках эукариот. Модификация состоит во включении эукариотического промотора и сигналов процессинга РНК в линкерный сегмент.

## Лигирование вектора со вставкой

После того как получены вектор и вставка, можно приступать к конструированию рекомбинантных ДНК. Обычно нужно осуществить только два двухцепочечных соединения независимо от того, представляет ли собой вектор линейную плазмиду или вирусный геном или два плеча ДНК фага X объединены в одну линейную молекулу по cos-сайтам. Если вставки имеют тупые концы, то перед лигированием для его облегчения к ним часто присоединяют липкие концы.

а. Соединение концов

Рассмотрим четыре возможные ситуации: вектор и вставка имеют полностью совпадающие липкие концы; две разные пары совпадающих

концов; тупые концы; пару совпадающих липких и пару тупых концов. Структура вектор-вставка, в которой каждый из компонентов содержит один липкий и один тупой концы, может образоваться только одним способом. То же самое относится к случаю, когда вектор и вставка имеют по два разных совпадающих липких конца. В тех же случаях, когда каждая молекула имеет два идентичных липких конца или два тупых конца, вставка может быть встроена в любой из двух возможных ориентации относительно вектора, в результате чего образуются два разных продукта. Липкие концы вектора и вставки соединяют с помощью ДНК-лигазы в условиях, способствующих образованию водородных связей между комплементарными участками. Для объединения тупых концов ДНК-лигаза Т4 и фрагменты должны присутствовать в высоких концентрациях, поскольку лигаза имеет низкое сродство к тупым концам.

Помимо лигирования вектора и вставки может происходить внутримолекулярное лигирование этих двух компонентов, в результате чего выход ре-комбинантных молекул снижается. Вероятность таких побочных реакций можно уменьшить, проводя перед лигированием дефосфорили-рование либо вектора, либо вставки. В отсутствие 5'-фосфомоноэфирных групп внутримолекулярное лигирование осуществляться не может. Обычно дефосфорилируют векторную молекулу, чтобы свести к минимуму ее способность к амплификации после трансфекции. Вставка, замкнувшаяся в кольцо, не способна к репликации, поэтому с ней возникает меньше проблем. Рекомбинантная молекула, образовавшаяся из дефосфорилированной векторной молекулы, содержит по одному пробелу в каждой из цепей. Такие молекулы легко репарируются в клетках соответствующих хозяев.

б. Присоединение липких концов

Встраивание сегментов ДНК в векторные молекулы облегчается, если эти сегменты и вектор имеют одинаковые липкие концы. Существуют два удобных способа образования липких концов у сегментов ДНК с тупыми концами: образование одноцепочечных "хвостов" и введение сайтов рестрикции.

Образование одноцепочечных "хвостов". Если с помощью терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы нарастить каждый из 3'-гидроксильных концов двухцепочечной вставки с тупыми концами и присоединить комплементарные нуклеотиды к концам линейной векторной ДНК, то при отжиге образуется кольцевая рекомбинантная молекула. Если размер "хвостов" одинаков, то концы легко сшиваются ДНК-лигазой. Однако такая ситуация встречается редко, поэтому перед лигированием бреши заполняют с помощью ДНК-полимеразы I. Напомним также, что для терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы требуются одноцепочечные З'-гидроксильные концы в качестве праймеров и что для эффективного наращивания дуплексных молекул ДНК с тупыми концами или молекул, у которых З'-гидроксильные концы заглублены, необходимы особые условия.

Введение сайтов рестрикции. Короткие фрагменты ДНК с тупыми концами, содержащие последовательности с сайтами для специфических рес-триктирующих эндонуклеаз, получают путем химического синтеза. Структуры двух таких "линкеров" и способ получения с их помощью липких концов у вставки с тупыми концами. Соединение линкера со вставкой катализируется Т4-лигазой. Затем эту ДНК обрабатывают соответствующей рестриктирующей эндонуклеазой, чтобы получить липкие концы. На этом последнем этапе возникают проблемы. Если фрагмент, к которому присоединены линкеры, содержит сайт узнавания для используемого фермента, то образование липких концов приводит к нарушению целостности фрагмента. Эту проблему можно решить двумя способами. Первый состоит в использовании другого линкера. Второй основан на защите внутренних сайтов путем метилирования с помощью метилазы, специфичной в отношении данного сайта.

Линкеры используют также для образования одинаковых липких концов у молекул вставки и вектора, имеющих разные липкие концы. Последние сначала превращают в тупые с помощью специфичной к одноцепочечным участкам нуклеазы или путем достройки заглубленных концов с помощью ДНК-полимеразы I или обратной транскриптазы, а затем присоединяют линкеры.

## Инфекция, трансфекция и клонирование

а. Перенос рекомбинантных молекул из пробирки в клетку

Сконструированные рекомбинантные молекулы ДНК вводят в клетки или вирусные частицы для клонирования и амплификации. Для разных систем хозяин-вектор применяются разные методы. Напомним, что рекомбинантные ДНК, сконструированные на основе бактериальных и дрожжевых плазмид или вирусов эукариот, трансфицируются в хозяйские клетки только после того, как клеточные мембраны становятся проницаемыми. Рекомбинанты, сконструированные с использованием Х-векторов или космид, упаковываются в фаговые частицы, которые затем используются для инфицирования пермиссивных клеток E. coli К12.

Обычно трансфекция происходит не очень эффективно. Рекомбинантный геном включается лишь в часть обработанных клеток. Выращивая клетки в условиях, при которых проявляется зависимость от векторных генов, можно идентифицировать нужные клетки и отобрать их.

Одна молекула ДНК на клетку. При планировании эксперимента по молекулярному клонированию и его проведении необходимо соблюдать два основных принципа. Во-первых, после конструирования in vitro отдельные молекулы рекомбинантных ДНК должны быть введены в разные структуры. Ни одна из клеток не должна получить более одной плазмидной молекулы или вирусной частицы. Во-вторых, эти структуры должны быть способны к репликации.

В результате трансфекции и инфекции образуются популяции самых разных клеток либо популяции вирусов или бактериофагов. Одни члены популяции содержат нужные рекомбинантные молекулы, другие несут рекомбинанты, содержащие нежелательные вставки, или векторные молекулы вообще без вставки, третьи представляют собой неизмененные клетки. Кроме того, могут встречаться разнообразные непредсказуемые и аберрантные рекомбинанты, в том числе векторы, в которые включены две или более вставок, и рекомбинанты, у которых в результате рекомбинации уже в клетке-хозяине произошло изменение вставки. Таким образом, трансфекция и инфекция не являются последним этапом эксперимента по получению рекомбинантной ДНК, а представляют лишь один из его этапов. Далее нужно провести клонирование и идентификацию нужного рекомбинанта.

б. Клонирование

Необходимым условием успешного клонирования является возможность разделения всех трансфицированных или инфицированных клеток. Только в этом случае каждый клон будет представлен отдельной колонией бактериальной или животной клетки или негативной фаговой либо вирусной колонией и будет содержать определенную рекомбинантную ДНК.

Плазмидные векторы. Трансфицированные клетки высевают на агар таким образом, чтобы они были полностью изолированы одна от другой и каждая могла дать начало отдельной колонии. Обычно векторы содержат по крайней мере один селективный маркер, по которому проводится отбор трансфицированных клеток. При этом нетрансфицированные клетки не могут образовывать колонии в используемой среде.

Фаговые векторы. Инфицированные клетки высевают на газоне чувствительных клеток, на котором в результате инфицирования соседних клеток образуются фаговые бляшки. Некоторые векторные системы имеют встроенные маркеры, позволяющие легко отбирать рекомбинанты среди реконструированных интактных векторов.

Векторы, сконструированные на основе вирусов животных. Трансдуцирующие 8У40-векторы, способные продуцировать вирусные частицы, клонируются так же, как и фаговые векторы. Однако, поскольку такие 8У40-векторы нуждаются в вирусе-помощнике, восполняющем утраченные ими функции, вирусные бляшки могут содержать как рекомбинантные геномы, так и геномы помощника. Плазмида, сконструированная на основе вируса SV40, и пассивно трансформирующие векторы, которые не продуцируют вирусных частиц, сначала клонируют как челночные векторы в клетках Е. coli. Обычно они содержат селективный маркер, определяющий фенотип животной клетки, что позволяет отобрать клоны трансформированных клеток. Аналогично рекомбинантные векторы на основе папилломавирусов крупного рогатого скота и ретровирусов клонируют в клетках Е. coli как челночные векторы, а затем трансфицируют ими клетки животных.

## Скрининг клонированных популяций рекомбинантных молекул

а. Обнаружение нужного клона

После разделения рекомбинантных молекул и получения отдельных клонов встает трудно разрешимая задача-обнаружение нужного клона или клонов. Идентификация клона основывается на том, что вставка в рекомбинантной ДНК детерминирует какое-то уникальное свойство содержащей ее клетки. Это свойство может определяться структурой самой вставки либо быть связанным с ее функцией. На нем основывается скрининг популяции клонов с целью идентификации одного нужного клона. Методы скрининга должны быть очень чувствительными, поскольку иногда приходится идентифицировать один клон из сотен тысяч или даже миллионов клонов.

б. Отжиг с комплементарным полинуклеотидом

Комплементарные одноцепочечные полинуклеотиды, будь то РНК или ДНК, при соответствующих условиях с легкостью ренатурируют, несмотря на присутствие большого избытка неродственных цепей. Благодаря этому исследователь получает мощный инструмент для обнаружения специфической вставки, который можно использовать в разных ситуациях.

Отжиг с радиоактивным зондом. Предположим, что мы имеем большую популяцию клонированных рекомбинантных молекул и проводим отжиг с определенным полинуклеотидным зондом. Тогда мечеными становятся только те рекомбинантные молекулы, которые содержат последовательности, комплементарные зонду. Успех эксперимента зависит прежде всего от наличия нужного зонда.

Для скрининга большого числа колоний, содержащих плазмиды, а также фаговых бляшек разработаны удобные и быстрые методы. На тех же принципах основан и скрининг 8У40-бляшек. Метод состоит в том, что бактериальные колонии или бляшки переносят с агара на иммобилизованную подложку, например на нитроцеллюлозный фильтр, и подвергают содержащуюся в них ДНК денатурации. Затем фильтр инкубируют в растворе, содержащем денатурированный 32Р-ме-ченный зонд, в условиях, способствующих ренатурации комплементарных цепей. Если колония или бляшка содержит ДНК, комплементарную зонду, то на радиоавтограмме в соответствующем месте будет наблюдаться потемнение. Несмотря на то что каждая бляшка или колония содержит лишь небольшое количество ДНК, ее удается выявить благодаря высокой удельной радиоактивности зондов.

Получить большие коллекции клонированных колоний или бляшек на нитроцеллюлозных фильтрах не составляет труда. Бактерии и дрожжи хорошо растут на самом нитроцеллюлозном фильтре, помещенном на соответствующий питательный агар. Фильтр, содержащий колонии, обрабатывают так, чтобы произошли лизис клеток и денатурация ДНК, отжигают денатурированную ДНК с зондом, идентифицируют бляшки, ДНК которых гибридизовалась, и отбирают клетки из соответствующего участка агара. Фаговые бляшки переносят на нитроцеллюлозный фильтр, наложив его на питательный агар. За один раз на фильтр может быть перенесено до 10000 бляшек с одной чашки диаметром 10 см. Если осторожно снять фильтр, то ДНК из каждой бляшки останется фиксированной на нем. После отжига и идентификации нужных бляшек можно отобрать фаговые частицы из бляшек, оставшихся на чашке с агаром.

Аналогичным образом можно выявить упакованные рекомбинантные молекулы вируса SV40. Питательный агар, покрывающий инфицированный монослой клеток обезьяны, удаляют, весь монослой переносят на нитроцеллюлозный фильтр и идентифицируют нужные бляшки путем отжига с соответствующим радиоактивно меченным зондом. Вирионы, содержащие рекомбинантные ДНК, отбирают из агарового слоя.

В качестве зондов можно использовать высоко очищенные мРНК и денатурированные гомологичные ДНК или кДНК. Особенно удобны одноцепочечные зонды, поскольку их не нужно денатурировать и тестируемые клонированные ДНК не конкурируют с другими гибридизующимися цепями ДНК во время отжига. мРНК-зонды уже являются одноцепочечными, а одноцепочечные кДНК-зонды легко получить, скопировав только одну цепь. Одноцепочечные РНК-зонды можно также приготовить из рекомбинантной плазмиды, содержащей последовательность зонда, встроенную в специальный вектор, например pGEM. Этот вектор содержит два разных высокоспецифичных бактериальных промотора, фланкирующих вставку в рекомбинантных молекулах. Используя очищенную соответствующим образом линеаризованную плазмиду в качестве матрицы in vitro и ту или иную из РНК-полимераз прокариот, синтезируют РНК, которая представляет собой копию одной из двух цепей вставки.

Если известна аминокислотная последовательность полипептида, кодируемого данным геном, то можно восстановить нуклеотидную последовательность этого гена и затем синтезировать его химическими методами. Даже в тех случаях, когда в качестве зонда используется участок ДНК длиной всего 15 нуклеотидов, можно получить относительно достоверный результат. Из-за вырожденности генетического кода невозможно точно восстановить уникальную последовательность кодирующего участка. Чтобы решить эту проблему, синтезируют смесь олигонуклеотидов, различающихся одним или несколькими нуклеотидами. Это не так трудно, как кажется. Вместо того чтобы использовать один защищенный мононуклеотид на определенном этапе химического синтеза, используют смесь защищенных мононуклеотидов.

Тестирование на синтез специфического полипептида in vitro. Иногда не удается провести прямой скрининг клонов потому, что просто отсутствует в достаточной степени очищенный подходящий зонд. В таком случае можно использовать непрямые методы, хотя обычно они неудобны при массовом скрининге клонированных популяций. Большинство обычно применяемых непрямых методов основаны на двух принципах. Во-первых, можно транслировать соответствующую мРНК in vitro и получить идентифицируемый полипептид. Во-вторых, можно использовать тот факт, что трансляция подавляется, если одноцепочечная мРНК ренатурирует с комплементарной клонированной ДНК. РНК, входящая в дуплекс РНК-ДНК, не способна функционировать как мРНК.

Если проинкубировать смесь мРНК in vitro в присутствии необходимых компонентов, то на них синтезируются соответствующие полипептиды. Смесь этих полипептидов можно разделить по размерам с помощью электрофореза. Эффективная трансляция in vitro осуществляется только с одноцепочечных мРНК. Если же до начала трансляции какая-то мРНК ренатурировала с комплементарной ДНК и образовался гибридный дуплекс ДНК-РНК, то информация с этой мРНК не будет считываться. С помощью процедуры, получившей название HART, клонированные рекомбинантные ДНК очищают, денатурируют и отжигают с препаратами мРНК до начала трансляции in vitro. Молекулы ДНК, гомологичные определенному гену, гибридизуются с мРНК, и среди продуктов трансляции не обнаруживается соответствующий полипептид.

Второй метод идентификации рекомбинантных молекул с помощью трансляции in vitro получил название гибридизационной селекции. Из популяции рекомбинантов выделяют и очищают рекомбинантные ДНК. Полученные препараты ДНК подвергают денатурации и каждый из них фиксируют на твердой подложке, например на нитроцеллюлозном фильтре. Каждый из препаратов инкубируют со смесью мРНК. Гибридизация и связывание РНК на фильтре происходят только в тех случаях, когда РНК оказывается комплементарной иммобилизованной клонированной ДНК. Все остальные РНК удаляются с фильтра при промывании. Связанную РНК отделяют от ДНК и тестируют на синтез специфического полипептида в системе трансляции in vitro. Это позволяет идентифицировать соответствующий рекомбинант.

Для облегчения идентификации полипептидов, образующихся при трансляции смеси мРНК in vitro, используют разные методы. Если препарат мРНК обогатить специфической мРНК, то полипептид, кодируемый такой мРНК, иногда удается идентифицировать среди продуктов трансляции по его размеру и количеству. Когда используется сложная смесь мРНК и полипептидов, интересующий нас полипептид можно идентифицировать по его способности взаимодействовать со специфическими антителами. В таких случаях применяют метод белкового блоттинга, аналогичный блоттингу ДНК. При другом подходе нужный полипептид осаждают в присутствии специфических антител из смеси продуктов трансляции in vitro, осадок растворяют и подвергают электрофорезу. В принципе в геле должны присутствовать только два белка - интересующий нас полипептид и иммуноглобулин.

в. Определение экспрессии гена в клетках

Экспрессирующийся ген, входящий в состав рекомбинантной ДНК, при определенных условиях придает клетке-хозяину специфические фенотипические свойства. Метод отбора, основанный на выявлении этого фенотипа, позволяет идентифицировать и выделять соответствующий клон точно так же, как стандартные селективные маркеры в векторных молекулах позволяют отбирать трансформированные клетки. К стандартным селективным маркерным системам, относятся клетки Е. coli, утратившие в-лактамазу, которые используются для отбора трансформантов, содержащих векторы с геном amp, а также клетки млекопитающих, имеющие фенотип ТК-, которые позволяют отобрать трансформанты, содержащие векторы с геном тимидинкиназы. С помощью фенотипического отбора можно отбирать специфические клоны непосредственно из популяций бактерий, дрожжевых или животных клеток, трансформированных смесью рекомбинантных векторов, содержащих различные гены бактерий, дрожжей или животных соответственно. Возможность проведения такого отбора зависит от наличия хозяйских клеток с определенным фенотипом, чаще всего клеток, дефектных в отношении продукта гена, который должен быть клонирован. Если отсутствуют нужные хозяйские клетки, то вместо фенотипического отбора можно использовать иммунологический скрининг. В таких случаях клоны отбирают с помощью антител, специфичных в отношении продукта данного гена.

Фенотипический отбор. Фенотипический отбор из популяции трансформированных клеток - это самый прямой путь выделения нужного клона. На практике этот метод, вообще говоря, ограничивается клонированием прокариотических генов и некоторых генов дрожжей и других грибов в клетках прокариот и эукариотических генов в клетках эукариот. Чтобы клонировать ген А, смесь фрагментов ДНК встраивали в векторные молекулы и трансфицировали ими клетки, мутантные по гену А. Клетки выращивали в условиях, требующих присутствия продукта гена А, так что колонии могли образовывать лишь те клетки, в которых синтезируется продукт гена А, присутствующего в векторе. Наиболее подходящими для проведения такого отбора являются клетки-хозяева, в которых делетирован либо весь ген А, либо его часть. В противном случае приходится выявлять и разграничивать ревертанты и трансформанты. Кроме того, делеционные мутанты исключают вероятность проявления фенотипа А+ в результате супрессии фенотипа А - какими-то другими генами.

Экспрессия эукариотических генов в бактериальных системах хозяин-вектор. Ни фенотипический отбор, ни иммунологический скрининг обычно неприменимы при выделении клеток Е. coli, содержащих определенный рекомбинантный эукариотический ген. Исключение составляют некоторые гены дрожжей и других грибов, способные экспрессироваться в клетках Е. coli. Однако большинство генов эукариот не могут должным образом экспресси-роваться в клетках Е. coli, поскольку они утратили функциональные промоторы и содержат некодирующие участки в составе кодирующих последовательностей. Другое дело, если рекомбинанты содержат кДНК-копии эукариотических мРНК, поскольку некодирующие участки выщепляются во время созревания мРНК в эукариотических клетках. Клетки Е. coli не способны осуществлять такой сплайсинг. В результате кДНК транслируются в правильные полипептиды в Е. coli. Для того чтобы клетки Е. coli смогли обеспечить транскрипцию и трансляцию клонированной эукариотической кДНК, в соответствующие сайты вектора обычно включают Е. сой'-промотор и сигналы трансляции. Подобным же образом, для того чтобы кДНК эукариот могла экспрессироваться в эукариотических клетках, вектор необходимо снабдить соответствующими сигналами регуляции транскрипции. Поскольку в норме геномные регуляторные сигналы обычно находятся вне транскрибируемой части гена, в 5' - или З'-фланкирующем участке, они отсутствуют в мРНК или кДНК.

Другие методы фенотипического скрининга в эукариотических клетках. Фенотипический скрининг редко применяется при работе с диплоидными эукариотическими клетками, поскольку для этого необходима линия клеток, у которых повреждены оба аллеля интересующего нас гена. Идентифицировать трансформированные клетки можно с помощью котрансформации, применяя селективный маркер и соответствующие мутантные клетки или доминантный маркер и клетки, ингибируемые антибиотиком. Однако при этом невозможно различить нужный котрансформант и сопутствующие контрансформированные колонии, содержащие разные рекомбинантные молекулы ДНК. Поэтому обычно скрининг основывается на использовании специфических свойств, проявляемых нужным клоном. В качестве примера можно привести морфологические изменения, наблюдаемые при превращении нормальных клеток в опухолевые, который описан в разделах, посвященных векторам на основе папилломавирусов крупного рогатого скота и ретровирусов. Клетки, трансформированные к онкогенному фенотипу, образуют характерную колонию, или фокус, в отличие от обычных клеток, образующих монослой. Этот метод использовали, например, при отборе рекомбинантов, содержащих клеточные онкогены из геномной ДНК животных.

Другой метод скрининга применяют при клонировании клеток животных, в которых экспрессируется рекомбинантный ген, кодирующий секретируемый полипептид. При этом используют клетки хозяина, в норме не образующие полипептид, и тестируют среду, в которой находятся трансформированные клетки, на присутствие в ней данного полипептида. Если продуктом является гормон, то его присутствие в среде можно обнаружить с помощью какого-либо удобного высокочувствительного биологического метода. Таким же способом были клонированы гены, кодирующие факторы роста, которые стимулируют пролиферацию специфических клеток-мишеней. Если активность полипептида как такового трудно измерить, то используют специфичные к нему антитела. Этот метод непригоден для одновременного скрининга большой популяции клонированных клеток, содержащих разные рекомбинантные молекулы, поскольку для этого пришлось бы проводить слишком много отдельных тестов. Вместо этого смесь трансформированных клеток подразделяют на удобное число отдельных групп и тестируют эти группы. Группу, дающую положительный ответ, снова подразделяют на подгруппы, вновь выделяют позитивную подгруппу, подразделяют ее, тестируют и так далее до тех пор, пока не будет идентифицирован один позитивный клон.

Иммунологический скрининг. Для скрининга рекомбинантной популяции в отношении экспрессии данного гена используют более общий метод, в основе которого лежит иммунологический подход. Синтезируемый белок в этом случае не должен быть функционально активным; необходимы лишь специфические антитела к нему и клетки хозяина, не синтезирующие данный антиген. Антитела взаимодействуют с белковыми молекулами одного клона. Их выявляют по аккумуляции радиоактивности, источником которой служат либо меченые антитела, либо специфические меченые реагенты, узнающие иммуноглобулины.

Было разработано несколько модификаций техники скрининга с участием антител применительно к Е. сой-системам хозяин-вектор. Все они сходны между собой, хотя применяемые приемы зависят, например, от того, какого рода клоны - бактериальные или фаговые-будут тестироваться. В одной из модификаций этого метода антитела равномерно распределяют по поверхности твердого носителя, например пластикового или бумажного диска, и затем прижимают его к агаровому слою, содержащему лизированные колонии или фаговые бляшки. Если специфический антиген синтезируется каким-либо клоном, он будет связываться с антителом на диске. Антиген можно локализовать, обработав снятый с агара диск другими радиоактивно меченными антителами, промыв диск и получив радиоавтограф. Эта процедура зависит от способности двух антител связываться с разными антигенными детерминантами на одном и том же полипептиде. Как и при скрининге путем отжига с ДНК - или РНК-зондами, позитивный клон дает четкое темное пятно на рентгеновской пленке.

Если интересующий нас ген кодирует полипептид, расположенный на поверхности животной клетки, то с помощью высокоспецифических методов можно провести иммунологический скрининг и отбор трансформированных клеток. Поверхностные белки могут взаимодействовать со специфическими антителами, а если эти антитела связываются с какой-либо флуоресцентной меткой, то клетки, синтезирующие данный белок, будут отличаться от других трансформантов по своим флуоресцентным свойствам. Жизнеспособные флуоресцирующие клетки выявляют среди громадного числа нефлуоресцирующих клеток с помощью специального прибора. Далее жизнеспособные клетки размножают и получают популяцию клонированных клеток. Некоторые поверхностные белки являются рецепторами, с которыми связываются специфические лиганды. Если исследуемый ген кодирует такой рецептор, то, используя флуоресцирующий лиганд, можно отделить трансформированные клетки с помощью прибора FACS.

## Библиотеки

Возможность проведения шотган-экспериментов рассматривалась еще тогда, когда технология рекомбинантных ДНК делала свои первые шаги. Идея амплификации очень сложных смесей фрагментов ДНК и последующего обнаружения одного из них казалась фантастичной, а сейчас она представляется почти банальной. Основной принцип этого подхода состоит в создании коллекции рекомбинантных молекул, составляющих полный геном данного организма. По существу, полный нефракционированный набор фрагментов ДНК превращают в соответствующий набор стабильных рекомбинантов, который можно сохранять и многократно использовать для клонирования различных вставок. При этом применяются Е. сой-системы хозяин-вектор, где в качестве вектора используются плазмиды или бактериофаги, поскольку они более пригодны для получения большого числа рекомбинантных молекул и удобны для хранения.

Наиболее важны два типа библиотек. Одна из них, создаваемая из суммарной геномной ДНК, в принципе должна содержать все гены данного организма. Однако такая цель обычно оказывается недостижимой, поскольку некоторые последовательности ДНК не удается клонировать. Один из вариантов геномной библиотеки представляет собой всю ДНК какой-то одной хромосомы. Для создания такой библиотеки необходимо выделить ДНК из отдельных хромосом. Хромосомы человека фракционируют с помощью методов, аналогичных используемым при сортировке флуоресцирующих и нефлуоресцирующих клеток. Метод основан на разной эффективности связывания флуоресцирующих красителей с хромосомами, которая зависит от размера хромосом и GC-содержания ДНК. Раствор окрашенных хромосом пропускают с высокой скоростью через узкое отверстие, на которое сфокусирован пучок света, испускаемого лазером. Хромосомы поочередно пересекают этот пучок, который индуцирует их специфическую флуоресценцию. Детектор определяет интенсивность флуоресценции и изменяет направление движения тех хромосом, интенсивность флуоресценции которых превышает заданную величину, таким образом, что они попадают в специальный коллектор. Изменяя этот заранее установленный уровень интенсивности флуоресценции, можно отбирать разные хромосомы.

Отдельные хромосомы дрожжей и некоторых простейших невозможно идентифицировать цитогенетическими методами, однако ДНК из них все же удается выделить. Для выделения применяют мягкие методы, чтобы избежать разрыва молекул. Затем ДНК подвергают электрофорезу в агарозном геле в условиях, позволяющих разделить молекулы длиной до 2000 т.п. н. Традиционные методы электрофореза не позволяют разделять дуплексные молекулы, размер которых значительно превышает 20 т.п. н. Скорость миграции столь больших молекул уже не зависит от их размера. Однако если вместо постоянного однонаправленного электрического поля, приложенного к обычному гелю, использовать поле, ориентация которого многократно меняется, то даже очень большие молекулы можно будет разделить по размерам. По-видимому, этот феномен объясняется механизмом прохождения молекул ДНК через поры агарозного геля. Предполагается, что молекулы вытягиваются в направлении поля, а затем при изменении этого направления переориентируются. Время переориентации зависит от длины цепи и угла между направлениями поля; они и определяют конечное расстояние, на которое перемещается молекула. В простейшем варианте импульсного электрофореза электрический ток подается импульсами, при этом направления поля примерно перпендикулярны друг другу, а само поле неоднородно. При более сложных распределениях используют однородные поля и оптимизируют угол между двумя направлениями, с тем чтобы повысить разрешение. Импульс обычно длится примерно минуту.

Библиотеки второго типа включают последовательности, составляющие всю мРНК, обнаруживаемую в определенных клетках. В этом случае популяцию мРНК превращают в популяцию молекул кДНК, которые затем клонируют. Геномные библиотеки представляют собой собрание генов и последовательностей ДНК; в библиотеках кДНК представлены продукты экспрессии этих генов в форме мРНК.

а. Геномные библиотеки

Геномные библиотеки обычно создают с помощью векторов, сконструированных на основе бактериофага X или космиды. Эти векторы содержат большие вставки, благодаря чему минимизируется число рекомбинантов, наобходимых для составления библиотеки. Например, если создается Х-библиотека генома млекопитающего, содержащего 3\*109 п. н. при средней длине вставки 17 т.п. н., то весь геном будет представлен 3\* 109/1,7\* 104 = 1,8\* 105 рекомбинантами. На самом деле для создания библиотеки, вероятность обнаружения в которой определенного сегмента генома превышает 99%, нужно получить ~ 106 отдельных рекомбинантных молекул, поскольку лигирование отдельных фрагментов происходит случайно. Так, некоторые фрагменты могут быть включены более чем в одну векторную молекулу, а другие могут вообще не участвовать в лигировании и упаковке. Полная космидная библиотека содержит меньше рекомбинантных молекул, поскольку размер вставок может достигать 45 т.п. н.

Фрагменты суммарной геномной ДНК для конструирования библиотек можно получать несколькими способами. Наиболее удобный из них состоит в частичном расщеплении ДНК рестриктирующей эндонуклеазой, сайт узнавания которой содержит шесть оснований, а образующиеся липкие концы соответствуют липким концам выбранного вектора. В этом случае разрезание осуществляют лишь в ограниченном числе возможных сайтов. Поскольку выбор таких сайтов производится случайно и в используемом препарате геномной ДНК содержится много копий любого геномного сегмента, практически каждый сегмент ДНК должен быть представлен во фрагментах ДНК, пригодных по своему размеру для клонирования. При таком подходе, однако, может получиться неполная библиотека. Те части генома, в которых сайты узнавания рестриктирующих эндонуклеаз находятся слишком далеко друг от друга, не смогут включиться в жизнеспособный рекомбинантный фаг. С другой стороны, те области генома, в которых сайты узнавания тесно сгруппированы, будут разделены на очень короткие фрагменты, и не все из них будут представлены в библиотеке.

Вообще говоря, более репрезентативную библиотеку можно получить при частичной фрагментации геномной ДНК, осуществляемой более случайно, чем с помощью фермента с сайтом узнавания из шести пар оснований. Для этого можно использовать гидродинамические методы деградации ДНК или очень ограниченную обработку эндонуклеазами с сайтами узнавания из четырех пар оснований, например Alu I и Нае III.

б. Библиотеки кДНК

Для создания библиотек кДНК обычно используют плазмидные или фаговые векторы, сконструированные на основе бактериофага X. Принципы конструирования не отличаются от описанных, за исключением того, что в этих случаях чаще используют смесь разных мРНК, а не очищенную мРНК. Полученные с помощью специально сконструированных векторов или определенным образом отобранные библиотеки кДНК могут использоваться для клонирования последовательностей мРНК даже в тех случаях, когда аминокислотная последовательность белка и кодирующая нуклеотидная последовательность неизвестны и даже отсутствует гомологичный зонд. Соответствующие примеры мы рассмотрим ниже.

Библиотека экспрессирующихся кДНК. Очищенную кДНК или смесь разных кДНК можно лигировать с векторами, специально сконструированными для осуществления транскрипции и трансляции кодирующей области кДНК. Нужный клон идентифицируют с помощью иммунологического скрининга с применением антител, специфичных к полипептиду, кодируемому данной кДНк. Эта весьма удобная методика позволяет осуществить клонирование даже тогда, когда ничего не известно о структуре нужного нам гена или белка.

Одним из векторов, широко применяемых для изучения экспрессии, является производное фага X, получившее название Xgtll. Когда кДНК, содержащие EсоRI-линкеры, включаются в вектор Xgtll в его единственном сайте для эндонуклеазы EcoRI, вставки оказываются в области, кодирующей бактериальный ген в-галактозидазы. Примерно одна из шести кДНК-вставок включается в подходящей для транскрипции ориентации и в фазе с рамкой считывания в-галактозидазы. При индукции в-галактозидазного гена с помощью в-галактозида в lac-промоторе начинается транскрипция, которая распространяется на эукариотический сегмент. В результате трансляции соответствующей РНК образуется гибридный белок, у которого на N-конце находится в-галактозидазный полипептид, а на С-конце-эукариотический. Библиотека кДНК, созданная с помощью A. gt11, образует популяцию бляшек, отдельные члены которой содержат эти гибридные белки. Бляшку, содержащую интересующий нас белок, идентифицируют по ее способности связывать соответствующее антитело. На одной чашке можно выявить одну позитивную бляшку среди 104 и без труда провести скрининг 106 бляшек.

Библиотеки селективных кДНК. Развитие и дифференцировка сложных многоклеточных организмов из одной оплодотворенной яйцеклетки осуществляются с помощью высокоорганизованной системы дифференцированной экспрессии генов. Одни гены экспрессируются только в одном или строго ограниченном числе типов клеток, другие - в какой-то определенный период времени. В результате популяции цитоплазматических мРНК в различных тканях и клетках оказываются представленными разными молекулами. Такая дифференцированная экспрессия генов может использоваться для клонирования кДНК, соответствующих регулируемым генам, даже в тех случаях, когда о продуктах этих генов ничего не известно.

Например, при изучении процессов раннего развития Xenopus важно знать, какие гены экспрессируются при первых клеточных делениях. Для этого нужно идентифицировать те мРНК, которые присутствуют в гаструле, но не в яйцеклетках. Это можно сделать, создав геномную библиотеку и проведя раздельный скрининг с использованием препаратов РНК из яйцеклеток и гаструл. Затем можно идентифицировать и клонировать фаговые бляшки, которые дают положительный ответ при отжиге только с РНК гаструл. Однако данный метод имеет тот недостаток, что многие из 105 или более мРНК в двух указанных выше препаратах являются одинаковыми и приходится проводить скрининг громадного числа бляшек, чтобы обнаружить те немногие, которые проявляют специфичность. Более эффективным является создание библиотеки кДНК на основе гаструлярной РНК.

Клонирование кДНК, кодирующей малую субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из листьев гороха.ruBPCase, - по-видимому, один из самых распространенных на земле белков, - состоит из восьми идентичных больших и восьми идентичных малых субъединиц. Ген большой субъединицы находится в хлоропластной ДНК, а ген малого полипептида - в ядерной хромосомной ДНК. Экспрессия генов зависит от освещенности, о чем свидетельствуют данные, представленные в левой верхней части рисунка. Растения гороха выдерживали 9 сут. в темноте и затем некоторые из них выставляли на свет на 48 ч. Полисомную poly-РНК, выделенную из растений обоих типов, транслировали in vitro.20 кДа - предшественник малой субъединицы RuBPCase синтезировался только в тех растениях, которые находились на свету. РНК из листьев растений, подвергшихся освещению, использовали для синтеза двухцепочечной кДНК, к которой были присоединены Hind III-линкеры. ДНК лигировали с разрезанной в Hind Ill-сайте плазмидой pBR322 и полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали штамм НВ101 Е. coli. Трансформированные бактериальные колонии, устойчивые к ампициллину, выращивали на нитроцеллюлозных фильтрах, помещенных на поверхность питательного агара в чашках. После фиксации ДНК на фильтрах клоны, содержащие кДНК RuBPCase, идентифицировали по их способности гибридизоваться с радиоактивно меченной poly-РНК из подвергавшихся освещению листьев и по отсутствию гибридизации с РНК из листьев растений, выращенных в темноте. Ложные положительные клоны элиминировали, проводя гибридизацию исходно положительных клонов с радиоактивно меченной РНК, обогащенной по мРНК RuBPCase. Обогащение проводили фракционированием РНК по размерам с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Искомая мРНК представляла собой молекулу длиной 900 п. н., присутствующую в подвергшихся освещению листьях, при трансляции которой in vitro образовывалась малая субъединица RuBPCase. Наконец, гибридные клоны были идентифицированы также при гибридизационной селекции. рая была предварительно обогащена последовательностями мРНК, специфичными для стадии гаструлы. Такое обогащение можно получить следующим образом. С помощью обратной транскриптазы на мРНК из гаструл синтезируют одноцепочечную кДНК. Затем все кДНК, гомологичные мРНК, присутствующим как в яйцеклетках, так и в гаструлах, удаляют путем образования гибридов кДНК'мРНК между кДНК гаструл и мРНК яйцеклеток; эти гибриды адсорбируются на гидроксиапатите, а в растворе остаются только одноцепочечные кДНК, специфичные для гаструл. Из этих кДНК получают обычным способом дуплексные молекулы кДНК и создают библиотеку кДНК. Такая библиотека обычно бывает сильно обогащена молекулами кДНК, соответствующими гаструлоспецифичной мРНК. Аналогичный подход можно использовать в случае мРНК, выделенной из любых двух родственных тканей или клеток. Вариации на эту тему включают использование в качестве зондов молекул кДНК, обогащенных описанным выше методом. В этом случае водили котрансфекцию с участием ДНК из этих клеток, отбор в среде HAT, сортировку и клонирование. ДНК из полученных вторичных трансформантов, содержащую менее 50 т.п. н. ДНК человека на мышиный геном, использовали для создания геномной библиотеки. Было отобрано шесть фаговых клонов, которые гибридизовались с зондом, содержащим повторяющиеся последовательности ДНК человека, разбросанные по всему геному. Все шесть клонов содержали перекрывающиеся сегменты ДНК. Две вставки из шести встраивали в фаговые векторы для воссоздания уникального сегмента ДНК размером 31 т.п. н., ответственного за синтез поверхностного рецептора трансферрина человека, после трансфекции в мышиные клетки.

Библиотеку кДНК подвергают скринингу, выявляя те клоны, которые гибридизуются с обогащенным мРНК - зондом.

## Некоторые стратегии клонирования генов и кДНК

Мы рассмотрели множество разных методов, используемых при конструировании, клонировании и отборе специфических рекомбинантных генов. На основе этих методов можно разработать множество стратегий для получения определенных клонированных генов или кДНК. При выборе эффективной и действенной стратегии важно учитывать природу гена и его продукта, а также происхождение вида. Чтобы представить себе все многообразие методов работы с рекомбинантными молекулами ДНК, лучше всего рассмотреть конкретные примеры клонирования различных генов и кДНК.