**Реферат на тему:**

**Методы генной инженерии**

**2009**

**Введение**

Современный экспериментатор нередко располагает лишь ничтожными количествами исходных препаратов индивидуального белка или ДНК. Например, в случае биопсии ткани человека или редкого штамма бактерии, плохо поддающейся выращиванию в объеме.

Между тем физические методы исследования требуют, хотя и на порядок величины меньшего количества биологического материала, чем два десятилетия назад, но, все-таки, зачастую во много раз большего, чем имеется в наличии. Кроме того, многие эксперименты имеют поисковый характер, когда необходимо обследовать сотни, если не тысячи, параллельных проб, варьируя условия поиска.

Все это привело к разработке методов многократного и точного воспроизводства структуры индивидуального белка или фрагмента ДНК, например отдельного гена. Ради экономии времени эти методы в значительной степени автоматизированы. Большинство из них используют подходы генной инженерии. Поэтому эта глава будет посвящена знакомству с понятиями и методами этой сравнительно новой области биологической науки.

**Рестриктазы**

В середине 70-х годов было сделано странное и не сразу понятое во всей своей значительности открытие. Из некоторых бактерий удалось выделить ферменты, обладающие способностью «разрезать» двойную спираль ДНК любого происхождения, т. е. способностью разрывать сахаро-фосфатные цепочки в обеих нитях. Условием такого разрезания оказалось наличие в этой ДНК короткой, но вполне определенной последовательности нуклеотидов (считая по одной из нитей в направлении 51—3'), так называемого «сайта узнавания» рестриктазы. Этот сайт может насчитывать от 4-х до 8 нуклеотидов. Ошибочно думать, что столь короткие последовательности должны встречаться очень часто. Даже серия из 4-х, наперед заданных нуклеотидов имеет реальный шанс появиться лишь один раз на отрезке ДНК длиной в 44 = 256 пар оснований. Для одной из наиболее часто используемых рестриктаз (EcoRl), сайт которой (ГААТТЦ) насчитывает 6 нуклеотидов, такой шанс появляется в среднем один раз на участке ДНК длиной в 46 = 4 096 пар оснований. Для некоторых рестриктаз (тип I и III) место разреза не однозначно связано с положением сайта узнавания. Такие рестриктазы неудобны для исследовательских целей. У типа II разрез локализован в самом сайте узнавания, что делает эту операцию определенной.

Два последних десятилетия поиск новых рестриктаад производился столь интенсивно, что к концу 1999 года их было найдено и очищено более 2 500. Такое изобилие обусловлено множеством видов бактерий, у которых рестриктазы служат средством защиты от вторжения в них вирусов, чью ДНК они и разрушают/ Для исследовательских целей в настоящее время используют около 300 рестриктаз, которые имеются на рынке биохимических препаратов.

Некоторые из рестриктаз разрезают обе нити ДНК в одном месте, точно ножом. У других — места разреза могут быть сдвинуты на одной нити ДНК относительно другой (в пределах сайта узнавания). В первом случае говорят о «тупых» концах разреза, во втором — о «липких» концах обеих нитей в области разреза. Название «липкие» отражает тот факт, что образующиеся в этом случае на каждой из нитей короткие однонитевые последовательности нуклеотидов, очевидно, комплементарны друг другу и могут, вообще говоря, вновь соединиться водородными связями между основаниями. Хотя это, конечно, не восстановит целостности разрезанного участка ДНК. По крайней мере до тех пор, пока уже знакомый нам фермент ДНК-лигаза не «зашьет» сделанные рестриктазой разрезы на каждой из нитей.

Могущество новообретенного инструмента для исследований было вполне оценено, когда примерно в те же годы было сделано второе важнейшее открытие — существование плазмид у бактерий.

**Плазмиды**

Было обнаружено, что у многих видов бактерий помимо основной массы ДНК, находящейся в «бактериальной хромосоме» (несколько миллионов пар оснований) имеются еще «крошечные» кольцевые, двунитевые и суперскрученные молекулы ДНК. Они были названы плазмидами — по месту расположения их в протоплазме клетки. Количество пар оснований в плазмидах ограничено диапазоном от 2-х до 20-ти тысяч. Некоторые бактерии имеют только по одной плазмиде. В других — их обнаруживается несколько сотен.

В норме плазмиды редуплицируются при делении бактериальной клетки одновременно с основной ДНК хромосомы. Для своего размножения они используют «хозяйские» ДНК-полимеразы I, III и другие ферменты. Плазмиды синтезируют свои специфические белки, для чего используется РНК-полимераза и рибосомы, также принадлежащие бактерии-хозяину. В числе этих «продуктов деятельности» плазмид иногда оказываются вещества, разрушающие антибиотики (ампимицин, тетрациклин, неомицин и другие). Что придает самой бактерии-хозяину устойчивость против воздействия этих антибиотиков, если она сама по себе таковой устойчивостью не обладает. Мало того. «Самостоятельность» некоторых плазмид простирается до того, что они оказываются способными размножаться в клетке бактерии даже тогда, когда синтез белка в ней (а следовательно, и ее деление) блокированы действием специфических ингибиторов. В этом случае в бактерии может накопиться до 2-3 тысяч плазмид.

Очищенные плазмиды способны проникать из питательной среды внутрь клеток чужеродных бактерий, там обосновываться и нормально размножаться. Правда, для этого приходится предварительно увеличивать проницаемость оболочек этих бактерий, обрабатывая их раствором хлористого кальция.

Успешное встраивание чужой плазмиды удается лишь для ничтожного меньшинства клеток обрабатываемой популяции. Однако если бактерия-реципиент не обладала устойчивостью к определенному антибиотику, а «прижившаяся» плазмида эту устойчивость ей сообщает, то даже из единичных успешно «трансформированных» бактерий на питательной среде с добавкой антибиотика можно вырастить вполне полноценные колонии, наследственно обладающие встроенной плазмидой.

Наконец, самое важное. Если в ДНК плазмиды (до начала трансформации) удастся «встроить» фрагмент вовсе чуждой для нее ДНК (например ген животного происхождения), то этот фрагмент вместе с плазмидой войдет внутрь клетки реципиента, вместе с ней будет размножаться и направлять внутри бактерии синтез «псевдоплазмидных» белков, закодированных в этом гене!

Вспомним теперь с какой скоростью размножаются бактерии в жидкой питательной среде, поддерживая и приумножая при этом синтез плазмидных (а также «псевдоплазмидных»!) белков. Очевидно, что здесь просматривается перспектива наработки большого количества индивидуального белка — продукта деятельности вторгнувшегося («тайком») в бактерию гена. Остается решить проблему встраивания именно избранного гена в плазми-ду. А также и получения первоначально необходимого количества этого самого гена, если отправным пунктом является известная (хотя бы частично) структура интересующего нас белка. Вот тут-то и раскроются уникальные возможности использования рестриктаз.

Но сначала несколько слов о выделении самих плазмид из клеток их нормальных бактерий-хозяев. Это — дело не сложное. Из бактерии можно очистить суммарную ДНК, как это было описано раньше. Потом одним из физических методов отделить низкомолекулярную ДНК плазмид от сравнительно высокомолекулярной ДНК бактериальной хромосомы. Надо только позаботиться о том, чтобы при вскрытии клетки не появились малые обломки основной ДНК. В частности, не следует пользоваться для разрушения оболочек бактерий ультразвуком.

Можно поступить проще. Сферопласты бактерий обработать слабой щелочью + DDC-Na или прокипятить в течение 1 минуты. ДНК бактериальной хромосомы, вместе со связанными с ней белками, денатурируется и выпадает хлопьями в осадок. Ее легко удалить центригурированием. ДНК кольцевых плазмид также сначала денатурируется. Но поскольку ее однонитевые кольца топологически связаны, они разойтись не могут. После восстановления нормальных условий среды ренатурируется и нативная структура плазмид. Они остаются в растворе.

За последние годы выделены и очищены сотни плазмид. Их описание, естественно, начинается с представления полной нуклеотидной последовательности плазмидной ДНК. Современ-ные автоматические «секвенаторы» позволяют расшифровать последовательность 4-х-5-ти тысяч пар нуклеотидов за неделю. В 80-е годы, когда секвенирование ДНК производили вручную, такая работа занимала несколько месяцев.

Подробные данные о каждой новой плазмиде, включая и карту расположения ее собственных генов, заносят в международную «библиотеку плазмид».

**Встраивание фрагмента чужеродной ДНК в плазмиду**

С помощью библиотеки плазмид можно без труда отыскать такую плазмиду, в ДНК которой имеется (случайно) сайт узнавания для одной из доступных рестриктаз. Для рестриктаз тоже есть своя библиотека и, как уже упоминалось, порядка 300 их видов имеется в продаже. Таким образом у исследователя имеются широкие возможности выбора наиболее удобной комбинации плазмиды и рестриктазы.

Далее разрезают выбранной рестриктазой удобную плазмиду так, чтобы образовалось два «липких» конца. Затем нужно снабдить такими же концами фрагменты встраиваемой ДНК. Хорошо, если по обоим концам этого фрагмента расположатся сайты узнавания выбранной рестриктазы. Но это случай маловероятный. Поступают следующим образом. К собственным окончаниям имеющегося фрагмента ДНК наращивают двунитевые участки искусственных (синтезированных химически) олигонуклеотидов. Заведомо содержащих сайты узнавания выбранной рестриктазы. Затем действием этой самой рестриктазы их превращают в «липкие» концы — в точности соответствующие липким концам плазмиды по обе стороны сделанного в ней разреза. (Рассказать о том как наращивают концы фрагмента ДНК было бы, пожалуй, слишком сложно для нашего курса. Зато я немного позже постараюсь пояснить каким образом синтезируются искусственные олигонук-леотиды с наперед заданной последовательностью пар оснований.)

Итак, далее в буферном растворе смешивают две ДНК, — плазмиды и вставки, — и выдерживают их при оптимальной температуре «гибридизации». Чужеродная ДНК «встраивается» в ДНК плазмиды, хотя и может превышать ее по длине, т. е. достигать размера в несколько тысяч пар оснований. Окончательное слияние, «приживание» новой ДНК, разумеется, обеспечивают ДНК-лигазы.

Я употребил термин «гибридизация». Что он обозначает в данном случае? Условимся называть так образование двухнитевой структуры в результате контакта двух комплементарных однонитевых последовательностей нуклеотидов, типа ДНК-ДНК или ДНК-РНК. Термин «комплементарные» нам уже знаком. Последовательности могут быть одинаковой длины, тогда образуется сплошь двухнитевой «гибрид». А могут быть и существенно различными по длине. В этом случае образуется «участок гибридизации», соответствующий длине более короткого из двух партнеров. Минимальная длина участка гибридизации, при которой он достаточно устойчив, — это 8-10 пар нуклеотидов. Впрочем, для устойчивой гибридизации комплементарных липких концов двух молекул ДНК эту цифру можно уменьшить вдвое, так как двунитевые структуры самих ДНК будут поддерживать новообразованный короткий участок гибридизации.

Может возникнуть вопрос: а почему сама разрезанная плаз-мида не восстанавливает кольцевую структуру путем гибридизации своих собственных липких концов? Ну, во-первых для сравнительно короткой ДНК плазмиды не так-то просто, распрямившись, самопроизвольно снова свернуться в кольцо. Во-вторых, встраиваемый фрагмент ДНК берется в большом избытке с тем, чтобы процесс встраивания в плазмиду имел конкурентное преимущество по отношению к процессу восстановления плазмиды. С этой же целью 5'-фосфатные группы из места разреза плазмиды убирают действием еще одного фермента — «щелочной фосфата-зы». Поначалу достаточно, чтобы соединилась одна пара липких концов, принадлежащих плазмиде и встраиваемой ДНК. Со временем, непременно, благодаря тепловым движениям соединится и вторая пара.

И все-таки поставленный вопрос не напрасен. Полностью избежать «реставрации» пустых плазмид, действительно, не удается. К счастью найден способ различать среди колоний бактерий, выросших на среде с антибиотиком, те, которые приютили « пустую « плазмиду от тех, что получили плазмиды со встроенным фрагментом чужой ДНК. Способ этот очень красив. Идея его такова. Некоторая модификация самой плазмиды позволяет ей в «сотрудничестве» с основным геномом бактерии E.coli в присутствии некоего хромогенного субстрата (похожего на лактозу) синтезировать продукт голубого цвета. В результате на чашке с агаром вырастают голубые колонии бактерий. Вставку же чужеродного фрагмента ДНК производят б таком месте, что плазмида утрачивает способность к «сотрудничеству». В результате чего вырастают колонии белого цвета. Их-то и отбирают, чтобы уже в большом объеме жидкой питательной среды наращивать бактериальную массу с плазмидами и чужеродной ДНК. Таким образом решается задача умножения количества («клонирования») интересующей нас ДНК.

Замечу попутно, что описанным выше способом в плазмиду можно вставить так называемый «поликлоновый сайт». Это — синтезированная химически последовательность в несколько десятков пар нуклеотидов, подобранная таким образом, что в ней содержатся сайты узнавания доброй дюжины различных рестрик-таз. Это существенно расширяет возможности эксперимента.

**Некоторые приемы экспериментальной микробиологии**

Мне только что пришлось использовать термины: «чашка с агаром», «колонии бактерий». Поскольку специализация в области молекулярной биологии требует понимания методов и хорошего владения приемами микробиологии, следует пояснить о чем идет речь.

Когда для лабораторных нужд наращивают значительное количество бактерий, это делают в больших колбах, наполненных жидкой питательной средой. Такие среды готовят и продают в сухом виде специализирующиеся на этом фирмы. Для сохранения доступа воздуха колбы закрывают ватными тампонами (обернутыми в марлю) и стерилизуют в автоклаве. После «инокуляции» — внесения в них малой порции бактерий колбы выдерживают в «теплой комнате», где поддерживается температура 37°С, в течение ночи. При этом их устанавливают на механической качалке ради улучшения аэрации. За ночь среда становится мутной — такое в ней нарастает количество бактерий. Их нетрудно собрать центрифугированием. В микробиологической промышленности в огромных стальных ферментерах с принудительной аэрацией наращивают тонны (1) бактерий. Затем из них выделяют вещества, используемые в качестве пищевых добавок к корму скота или в фармакологии.

Если же стоит задача отобрать в лаборатории бактерии, отличающиеся определенными свойствами (например, устойчивостью к действию антибиотиков) поступают прямо противоположным образом. Следят за нарастанием потомства единичных бактерий. Для этого используют особое вещество — агар. Его выделяют из определенного вида морских водорослей. Уже смешанный с питательной средой «бакто-агар» поставляется в высушенном виде. Его растворяют в горячей воде, стерилизуют в автоклаве и разливают в стерильные «чашки Петри». Это — круглые, плоскодонные пластмассовые чашки диаметром в 9 и высотой в 1 сантиметр с крышками. Бактоагар застывает в виде очень пористой твердой массы, поры которой заполнены питательным бульоном.

Исследуемую популяцию бактерий многократно разбавляют с таким расчетом, чтобы в 2-3-х миллилитрах суспензии, которые выливают на поверхность агара, содержалось лишь порядка сотни бактерий. Они случайным образом распределяются по поверхности агара. Далее закрытые чашки на 12—14 часов оставляют в теплой комнате. (Перевернув, для того чтобы питательный бульон притекал к поверхности агара.) Каждая бактерия дает многочисленное потомство, которое хорошо видно глазом. Это и есть «колонии» бактерий. Начальное разбавление и время инкубации выбирают так, чтобы колонии не сливались друг с другом.

Остается добавить, что при всех описанных операциях выполняются требования строгой стерильности. Инокуляцию колб с питательной средой, разлив бакто-агара в чашки, разбавление суспензий бактерий и нанесение пробных аликвотов на агар производятся в специальном, так называемом «ламинарном» застекленном шкафу. Через который непрерывно, в направлении из шкафа в комнату прокачивается стерилизованный прохождением через фильтр воздух.

**Литература**

1. Довгяло О.П., Федоренко Н.М. Ишемическая болезнь сердца. - М.: Медицина, -1986.
2. Долгов В.В. Морфо-функциональная характеристика эндотелия сосудистой стенки в норме и при атеросклерозе. Автореф. Док. дис. - М. -1985.
3. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Чукичев А.В., Колесников А.Л. Роль нейтрофилов в регуляции иммунной реактивности и репаративных реакций повреждения ткани. // Вестник Росс. Акад. мед.наук.-2000. N 2. -C.-14-19.