

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
СЕВЕРНОГО ЗАУРАЛЬЯ»

А. Б. Саткеева, К. А. Сидорова

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебное пособие



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Государственный аграрный университет Северного Зауралья»

**А. Б. Саткеева, К. А. Сидорова**

# **МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Учебное пособие

Текстовое (символьное) электронное издание

Редакционно-издательский отдел ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья  
Тюмень 2023

© А. Б. Саткеева, К. А. Сидорова, 2023

© ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья, 2023

ISBN 978-5-98346-119-2

УДК 577.2.08: 577.212

ББК 28.04: 52.6

**Рецензенты:**

профессор, ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный аграрный университет, доктор сельскохозяйственных наук А. А. Овчинников;  
профессор, ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья, доктор биологических наук В. Н. Домацкий

**Саткеева, А. Б.**

Молекулярная биотехнология : учебное пособие / А. Б. Саткеева, К. А. Сидорова. – Тюмень : ГАУ Северного Зауралья, 2023. – 112 с. – URL: <https://gausz.ru/nauka/setevye-izdaniya/2023/satkeeva.pdf>. – Текст : электронный.

В учебном пособии изложены этапы развития молекулярной биотехнологии, описаны структура ДНК, РНК и синтез белка, методы получения рекомбинантных ДНК, прокариот и эукариот, особое внимание уделено клеточной и генетической инженерии, рассмотрены методы получения и пересадки эмбрионов, трансгенных и химерных животных, вопросы микробиологического производства лекарственных средств.

Предназначено и рекомендовано для студентов высших учебных заведений направления подготовки 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза».

Издается по решению Методической комиссии Института биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Государственного аграрного университета Северного Зауралья», протокол №3 от 18 ноября 2020 г.

Текстовое (символьное) электронное издание

© А. Б. Саткеева, К. А. Сидорова, 2023  
© ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
1. Основы молекулярной биотехнологии.....	6
1.1 Возникновение, становление и развитие биотехнологии .....	6
1.2 Структура ДНК, РНК и синтез белка .....	12
1.3 Технология рекомбинантных ДНК.....	20
1.4 Плазмидные векторы.....	26
1.5 Иммунологический скрининг.....	33
2. Биологические системы, используемые в молекулярной биотехнологии .....	38
2.1 Прокариоты и эукариоты.....	38
2.1.1 Генетическая трансформация прокариот.....	39
2.1.2 Культуры эукариотических клеток.....	43
3. Молекулярная биотехнология микробиологических систем.....	46
3.1 Молекулярная диагностика.....	46
3.2 Ферментный иммуно-сорбентный анализ.....	49
3.3 Моноклональные антитела.....	51
4. Генетическая инженерия.....	55
4.1 Ферменты генной инженерии.....	58
4.2 Методы изучения генома, генодиагностики и генотерапи.....	63
4.3 Генетически модифицированные продукты.....	67
5. Клеточная инженерия.....	71
5.1 Трансгенез.....	73
5.2 Клонирование.....	80
5.2.1 Трансплантация эмбрионов .....	85
5.2.2 Химерные животные .....	90
5.3 Стволовые клетки.....	94
6. Микробиологическое производство лекарственных средств.....	98
6.1 Вакцины .....	99
6.2 Антибиотики.....	105
6.3 Ферменты.....	107
Список использованной литературы.....	110

## ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная биотехнология относится к приоритетным областям биологической науки, достижения которой широко используются во всем мире, вносит весомый вклад в повышение уровня жизни человека, сфера которой с каждым годом расширяется, решая такие проблемы, как нехватка продовольствия, профилактика и лечение различных болезней, загрязнение окружающей среды.

Фундаментом современной биотехнологии являются молекулярная биология, микробиология, генетика, биохимия, биофизика, технология. За последние годы произошли существенные изменения в развитии этих наук, что привело к революции в производстве биопрепаратов, созданию трансгенных растений и животных с заданными уникальными свойствами.

Объектами биотехнологии служат многочисленные представители живых организмов — микроорганизмы (вирусы, бактерии, дрожжи и др.), растения, животные, клетки и субклеточные структуры (органеллы).

С появлением молекулярной биотехнологии произошел настоящий переворот во взаимоотношениях человека с живой природой. В ее основе лежит перенос генов из одного организма в другой, осуществляемый методами генной инженерии. В большинстве случаев целью такого переноса является создание нового продукта или получение уже известного продукта в промышленных масштабах. Выдающимся достижением молекулярной биологии является открытие Д. Уотсона и Ф. Крика о химической структуре и пространственной организации двойной спирали ДНК. Последующие исследования позволили в 2000 г осуществить секвенирование ДНК, а в 2003 году получить окончательные результаты расшифровки генома человека.

Развитие биотехнологии идет одновременно по нескольким направлениям, что позволяет широко внедрять полученные знания в генетике, микробиологии, генной инженерии, биохимии, в развитии химических технологий, используя как микроорганизмы и клетки тканей

животных, так и отдельные молекулы белков, углеводов, ферментов и нуклеиновых кислот.

Основная цель и задачи биотехнологии направлены на разработку методов и приемов, позволяющих получать биологически активные соединения (ферменты, гормоны, вакцины), а также конструировать молекулы новых веществ и создавать новые формы организмов, отсутствующие в природе (химерные молекулы, животные).

Одним из наиболее перспективных направлений биотехнологии – генная и клеточная инженерия, с помощью которых можно ускорить селекционный процесс по созданию новых высокопродуктивных пород сельскохозяйственных животных. Разработана методика по созданию идентичных (клонов) эмбрионов путем внесения ядра клетки эмбриона высококлассного животного в неоплодотворенную яйцеклетку с предварительно удаленным ядром, малоценным в племенном отношении, деление эмбрионов на два, четыре, шесть и восемь частей.

Другим достижением биотехнологических исследований в области животноводства является метод получения трансгенных животных, в геном которых встроен чужеродный ген. С его помощью за короткий период можно получить быстрорастущих животных, с высокой молочной продуктивностью и устойчивых к различным заболеваниям.

Наиболее перспективными направлениями в биотехнологии являются производства лекарственных препаратов, увеличение продовольственных ресурсов, создание источников энергии, сокращение вредных антропологических воздействий на окружающую среду.

# **1. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

## **1.1 Возникновение, становление и развитие биотехнологии**

Одним из приоритетных направлений научно-технического прогресса являются исследования в области биотехнологии, базируясь на использовании каталитического потенциала биологических агентов и систем различной степени организации и сложности - микроорганизмов, вирусов, растительных и животных клеток и тканей, а также внеклеточных веществ и компонентов клеток обеспечивает получение полезных продуктов для различных сфер деятельности человека. Развитие и преобразование биотехнологии обусловлено глубокими переменами, основу этих событий составили новые представления в области молекулярной биологии и генетики.

Расширение практической сферы биотехнологии обусловлено также социально-экономическими потребностями общества. Такие актуальные проблемы, стоящие перед человечеством на пороге 21 века, как дефицит чистой воды и пищевых веществ, загрязнение окружающей среды, недостаток сырьевых и энергетических ресурсов, необходимость получения новых, экологически чистых материалов, развития новых средств диагностики и лечения, не могут быть решены традиционными методами. Поэтому для жизнеобеспечения человека, повышения качества жизни и ее продолжительности становится все более необходимым освоение принципиально новых методов и технологий.

Биотехнология - динамично развивающаяся отрасль и призвана решать многие проблемы современности, обеспечивая при этом сохранение баланса в системе взаимоотношений «человек - природа - общество».

Достижениями биотехнологии люди пользовались с древних времен, сами того не подозревая и не зная о существовании микроорганизмов они использовали их деятельность в хлебопечении, виноделии, пивоварении, получении кисломолочных продуктов и сыров. Процессы, лежащие в основе этих процессах, долго оставались загадочными, их природа

прояснилась лишь в конце 19 — начале 20 века, в этот период были разработаны методы культивирования микроорганизмов, пастеризации, выделены чистые линии бактерий.

Биотехнология сегодня является неотъемлемой частью жизни современного общества, так как эта наука служит источником не только новых продуктов питания, медицинских препаратов, химических веществ, энергии, но и получения новых организмов с заданными свойствами. Все эти возможности делают биотехнологию все более востребованной во многих областях науки, медицине, техники, народного хозяйства, селекции, пищевой и перерабатывающей промышленности.

Впервые термин «биотехнология» был предложен в 1917 г Карлом Эреки, описав переработку сельскохозяйственного сырья в другие пищевые продукты с помощью живых организмов. Процесс брожения по мнению Э. Бухнер, вызывают не только микроорганизмы, но и бесклеточный экстракт, содержащий фермент, катализирующий химические реакции.

Огромную роль в разработке научных основ биотехнологии сыграли исследования Луи Пастера, он доказал, что спиртовое брожение сахара есть процесс, тесно связанный с жизнедеятельностью дрожжевых грибков, которые питаются и размножаются за счет бродящей жидкости, при этом часть сахара тратится на постройку дрожжевых клеток и образование побочных продуктов - глицерина и янтарной кислоты. Опроверг взгляды Либиха на брожение как на механико-химический акт. Изучение масляного брожения привело к открытию важного факта: было показано, что микробы масляного брожения могут развиваться только в отсутствие воздуха. Были установлены два типа бактерий: аэробные, требующие для своей жизни воздух, и анаэробные, развивающиеся без него. Выработал оптимальные правила для образования уксуса, а изучив спиртовое, масляное и молочное брожение опроверг теорию самозарождения микроорганизмов и сделал важное обобщение о брожении как жизни в отсутствие воздуха. Для предохранения вина от вредных изменений он



предложил повторно его нагревать, позже такое нагревание стали использовать для увеличения сроков хранения пива и молока, в дальнейшем этот процесс получил название «пастеризация». Велика роль Луи Пастера в развитие микробиологии и разработке вакцин против многих инфекционных болезней, в частности, сибирской язвы и бешенства. Почти столетний период с 60-х годов 19-го века до 40-х годов 20-го века часто называют пастеровской эрой. На основе работ Пастера и его учеников были созданы производство этанола, бутанола, ацетона, глицерина, лимонной кислоты, многих вакцин, организованы процессы биологической очистки сточных вод.

Долгое время под биотехнологией подразумевалось лишь использование микроорганизмов для ферментации.

Начало следующему этапу развития биотехнологии положила работа английского микробиолога А. Флеминга (1928), отметившего способность нитчатого гриба зеленой плесени (*Penicillium notatum*) вызывать гибель стафилококков, что в дальнейшем послужило к выделению в чистом виде первого антибиотика пенициллина. За пенициллином последовало получение стрептомицина, тетрациклинов, эритромицина и других антибиотиков, начала развиваться микробиологическая промышленность.

С открытием Д. Уотсоном и Ф. Криком знаменитой двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и постулированием матричного механизма ее синтеза, так в 1953 г заявила о себе молекулярная биология. В период пост антибиотической эры (1960-1975 гг.) были созданы технологии получения аминокислот, витаминов В2 и В12, биогаза, микробиологического белка на парафинах, иммобилизованных ферментов.

Начало современного этапа развития биотехнологии было положено с рождением генетической инженерии. Группе ученых под руководством Пола Берга удалось получить первую *in vitro* рекомбинантную молекулы ДНК, тем самым показав возможность направленных манипуляций с генетическим материалом бактерий. А без фундаментальной работы Ф.

Крика и Дж. Уотсона по установлению структуры ДНК было бы невозможно достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и репликации ДНК, выделение и изучение специфичных ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнических процессов на основе генно-инженерных манипуляций.

Генетическая инженерия существенно расширила экспериментальные границы молекулярной биологии, поскольку позволила вводить в различные типы клеток чужеродную ДНК, это позволило понять общебиологические закономерности организации и выражения генетической информации в различных организмах. Данный подход открыл перспективы создания принципиально новых продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих активные чужеродные гены. Кроме того, использование методов генетической инженерии позволило решить многие практически важные задачи, в частности - получение лекарственных средств.

Наука формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. Возникновение, становление и развитие биотехнологии условно можно подразделить на 4 периода:

1. Эмпирический период или доисторический - самый длительный, охватывающий примерно 8000 лет, из которых более 6000 лет до н.э. и около 2000 лет н.э. Древние народы того времени интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива и других продуктов, приобретенный опыт передавался из поколения в поколение. К эмпирическому периоду относятся получение кисломолочных продуктов, квашеной капусты, медовых алкогольных напитков, силосование кормов.

2. Этиологический период в развитии биотехнологии охватывает вторую половину 19 в. и первую треть 20 в. (1856 - 1933 гг.) связан с выдающимися исследованиями Л. Пастера основоположником научной микробиологии, он установил микробную природу брожения, доказал

возможность жизни в бескислородных условиях, создал научные основы вакцинопрофилактики. В 1881г. Р. Кох предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля и на агаризованных питательных среда, доказал индивидуальность микробов, получил их в чистых культурах. Более того доказал, что каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.). В этот период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, продуктов их метаболизма - ацетона, этанола, бутанола, лимонной и молочной кислот, глицерина, вакцин, кормовых дрожжей из углеводов аэробная очистка канализационных вод.

3. Биотехнический период (1933 - 1975 гг.), особенно мощный толчок в этот период был отмечен в во время становления и развития производства антибиотиков путем глубинной ферментации, аминокислот с помощью микробных мутантов, получение чистых ферментов. Культивирование растительных клеток и вирусных вакцин. Анаэробная очистка сточных вод.

4. Генно-технический период связан с созданием первой рекомбинантной молекулой ДНК, использованием генной и клеточной инженерии, получением гибридов, моноклональных антител, трансплантацией эмбрионов.

Наиболее важные достижения биотехнологии четвертого периода:

- разработка интенсивных процессов на основе направленных, фундаментальных исследований (с продуцентами антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов);
- получение супер продуцентов;
- создание различных продуктов, необходимых человеку, на основе генно-инженерных технологий;
- создание необычных организмов, ранее не существовавших в природе;
- разработка и внедрение аппаратуры биотехнологических систем;

- автоматизация биотехнологических процессов при максимальном использовании сырья и минимальном потреблении энергии.

Наиболее широко биотехнология применяется в медицине, сельском хозяйстве и промышленности.

Биотехнологические процессы, применяемые в сельском хозяйстве, позволили получить трансгенных животных и растений с заданными свойствами, улучшить охрану окружающей среды, благодаря использованию биопестицидов, биогербицидов и биоудобрений. Примером промышленной биотехнологии является создание микроорганизмов, продуцирующих нужные вещества, использование ферментов в качестве промышленных катализаторов для снижения загрязнения окружающей среды. Вклад биотехнологии в развитие и повышение эффективности традиционных технологий постоянно растет. Биотехнологические методы направлены на увеличение количества и улучшение качества продукции за счет повышения устойчивости биологических видов к условиям внешней среды, вредителям и патогенам. А новейшие биотехнологические методы позволяют диагностировать многие заболевания и патологические состояния с высокой точностью.

Разработаны новые типы катализаторов, в том числе с применением техники иммобилизации ферментов, способные функционировать в неводной среде, при значительных сдвигах рН и температуры среды, а также растворимые в воде и катализирующие биологические реакции при нейтральном рН и при сравнительно низких температурах.

Несмотря на то что препараты и продукты, получаемые в процессах промышленной биотехнологии, наиболее впечатляющие успехи и прорывы в этой области связаны с использованием достижений клеточной и генетической инженерии. К сожалению развитие научно-технического прогресса, сопровождающееся повышением темпов материальных и энергетических ресурсов, приводит к нарушению баланса в биосферных процессах.

Потенциал белковой инженерии позволяет улучшать свойства используемых в биотехнологии белков (ферментов, антител, клеточных рецепторов) и создавать принципиально новые протеины, пригодные в качестве лекарственных препаратов, для обработки и улучшения питательных и вкусовых качеств пищевых продуктов.

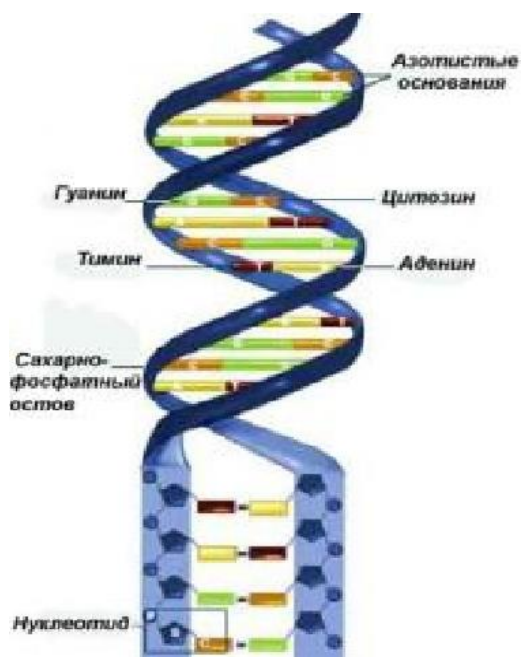
В настоящее время биотехнологию использует на практике молекулярной биологии и генетике, биоорганической химии, производят биопрепараты не только путем микробной ферментации, но современными методами с использованием генетической и клеточной инженерии.

## **1.2 Структура ДНК, РНК и синтез белка**

Структура полинуклеотидов хорошо приспособлена для хранения и передачи информации. Наиболее важными компонентами считаются полипептиды или белки и полинуклеотиды в форме ДНК и РНК. Химические различия между двумя типами полинуклеотидов делают приспособленными их для решения разных задач, например, ДНК - носитель генетической информации, так как ее молекула более стабильна, чем молекула РНК. Вероятно, обусловлено это тем, что полинуклеотид в большей степени подвержен гидролизу.

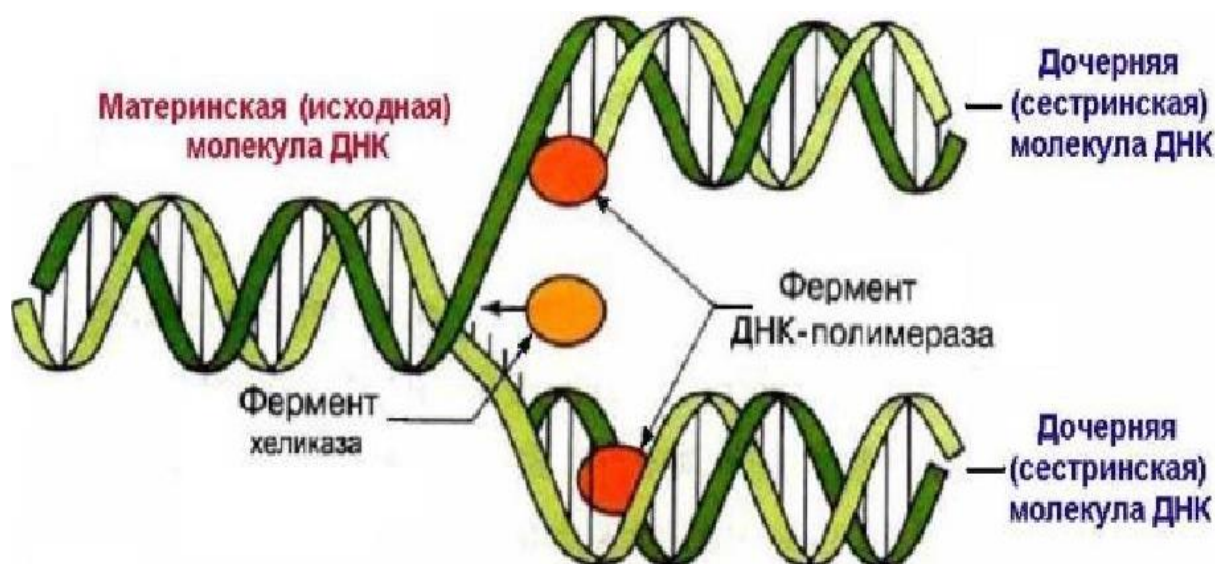
Нативная ДНК - длинная полимерная молекула, состоит из двух цепей, образующих спираль. В состав ДНК входят азотистое основание, дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты.

Азотистые основания делят на пуриновые (аденин и гуанин) и пиримидиновые (тимин и цитозин). Две цепи нуклеотидов соединяются между собой через азотистые основания (рис.1) по принципу комплементарности: между аденином и тимином возникают две водородные связи, между гуанином и цитозином – три. Механизм комплементарного матричного копирования занимает центральное место в процессах переноса информации в биологических системах. Генетическая информация каждой клетки закодирована и передается из поколения в поколение.



**Рис.1** – Схема строения ДНК

Процесс самовоспроизведения ДНК называется репликацией (рис.2), обеспечивающая копирование генетической информации и передачу из поколения в поколение, генетическую идентичность дочерних клеток, образующихся в результате митоза, и постоянство числа хромосом при митотическом делении клетки.

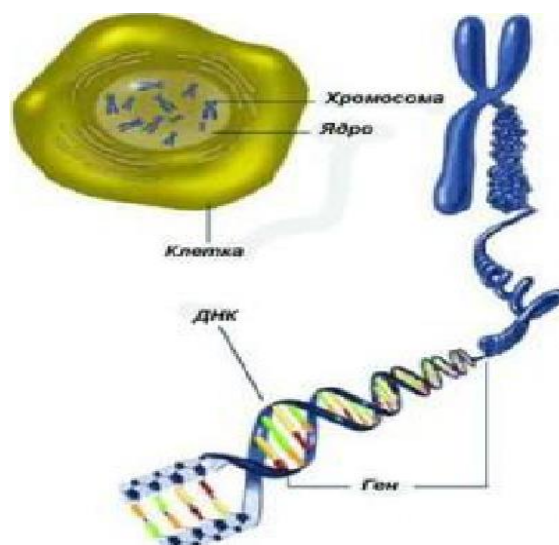


**Рис.2** – Схема репликации (редупликация, удвоение) ДНК

Репликация происходит в синтетический период интерфазы митоза. Фермент репликаза движется между двумя цепями спирали ДНК, разрывает водородные связи между азотистыми основаниями. Затем к каждой из цепочек с помощью фермента ДНК-полимеразы по принципу комплементарности достраиваются нуклеотиды дочерних цепочек. В результате репликации образуются две идентичные молекулы ДНК. Количество ДНК в клетке удваивается. Такой способ удвоения ДНК называется полуконсервативным, так как каждая новая молекула ДНК

содержит одну старую и одну вновь синтезированную полинуклеотидную цепь. Структурными единицами наследственной информации являются гены, кодирующие синтез определенного белка.

Ген – элементарная единица наследственности, представляющая собой участок молекулы ДНК, содержащий информацию о первичной структуре одного белка. ДНК одной хромосомы может содержать несколько тысяч генов, располагающихся в линейном порядке. Гены находятся в хромосомах в ядре клетки.



**Рис.3** – Схема строения хромосомы, гена, ДНК

В некоторых генах 800 пар нуклеотидов, в других - около миллиона.

С молекулярной точки зрения ген представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность, транскрибируемую в РНК. Подавляющее большинство транскрибируемых последовательностей ДНК составляют так называемые структурные гены, на которых синтезируется мРНК. Остальные кодирующие последовательности приходятся на долю тРНК (транспортной) и рРНК (рибосомальной). Структурные гены кодируют белки, другие - только молекулы РНК. Информация кодирующая белки, расшифровывается в ходе двух последовательных процессов: синтеза РНК, носящего название транскрипции и синтеза белка - трансляции.

У прокариот структурный ген представляет собой непрерывный участок молекулы ДНК. Транскрипция начинается со связывания РНК-полимеразы с промотором, и далее последовательно копируется весь структурный ген с образованием функциональной мРНК.

В бактериальном геноме гены почти непрерывно следуют один за другим по всей длине молекулы ДНК, а в некоторых случаях даже

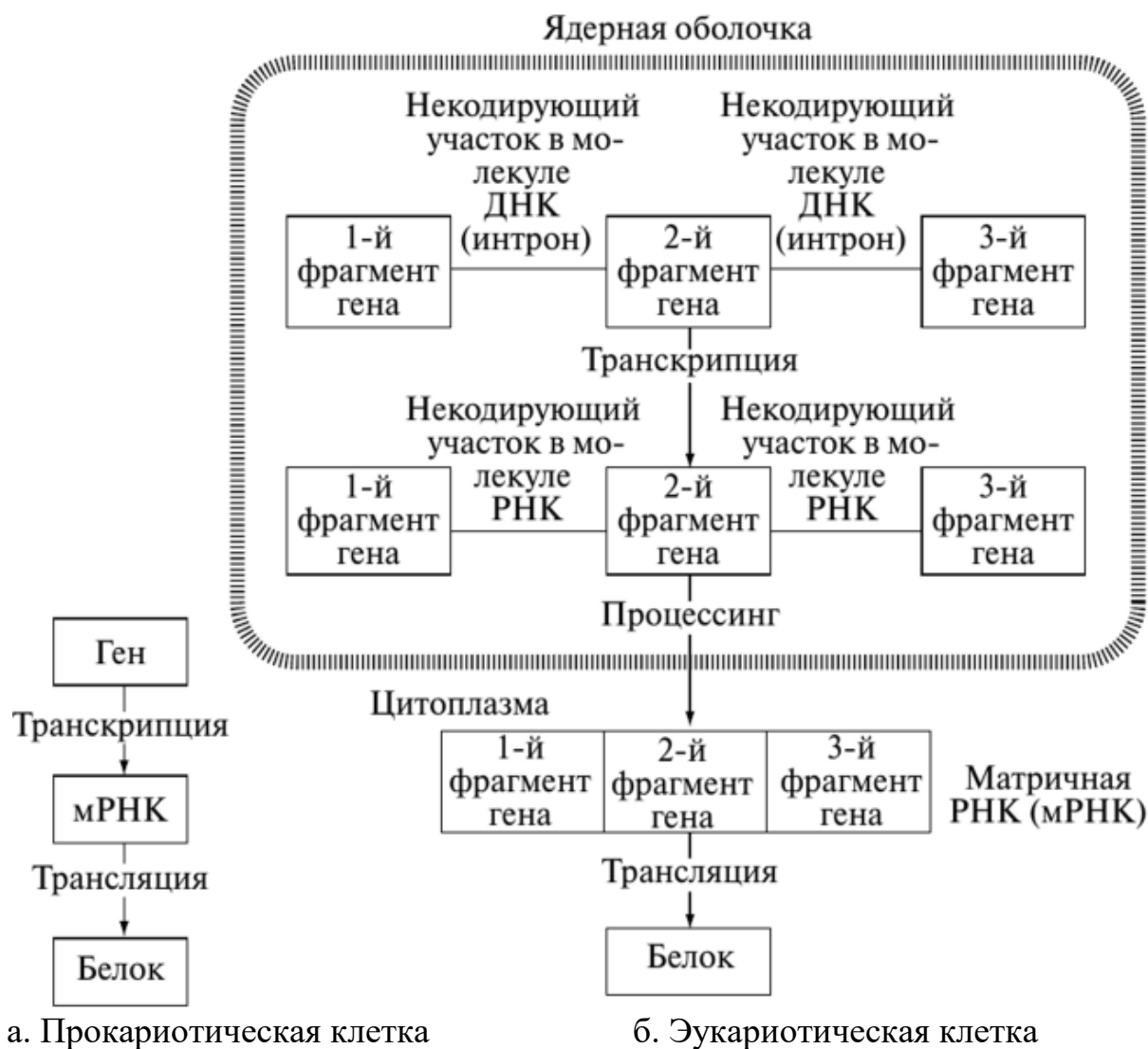
перекрываются. Гены, кодирующие ферменты одного метаболического пути, или ферменты, активности которых так или иначе связаны между собой, часто образуют опероны. Обычно оперон находится под контролем единственного промотора, и при его транскрипции образуется единственная молекула мРНК, кодирующая несколько белков. При трансляции такой мРНК, в которой стоп-кодов предыдущего гена соседствует со старт-кодом последующего, синтезируется набор отдельных белков.

Белок-кодирующие последовательности ДНК у эукариот прерываются не кодирующими участками ДНК. Не кодирующие сегменты называются интронами, а кодирующие участки генов – экзонами. После завершения транскрипции интроны удаляются из первичного транскрипта, а экзоны сшиваются друг с другом, получивший название сплайсинга.

Гены получают одним из трех способов: непосредственным выделением из природного источника, получением дезоксиполи-нуклеотидных репликации (кДНК) путем копирования мРНК и химическим синтезом. Ген в большинстве случаев содержит только последовательность, необходимую для синтеза полипептидной цепи, но не имеет системы сигналов. Такую систему в клетке создает вектор - циклической дезоксиполинуклеотидной молекулы. Сочетание генов и векторов дает рекомбинантную молекулу ДНК.

На определенном участке ДНК сначала синтезируется мРНК (матричная РНК), в животных клетках этот процесс осуществляется в ядре. Затем перенеся информацию из ядра в цитоплазму, в ходе согласованной работы многокомпонентной системы при участии тРНК (транспортных РНК), мРНК, ферментов и различных белковых факторов осуществляется синтез белковой молекулы. Эти процессы обеспечивают правильный перевод зашифрованной в ДНК генетической информации с нуклеотидов на аминокислоты. В свою очередь аминокислотная последовательность белковой молекулы задает ее структуру и функции. Нуклеотиды как субъединицы ДНК, РНК выступают в качестве переносчиков энергии.





**Рис. 4** - Схема последовательных этапов синтеза белков:

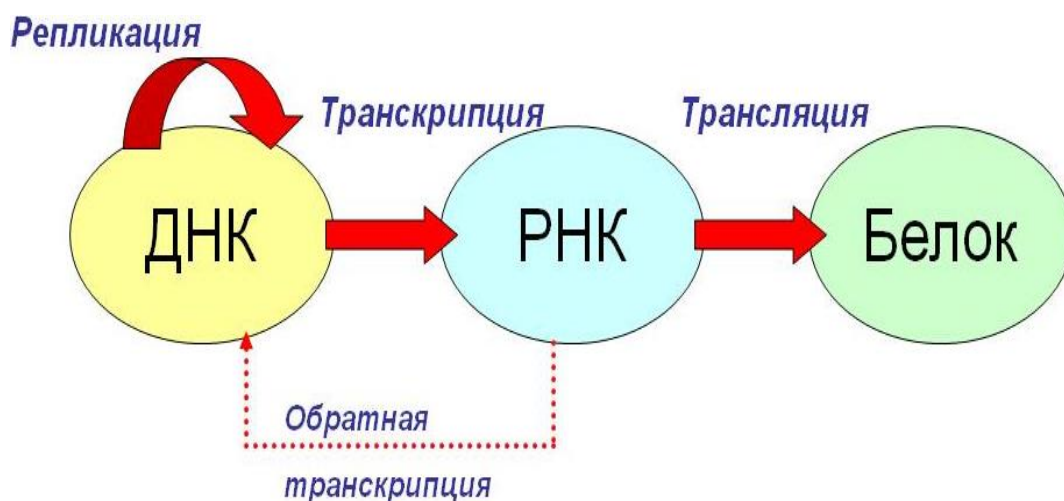
а - экспрессия прокариотического (бактериального) гена: любой синтезируемый белковый продукт коллинеарен кодирующим этот белок областям ДНК; б - экспрессия эукариотического гена: гены дискретны, ядерная оболочка отделяет ДНК от цитоплазмы.

Линейной полинуклеотидной молекулой является РНК. Большинство молекул РНК одно цепочечные, хотя часто в них имеются взаимно комплементарные участки, образующие двух цепочечные структуры. Существуют три основных типа РНК: информационная (мРНК), рибосомная (рРНК) и транспортная (тРНК). Все они играют важную роль в процессе расшифровки генетической информации.

Синтез РНК на ДНК-матрице называется транскрипцией. У большинства прокариот транскрипция всех РНК осуществляется с

помощью одной и той же РНК-полимеразы. У эукариот мРНК, рРНК и тРНК транскрибируются разными РНК-полимеразами.

Транскрипция во многом сходна с репликацией. Матрицей при синтезе РНК служит определенный участок одной из цепей ДНК. РНК-полимераза копирует этот участок, последовательно соединяя друг с другом с помощью рибонуклеотиды. В ходе транскрипции синтезированная молекула РНК отсоединяется от ДНК, и двойная спираль ДНК восстанавливается. Чтобы обеспечить транскрипцию только отдельных сегментов ДНК, должны существовать некие сигнальные последовательности, указывающие, где начинается транскрипция и где она останавливается.



**Рис.5** – Схема обратной транскрипции

Сложившиеся представления о переносе генетической информации по схеме ДНК → РНК → белок принято называть «центральной догмой» молекулярной биологии. Наряду с этим направлением переноса, иногда обозначают как «общий перенос», известна и другая форма реализации генетической информации, обнаруженная у РНК-содержащих вирусов.

В этом случае наблюдается процесс, получивший название обратной транскрипции, когда вирусная РНК, проникшая в клетку-хозяина, служит матрицей для синтеза комплементарной ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы). Следовательно, генетическая информация осуществляется по схеме РНК → ДНК → РНК → белок.

Каждый вид организмов имеет особый, характерный только для набор белков, что составляет основу индивидуальной и видовой специфичности. Однако у особей одного вида белки различаются по строению и свойствам.

Основные отличительные особенности между ДНК и РНК:

- ДНК имеет двухцепочечную структуру, локализована в ядре клетки, построена из АМФ, ГМФ, ЦМФ и ТМФ;

- РНК – одноцепочечная, локализована в цитоплазме, бывает 3-х видов: иРНК, тРНК и рРНК, построена из АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ.

Таким образом, в ДНК никогда не встречается УМФ, а РНК – ТМФ.

Наследственная информация о строении белков хранится в молекулах ДНК, входящие в ядро хромосом. Непосредственного участия ДНК в синтезе белка не принимает. Синтез белка осуществляется в рибосомах. Генетическая информация в ядре с молекулы ДНК передается на информационную молекулу РНК (иРНК). Вся последовательность процессов, происходящих при синтезе белковых молекул, можно объединить в 3 этапа: транскрипция, процессинг и трансляция.

Транскрипция - процесс синтеза молекулы иРНК на молекуле ДНК, выступающей в роли матрицы. Передача генетической информации осуществляется с молекулы ДНК на молекулу иРНК (информационную или матричную). ДНК деспирализуются, рвутся водородные связи между азотистыми основаниями и цепочки расходятся на участке какого-либо гена. Сборку молекулы иРНК осуществляет фермент РНК-полимераза по принципу комплементарности из свободных нуклеотидов.

Некоторые участки иРНК не несут информацию о будущей молекуле белка. Их присутствие связано с особенностями строения генов и механизма транскрипции.

Процессинг - процесс созревания молекулы информационной РНК, сопровождающийся удалением участков, не несущих информацию о последовательности аминокислот в синтезируемом белке и сращиванием остающихся фрагментов. Поэтому длина созревшей и направляющейся к

рибосомам молекулы иРНК оказывается короче первоначальной. Эту РНК называют матричной (мРНК).

Трансляция – этап синтеза белка, происходящий в рибосомах ядра и цитоплазмы. В нем активное участие принимают транспортные РНК (тРНК), которые подносят к рибосоме активированные аминокислоты и участвуют в расшифровке генетического кода. Небольшие молекулы (70-90 нуклеотидов) тРНК способны сворачиваться таким образом, что образуют структуры, напоминающие по форме клеверный лист. В клетке имеется столько же разных тРНК, сколько кодонов, шифрующих аминокислоты. На вершине среднего «листа» имеется распознающий триплет – антикодон. Трансляция состоит из трех фаз: инициации, элонгации и терминации.

Инициация - на этом этапе происходит сборка всего комплекса, участвующего в синтезе молекулы белка. Последовательно объединяются мРНК, малая субъединица рибосомы, первая тРНК со своей аминокислотой, специальные ферменты и большая субъединица рибосомы.

Элонгация - в молекуле любой мРНК есть участок, комплементарный рРНК - малой субъединицы рибосомы и специфически управляемый ею. На рибосоме имеются два участка для связывания двух молекул тРНК. На пептидилном участке уже находится первая тРНК, несущая аминокислоту метионин, с неё начинается синтез любой молекулы белка. Во второй аминоацильный участок (рибосомы) поступает вторая молекула тРНК, она присоединяется к своему кодону. Между метионином и второй аминокислотой образуется пептидная связь. Вторая тРНК перемещается вместе со своим кодоном мРНК в пептидилный центр. Перемещение тРНК с полипептидной цепочкой из аминоацильного участка в пептидилный сопровождается продвижением рибосомы по мРНК на шаг, соответствующий одному кодону. Этот этап требует затраты энергии. тРНК, доставившая метионин, уходит, а аминоацильный центр освобождается. В него поступает новая тРНК, связанная с аминокислотой, зашифрованной очередным кодоном. Между третьей и второй аминокислотами образуется

пептидная связь, третья тРНК вместе с кодоном мРНК вновь перемещается в пептидилный центр.

Таким образом, в растущей белковой молекуле аминокислоты оказываются соединенными в последовательности, в которой расположены шифрующие их кодоны мРНК. Процесс элонгации, удлинения белковой цепи, продолжается до тех пор, пока в рибосому не попадет один из трех кодонов, не кодирующих аминокислоты. Это триплеты терминации: УАА, УГА, УАГ. Ни одна из тРНК не может занять место в аминоацильном центре.

Терминация - завершение синтеза белковой молекулы. В клетке не существует тРНК с антикодонами, комплементарными триплетам терминации. К рибосоме присоединяется специальный фактор терминации, который способствует разъединению субъединиц рибосомы и освобождению синтезированной молекулы белка.

Последовательность триплетов в молекуле иРНК определяет последовательность аминокислотных остатков в синтезируемой на данной матрице молекуле белка. Только в том случае, если антикодон тРНК комплементарен кодону иРНК, тРНК оставляет в рибосоме принесенную аминокислоту, в дальнейшем она присоединяется к синтезируемой белковой цепочке. Для увеличения производства белков по одной молекуле мРНК перемещается сразу много рибосом. Такую структуру, объединенную одной матрицей (молекулой мРНК), называют полирибосомой. В рибосоме могут находиться одновременно две тРНК.

Таким образом, зная строение ДНК (гена), можно расшифровывать структуру молекулы белка. Если известны изменения в ДНК, то можно предвидеть изменения в структуре белка.

### **1.3 Технология рекомбинантных ДНК**

Технология рекомбинантных ДНК - это совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществлять перенос генетической информации из одного организма в другой, выделять

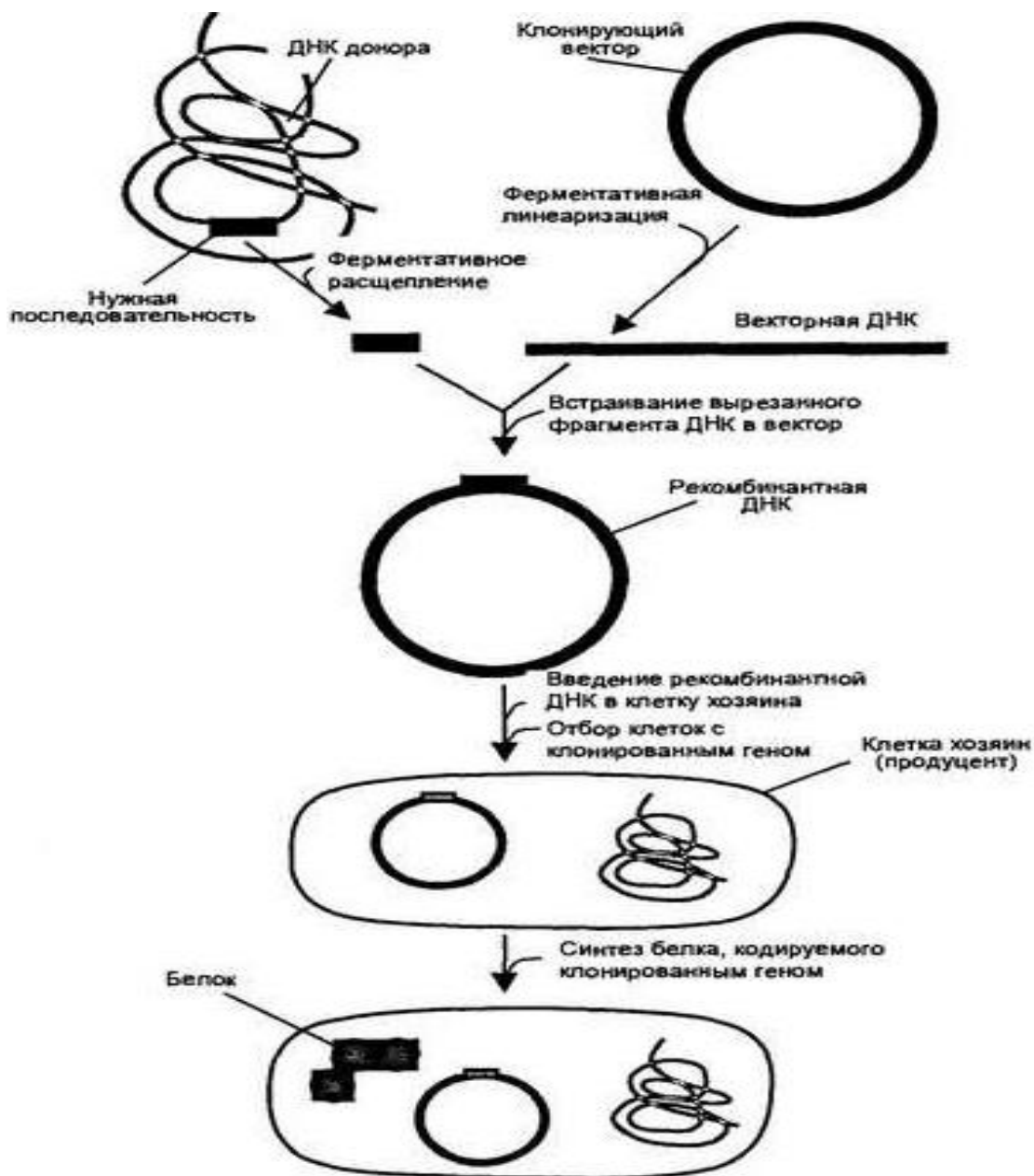
конкретные гены, вырезать отдельные участки ДНК, получать нуклеотиды на ДНК-синтезаторах практически в неограниченном количестве, определять последовательность нуклеотидов, изменять выделенный ген, ввести его вновь в геном культивируемых клеток, где этот измененный ген начнёт функционировать.

Технология рекомбинантных ДНК стимулировала не только развитие различных областей науки, но и создала необходимые предпосылки для появления биотехнологии.

Самым эффективным методом повышения продуктивности организмов до эпохи рекомбинантных ДНК был мутагенез с последующей селекцией оптимального штамма продуцента. Это длительный, трудоемкий, высоко затратный и не безошибочный процесс, позволяющий улучшить лишь немногие из присущих природному организму свойств. В то же время технология рекомбинантных ДНК — это быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов с заранее заданными генетическими характеристиками.

Понятие «рекомбинантная ДНК» тесно связано с понятием «клонирование». Если с первым термином всё понятно — это молекула, составленная из фрагментов ДНК разного происхождения, то со вторым часто происходит путаница. Если речь идет о геномной инженерии, то под клонированием обычно подразумевается молекулярное клонирование, то есть введение интересующего фрагмента ДНК в молекулу-вектор, которая вместе с собой размножит этот фрагмент в какой-то клетке. Иногда ген нужно не копировать в составе вектора, а встроить в хромосому клетки, и тогда он будет размножаться только вместе с ней, при клеточном делении.

Молекулярное клонирование используют для создания рекомбинантной ДНК. Это один из двух наиболее широко используемых методов, наряду с полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Он позволяет управлять репликацией любой конкретной последовательности ДНК, выбранной экспериментатором.



**Рис.6** – Клонирование рекомбинантной ДНК:

донорную ДНК расщепляют рестрицирующей эндонуклеазой и встраивают в клонирующий вектор. Полученную конструкцию вводят в популяцию клеток-хозяев, идентифицируют те клетки, которые содержат рекомбинантную ДНК и культивируют их.

Есть два фундаментальных различия между методами рекомбинантных ДНК. Одним из них является то, что молекулярное клонирование включает репликацию в живой клетке, а ПЦР - в пробирке. Другое отличие состоит в том, что первый метод допускает вырезание и вставку последовательностей ДНК, а второй усиливается путем копирования существующей очередности.

Получение рекомбинантной ДНК требует клонирующего вектора. Он происходит от плазмид или вирусов и представляет собой относительно небольшой сегмент. Выбор вектора для молекулярного клонирования зависит от выбора организма-хозяина, размера клонируемой ДНК и от того, должны ли экспрессироваться чужеродные молекулы. Поскольку при каждом клеточном делении бактерии удваивают свою ДНК, это можно использовать для умножения количества необходимой ДНК. Для того, чтобы внедрить фрагмент ДНК в бактерию, необходимо «вшить» его в специальный вектор, в качестве которого обычно используют бактериальную плазмиду. В некоторых случаях используют искусственную бактериальную хромосому.

В плазмиду с помощью рестриктаз и лигаз встраивают необходимый фрагмент ДНК, после чего добавляют ее в культуру бактерий при специальных условиях, обеспечивающих трансформацию — процесс активного захвата бактерией ДНК из внешней среды (рис.7). После этого проводят отбор бактерий, трансформация которых прошла успешно, добавляя соответствующий гену в плазмиде антибиотик: в живых остаются только клетки, несущие ген устойчивости. Далее, после роста культуры клеток, из нее выделяют плазмиды, а из них с помощью рестриктаз выделяют фрагмент ДНК (или используют плазмиду целиком). Если же ген вставили в плазмиду для того, чтобы получить его белковый продукт, необходимо обеспечить культуре условия для роста, а потом просто выделить требуемый белок.

Конструирование рекомбинантных молекул осуществляется с помощью ряда ферментов — обязательного и незаменимого инструмента практически всех этапов сложного процесса, прежде всего ферментов рестрикции (рестрицирующих эндонуклеаз, рестриктаз).



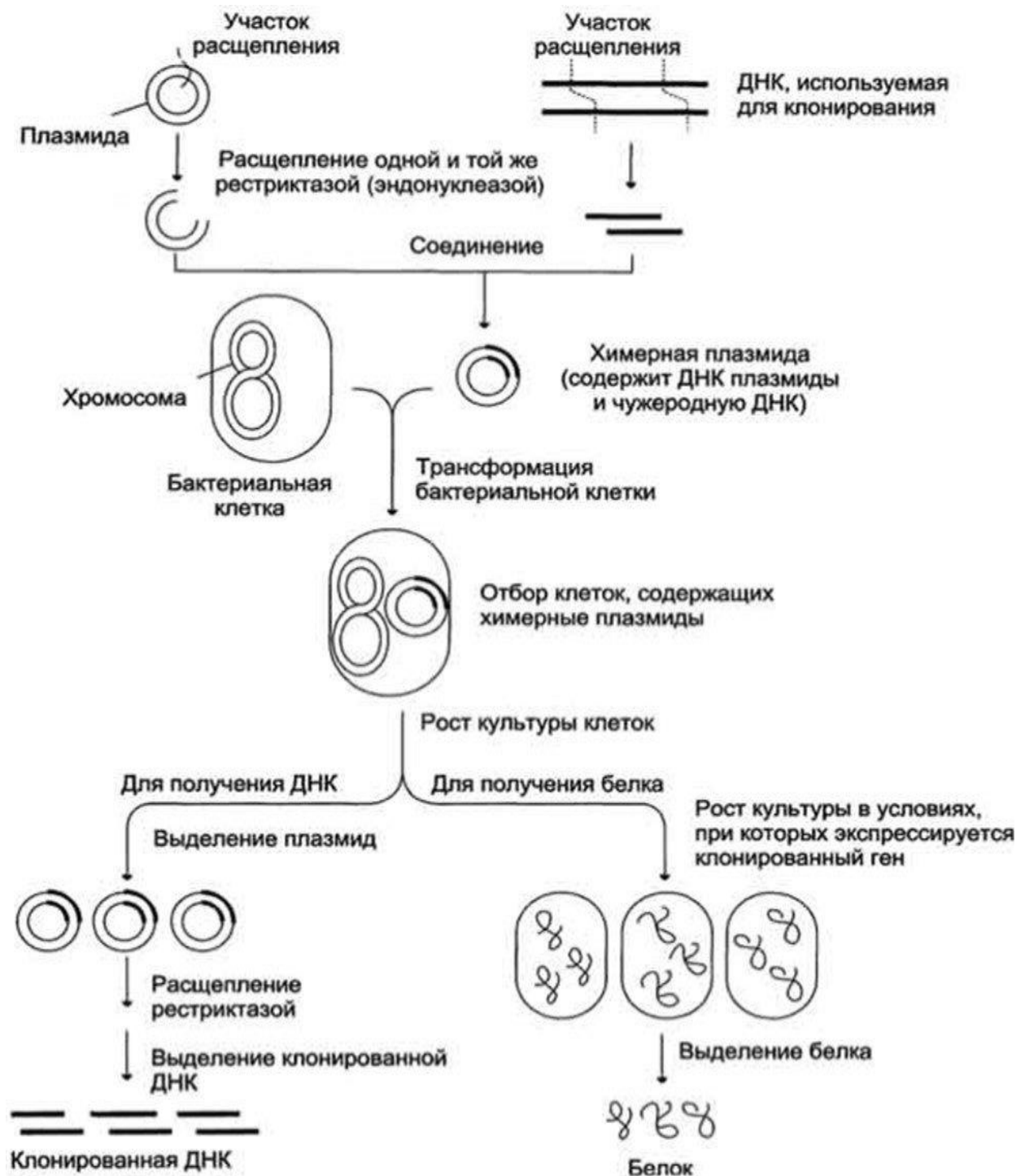
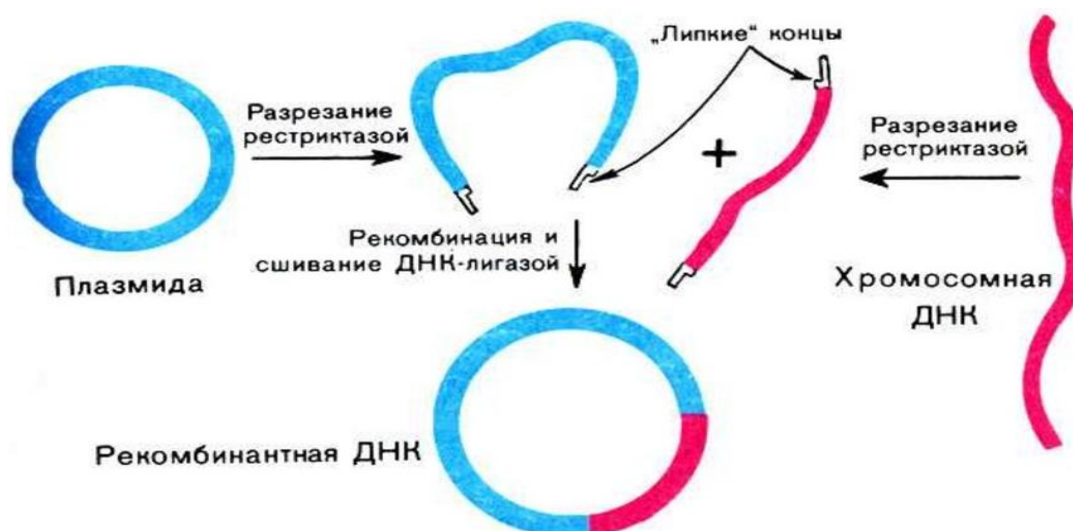


Рис.7 - Схема клонирования участка ДНК в бактериях

Рестриктазы являются составной частью системы рестрикции — модификации прокариотических клеток. Данная система связана с защитой клеток от проникновения чужеродной ДНК.



**Рис.8** – Создание рекомбинантной ДНК с использованием рестрикции

Система модификации осуществляет немедленное метилирование собственной ДНК после ее узнавания и репликации; чужеродную ДНК, проникающую в клетку, бактерии гидролизуют с помощью рестриктаз. Несмотря на то, что все рестриктазы узнают на ДНК строго определенные последовательности, различают 3 основных класса рестриктаз:

- рестриктазы I класса разрывают молекулы ДНК в произвольных точках;
- рестриктазы II класса расщепляют ДНК только внутри сайтов узнавания, состоят из двух отдельных белков: рестрикционной эндонуклеазы и модифицирующей метилазы;
- рестриктазы III класса узнают и расщепляют ДНК на фиксированном от сайтов рестрикции расстоянии, обладают метилирующей и эндонуклеазной активностью.

В молекулярной биотехнологии и в генной инженерии, используются исключительно ферменты второго класса. В настоящее время выделено около 500 рестриктаз этого класса. Эти ферменты синтезируют самые разнообразные микроорганизмы. Для их культивирования необходимы оптимальные условия (температура, рН среда, концентрация кислорода и т.д.). С целью повышения продуктивности и процесса получения этих ферментов клонируют гены рестрицирующих эндонуклеаз в *E.coli*.

Большинство рестриктаз узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двух цепочечной молекуле ДНК. При молекулярном клонировании важно, чтобы расщепление донорной и векторной ДНК происходило в строго определенных участках.

Каждый фермент рестрицирующих эндонуклеаз узнает в ДНК специфическую последовательность от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Связано это с вероятностью встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов - через 4096 пар оснований.

Таким образом, одна часть рекомбинантной молекулы ДНК несет нужный ген, который предполагается клонировать, другая — содержит информацию, необходимую для репликации в клетке.

#### **1.4. Плазмидные векторы**

Плазмиды представляют собой внехромосомный генетический элемент в виде кольцевых молекул ДНК, содержащих 1-3% генома бактериальной клетки. Плазмиды есть у всех бактерий. Одни из них содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (Р-плазмиды), другие - несут гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию метаболитов. Каждая плаزمида содержит участок начала репликации, без которого репликация плазмиды в клетке-хозяине невозможна. Если две или более плазмиды не могут

сосуществовать в одной и той же клетке — они принадлежат к одной группе несовместимости.

Плазмиды, относящиеся к разным группам несовместимости, беспрепятственно существуют в одной клетке независимо от числа копий. У некоторых микроорганизмов в одной клетке обнаружено до 10 разных плазмид, каждая из которых выполняла свои функции и относилась к своей группе несовместимости. Репликация плазмид идет независимо от репликации хромосом. Количество копий определяется регуляторной системой клетки.

Плазмиды – клеточные структурные элементы способные к автономной репликации, имеющие самые разнообразные величины. Мелкие плазмиды, содержащиеся в клетке в большом количестве копий, реплицируются независимо от бактериальной хромосомы, хотя существуют системы, контролирующие их численность. При некоторых условиях, например, при подавлении синтеза белка, бактериальная хромосома уже не может удваиваться, а плазмиды активно реплицируются и их численность увеличивается. Этот феномен используют при выделении плазмидной ДНК. Мельчайшие формы могут содержать в себе около двух тысяч парных оснований или меньше, в то время как другие, крупнейшие формы плазмид, заключают в себе по несколько сотен тысяч оснований парного типа.

Плазмиды попадают в клетку, используя один из двух путей. Первый путь – установление контакта между клеткой-носителем и клеткой, которая не содержит плазмид. Существуют конъюгативные плазмиды у бактерий грамположительных и грамотрицательных. К первому способу относятся передачи в момент трансдукции или трансформации. Вторым путем осуществляется искусственно, путем внедрения плазмид в клетку, при этом организм должен пережить экспрессию генов клетки-носителя, то есть приобрести компетентность клетки.

Таким образом, плазмиды обладают свойствами, позволяющими использовать их в качестве вектора для переноса клонируемой ДНК.

Бактериальный клон, содержащий такую плазмиду, можно сравнить с фабрикой по производству этого фрагмента.

Плазмидные векторы, как правило, создают методом генной инженерии, так как природные (не модифицированные) плазмиды лишены ряда обязательных для «высококачественного вектора» свойств:

- небольшого размера, так как эффективность переноса экзогенной ДНК в *E. coli* снижается при длине плазмиды более 15 тысяч пар нуклеотидов;
- наличия участка рестрикции, в который осуществлена вставка;
- наличия одного или более селективных генетических маркеров для идентификации реципиентных клеток, несущих рекомбинантную ДНК.

Вводят плазмиды в соматические клетки с помощью химических реагентов, повышающих проницаемость клеточной оболочки. Чтобы обеспечить проникновение в клетки плазмидной ДНК, их обрабатывают ледяным раствором кальция хлорида, затем выдерживают при 42°C в течение 1,5 мин. Эта обработка приводит к локальному разрушению клеточной стенки.

Максимальная частота трансформации составляет 10, т.е. на каждую тысячу клеток приходится одна трансформированная. Частота трансформации не бывает 100%, в связи этим используют схемы отбора, что позволит идентифицировать трансформированные клетки.

В качестве маркеров плазида может содержать гены, определяющие устойчивость бактерии к антибиотикам. Вставка чужеродного (донорного) гена в маркерный ген приводит к инактивации последнего. Это позволяет отличать трансформированные клетки, получившие векторную плазмиду (утратившие устойчивость к антибиотику), от клеток, получивших рекомбинантную молекулу (сохранивших устойчивость к одному, но утративших устойчивость к другому антибиотику). Этот прием называется инактивацией маркера вставки.

Для отбора трансформированных клеток, содержащих гибридную плазмиду (рекомбинантную ДНК), проводят тестирование на резистентность к определенным антибиотикам. Например, клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину (в маркерный ген которого и внедрена донорная ДНК). Процесс разделения геномной ДНК на клонируемые элементы и введения этих элементов в клетки-хозяева называется созданием геномной библиотеки (банка клонов, генов).

Генетический вектор – молекула ДНК или РНК, которые способны переносить в клетку чужеродную ДНК, обеспечить её амплификацию и интеграцию в геном. По профилю использования векторы бывают:

- векторы для клонирования – используются для амплификации фрагмента ДНК, встроенного в вектор посредством её репликации.

- экспрессионные векторы – для наработки определенного белка, а также для анализа генома и его продуктов.

- векторы для трансформации – служат для введения чужеродного фрагмента ДНК в геном реципиента.

Существуют следующие требования к векторам:

- вектор должен быть небольшим и содержать сайты рестрикции для нескольких рестриктаз;

- должен обладать определенной емкостью;

- быть способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться);

- многократно копироваться (амплифицироваться);

- экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности);

- должен иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции;

- должен быть способным передаваться в клетку соответствующего организма.

В настоящее время широко применяются, в качестве прокариотических векторов - плазмиды, бактериофаги, а в качестве эукариотических - вирусы животных и растений, а также искусственно сконструированные векторы, способные реплицироваться как в бактериальных, так и в эукариотических клетках (челночные векторы).

Бактериальные плазмиды делятся на два класса. Одни плазмиды (например, хорошо изученный фактор F, определяющий пол у *E.coli*) сами способны переходить из клетки в клетку, другие такой способностью не обладают. По ряду причин, и прежде всего для предотвращения неконтролируемого распространения потенциально опасного генетического материала, подавляющее большинство бактериальных плазмидных векторов создано на основе плазмид второго класса.

Важнейшим компонентом вектора является его репликон - элемент, от которого зависит автономное размножение вектора в клетке-хозяине. Чтобы получить плазмидный вектор, необходимо объединить репликон с генами, которые допускали бы возможность селекции. Гены, кодирующие резистентность к антибиотикам, оказались наиболее полезными.

Особенность плазмиды состоит в том, что в присутствии ингибитора синтеза белка антибиотика хлорамфеникола ее число в *E.coli* возрастает от 20-50 до 1000 молекул на клетку, что позволяет получать большие количества клонируемого гена.

Для всех процедур молекулярного клонирования широко используется *E. coli* в качестве клетки-хозяина. Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК, называются компетентными; компетентность *E.coli* повышают, используя специальные условия культивирования. Для получения больших количеств чужеродных белков с помощью рекомбинантных штаммов *E. coli* была сконструирована плазида, содержащая сильный промотор, селективный маркерный ген и короткий участок с несколькими уникальными сайтами для рестрицирующих ферментов - полилинкер.

Эффективным методом трансформации *E. coli* плазмид является воздействие на клеточные мембраны электротоком для увеличения их проницаемости (электропорация). Для введения клонированных генов в соматические клетки применяют микроинъекции и микроукалывания или слияние с клеткой нагруженных ДНК мембранных везикул (липосом).

Плазмидные векторы удобны для клонирования относительно небольших фрагментов геномов, т.е. плазмидные вектора обладают небольшой емкостью. Если же требуется получить клонотеку генов высших растений и животных, общая длина генома которых достигает огромных размеров, то обычные плазмидные векторы для этих целей непригодны. Проблему создания библиотек генов для высших эукариот удалось решить с помощью использования в качестве клонирующих векторов производных бактериофаг.

Бактериофаги – группа вирусов, паразитирующих в бактериальных клетках. Они широко распространены в природе — их выделяют из воды, почвы, организмов различных животных и человека.

Принципы классификации бактериофагов аналогичны подходам к систематике вирусов. В основу классификации положены антигенная структура, морфология фагов, спектр действия, химический состав и др. Большинство фагов относится к ДНК-содержащим вирусам с нуклеокапсидом, организованным по принципу смешанной симметрии.

Использование бактериофагов в качестве носителей генетической информации основано на том, что рекомбинантный ген встраивается в геном вируса и в последующем реплицируется с генами вируса при размножении в инфицированной клетке-хозяина. С этой целью применяют бактериофаг М-13 - вирус с двух цепочечной ДНК, которая после проникновения в клетку смыкается в кольцо. Бактериофаг М-13 - вирус нитевидной формы с кольцевой замкнутой ДНК, которая в клетке превращается в двух цепочечную и реплицируется в клетках-потомках. В поисках эукариотических систем экспрессии, для получения биологически активных белков, созданы бакмиды - экспрессирующие векторы на основе



бакуловирусов для E. coli и клеток насекомых. Выход рекомбинантных бакуловирусов в такой системе повысился до 99%. Клетки насекомого, инфицированные бакуловирусами, синтезировали гетерологичный белок. Векторы на основе фага удобны для создания клонеток (банка генов), но не для тонких манипуляций с фрагментом ДНК. Для детального изучения и преобразования фрагменты ДНК переклонировывают в плазмиды.

Кроме указанных векторов применяют гибридные вектора, содержащие ДНК фага и плазмиды. К ним относятся космиды и фазмиды.

Космиды – плазмидные вектора, в которые встроен участок генома фага  $\lambda$ , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Фаговые частицы обеспечивают хорошее проникновение гибридной ДНК в клетку (путем инъекции), после чего происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам, и репликация ее по плазмидному типу.

Фазмиды - гибриды между фагами и плазмидами - способны развиваться как фаг и как плазида. Уступая космидам по клонирующей емкости, фазмиды дают возможность отказаться от переклонирования генов из фаговых в плазмидные векторы.

Основными компонентами космидного вектора являются: плазмидный репликон, маркер резистентности к антибиотику и фрагмент ДНК фага  $\lambda$ , который содержит так называемый COS – участок или липкие концы, репликон, маркер антибиотикорезистентности. Наличие COS - участка позволяет производить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*, что обеспечивает возможность их введения в клетку путем инфекции, а не трансформации.

Основная проблема при разработке векторов — преодоление иммунологического барьера реципиента, ограждающего организм от различных внешних воздействий, в том числе и от внедрения чужеродной ДНК в геном клеток. Особый интерес представляют вирусы, так как из всех известных агентов лишь они способны более или менее успешно

интегрировать генетический материал в геном клеток. Поэтому все усилия специалистов генной терапии на настоящий момент сконцентрированы в области генной инженерии вирусов, применяемых в качестве векторов, доставляющих терапевтические гены в клетки организма больного.

Векторы, созданные на основе ДНК-вирусов, обладают большими размерами по сравнению с РНК-вирусами и поэтому могут вмещать фрагменты ДНК (трансгены) длиной до 35 000 пар оснований. С точки зрения переноса чужеродного ДНК в организм реципиента удобными оказались так называемые «челночные векторы», способные реплицироваться как в клетках животных, так и в клетках бактерий. Их получают, сшивая друг с другом большие сегменты вирусов животных и бактерий так, чтобы районы остались незатронутыми. Это позволяет проводить основные операции по конструированию вектора в бактериальной клетке, а затем полученную рекомбинантную ДНК использовать для клонирования генов в животной клетке.

Таким образом, для получения любого белкового продукта необходимо обеспечить правильную транскрипцию кодирующего его гена и трансляцию соответствующей мРНК. Для синтеза РНК в нужном сайте необходим промотор, для ее остановки -терминирующий кодон. Придавать новые свойства существующим белкам, создавать уникальные ферменты, производя специфические изменения с помощью плазмид или ПЦР.

### **1.5 Иммунологический скрининг**

Важнейшей технологией в установлении функции отдельных генов является секвенирование - общее название физико-химических методов, позволяющая установить первичную структуру в молекулах биополимеров. Технологии ДНК-секвенирование зародились в 70-х годах прошлого века благодаря работам У. Гилберта и Ф. Сенгера.

В основе, данной технологий лежат различные стратегии, основанные на уникальных комбинациях приготовления ДНК-матриц, визуализации, выравнивание и составление нуклеотидных последовательностей.

Важнейшим достижением в области секвенирования нуклеиновых кислот является геном человека, в процессе исследований определено точное число генов, их взаиморасположение на генетической карте и структурно-функциональные особенности. В процессе секвенирования генома организма можно получить информацию о всей ДНК, находящейся в клетках хромосом, сведения о количестве и последовательности всех генов и не кодирующих участков. Помимо колоссальных теоретических обобщений предполагалось, что исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе развития очень многих моногенных нарушений, окажет огромное влияние на понимание патогенеза, предупреждение и лечение наследственных болезней, будет способствовать более эффективному поиску генетических основ наследственной предрасположенности к различным болезням.

К настоящему времени в мире идентифицировано множество генов, расшифрованы структуры этих генов, что позволяет проводить раннюю и эффективную диагностику и лечение.

Установленная последовательность генома поможет идентифицировать новые гены и выявить среди них те, что обуславливают предрасположенность к тем или иным заболеваниям.

Не менее важное значение секвенирование нуклеиновых кислот имеет для животноводства и ветеринарии. Секвенирование геномов животных широко используется для определения изменчивости генов внутри и между породами, установления происхождения и генетических взаимосвязей внутри популяции, идентификации географической локализации отдельных популяций, осуществления картирования генов, включая идентификацию носителей известных аллелей генетически детерминированных заболеваний, а также аллелей и генов, ассоциированных с повышенной устойчивостью к инфекционным и неинфекционным заболеваниям.

В 2009 г было выполнено полное секвенирование генома крупного рогатого скота, что привело к многообещающему открытию для поисков биомаркеров повышенной устойчивости и продуктивности животных.

Благодаря развитию методов геномного сканирования появилось новое направление – геномная селекция.

Геномная селекция подразумевает использование ДНК-матриц для генотипирования около 50 тыс. однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в геноме коров, генотипы по SNP которых ассоциированы с желательным проявлением характеристик молочной продуктивности.

Основные методы секвенирования - химический и ферментативный.

Химическое секвенирование основано на избирательном разрушении нуклеотидов. Метод секвенирования ДНК путем химической дегградации был предложен в 1977 г А.М. Максом и В. Гильбертом. В его основе лежит расщепление меченого по одному концу фрагмента ДНК под действием специфических реагентов. Для секвенирования этим методом вначале получают одноцепочечную молекулу ДНК, один из концов которой метят с помощью радиоизотопа фосфора ( $^{32}\text{P}$ ). Препарат меченый ДНК делят на 4 порции, каждую из которой обрабатывают реагентом, специфически разрушающим азотистые основания.

Концентрация модифицирующего реагента и продолжительность его воздействия на молекулы ДНК подбирается с таким расчетом, чтобы в каждой молекуле произошла модификация только одного нуклеотида, а поскольку в реакционной смеси присутствует огромное количество таких молекул, то согласно теории вероятности, все основания данного типа в секвенируемом фрагменте ДНК окажутся модифицированными. Так при добавлении 60% муравьиной кислоты разрушаются пуриновые основания (аденин и гуанин), а при диметилсульфата – только гуанина, гидразин разрушает пиримидиновые основания (тимин и цитозин), под действием 1,5 М NaCl разрушаются только цитозинового основания. В результате получается набор меченых фрагментов, длина которых определяются

расстоянием от разрушенного азотистого основания до конца молекулы. Фрагменты, образовавшиеся во всех четырех пробах, разделяют путем электрофореза в акриламидном геле.

Проводят радиоавтографию и по положению фрагментов, содержащих радиоактивную метку, определяют расстояние от меченого конца где находилось разрушенное основание. Однако метод имеет ряд недостатков, среди них - длительность анализа и трудоемкость.

Ферментативное секвенирование предложенный в 1977 г известен как метод Сэнгера и получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. Этот способ несколько модифицированный, но до сих пор применяется технологичном варианте.

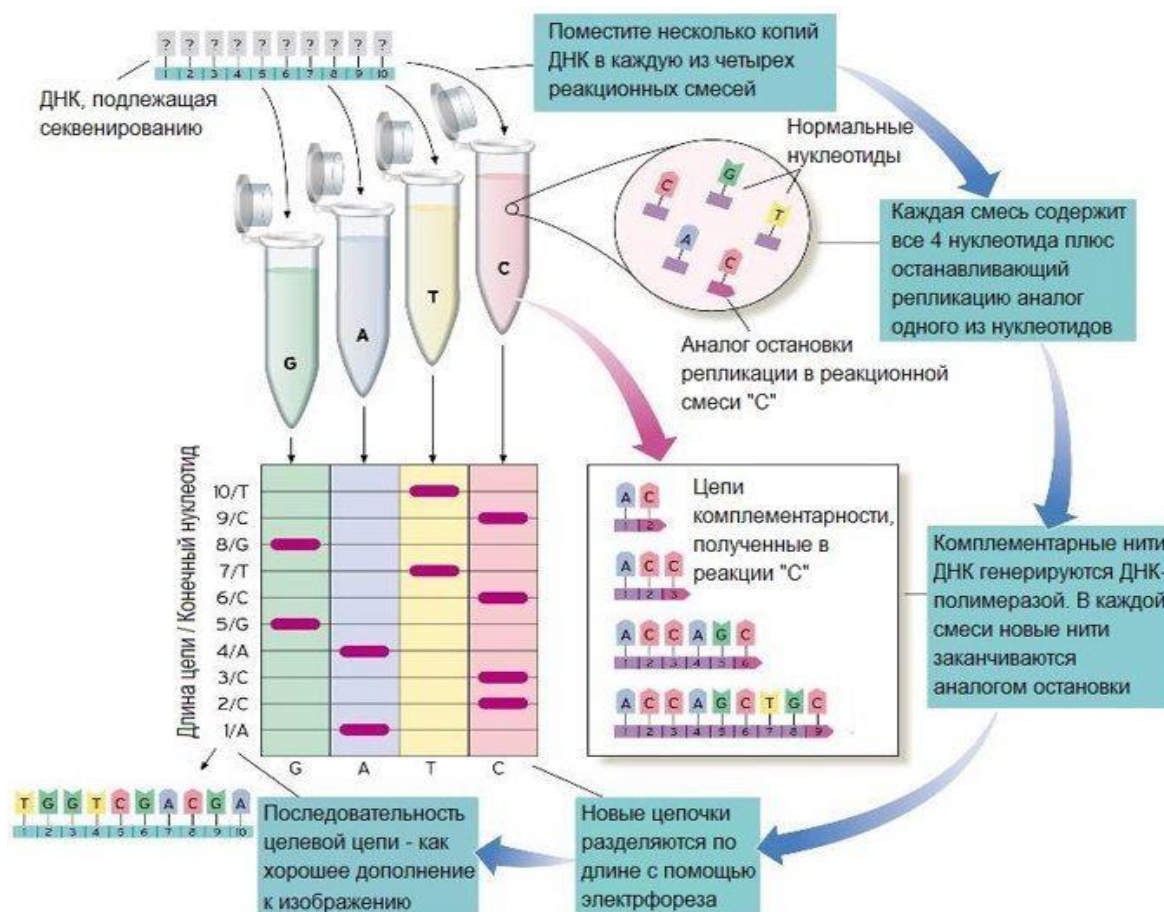


Рис.9 - Ферментативный метод секвенирования

В основе метода лежит ферментативное клонирование ДНК, используя синтетически олигонуклеотидов в качестве праймеров. По четырем пробиркам распределяют раствор с праймерами, в каждой из которых находятся четыре дезоксирибонуклеотида, dATP, dCTP, dGTP и dTTP,

один из них — меченный радиоактивным изотопом и один из четырех дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP).

Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается. В результате этого в каждой из четырех пробирок при участии ДНК-полимеразы образуется уникальный набор олигонуклеотидов разной длины, включающих праймерную последовательность. Далее в пробирки добавляют формамид для расхождения цепей и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках. Проводят радиоавтографию, которая позволяет прочесть нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК.

В более современном варианте дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями, в одной пробирке проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Затем в определенном месте геля во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера возбуждают флуоресценцию красителей, детектором определяют какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель.

Технология методов секвенирования нового поколения позволяет «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что является главным отличием от более ранних методов секвенирования.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Каков химический состав ДНК, ее структура и функции?
2. Что такое нуклеотид? Какие нуклеотиды входят в состав ДНК?
3. Что обуславливает первичную структуру молекулы ДНК?
4. В репликации молекулы ДНК какие ферменты принимают участие?
5. Каков химический состав и структура молекулы РНК?
6. В чем сходство и отличие ДНК и РНК?
7. Где синтезируется иРНК и какова ее функция?
8. Из каких этапов состоит биосинтез белка?
9. Где и каким образом происходит трансляция?
10. Какие молекулы ДНК называют векторными?

## **2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Объектами молекулярной биотехнологии являются самые разнообразные биологические системы: микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, вирусы насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы (растения, мышцы, домашние животные и т.д.) — выбор системы зависит от целей эксперимента. Характер биологической системы исключительно важен для биотехнологического процесса. Среди множества биологических объектов, используемых в молекулярной биотехнологии являются бактерии, одноклеточные дрожжи и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

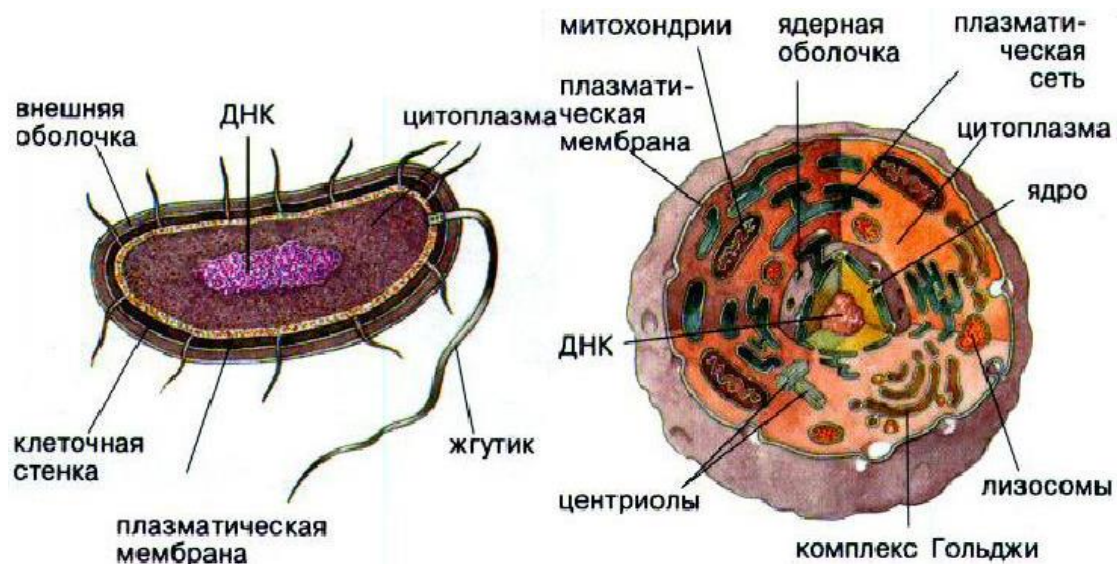
### **2.1 Прокариоты и эукариоты**

Все живые организмы делятся на две основные группы: прокариоты и эукариоты. В основе этой классификации лежат многочисленные структурные различия, основные из них:

- наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- строение и химический состав клеточной стенки;
- наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической клетке, например, бактериальная и хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан, в клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл.

В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре, клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (аппарат Гольджи, митохондрии).



**Рис.10** – Сравнение прокариотической и эукариотической клетки

Основное отличие прокариотических клеток от эукариотических заключается в том, что их ДНК не организована в хромосомы и не окружена ядерной оболочкой. Эукариотические клетки устроены значительно сложнее. Их ДНК, связанная с белком, организована в хромосомы, которые располагаются в особом образовании, по сути самом крупном органоиде клетки - ядре. Кроме того, внеядерное активное содержимое такой клетки разделено на отдельные отсеки с помощью эндоплазматической сети, образованной элементарной мембраной. Эукариотические клетки обычно крупнее прокариотических. В эукариотической клетке носители генов - хромосомы - находятся в морфологически оформленном ядре, отграниченном от остальной клетки мембраной.

### **2.1.1 Генетическая трансформация прокариот**

Геномы прокариот включают два типа генетических структур: нуклеоид (аналог хромосомы) и внехромосомные элементы (плазмиды, способные к автономной репликации). В состав хромосомы входят: структурные гены, кодирующие белки и РНК, межгенные участки (спейсеры), регуляторные элементы, определяющие работу генов, различные мобильные элементы. Большую часть генома прокариот (80–90%) составляют последовательности, кодирующие белки и РНК. Интроны у бактерий, и архей встречаются как в генах, кодирующих рибосомные и



транспортные РНК, так и в белок-кодирующих генах. Однако частота встречаемости интронов в генах прокариот гораздо ниже, чем у эукариот.

Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида. Полученные путем секвенирования генома одного конкретного штамма сведения не позволяют говорить о геноме всего вида из-за штаммовых различий в генном составе и размерах геномов. Так, у разных по патогенности штаммов кишечной палочки различия по количеству генов могут достигать 30%. Исходя из внутривидовой variability геномов сложились представления о базовом (core) и гибком вспомогательном наборе генов.

Консервативный базовый набор включает гены, отвечающие за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую принадлежность. В категорию вспомогательных входят гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенным условиям. Многие из таких генов локализованы в плаزمидях, мобильных элементах, геномных островках, которые не всегда присутствуют во всех штаммах одного вида.

В процессе эволюции некоторые гены базового набора могут переходить в категорию вспомогательных, а гены вспомогательного набора становятся базовыми. Под видовым геномом следует понимать совокупность всех генов всех штаммов данного вида. На основе сведений о базовых наборах рассматривается вопрос о том, каков же минимальный набор генов, необходимых для обеспечения жизни клетки. По мнению ряда исследователей, в таком наборе должно быть не менее 200 базовых генов, без которых клетка существовать не может.

Генетическое изменение клеток в результате включения в их геном экзогенной ДНК является трансформация. При трансформации не требуется непосредственного контакта между клеткой-донором и клеткой-

реципиентом. Феномен открыл Ф. Гриффит (1928), позднее О. Эвери, К. Маклеод и М. Мак-Карти (1944) выделили трансформирующее вещество из клеток капсульных пневмококков в составе молекулы ДНК.

Трансформация — процесс поглощения клеткой организма свободной молекулы ДНК из среды и встраивания её в геном, что приводит к появлению у такой клетки новых для неё наследуемых признаков, характерных для организма-донора ДНК. Также под трансформацией понимают любые процессы горизонтального переноса генов, в том числе трансдукцию, конъюгацию и т.д.

В любой популяции лишь часть бактерий способна к поглощению из среды молекул ДНК. Обычно максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце фазы логарифмического роста. В состоянии компетентности бактерии вырабатывают особый низкомолекулярный белок, активизирующий синтез аутолизина, эндонуклеазы I и ДНК-связывающего белка. Аутолизин частично разрушает клеточную стенку, что позволяет ДНК пройти через неё, а также снижает устойчивость бактерий к осмотическому шоку. В состоянии компетентности также снижается общая интенсивность метаболизма. Возможно искусственное приведение клеток в состояние компетентности. Для этого применяют среды с высоким содержанием ионов кальция, цезия, рубидия, электропорацию или заменяют клетки реципиента протопластами без клеточных стенок.

Эффективность трансформации определяется количеством колоний, выросших на чашке Петри после добавления к клеткам 1 мкг суперскрученной плазмидной ДНК и посева клеток на питательную среду.

Современные методы позволяют добиваться эффективности, при этом поглощаемая ДНК должна быть двухнитевой (эффективность трансформации однонитевой ДНК на порядки ниже, однако несколько возрастает в кислой среде), её длина — не менее 450 пар оснований. Оптимальный pH для прохождения процесса — около 7.

Для некоторых бактерий поглощаемая ДНК должна содержать определённые последовательности. ДНК необратимо адсорбируются на ДНК-связывающем белке, после чего одна из нитей разрезается эндонуклеазой на фрагменты длиной 2—4 тыс. пар оснований и проникает в клетку, вторая полностью разрушается. В случае, если эти фрагменты имеют высокую степень гомологии с какими-либо участками бактериальной хромосомы, возможна замена этих участков на них. Поэтому эффективность трансформации зависит от эволюционного расстояния между донором и реципиентом. Общее время процесса не превышает нескольких минут.

Впоследствии, при делении, в одну дочернюю клетку попадает ДНК, построенная на основе исходной нити ДНК, в другую — на основе нити с включённым чужеродным фрагментом (выщепление). Погибшие бактерии постоянно высвобождают ДНК, которая может быть воспринята другими бактериями. Как правило, любая чужеродная ДНК, попадающая в бактериальную клетку, расщепляется эндонуклеазами, но при некоторых условиях такая ДНК может быть включена в геном бактерии.

По происхождению ДНК может быть плазмидной либо хромосомной и нести гены, «трансформирующие» реципиента. Подобным путём в популяции могут быть распространены гены, кодирующие факторы вирулентности. В обмене генетической информацией трансформация играет незначительную роль.

Трансформация протекает в три стадии: адсорбция двухцепочечной ДНК на участках клеточной стенки компетентных клеток; ферментативное расщепление связавшейся ДНК в некоторых случайно расположенных местах с образованием фрагментов  $4\text{—}5 \cdot 10^6$  D; проникновение фрагментов ДНК с молекулярной массой не менее  $5 \cdot 10^6$  D, сопровождающееся разрушением одной из цепей ДНК (последний этап энергозависим). Проникшая цепь ДНК рекомбинирует с генетическим материалом реципиентной клетки.

Трансформация служит хорошим инструментом для картирования хромосом, поскольку трансформированные клетки включают различные фрагменты ДНК. Определение частоты одновременного приобретения двух заданных характеристик (чем ближе расположены гены, тем более вероятно, что они оба включатся в один и тот же участок ДНК) даёт информацию о взаиморасположении соответствующих генов в хромосоме.

### **2.1.2 Культуры эукариотических клеток**

Эукариотические клетки в большинстве случаев входят в состав многоклеточных организмов. Однако в природе есть немалое количество одноклеточных эукариот, которые в структурном отношении являются клеткой, а в физиологическом — целым организмом. В свою очередь эукариотические клетки, являющиеся частью многоклеточного организма, не способны к самостоятельному существованию. Их принято делить на клетки растений, животных и грибов. Каждые из них обладают своими особенностями и имеют подтипы клеток, формирующие различные ткани.

Во всех эукариотических клетках выделяют цитоплазму, в которой присутствуют многочисленные рибосомы, различные включения. В ядре находится ядрышко, хроматин, ядерный сок.

При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты, разрушающие клеточную стенку).

Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается переносить (субкультивировать) и

поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут.

Культивируемые клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, поэтому их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей. Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост.

Культуры клеток, при этом приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту *in vitro* и называются устойчивыми клеточными линиями. Одни клеточные линии сохраняют основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет.

У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа одних хромосом и потеря других.

В молекулярной биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Их применяют для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения — во многих случаях это необходимо для правильного функционирования белка. К сожалению, *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae*, а также другие виды дрожжей.

### Вопросы для самоконтроля

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

### **3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

С развитием технологии рекомбинантных ДНК появилась возможность более эффективно использовать многие полезные свойства микроорганизмов. Часто успехи современной медицины, сельского хозяйства и селекции зависят от того, удастся ли обнаруживать специфические вирусы, бактерии, грибы, микроорганизмы, белки и низкомолекулярные соединения в организме человека или животных, в растениях, воде или почве.

#### **3.1 Молекулярная диагностика**

Молекулярная диагностика — быстро развивающееся направление, на генетическом уровне дает ответ на вопрос, входят ли обследуемые индивидуумы или их потомки в группу повышенного генетического риска. Хотя его основные принципы уже сформировались, технические детали отдельных тестов могут различаться. Для получения в достаточном количестве ДНК-мишени сейчас успешно применяют ПЦР. Использование ПЦР и специфических зондов существенно повышает чувствительность тестов и позволяет применять нерадиоактивные хромогенные, хемилюминесцентные и флуоресцентные системы регистрации. Во многих случаях для выявления мутации или экзогенной ДНК инфекционного агента в исследуемом образце достаточно провести ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов. Не вызывает сомнения, что с помощью ДНК-диагностики можно будет выявлять большинство, а возможно и все наиболее распространенные генетические и инфекционные заболевания, а также новообразования.

Методы ДНК-технологии используют для выяснения локализации в той или иной хромосоме мутантного гена, ответственного за происхождение определённых форм наследственной патологии. Так как ген представляет собой участок ДНК, а мутация генов - повреждение первичной структуры ДНК (под мутацией понимают все изменения в последовательности ДНК,

независимо от их локализации и влияния на жизнеспособность индивида), то, зондируя препараты метафазных хромосом больного с наследственным заболеванием, удаётся установить локализацию патологического гена.

Методы молекулярной генетики создают возможности для диагностики болезней на уровне изменённой структуры ДНК, они позволяют выяснять локализацию наследственных нарушений.

Молекулярно-генетические методы могут выявить мутации, связанные с заменой даже одного-единственного основания.

Для проведения многих диагностических процедур необходимо сначала вырастить культуру потенциально патогенного микроорганизма и лишь затем проанализировать спектр его физиологических свойств. Хотя подобные тесты весьма эффективны и обладают достаточно высокой специфичностью, однако они часто занимают много времени и являются дорогостоящими. Это относится к идентификации и бактерий, и паразитических микроорганизмов. Кроме того, весьма ограничена возможность выявления тех патогенных микроорганизмов, которые плохо растут в культуре либо вообще не поддаются культивированию. В качестве примера можно привести облигатных внутриклеточных паразитов, их трудно диагностировать, поскольку для этого необходима перевиваемая культура клеток. При этом часто получают ложноотрицательные результаты (т.е. ошибочно диагностируют отсутствие микроорганизма), в результате чего не проводится адекватное лечение. Безусловно, если для выявления микроорганизма необходимо выращивать его в культуре, то рутинной может стать идентификация лишь нескольких из всех известных патогенных микроорганизмов. Чтобы устранить это принципиальное ограничение, были разработаны методы молекулярной диагностики, в основе которых лежат иммунологические подходы или методы обнаружения специфической ДНК.

Любой метод выявления патогенных микроорганизмов должен быть достаточно простым и обладать высокой специфичностью и



чувствительностью. Специфичный диагностический тест должен давать положительный ответ только на микроорганизм или молекулу-мишень, чувствительный — обнаруживать очень малые количества такой мишени даже на фоне других микроорганизмов или молекул, загрязняющих образец. Простота метода подразумевает, что он является достаточно продуктивным, эффективным и недорогим для рутинного применения.

Многие иммунологические системы детекции обладают высокой чувствительностью и специфичностью, являясь в то же время достаточно простыми. Они широко используются для тестирования лекарственных препаратов, оценки мониторинга различных онкологических заболеваний, определения специфических метаболитов, идентификации и контроля патогенных микроорганизмов, но имеют и свои ограничения. Если молекулой-мишенью является белок, то необходимо обеспечить экспрессию детерминирующих его генов и создать условия, в которых не происходит маскирование или блокирование сайта связывания с антителом.

Традиционные процедуры диагностики возбудителей инфекции опираются либо на набор характеристик патогенного микроорганизма, либо, что предпочтительнее, на одну уникальную, легко различимую его особенность. Клинические микробиологи пытаются найти тот минимальный набор биологических характеристик, при помощи которого можно будет гарантированно обнаруживать и идентифицировать патогенные микроорганизмы. Например, некоторые возбудители вырабатывают специфические биохимические соединения, которые необходимо обнаружить в биологическом образце. Часто подобную маркерную молекулу можно выявить непосредственно, проведя высокоспецифичный биохимический анализ. Но такой подход неизбежно приведет к увеличению числа индивидуализированных систем детекции патогенных микроорганизмов. Более предпочтительным был бы универсальный метод, позволяющий выявлять любую маркерную молекулу

независимо от ее химической природы. Именно таким является метод, основанный на идентификации комплексов антиген—антитело.

### **3.2 Ферментный иммуно-сорбентный анализ**

Существует целый ряд подходов, позволяющих определить, произошло ли связывание антитела с антигеном-мишенью. Один из них - это ферментный иммуно-сорбентный анализ (ELISA), который часто используют для диагностики, процедура включает следующие этапы:

1. Образец, в котором хотят обнаружить специфическую молекулу или микроорганизм, фиксируют на твердой подложке, например, на пластиковой микротитровальной плашке, обычно имеющей 96 лунок.

2. К фиксированному образцу добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело), затем промывают лунку, чтобы удалить не связавшиеся молекулы первого антитела.

3. Добавляют второе антитело, которое специфически связывается с первым антителом и не взаимодействует с маркерной молекулой. К этому антителу присоединен фермент (щелочная фосфатаза, пероксидаза или уреазы), катализирующий превращение неокрашенного субстрата в окрашенный продукт. Промывают лунку, чтобы удалить не связавшиеся молекулы конъюгата второе антитело—фермент.

4. Добавляют неокрашенный субстрат.

5. Проводят качественное или количественное определение окрашенного продукта.

Если первое антитело не связывается с мишенью образца, то оно удаляется при первом промывании. Поскольку при этом конъюгату второе антитело—фермент не с чем связываться, он удаляется при втором промывании, и образец остается неокрашенным. Если связывание с мишенью происходит, то второе антитело присоединяется к первому, и конъюгированный фермент катализирует образование легко регистрируемого окрашенного продукта.



**Рис.11** – ИФА (иммуоферментный анализ)

Основной принцип ELISA — специфическое связывание первого антитела с мишенью. Если молекула-мишень представляет собой белок, то его очищенный препарат обычно используют для получения антител, при помощи которых затем и выявляют данную мишень. Антитела, которые образуются в сыворотке (антисыворотке) крови иммунизированного животного, связываются с разными антигенными детерминантами (эпитопами) молекулы-мишени. Такую смесь антител называют поликлональным препаратом.

Использование поликлональных антител имеет два недостатка, существенных для некоторых методов диагностики:

- содержание отдельных антител в поликлональном препарате может варьировать от одной партии к другой;

- поликлональные антитела нельзя применять, если необходимо различить две сходные мишени, т.е. когда патогенная (мишень) и непатогенная (не мишень) формы различаются единственной детерминантой. Однако эти проблемы вполне разрешимы, поскольку сейчас научились получать препараты антител, выработанных к одной антигенной детерминанте, т.е. препараты моноклональных антител.

### 3.3 Моноклональные антитела

Одним из важнейших достижений гибридной технологии является разработка методики получения моноклональных антител.

Моноклональные антитела – это антитела строго определённой специфичности, продукт одного клона клеток. Моноклональные антитела гомогенны как по специфичности, так и по физико-химическим свойствам. Моноклональное антитело связывается только с одной антигенной детерминантой на молекуле антигена. Получение моноклональных антител стало возможным благодаря работам Г. Келера и Ц. Мильштейна в 1984 г, они из лимфоидной опухоли (миелома) и нормального лимфоцита получили гибридные клетки. Гибридные клетки имели часть хромосом нормального лимфоцита и часть была взята от опухоли. Результатом этого процесса стало, что гибридома унаследовала от нормальной клетки способность к синтезу антител, а от опухолевой клетки – способность к неограниченному числу делений. Следовательно, гибридная технология получения моноклональных антител - слияние лимфоцитов тканей организмов, предварительно иммунизированных определенным антигеном, с раковыми клетками, способными к бесконечному делению.

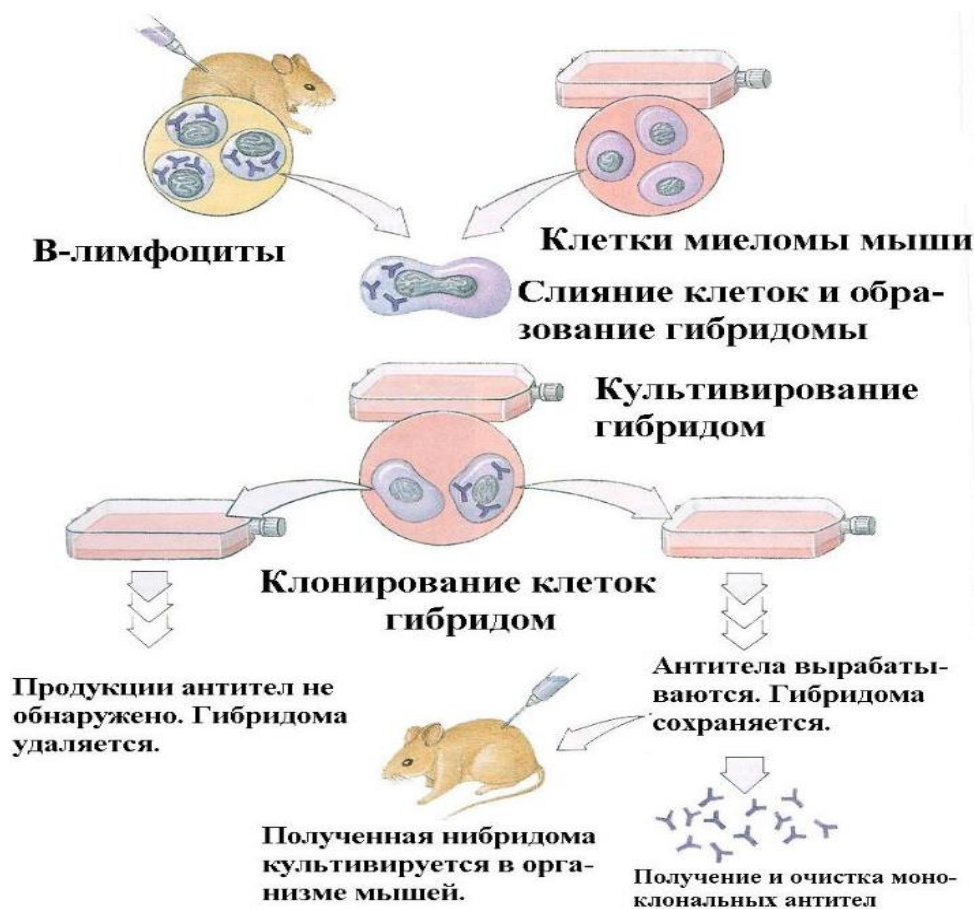
В настоящее время создание гибридной технологии можно считать наиболее яркой страницей в молекулярной биотехнологии.

Гибридомы - бессмертные клоны клеток лимфоидной ткани, синтезирующие моноклональные антитела. Моноклональные антитела, продуцируемые одним клоном обладают следующими свойствами:

- высокоспецифичны, специфичность направлена только к заданной антигенной детерминанте;
- идентичны по аллотипу и идиотипу, а также по аффинности и физико-химическим характеристикам.

Стабильные культуры гибридом способны продуцировать моноклональные антитела в неограниченном количестве. Благодаря своим уникальным свойствам моноклональные антитела успешно используются

для решения многих актуальных задач биологии и медицины. Сегодня более 20% разрабатываемых биофармацевтических препаратов являются продуктами гибридной технологии.



**Рис.12** - Этапы получения моноклональных антител

Получение и использование моноклональных антител — одно из существенных достижений современной иммунологии. С их помощью можно определить любое иммуногенное вещество:

- антигены, определяющие гистосовместимость и дифференцировку;
- дифференцировочные, опухолевые и другие антигены клеточной поверхности, которые лишены полиморфизма и не иммуногены в аллогенных системах, но распознаются при иммунизации;
- вирусные и бактериальные антигены;
- единичные антигенные детерминанты разнообразных белков, нуклеиновых кислот и др.

Моноклональные антитела можно использовать для диагностики рака и определения локализации опухоли, для диагностики инфаркта миокарда.

Можно использовать моноклональные антитела для определения пола у крупного рогатого скота на предимплантационной стадии развития, а также для стандартизации методов типирования тканей при трансплантации органов, при изучении клеточных мембран, для построения антигенных карт вирусов, возбудителей болезней. В медицине на основе моноклональных антител разработано большое количество диагностических систем для различных заболеваний (инфекционных, онкологических), активно разрабатываются лекарственные препараты, например, противоопухолевые, антицитокиновые антитела и другие.

В ходе эволюции у млекопитающих выработался сложный набор клеточных систем, защищающих организм от токсичных веществ и инфекционных агентов. Составной частью защитной реакции является индуцированная выработка клетками лимфатической системы специфических белков (антител), которые соединяются с чужеродными веществами (антигенами) и при помощи других белков иммунной системы, включая системы комплемента, нейтрализуют их эффект.

При введении антигена в организм возникает большое семейство различных антител, направленных к разным его детерминантам. Однако, иногда требуется только определенный вид антител, специфичных лишь к одной детерминанте антигена и имеющих одни и те же характеристики.

В ответ на иммунологический стимул каждая антитело-продуцирующая клетка синтезирует и выделяет единственный вид антител, которые с высоким сродством распознают отдельный участок (эпитоп, антигенную детерминанту) молекулы антигена. Поскольку в молекуле антигена обычно присутствует несколько разных эпитопов, антитела против каждого из них вырабатываются отдельными клетками иммунной системы. Такие антитела, каждое из которых взаимодействует с данным антигеном, называют поликлональными. К сожалению, эффективность препаратов поликлональных антител варьирует от одной партии к другой, поскольку в одних случаях при проведении иммунизации антителопродуцирующие

клетки сильнее стимулируются одними детерминантами данного антигена, в других иммунная система активнее отвечает на другие эпитопы того же антигена. Это может влиять на способность разных препаратов нейтрализовать антигены, поскольку отдельные эпитопы обладают разной эффективностью. Следовательно, в данной партии поликлональных антител может содержаться мало молекул, направленных против основного эпитопа, в результате она будет менее эффективной, чем предыдущая.

Таким образом, для практического применения антител в качестве диагностического инструмента или компонентов терапевтических средств необходимо было создать такую линию клеток, которая росла бы в культуре и продуцировала антитела одного типа, обладающие высоким сродством к специфическому антигену-мишени — моноклональные антитела.

Применение моноклональных антител позволяет существенно повысить специфичность метода ELISA, поскольку они связываются с одним, строго определенным антигенным сайтом. К настоящему времени получен целый ряд моноклональных антител, которые можно использовать для обнаружения различных соединений и патогенных микроорганизмов.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Каким образом готовят посевную микробную культуру?
2. Как получить полужидкие и твердые питательные среды?
3. Какие методы молекулярной диагностики применяются для выявления генетических заболеваний?
4. Расскажите о методах иммунодиагностики.
6. С какой целью используют ДНК-зонды?
7. С какой целью используют моноклональные антитела?
8. Из каких этапов состоит ферментный иммуно-сорбентный анализ?
9. С помощью какого метода можно выявить мутации?
10. Моноклональные антитела и их значение.

#### 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Генетическая инженерия - совокупность методов биохимии и молекулярной генетики, с помощью которых осуществляется перенос генетической информации из одного организма в другой. Кроме того, генная инженерия позволяет преодолевать природные межвидовые барьеры и создавать клетки и организмы с не существующими в природе сочетаниями генов, с заданными наследуемыми свойствами. С развитием генной инженерии ученые получили возможность синтезировать, комбинировать и перемещать гены и любые другие фрагменты ДНК.

Создание новых сочетаний генов оказалось возможным благодаря принципиальному сходству строения молекул ДНК у всех видов организмов, а фактическая универсальность генетического кода обеспечивает экспрессию чужеродных генов в любых видах клеток.

Сегодня генная инженерия достигла довольно высокого уровня развития, благодаря которой человечество получило шанс разрешения многих вопросов в различных областях, в частности в медицине, сельском хозяйстве, пищевой и перерабатывающей промышленности. Внесла революционный вклад в развитие биотехнологии, появилась возможность изучения молекулярной организации геномов, что привело к возникновению геномики — раздела генетики, изучающего структурную организацию и функционирование геномов.

Первым этапом в развитии генной инженерии является попытка расшифровать геном живого организма. Ученые впервые пробовали понять, за какие конкретно функции в организме живого существа отвечает тот или иной отдельно взятый ген. В 1972 году Пол Берг, Уолтер Гилберт и Фредерик Сенгер получили первую рекомбинантную ДНК из фрагмента ДНК обезьяньего вируса ОВ40 и бактериофага  $\lambda$  dvgal с галактозным опероном *E. coli*. В 1977 г удачной попыткой такого рода стала работа К. Итакуры и Г. Бойера с соавторами (1977г.) по экспрессии в *E. coli* химически синтезированного гена, кодирующего гормон млекопитающих —



соматостатин. В 1998 г была создана полная генетическая карта животного (круглого червя). В 2003 г полностью расшифрован геном человека. Одним из последних достижений генной инженерии является работа К. Вентера (2010) по созданию первой синтетической клетки, основной целью, которой является создание целого генома и перепрограммирование организмов.

Метод химического синтеза генов открыл путь для производства продуктов белковой природы путем введения в клетки микроорганизмов, где они могут встраиваться в состав гибридных молекул. Таким способом получены и клонированы гены, кодирующий глобин человека и животных, белок хрусталика глаза, фиброин шелка, продуцируемый тутовым шелкопрядом. Этот же принцип был применен для получения, клонирования и экспрессии генов интерферона человека в бактериях, получения штаммов бактерий - продуцентов инсулина.

Искусственный перенос гена проводят с использованием так называемого вектора, когда генетический материал из одной структуры переносят в генетическую структуру организма другого вида. Например, ген млекопитающего пересаживают в геном бактерии, где донорская молекула ДНК должна давать выход массы донорского гена.

Толчком для дальнейшего развития генной инженерии стали работы по применению метода распознавания последовательности нуклеотидов в фрагментах нуклеиновых кислот. Такими векторами служат рекомбинантные молекулы ДНК-плазмид, которые сочетают в себе гены разных плазмид или несут гены, выделенные из хромосом разных видов. Выделенный или синтезированный ген, предназначенный для изменения наследственности каких-то клеток, должен быть доставлен и внедрен в эти клетки. Для создания рекомбинантных плазмид требуются многие ферменты типа рестриктаз, липаз, нуклеаз, ДНК – полимераз и др.

С помощью рекомбинантных плазмид можно проводить множественное копирование молекул ДНК, необходимых для синтеза разнообразных белков. Этим путем были синтезированы гормоны роста, ген

инсулина человека, глобины кроликов и др. Смесь фрагментов ДНК клетки – донора образует новую, так называемую рекомбинантную молекулу ДНК, в которую вставлен нужный ген, перенесенный с помощью плазмиды в геном микроорганизма кишечной палочки.

Генетическая инженерия имеет яркую историю, благодаря открытиям в области исследований нуклеиновых кислот. Впервые нуклеиновые кислоты были открыты в 1869 г. Фридрихом Мишером, когда из лейкоцитов крови человека выделил «нуклеин» - вещество с кислотными свойствами. К концу XIX века нуклеиновые кислоты были получены Р. Альтманом (1889) в чистом виде из клеток тканей животных и дрожжей. Термин «нуклеиновые кислоты» был предложен 1889 году А. Косселем, роль нуклеиновых кислот как носителей наследственности была установлена сравнительно недавно и был сделан Гриффисом в 1928 году, который открыл явление бактериальной трансформации. В опытах Гриффиса было показано, что пневмококки бескапсульной формы (R-формы) приобретают вирулентность, если их смешивать с убитыми нагреванием вирулентными штаммами пневмококков.

Современная генная инженерия пользуется комплексом разнообразных методов и технологий на молекулярном уровне. Для конструирования новых генетических структур на молекулярном уровне служат следующие методы:

- выделение молекул ДНК из различных естественных природных веществ;
- разделение молекул ДНК на фрагменты с помощью различных ферментов (эндонуклеаз, рестриктаз, ДНК – полимераз и т.п.);
- склеивание фрагментов ДНК разной структуры ферментом липазой для образования новых генетических комплексов;
- конструирование рекомбинантных ДНК с использованием векторов в виде фагов, бактерий и плазмид.

Использование достижений генной инженерии идет в основном в следующих направлениях:

- изучение организации генетического аппарата высших организмов;
- использование микроорганизмов как продуцентов хозяйственно полезных веществ;
- конструирование новых организмов путем пересадки чужеродных генов, т.е. получение трансгенных животных.

На сегодняшний день с помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками. В условиях *in vitro* гены выделяют из природного вещества, содержащего ДНК, получают химическим синтезом, ферментативным или комплексным методом.

Сейчас, даже трудно предсказать все возможности, которые будут реализованы в ближайшие несколько десятков лет. Самые большие надежды возлагаются на возможность применения результатов секвенирования генома человека для лечения генетических заболеваний. К настоящему времени в мире идентифицировано множество генов. Структуры этих генов полностью расшифрованы, а сами они клонированы.

#### **4.1 Ферменты генной инженерии**

В генетической инженерии используется большая группа ферментов. Успехи генетической инженерии стали возможны, прежде всего, благодаря изучению ферментов, позволяющих проводить химические операции с генетическим материалом. В генетической инженерии ферменты служат инструментами молекулярного манипулирования с генетическим материалом. Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);

- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы – специфические эндонуклеазы, расщепляющие молекулу ДНК в строго определенных точках. В 1968 г они впервые были выделены из *E. Coli*. Основной характеристикой рестриктаз является их субстратная специфичность. Сейчас известны основные проявления специфичности этих ферментов: узнаваемая последовательность, место расщепления, зависимость действия рестриктаз от метилирования оснований в пределах узнаваемой последовательности.

Наиболее важным параметром рестриктаз является узнаваемая последовательность нуклеотидов сайтом рестрикции, их число и тип строения в молекулярной биологии. Для большинства участков, узнаваемых рестриктазами, характерна вращательная симметрия второго порядка, т.е. они являются палиндромами. Несмотря на то, что все рестриктазы узнают на ДНК строго определенные последовательности, различают 3 основных класса: рестриктазы 1-го класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, точнее на произвольном от сайтов расстоянии; рестриктазы 2-го класса расщепляют ДНК только внутри сайтов узнавания; рестриктазы 3-го класса узнают и расщепляют ДНК на фиксированном от сайтов рестрикции расстоянии. В генной инженерии используются исключительно ферменты второго класса.

Рестриктазы делят на мелко и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетра nukлеотид, вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие. Вероятно, это связано с тем, что из четырех нуклеотидов встречаемости определенной последовательности гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов.

Реакция разрезания осуществляется в две ступени. Сначала разрезается одна цепь ДНК, затем рядом другая. В областях, прилегающих с каждой стороны к сайту разрезания, может иметь место

эксонуклеотическая деградация, когда фермент узнает один сайт, а разрезает другой, достаточно удаленный от первого. Это явление напрямую связано с метилированием ДНК. Сайт-мишень может быть полностью метилирован (обе цепи модифицированы), полуметилирован (только одна цепь метилирована) или не метилирован.

Полностью метилированный сайт не подвержен ни рестрикции, ни модификации. Полуметилированный сайт не узнается ферментом рестрикции, но может быть превращен с помощью метилазы в полностью метилированный. У бактерий метилирование связано с сохранением имеющегося состояния модификации. Репликация полностью метилированной ДНК ведет к образованию полуметилированной ДНК. Неметилированный сайт-мишень представляет собой субстрат либо для рестрикции, либо для модификации *in vitro*.

ДНК-полимеразы обладают способностью удлинять цепь ДНК в направлении 5'→3' путем присоединения комплементарного нуклеотида. Впервые ДНК-полимераза была выделена из *E. Coli* Корнбергом в 1958 г. Фермент состоит из одной полипептидной цепи с 3-х доменной структурой. Каждый домен обладает своей 5' - 3 / полимеразной, 3' - 5 / экзонуклеазной или 5' - 3 / экзонуклеазной активностью.

Известно, что при полимеразной реакции, катализируемой полимеразой с определенной частотой, возможно включение в растущую цепь и не комплементарного нуклеотида, после чего дальнейший рост полинуклеотидной цепи останавливается. Полимераза не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при ее участии. 3'—5' экзонуклеаза способствует вырезанию ошибочного нуклеотида, на место которого затем присоединяется правильный нуклеотид - предшественник.

Таким образом, 3'—5' экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы играет важную роль в точности полимеризации, направляемой матрицей. 5'— 3' экзонуклеазная активность полимеразы способствует деградации

одной цепи ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'—5' экзонуклеазы, 5'—3' экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК и может вырезать с 5'-конца олигонуклеотиды длиной до десяти остатков. Такое сочетание ферментативных активностей позволяет ДНК-полимеразе играть активную роль в репарации повреждений ДНК *in vivo*.

В молекулярной биотехнологии наиболее часто используются фермент ДНК-полимераза I, выделенная из *E. Coli*, а также термостабильная ДНК-полимераза – Таq- полимераза, выделенная из бактерий, живущих в горячих источниках (гейзерах). Таq-полимераза сыграла особо важную роль в разработке технологий полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Обратная транскриптаза, или ревертаза – РНК зависимая ДНК-полимераза, с помощью которого осуществляется обратная транскрипция, т.е. синтез ДНК на РНК матрице. Ревертаза кодируется геномами некоторых РНК содержащих вирусов и подвижных генетических элементов генома высших организмов, в генной инженерии с их помощью можно получить ген. Она используется для транскрипции мРНК в комплементарную цепь ДНК. Ревертаза обладает тремя ферментативными активностями:

- ДНК-полимераза использующей в качестве матрицы РНК и ДНК;
- РНК-азной гидролизует в составе гибрида РНК—ДНК;
- ДНК эндонуклеазной, расщепляющей молекулы ДНК по внутренним сложноэфирным связям между нуклеотидами.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеазная, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий участок нуклеиновых кислот (праймер). Праймером может служить одноцепочечный фрагмент как РНК, так и ДНК. Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК (кДНК). Реакцию обратной транскрипции проводят в специально подобранных условиях с

использованием сильных ингибиторов РНК-азной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК.

В 1957 г М. Мезелсон и Ф. Сталь исследуя механизмы репликации ДНК установили, что репликация ДНК имеет полуконсервативный механизм. Это означает, что каждая дочерняя спираль ДНК состоит из одной материнской и из одной вновь синтезированной цепи, что положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 г такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза, он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты. Создание фосфодиэфирных связей в одноцепочечных разрывах двухцепочечной ДНК с помощью ДНК-лигаз является наряду с рестрикцией одним из важнейших этапов получения рекомбинантных ДНК *in vitro*. ДНК-лигазы разделяют на два семейства в зависимости от механизма действия:

- АТФ - зависимые лигазы;
- NAD<sup>+</sup> - зависимые ДНК-лигазы.

Наибольшее применение в генной инженерии находит АТФ-зависимая ДНК-лигаза бактериофага Т4. Соединение фрагментов ДНК осуществляет Т4-ДНК-лигаза, обладающая комплементарными «липкими» или «тупыми» концами. Реакция идет в два этапа. В первом образуется комплекс фермент – АМФ, во втором – остаток АМФ переносится на 5' - фосфатную группу концевой нуклеотида в точке разрыва ДНК.

Нуклеаза – фермент, гидролизующий молекулы нуклеиновых кислот. В результате действия нуклеаз молекула ДНК или РНК распадается на фрагменты или отдельные нуклеотиды. Различают ДНК-азы и РНК-азы, гидролизующие ДНК и РНК. Различают экзонуклеазы - гидролизующие 5' или 3' концевые фосфатные связи и эндонуклеазы – расщепляющие внутренние связи полинуклеотидной цепи молекулы ДНК. Некоторые нуклеазы гидролизуют избирательно только одноцепочечные молекулы

(нуклеаза SI), только двухцепочечные молекулы ДНК (эндонуклеаза III) или гибридные ДНК-РНК молекулы (рибонуклеаза H).

В молекулярной биотехнологии наиболее широко применяются экзонуклеаза III *E. Coli*, нуклеаза S1, панкреатическая рибонуклеаза A, панкреатическая дезоксирибонуклеаза I и др. Экзонуклеаза III *E. coli* катализирует последовательное отщепление 5' - нуклеотидов ДНК. Фермент обладает также эндонуклеазной активностью, активностью РНК-азы H (гидролиз РНК в РНК-ДНК-гибридах) и 3' - фосфатазной активностью. Нуклеаза S1 из *Aspergillus oryzae* специфически расщепляет молекулы ДНК и РНК с образованием 5' - фосфорилированных моно- и олигонуклеотидов. Панкреатическая рибонуклеаза A (РНК-аза A) является небольшим белком, который обладает активностью эндорибонуклеазы, специфически расщепляющей фосфодиэфирные связи, образованные пиримидиновыми нуклеотидами. Панкреатическая дезоксирибонуклеаза I (ДНК-аза I) представляет собой эндонуклеазу, гидролизующую как одно-, так и двухцепочечную ДНК с образованием сложной смеси моно- и олигонуклеотидов, содержащих 5' - фосфатные группы.

#### **4.2 Методы изучения генома, генодиагностики и генотерапии**

Геном - наука о структуре и функции разных организмов, содержит биологическую информацию, необходимую для построения и поддержания организма.

В молекулярной генетике геном – это совокупность последовательностей нуклеотидов в молекулах ДНК, у некоторых вирусов – в РНК, свойственная каждой клетке особи данного вида, содержит в себе как кодирующие последовательности (гены), так и не кодирующие.

Структура генома может изменяться в поколениях. К его наследуемым изменениям (мутациям) относятся замены отдельных нуклеотидов в хромосоме, удвоение, утрата, перемещение или инвертирование участков хромосом, а также изменение числа отдельных хромосом или полных хромосомных наборов клетки. Такие изменения лежат в основе эволюции



генома. Изменения в геноме отдельных клеток (спонтанные и запрограммированные) могут происходить в процессе жизнедеятельности. Примером спонтанных изменений являются мутации, накапливающиеся при делении клеток тела, примером запрограммированных – перестройки бактериальных геном при образовании спор или азотфиксации, либо перестройки генов, кодирующих иммуноглобулины в клетках иммунной системы млекопитающих. Возникновение и фиксация мутаций приводят к тому, что геном каждой особи характеризуется своей последовательностью нуклеотидов ДНК, отличающей его от генома другой особи.

В зависимости от задач и особенностей изучаемого объекта генетический анализ проводят на популяционном, организменном, клеточном и молекулярном уровнях. К основным методам относятся: гибринологический, близнецовый, биохимический, цитогенетический, молекулярно-генетический, популяционно-статистический.

Гибринологический метод – анализ характера наследования признаков с помощью системы скрещиваний, суть которых состоит в получении гибридов и анализе их потомков в ряду поколений (анализ расщепления). Особенности метода заключается в следующем:

- подбор родительский пар (гомозиготы с четкими альтернативными признаками);
- получение гибридов и последующее их скрещивание между собой;
- количественный учет потомков, различающихся по отдельным признакам в ряду последовательных поколений результаты скрещивания оцениваются статистически – математический анализ).

Генеалогический метод позволяет проследить наследование признаков (нормальных и патологических) в ряду поколений с указанием родственных связей. Он включает два этапа:

- составление родословной на основании сведений, полученных от пробанда, с использованием специальных символов;

- анализ родословной (определение типа наследования, генотипов, прогнозирование проявления признака у потомства).

Близнецовый метод заключается в изучении наследования признаков в парах монозиготных и дизиготных близнецов. При использовании близнецового метода проводится сравнение:

- монозиготных (однойцевых) близнецов — МБ с дизиготными (разнойцевыми) близнецами — ДБ;

- партнеров в монозиготных парах между собой;

- данных анализа близнецовой выборки с общей популяцией.

Популяционно-статистический метод заключается в изучении, как изменяются частоты генотипов и генов в последующих поколениях, используется закон Харди-Вайнберга. В бесконечно большой популяции диплоидных организмов частоты генов остаются неизменными из поколения в поколение.

Иммуногенетический метод включает в себя серологические реакции, иммуноэлектрофорез и другие. Их используют для изучения групп крови, белков и ферментов сыворотки крови и тканей. С его помощью можно установить иммунологическую несовместимость, выявить иммунодефицит и др. Один из наиболее информативных методов оценки степени взаимной иммунологической несовместимости является реакция смешанной культуры лимфоцитов. Ее суть заключается в том, что иммунокомпетентные клетки реципиента распознают клетки донора с помощью системы HLA. Это комплекс генов, обеспечивающих генетический контроль иммунного ответа и взаимодействие между собой клеток, которые реализуют этот ответ.

Генетическая диагностика - совокупность методов по выявлению изменений в структуре генома. Это относительно новое, перспективное, быстро развивающееся направление диагностики. Диагностические методы обладают высокой специфичностью и чувствительностью, достаточно

просты и достоверны, позволяет точно диагностировать наиболее распространенные генетические и инфекционные заболевания.

Генетическая инженерия ввела в практику ДНК-диагностику. Известно, что участок ДНК, отвечающий за данный биологический признак, имеет определенную нуклеотидную последовательность, которая может служить диагностическим маркером. В основе методов ДНК-диагностики лежит выявление специфических нуклеотидных последовательностей в биологических образцах методом гибридизации (ДНК — ДНК, ДНК — РНК) или полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Генетическая терапия позволит устранить генетические дефекты путем введения в соматические клетки полноценных генов вместо поврежденного (мутантного) гена, а также лечить различные заболевания за счет введения в организм чужеродной генетической информации с целью получения терапевтического эффекта.

Принципиальный смысл генетической терапии заключается в замещении мутантного белка клеток на соответствующий нормальный белок, который будет синтезироваться в клетках. Генотерапия направлена на компенсацию нарушенных функций клетки на генетическом уровне. Причем таким способом возможно лечение не только генетических, но и неинфекционных и инфекционных заболеваний. Существует два типа генотерапии: заместительная и корректирующая.

Заместительная генотерапия заключается во вводе в клетку неповрежденного гена, когда болезнь связана с отсутствием или малым количеством белкового продукта. В клетку вводится неповрежденный ген, и создаются условия для его экспрессии с целью получения достаточного количества нормального белка-продукта. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК.

Корректирующая генотерапия предполагает замену дефектного гена нормальным в результате рекомбинации.

### **4.3 Генетически модифицированные продукты**

Первые трансгенные продукты появились в конце 80-х годов 20 века на мировой продовольственный рынок. Казалось бы, открытие генно-модифицированных организмов (ГМО) – это важнейший шаг в деле победы человека над природой. Ведь возможность создания новых организмов с таким набором генов, который никогда ранее не встречался в природе, позволяют ученым производить новые виды животных и растений в лабораторных условиях. Однако с момента появления проблема генно-модифицированных организмов не перестает тревожить умы, как ученых, так и простых обывателей. Это связано с тем, что их воздействие на организм человека мало изучено.

Огромное количество людей на планете ежедневно употребляют в пищу продукты, содержащие ГМО. Но до сих пор нет однозначного ответа на вопрос: безопасны ли такие продукты, каково их влияние на организм.

Защитники трансгенных организмов замалчивают влияние ГМО на людей и животных и провозглашают эти продукты как уникальное спасение всего человечества от голода. Ведь население планеты продолжает увеличиваться, а имеющиеся ресурсы уже не способны покрыть все возрастающие потребности. Следовательно, необходимо в несколько раз увеличить объемы производства продуктов питания, в частности сельскохозяйственной продукции. Несомненно, генно-модифицированные организмы обладают рядом преимуществ - высокая урожайность, повышенная морозо- и засухоустойчивость, способность противостоять многим болезням и вредителям. В свою очередь специалисты-противники генно-модифицированных организмов приводят данные исследований, подтверждающих негативное влияние ГМО как на человека, так и на окружающую среду. В частности, возможно возникновение аллергических реакций, угнетение иммунной системы. Могут быть выявлены различные

расстройства обмена веществ. Опасность ГМО может быть обусловлена несколькими причинами.

Во-первых, большое значение имеет, какие именно гены встраиваются. В процессе внедрения гены могут как сами мутировать, так и оказывать негативное воздействие на геном организма-хозяина.

Во-вторых, в результате активности внедренных генов могут образовываться неизвестные токсичные белки, вызывающие токсикозы или аллергию у человека и животных. К тому же растения могут аккумулировать гербициды и пестициды, к которым они устойчивы.

В-третьих, особое внимание надо обратить на сами способы встраивания гена, которые еще несовершенны и не гарантируют безопасности растений, созданных с их помощью. Дело в том, что для встраивания гена используют вирусы, транспозоны или плазмиды, способные проникнуть в клетку организма и затем использовать клеточные ресурсы для создания множества собственных копий или внедриться в клеточный геном.

В настоящее время подавляющее большинство ГМО растительного происхождения, представленных на рынке, отличается от исходного традиционного сорта растения наличием в геноме рекомбинантной ДНК. Любой ген кодирует первичную структуру определенного белка, который определяет новый признак, и содержит нуклеотидные последовательности, регулирующие работу этого гена. Поэтому в качестве мишени для определения ГМО в пищевом продукте могут рассматриваться как новый модифицированный белок, так и рекомбинантная ДНК.

Химические методы направлены на определение соединений, которые могут синтезироваться в клетках генно-модифицированных организмов в ответ на внедрение чужеродных генов: трансгенная ДНК, новый экспрессированный белок, ферменты, олигосахариды, высокомолекулярные жирные кислоты, гормоны.

Наиболее широко применяются методы хроматографии, спектрофотометрии, спектрофлюориметрии и другие, которые выявляют измененные параметры в химическом составе продукта. Так, генетически модифицированные линии сои G94-1, G94-19, G168 имеют измененный жирнокислотный состав, сравнительный анализ которого показал увеличение содержания олеиновой кислоты в генетически модифицированной сое (83,8%) по сравнению с ее традиционным аналогом (23,1%). Применение в данном случае метода газовой хроматографии позволяет выявить генетическую модификацию сои даже в таких продуктах, которые не содержат ДНК и белка - рафинированное соевое масло.

Присутствие в продукте нового белка дает возможность применять для определения ГМО иммунологические методы. Они наиболее просты в исполнении, позволяют определить конкретный белок, несущий новый признак. В настоящее время разработаны тест-системы, применяя которых можно проводить количественное определение модифицированного белка в продуктах. Технологической основой в подобных тест-системах в большинстве случаев используются методы иммуноферментного анализа.

Принцип метода заключается в том, что антиген (АГ) или антитело (АТ), вступающее в иммунную реакцию, метится ферментом и по превращению субстрата ферментом можно судить о количестве вступившего во взаимодействие компонента реакции АГ – АТ.

Чувствительность ИФА чрезвычайно высока и позволяет определять минимальные количества вещества (нанограммы). Одним из недостатков этого метода при идентификации ГМО является низкая эффективность при оценке продуктов, подвергшихся какой-либо технологической обработке, вызывающей практически полную денатурацию или расщепление молекул модифицированного белка. Возможность определения белка иммуноферментным методом может быть ограничена уровнем его содержания в продукте. В большинстве стран мира основным способом определения ГМО в продуктах являются молекулярно-генетические методы, основанные на

определении рекомбинантной ДНК и главным образом, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК более стабильна, чем белок, и в меньшей степени разрушается при технологической или кулинарной обработке пищевых продуктов, что делает возможным определение в них ГМО. В России ПЦР был утвержден Минздравом РФ в качестве основного метода для идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в пищевых продуктах.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Этапы реализации генетической информации в клетке.
2. Ферменты генной инженерии, особенности механизма действия.
3. Типы генотерапии.
4. Методы изучения генетического материала клетки.
5. Современные методы генодиагностики и генотерапии.
6. Генетически модифицированные организмы.
7. Методы идентификации ГМ-продуктов.
8. Методы внедрения вектора в клетку.
9. Структура и методы генома.
10. Основные методы и объекты генной инженерии.

## 5. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Клеточная инженерия - совокупность методов, используемых для конструирования новых клеток. Включает культивирование и клонирование клеток на специально подобранных средах, гибридизацию клеток, пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по разборке и сборке жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов.

Клеточная инженерия является одним из основных разделов молекулярной биотехнологии. Под клеточной инженерией в основном понимают метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции. Область применения достижений клеточной инженерии сегодня стремительно расширяется.

С переходом на культивирование клеток биологи получили мощный инструментарий для изменения наследственности организмов, получения принципиально новых форм, разработки новых технологий в практической медицине и ветеринарии, в генетике животных и растений, в защите растений и повышения плодородия почв, защите окружающей среды и др.

Для культивирования могут быть использованы клетки различных органов, лимфоциты, фибробласты, эмбрионы, клетки почек животных и человека, раковые клетки человека и т.д. Культуры, приготовленные непосредственно из тканей организма, называются первичными. В большинстве случаев клетки первичной культуры можно перенести из культуральной чашки и использовать для получения вторичных культур, которые можно последовательно перевивать в течение недель и месяцев.

Возникновение клеточной инженерии связано с разработкой технологий гибридизации соматических клеток, которую проводят методом культивирования клетки различных линий одного вида или клетки различных видов, без участия полового процесса. Слияние двух разных клеток в одну гибридную происходит при определенных условиях. Таким способом удалось получить гибриды между клетками животных, далеких по систематическому положению, например, мыши и курицы.



Соматические гибриды нашли широкое применение, как в научных исследованиях, так и в биотехнологии.

С помощью гибридных клеток, полученных от клеток человека и мыши, человека и китайского хомячка, была проделана важная для медицины работа по картированию генов в хромосомах человека. Гибриды между опухолевыми клетками и нормальными клетками иммунной системы обладают свойствами обеих родительских клеточных линий. Кроме того, они способны долго делиться на искусственных питательных средах и вырабатывать моноклональные антитела определенной специфичности. Такие антитела применяют в лечебных и диагностических целях, в качестве чувствительных реагентов на различные органические вещества.

Другое направление клеточной инженерии – манипуляции с безъядерными клетками, свободными ядрами и другими фрагментами, сводящиеся к комбинированию разнородных частей клетки.

Путем соединения клеток разных зародышей на ранних стадиях их развития выращивают мозаичных животных, или химер, состоящих из двух различающихся генотипами видов клеток. С помощью таких экспериментов изучают процессы дифференцировки клеток и тканей в ходе развития организма. Ведущиеся уже не одно десятилетие опыты по пересадке ядер соматических клеток в лишённые ядер (энуклеированные) яйцеклетки животных, с последующим выращиванием зародыша во взрослый организм, с конца 20 в. получили широкую известность как клонирование животных.

Реконструкция эмбриональных клеток позволяет вплотную подойти к выяснению механизмов реализации генетической информации. В первую очередь, интересны исследования по анализу тотипотентности генома клеток разного уровня дифференцировки или его способности к репрограммированию, возможности получения отцовских и материнских копий, получения межвидовых химерных животных. Реконструкция эмбриональных клеток важна и для глобальной проблемы.

Преимущество клеточной инженерии в том, что она позволяет экспериментировать с клетками, а не с целыми организмами. Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве или биотехнологии часто применяют в сочетании с генной инженерией.

### 5.1 Трансгенез

Трансгенез – один из процессов в молекулярной биотехнологии, объединяющий генную и клеточную инженерию в одно целое. Искусственный перенос гена или группы генов из одного организма в другой и создание условий для их экспрессии называется трансгенез.

Несколько лет назад многие ученые склонялись к мысли, что обновление генотипа с/х животных путем применения методов генетической инженерии не даст никакого результата по сравнению с традиционным скрещиванием, так как для передачи определенного признака необходимо перенести группу или даже несколько групп генов. Первым примером переноса чужеродных генов в организм животного с помощью технологии рекомбинантных ДНК была мышь, ей встроили в геном ген гормона роста крысы, в результате потомство мыши было значительно крупнее, чем их родители, таким образом было получено первое трансгенное животное, которое получило новый генетический материал искусственным способом. В дальнейшем были длительные дискуссии об экономическом потенциале трансгенных с/х животных, однако в настоящее время нет сомнения, что это направление является перспективным и сулит большие выгоды всему человечеству.

Хотя не всегда опыты по получению трансгенных животных заканчивались положительным результатом, однако это направление успешно развивается и используется:

- в сельском хозяйстве для повышения устойчивости животных к различным заболеваниям, способствуют увеличению количества и улучшению качества продуктов;

- в качестве источника органов для трансплантации;

- как живые биореакторы для производства необходимых белков;
- для тестирования вакцин, оценки токсичности, канцерогенности и мутагенности разных веществ;
- для научных исследований для расшифровки функционирования различных генов у разных видов животных.

Из выше перечисленных направлений самым необычным и более перспективным считается, использование лактирующих животных (коровы, овцы, свиньи и кролики) для получения специальных белков из их молока, из которого затем выделяли и использовали в качестве биопрепаратов.

К другим опасениям, связанным с трансгенными животными, можно отнести следующие:

- в них могут содержаться физиологически активные вещества, попадание которых в пищу нежелательно (гормоны, стимулирующие рост, лактацию);
- они могут случайно передать гены не трансгенным сородичам;
- некоторые опасения вызывало использование в качестве векторов ретровирусов.

Все эти и другие нежелательные последствия еще не достаточно изучены. После получения трансгенных животных необходимо убедиться, что чужеродная ДНК стабильна и наследуется некоторыми потомками.

Основным моментом является доказательство того, что ген хорошо регулируется и функционирует в новом для него организме. В отношении трансгенных растений в настоящее время общественность также склоняется к более рациональному и оптимистичному подходу, поскольку состав вводимого генетического материала всегда точно известен.

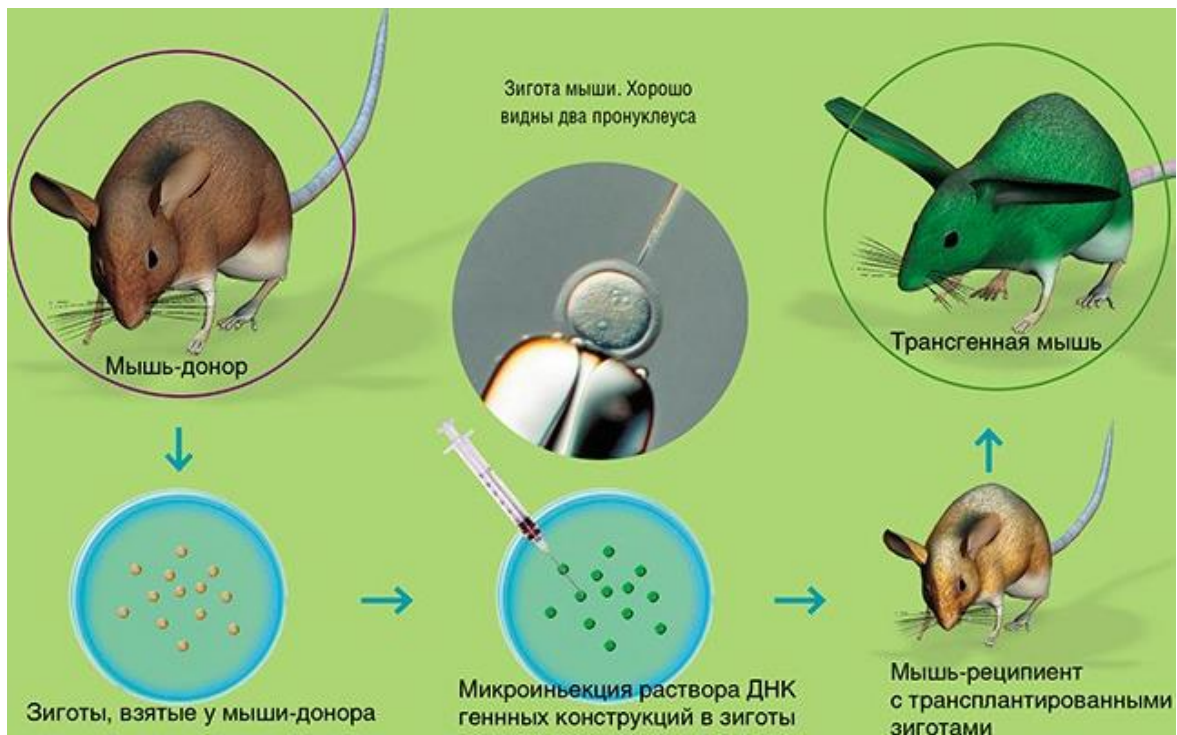
Несомненно, мутации, включая вставки и генетические перестройки, могут возникнуть при введении генов в реципиентный геном, и именно они могут оказаться потенциально опасными. Теоретически такая возможность не исключена.

При этом необходимо помнить, что разнообразные перестройки в геноме животных и растений происходят в их организме в течение десятилетий и без всякого вмешательства человека. При этом изменения, приводящие к выработке токсичных или других вредных соединений, имеют место только при значительном селективном давлении. Таких случаев в растениеводстве и животноводстве не было отмечено. Но тем не менее трансгенные животные (свиньи, овцы и коровы) уже получены, хотя и частота успеха их равна 1% по сравнению с мышами (2-5%). Такая низкая эффективность сдерживает широкое получение и использование трансгенных животных. Знание механизмов, регулирующих экспрессию гена у высших животных, недостаточны и это ограничивает возможности получения трансгенных животных.

Огромные перспективы использования трансгенных животных ожидаются в медицине. Многие биофармацевтические препараты уже производят методом генетической инженерии в клетках млекопитающих, растений, бактериях или классическим методом – микробной ферментацией. Кроме того, с получением трансгенных животных становится возможным получать некоторые белки, благодаря которым можно активировать тканевой плазминоген и повысить свертываемость крови. У этих животных необходимые вещества накапливаются в молоке. В связи с этим был сконструирован ген, кодирующий этот белок, он был успешно встроен в геном овец. В дальнейшем этот ген экспрессируется, хотя и незначительной степени, но наследуется потомством.

Процесс экспрессии не наносит вреда животному, он продолжает давать молоко как обычно. Нет сомнения в том, что этот путь станет одним из основных при получении ряда белков, необходимых так человеку.

Одним из перспективных направлений считают метод пересадки человеку органов и тканей от трансгенных животных.



**Рис.13** – Получение линий трансгенных мышей

Основные этапы в создании трансгенного организма:

- получение изолированную целевую последовательность ДНК (ген);
- на основе данной последовательности конструирование специального трансгенного вектора;
- внедрение вектора в модифицируемый организм;
- выявление и отбор модифицированных особей.

Методы выделения генов и конструирования генетических векторов идентичны тем, что применяются в генной инженерии. В настоящее время известны различные способы внедрения экзогенной ДНК в геном животных. Наиболее широкое применение в практике получили:

- метод микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы;
- перенос генов ретровирусами;
- перенос трансформированных ядер генеративных и соматических клеток;
- искусственное оплодотворение с использованием генетически модифицированных сперматозоидов (ICSI);
- электропорация.

Каждый из методов имеет свои достоинства и недостатки. Выбор того или иного метода зависит от цели конкретного исследования.

Перенос генов с использованием ретровирусных векторов – достаточно эффективный и результативный способ передачи ДНК в эмбриональные клетки.

Ретровирусы – семейство эукариотических РНК содержащих вирусов. Как уже было сказано в предыдущей главе, ретровирусная РНК попадая внутрь клетки, превращается в ДНК путем обратной транскрипции, которая встраивается в геном клетки. Таким образом, ретровирус своего рода естественно-природный генетический вектор.

В молекулярной биотехнологии наиболее часто используются ретровирусные вектора на основе ретровирусов мыши типа С (вирус лейкемии мыши). Такие векторные системы состоят из двух компонентов: векторной конструкции и линии клеток-упаковщиц. В векторной конструкции (провирусная ДНК) гены, кодирующие структурные белки ретровируса, замещаются чужеродными генами. Преимуществом такого подхода является тот факт, что до 100% обработанных эмбрионов могут быть успешно инфицированы ретровирусом. К недостаткам относят ограниченную емкость таких систем, а также возможное подавление экспрессии трансгенов и вероятность активации клеточных онкогенов.

Другим способом получения трансгенных животных является использование трансформированных генными конструкциями клеточных линий. С этой целью могут быть использованы линии, как стволовых, так и соматических клеток. Преимуществом этого подхода является возможность тестирования интеграции трансгена непосредственно в культуре клеток и возможность оценки экспрессии трансгенов.

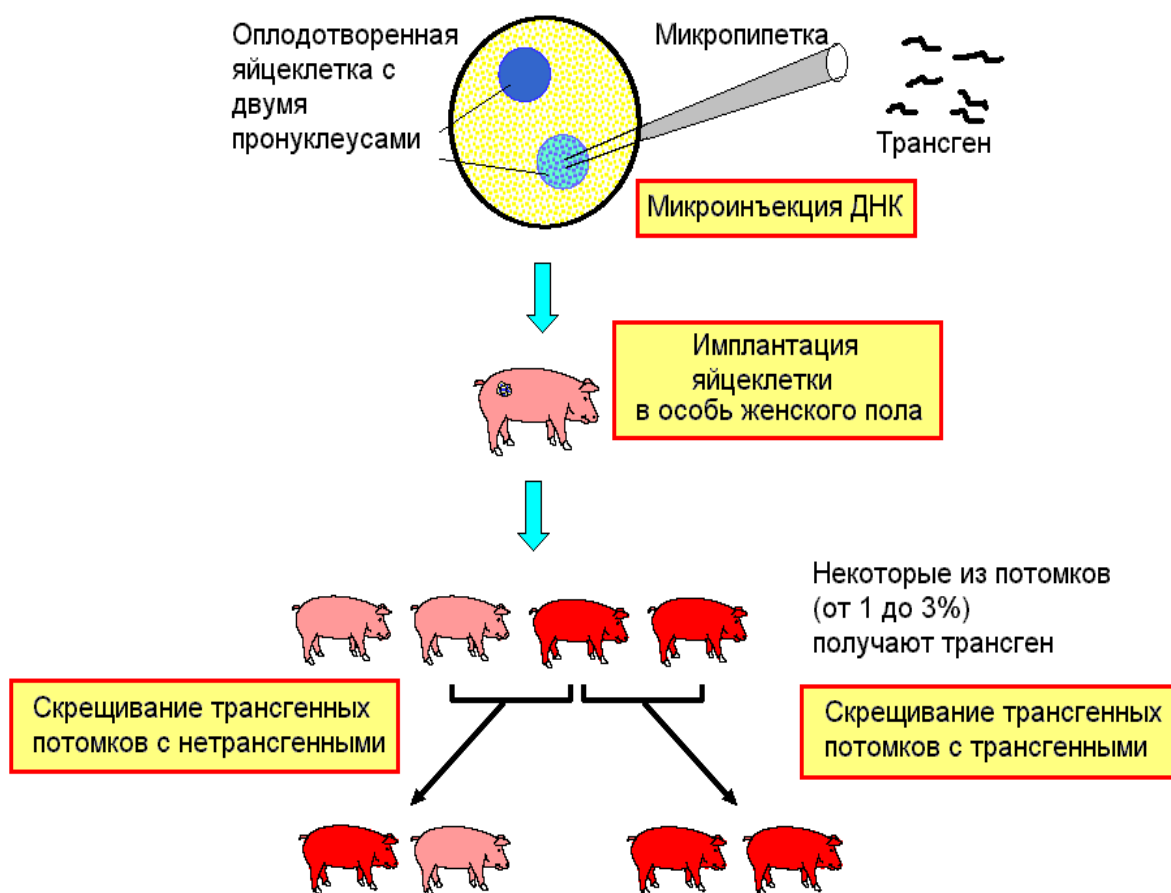
Таким образом, можно получать только трансгенное потомство, отбирая для пересадки ядер только те клеточные линии, в которых трансген транскрипционно и трансляционно активен.

В качестве природного вектора, доставляющего ДНК в клетки, могут быть использованы сперматозоиды. Сперматозоиды могут поглощать экзогенную ДНК и аккумулировать её в ядре. Очевидным преимуществом является возможность использования сперматозоидов после криоконсервации и длительного культивирования.

Ещё одним способом внедрения экзогенной ДНК в клетки является метод электропорации, суть которого в кратковременном воздействии электрического поля высокой напряженности (1 – 15 кВ/см) на бислойную липидную мембрану, что приводит к образованию в ней пор. Время существования и размер пор позволяют таким макромолекулам, как ДНК, войти в клетку под действием осмотических сил.

Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрация экзогенной ДНК, количество клеток-реципиентов подбираются экспериментально. Электропорация является наиболее простым, эффективным и хорошо воспроизводимым методом введения молекул ДНК в клетки.

Классическим методом трансформации животных является метод микроинъекции. Основным методом получения трансгенных животных является перенос генов методом микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы. Впервые задачу переноса генов лабораторным млекопитающим (мышам) удалось разрешить Дж. Гордону в 1980 году. Было доказано, что при инъекции чужеродных генов в мужской пронуклеус зиготы они интегрируются в хромосоме реципиента, а затем в ходе развития эмбриона и новорожденного животного распределяются по соматическим и половым клеткам. Суть метода заключается в следующем (рис.14). Из яйцевода самки извлекают зиготы, освобождают их от окружающих фолликулярных клеток, инкубируют в специальных средах под объективом микроскопа. Зиготу фиксируют микропипеткой, закрепленной на микроманипуляторе. С противоположной стороны подводят инъекционную микропипетку, в которой находится раствор с геном.



**Рис.14** – Схема получения трансгенных животных

Для инъекции чужеродной ДНК в мужской пронуклеус зиготы используют плазмиды с конструкциями, включающими промотор и структурный ген. В мужской пронуклеус инъецируют около 1 пиколитра буферного раствора с рекомбинантной ДНК, содержащей до 100 и более копий гена. Как правило, 60-80% реконструированных зигот хорошо переносят микроманипуляции. После оценки жизнеспособности зиготы трансплантируют самке-реципиенту другой генетической линии.

Таким образом, получение трансгенных животных, которых можно использовать в качестве продуцентов для производства лекарственных белков, является крупнейшим шагом в становлении фармацевтической промышленности нового типа. В Англии созданы трансгенные овцы, молоко которых содержит фактор свертывания крови. В России получены кролики, выделяющие  $\gamma$ -интерферон, эритропоэтин. Были получены овцы, свиньи, рыба и кролики – с увеличением массы тела на 30-50%.



Одним из излюбленных доноров органов являются свиньи, так как имеется анатомическое сходство органов и сходство иммунологических свойств. Реакции отторжения при трансплантации является наиболее значимой проблемой и имеют сложный молекулярный механизм развития. Одним из сигналов для атаки организма на чужой орган являются белки, локализованные на внешней поверхности мембраны. У трансгенных свиней эти белки заменены на человеческие.

Еще одно направление развития трансгенеза – получение устойчивых к болезням животных. К защитным белкам относятся интерфероны, поэтому ген интерферона встраивали различным животным. Трансгенные мыши получили устойчивость, они не болели или болели мало, а вот у свиней такого эффекта не обнаружено.

Другое направление – введение генов, кодирующих антисмысловую РНК. Для животноводства острой проблемой являются лейкозы, вызываемые РНК-вирусами. Трансгенные кролики, несущие гены, отвечающие за присутствие в клетке антисмысловой РНК, были устойчивы к лейкозам. Трансгенных животных также можно использовать для изучения наследственных заболеваний мозга и нервной системы.

## **5.2 Клонирование**

Клонирование – процесс изготовления генетически идентичных копий отдельной клетки или организма. Под клоном понимают генетически однородных потомков одной исходной особи, образующихся в результате бесполого размножения. Эти организмы похожи не только внешне, но и генетический код у них одинаков.

Метод клонирования возник в результате попыток доказать, что ядра зрелых клеток содержат всю необходимую информацию для кодирования всех признаков организма, специализация каждой клетки обусловлена включением определённых генов или прекращением функционирования определенных генов.

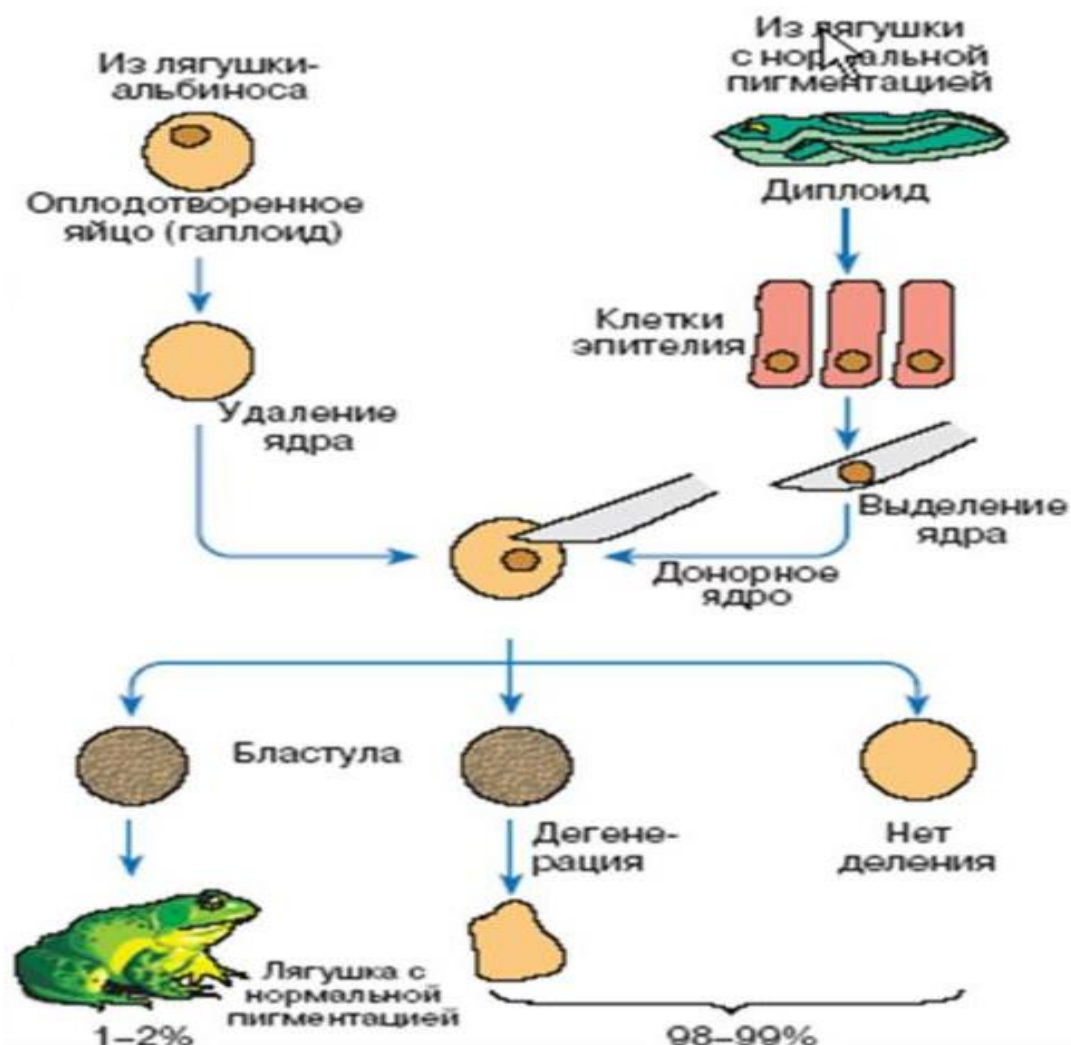
История клонирования берет свое начало с 1839 года, именно в этом году Т. Шванном была создана клеточная теория, которая произвела настоящий переворот в области генетики. Основная идея клеточной теории - любая клетка происходит от клетки. Два противоречащих положения теории – наследственность и дифференциация. Долгое время ученые не могли выяснить, какие клетки образуются в процессе деления – идентичные дочерние или производные разные.

Первый успех в области клонирования было достигнуто профессором Корнельского университета Ф. Стюардом, доказавший, что выращивая отдельные клетки съедобной части моркови в среде, содержащей нужные питательные вещества и гормоны, можно индуцировать процессы клеточного деления, приводящие к образованию новых клеток моркови.

В 1892 году Ханс Дриш разделив клетки двух клеточного зародыша морского ежа, он получил два генетически идентичных организма.

Первое успешное оплодотворение в пробирке было проведено в 1943 году, в основе которого находился метод трансплантации (пересадки) ядер клетки в яйцеклетку лягушки, но эксперимент закончился неудачей, через некоторое время эмбрион погиб. В более поздних экспериментах пересадка ядра из клеток взрослого организма привели к тому, что особи проходили стадию метаморфозы и превращались во взрослых лягушек, но лягушки рождались очень слабыми, практически не приспособленными к дальнейшему существованию. Роберт Бриггс и Томас Кинг в 1952 году провели первые успешные опыты по трансплантации ядер клеток тела организма в яйцеклетку амебы. В 1976 году Джон Гёрдон доказал возможность клонирования на лягушках. В 1979 году Стин Виладсен разработал метод получения однойяцевых близнецов из эмбрионов овцы и коровы. В конце 80-х годов 20 века генетические опыты стали проводиться с завидной регулярностью.

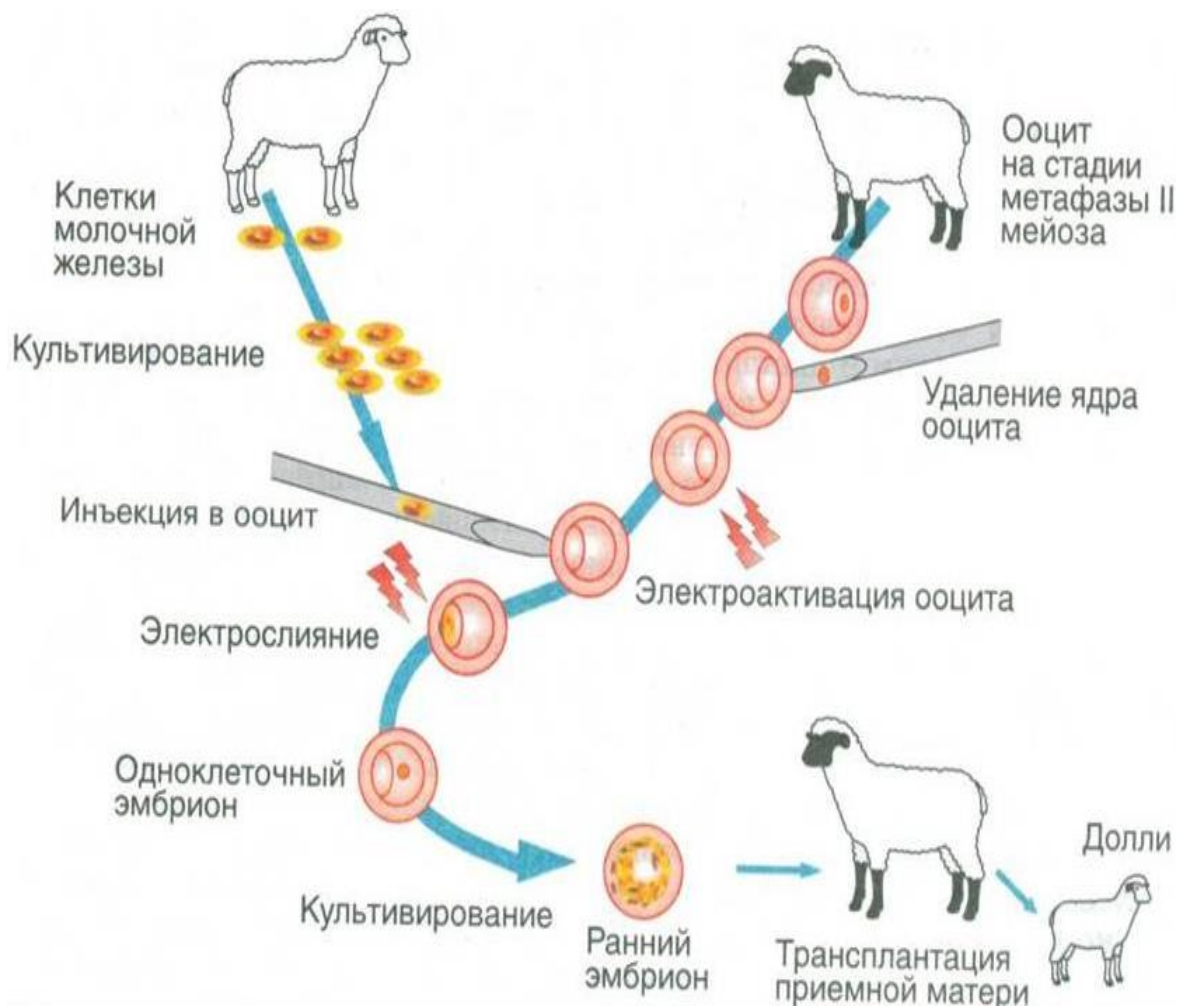
Но принципиальным отличием от предыдущих исследований было использование клеточных ядер не эмбриональных, а эпителиальных клеток кишечника головастика южноафриканской гладкой шпорцевой лягушки.



**Рис.15** – Схема клонирования лягушки

Ядро из яйцеклетки удалялось не с помощью хирургических манипуляций, а разрушалось воздействием ультрафиолетового излучения. Результаты были не столь впечатляющими, как у Т. Кинга и Р. Бриггса, что большая часть реконструированных яйцеклеток не развивалась и погибала и лишь 1% эмбрионов достигал стадии половозрелых особей. Вероятно, была ошибка, так как для пересадки случайно могли быть использованы ядра гоноцитов – первичных половых клеток, находящихся в эпителии кишечника головастика. В последствии Д. Гёрдон использовал в качестве донора - ядер специализировавшиеся клетки эпителия кишечника головастика, в результате выжило не более 2% клонированного потомства.

Он доказал, что если использовать яйцеклетки на стадии бластулы, в результате выживаемость эмбрионов увеличилась.



**Рис.16** – Клонирование овцы методом переноса ядра

Появление в 1996 г овечки Долли (рис.16) стало настоящим прорывом в клеточных технологиях, революцией в генной инженерии. Первое теплокровное животное, полученное из генетического кода другого взрослого существа путем клонирования. Метод клонирования состоял в том, что из яйцеклетки удалялось ядро и в нее трансплантировались разные ядра из специализированных клеток.

В основе технологии клонирования лежит способность клетки развиваться только с материнским диплоидным набором хромосом.

Ученые из университета штата Висконсин опробовали новую методику клонирования млекопитающих, отличную от той, что применялась учеными из Рослингского института, вырастившими Долли.

Они в качестве основного исходного материала использовали яйцеклетку коровы, у которой генетический материал заменили на молекулы ДНК других клонируемых животных - свиньи, крысы, овцы или обезьяны. При этом источником наследственного материала служили клетки тканей взрослых особей, взятые, например, из свиного или крысиного уха. После искусственного оплодотворения из коровьей яйцеклетки, получившей новую генетическую информацию, развивался зародыш другого млекопитающего - копия генетического донора.

Таким образом, ученым удалось благополучно вырастить в лабораторных условиях эмбрионы свиньи, крысы, овцы и обезьяны. Разработчики метода уверены, что их исследования имеют важное значение для развития генной инженерии и изучения возможностей генетического донорства. Данная методика клонирования в будущем сможет помочь сохранению исчезающих и редких видов животных.

В настоящее время выделяют два вида клонирования: хирургическое и терапевтическое. В результате хирургического клонирования образуется новый целостный организм, который является генетической копией другого организма – клон. Основан данный способ на замене гаплоидного ядра яйцеклетки на диплоидное ядро, взятое из клеток эмбрионов. Эти клетки ещё не дифференцированы, то есть не началась закладка органов, поэтому их ядра легко заменяют функцию диплоидного ядра только что оплодотворённой клетки. Таким методом были получены генетические копии лягушки, овечка Долли.

Терапевтическое клонирование – это процесс, известный как пересадка ядер соматических клеток, состоящий в изъятии яйцеклетки из которой было удалено ядро и замена этого ядра ДНК другого организма. После многих митотических делений культуры (митозов), данная клетка образует бластоцисту (ранняя стадия эмбриона, состоящая из 100 клеток) с ДНК почти идентичным первичному организму.

Наиболее перспективным направлением в клеточной инженерии является клонирование животных с использованием методов генной инженерии. Введение в эмбрион новой ДНК позволяет получать животных с новыми свойствами их организмов. Эти свойства могут быть использованы в медицине для лечения различных заболеваний, трансплантации, в фармацевтической и пищевой промышленности.

Наиболее вероятным и перспективным направлением в использовании технологии клонирования является клонирование домашних животных с целью удовлетворения потребности населения в мясных продуктах питания, терапевтическое клонирование органов тела человека для последующей их трансплантации.

### **5.2.1 Трансплантация эмбрионов**

Трансплантация — метод ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных путем получения и переноса одного или нескольких эмбрионов от высокоценных животных (доноров) менее ценным животным (реципиентам).

Ускорение темпов селекции животных в значительной степени зависит от возможности использования мирового фонда генетических ресурсов. Использование мирового генофонда является задачей большой народнохозяйственной значимости. Большее значение приобрел в начале экспорт животных, а затем экспорт-импорт спермы, что позволило сделать этот процесс более оперативным и экономически обоснованным. В последние годы появилась возможность обмена генетическими ресурсами путем экспорта-импорта ранних эмбрионов.

Данный метод имеет ряд преимуществ, состоящий в следующем: вероятность заражения заболеваниями значительно меньше; быстрота реализации ожидаемых потенциальных качеств выдающихся животных.

При отборе коров, доноров эмбрионов, руководствуются комплексом селекционных признаков: породность, экстерьер, конституция, морфо-функциональные свойства вымени, легкость отелов, жизнеспособность

приплода. Предпочтение отдают животным с длительным сроком использования, высокой молочной и мясной продуктивностью.

В качестве реципиентов можно использовать коров и телок клинически здоровых, без признаков нарушения обмена веществ, с отелами без осложнений, хорошо выраженной охотой. Минимальный возраст телок 16–18 месяцев с живым весом 350–380 кг.

Для проведения мероприятий, направленных на получение эмбрионов, необходимо подготовить животных к осеменению.

Гормональную обработку доноров следует начинать не ранее 60-го дня после отела. Обычно ее проводят после 2–3 эстральных циклов.

Стимуляция и синхронизация охоты осуществляются с помощью прогестерона – женского полового гормона стероидной природы, регулирующего ход эстрального цикла, простагландинов, а также их комбинации. Этот прием позволяет вызывать появление охоты у групп племенных животных в один и тот же период времени.

В настоящее время используют в основном два типа гонадотропинов: гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) и фолликуло-стимулирующий гормон (ФСГ). ГСЖК получают из крови кобыл с 40-го по 130-й день жеребости. Гонадотропин имеет длительный (50–120 часов) период полураспада в организме крупного рогатого скота, что объясняется наличием в его молекуле сигналовой кислоты. Достоинством ГСЖК является достаточность всего одной инъекции для вызывания суперовуляции, что позволяет сократить затраты труда и уменьшить стрессовое воздействие на животных. Активность ГСЖК выражают в интернациональных (И.Е.) или мышинных (м.е.) единицах действия. Одна И.Е. эквивалентна приблизительно 2,0–2,5 м.е. Обычная доза ГСЖК, применяемая для индукции суперовуляции, составляет 2500–3000 И.Е. Недостаток ГСЖК – его высокие антигенные свойства, что иммунизирует обработанных животных и делает проблематичным повторное использование доноров.

Фолликулостимулирующий гормон имеет непродолжительный (около 6 часов) период полураспада. Поэтому его вводят в организм в течение 4–5 дней утром и вечером, с интервалом между инъекциями в 12 часов, с целью поддержания необходимой для суперовуляции концентрации гормона в крови животного. Наибольшее распространение получили схемы вызывания суперовуляции с общей дозой 32 и 50 мг ФСГ со снижающейся дозировкой при последующих инъекциях.

Препараты ФСГ, в отличие от ГСЖК, не вызывают кистозных изменений в яичниках и не индуцируют выработку антител.

Осеменение доноров проводят через 48–54 часа после введения простагландина. Доноров осеменяют 3–4 раза с интервалом 10–12 часов.

Извлечение эмбрионов проводят на 7–8-й день после первого осеменения. Извлечение эмбрионов до 70-х годов производили в основном хирургическим путем, впоследствии он был заменен менее травматичным и трудоемким нехирургическим, основанным на введении в матку особого зонда по естественному каналу. Из этой жидкости извлекаются эмбрионы. В среднем при суперовуляции от донора можно получить от 5 до 7 эмбрионов. После извлечения эмбрионы оценивают.

Полноценные эмбрионы должны иметь шарообразную форму, неповрежденную прозрачную оболочку, одинаковые бластомеры с четкой плазматической оболочкой и светлую гомогенную цитоплазму.

После оценки пригодные эмбрионы трижды промывают стерильным 20%-м раствором ФС (фетальная сыворотка) ФСБ (фосфатносолевой буфер Дюльбекко). Эти операции проводят последовательно, пересаживая эмбрионы из капли в каплю.

Интервал времени между получением зародыша и началом следующего технологического этапа (краткосрочного хранения, криоконсервации) не должен превышать двух часов.



Краткосрочное хранение целесообразно, если рассинхронизация между стадией развития эмбриона и половым циклом реципиентов не превышает 1,5 суток. В остальных случаях применяют криоконсервацию.

Трансплантация эмбрионов в настоящее время является одной из наиболее актуальных проблем в области животноводства. С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить выход числа потомков от высокопродуктивных коров. Применение этого метода упрощает обмен генофондом сельскохозяйственных животных между странами.

По типу доноров выделяют следующие виды трансплантации (в зависимости от взаимоотношения между донором и реципиентом):

Ауто трансплантация – пересадка органа осуществляется в пределах одного организма. Например, у пациента поражено устье почечной артерии, обычная реконструкция невозможна, а наложение обходных шунтов связано с высоким риском осложнений. Почку можно удалить, осуществить экстракорпоральную (иногда микрохирургическую) реконструкцию артерии и пересадить почку на подвздошные сосуды.

Алло трансплантация (гомотрансплантация) – производят пересадку от одного организма другому, т.е. осуществляют пересадку между организмами одного и того же вида (от собаки собаке, человека человеку), имеющими разный генотип. Это наиболее часто используемый вид трансплантации. Возможен забор органов у родственников реципиента.

Ксенотрансплантация (гетеротрансплантация) – донор и реципиент относятся к разным видам. Орган или ткань пересаживают от представителя одного вида другому, например, от животного человеку. Метод получил крайне ограниченное применение (ксенокожи - кожи свиньи, клеточной культуры  $\beta$ -клеток поджелудочной железы свиньи).

Изотрансплантация – осуществляют пересадку между двумя генетически идентичными организмами (между однояйцовыми близнецами). Подобные операции проводят редко, так как количество

однойцовых близнецов невелико, кроме того, они часто страдают схожими хроническими заболеваниями.

По месту имплантации органа классифицируют на:

1. Ортотопическая трансплантация – пересадку органа производят на то же место, где находился соответствующий орган реципиента. Таким образом осуществляют пересадку сердца, лёгких, печени.

2. Гетеротопическую трансплантацию – орган пересаживают не на место нахождения органа реципиента, а в другую область. Причём неработающий орган реципиента может быть удалён, а может и находиться на своём обычном месте. Гетеротопическую трансплантацию выполняют при пересадке почки, органной пересадке поджелудочной железы. Почку, например, пересаживают на подвздошные сосуды.

По типу трансплантатов - все операции трансплантации делят на пересадку органов или комплексов органов (трансплантация сердца, почки, печени, поджелудочной железы, комплекса сердце-лёгкие) и пересадку тканей и клеточных культур (пересадка костного мозга, культуры  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, эндокринных желёз и др.).

Трансплантацию эмбрионов применяют для следующих целей: размножения генетически ценных особей; получения идентичных животных путем деления ранних эмбрионов; сохранения мутантных генов, малых популяций и генофонда пород; получения потомков от бесплодных, но генетически ценных по генотипу животных; выявления вредных рецессивных генов и хромосомных аномалий; повышения устойчивости животных к болезням; борьбы с болезнями путем замены импорта и экспорта животных на импорт и экспорт криоконсервированных эмбрионов; получения химерных животных, которые развиваются из ранних эмбрионов, сконструированных из бластомеров разных животных.

## 5.2.2 Химерные животные

Одним из перспективных направлений биотехнологии является искусственное получение химер (аллофенных животных). Понятие химера означает составное животное. Сущность метода получения химер заключается в искусственном объединении эмбриональных клеток двух и более животных. Животные могут быть как одной породы, так и разных пород и даже разных видов. Современная микрохирургия позволяет получать химер, имеющих 3—4 и более родителей. Химеры обладают признаками животных разных генотипов.



**Рис.17** - Получение трансгенных мышей методом реконструкции эмбрионов с помощью генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток (ES-клеток). ES-клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши

Существует два основных метода получения химер искусственным путем: агрегационный и инъекционный.

1. Агрегационный метод — объединение двух и более морул или бластоцист в один эмбрион. Данный метод был предложен в 1961-1962 гг. и использовался для зародышей разных животных, достигшие стадии 8 бластомеров, помещают их в условия, способствующие агрегации и образованию 16-ти клеточного зародыша.



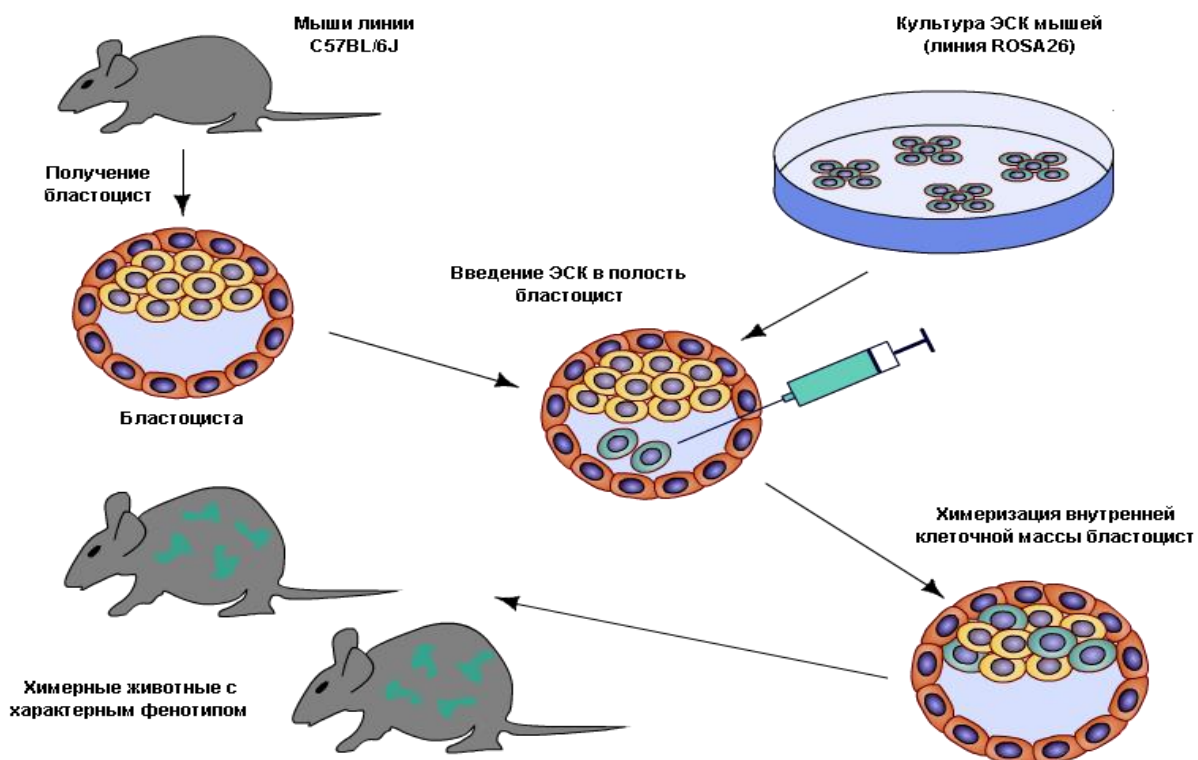
**Рис.18** - Агрегационный метод

Составные (химерные) зародыши развиваются *in vitro* до стадии бластоцисты, после чего их имплантируют в матку приемной матери, где они продолжают развиваться. Преимуществом метода является то, что не требуется вмешательства микрохирургической техники, поэтому широко используется в эмбриогенетике.

2. Инъекционный метод — микроинъекция клеток внутриклеточной массы (ВКМ) бластоцисты доноров в бластоцель эмбриона-реципиента.

Метод был предложен в 1968 г, в данном варианте используются эмбрионы на стадии бластоцисты. С помощью микроманипулятора путем инъекции вводят клетки донора в бластоцель эмбриона-реципиента.

Метод нашел применение при получении межвидовых химер, например, овцекоз. Половым путем овцы и козы не скрещиваются, так как имеют разный набор хромосом. В 1984 году были получены межвидовые химеры между овцой и козой - овцекозы, причем практически одновременно в Англии и ФРГ.



**Рис.19** - Инъекционный метод

В обоих случаях получают особей, ткани и органы которых построены из клонов клеток объединенных (двух или более) эмбрионов. Следует отметить, что химерные животные не передают потомкам генетическую мозаичность. У них происходит расщепление, как у гетерозигот, в результате чего нарушаются ценные генетические комбинации.

Хотя химерные животные поддерживают ценные хозяйственно полезные признаки лишь на протяжении одного поколения в скотоводстве, но они могут представлять большой практический интерес. Он заключается в создании животных, сочетающие важные хозяйственно-полезные признаки, как мясную и молочную продуктивность, которые являются антагонистами и трудносовместимы в одном животном.

Первыми созданы химеры лабораторных мышей между линиями агути (кремовые) и не агути (черные). Они выглядели крапчатыми. Их окраска сочетала признаки обоих родителей: полосы пигментированной шерсти чередовались со светлыми, каждая полоса представляла клон клетки-родоначальницы.

Их использование помогает изучению фундаментальных проблем дифференцировки клеток в процессе онтогенеза, многих вопросов механизма клеточного развития и происхождения отдельных тканей, иммунологического взаимодействия в развитии.

В настоящее время имеются внутривидовые и межвидовые химеры не только лабораторных животных (мышей, хомяков, крыс), но и сельскохозяйственных животных (коров, коз, овец).

Изучение химер позволяет понять процесс реализации генома в фенотипе животных. В Великобритании и ФРГ были получены межвидовые химеры между овцой (2п = 54) и козой (2п = 60) названные овцекозами, в крови которых были обнаружены красные кровяные тельца овцы и козы. Их шерсть представляла собой смесь волос того и другого вида. Экстерьер соответствовал одному из родителей.

Интересным фактом является рождения ягненка от козы и козленка от овцы. В США в 1987 г. были получены химеры овец и коз и химеры овцы между породами рамбулье и финский ландрас. В нашей стране получен химерный бычок от животных черно-пестрой и красной пород. Он в фенотипе сочетал черно-пеструю масть с красными пятнами.

Приведенные материалы свидетельствуют о возможности получения химер (генетических мозаиков) в животноводстве. Однако в потомстве химерных животных не сохраняется родительский генотип, происходит расщепление и нарушаются ценные генетические комбинации. Несмотря на это предполагается, что при усовершенствовании методов получения химер они представляют большой интерес для практики животноводства.

Таким путем можно получить животных с более высокой резистентностью к ряду болезней и с признаками, которые обычно плохо сочетаются в одном организме.

### 5.3 Стволовые клетки

Стволовые клетки — это иерархия особых клеток живых организмов, каждая из которых способна впоследствии дифференцироваться особым образом, т.е. получать специализацию и далее развиваться как обычная клетка. Открытие эмбриональных стволовых клеток является третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека». Все органы образуются из одной и той же стволовой клетки, но почему-то в одном месте она превращается в клетку крови, в другом – в клетку жировой или костной ткани, а в третьем из нее появляется хрящевая клетка. Природа использует огромное количество биологически активных веществ в том или ином сочетании, чтобы дифференцировать стволовые клетки в разных направлениях и создавать из них разные органы. Разгадка этого природного кода – самая сложная задача, которой занимаются ученые многих стран мира.

Клетки, выделенные из эмбрионов на стадии бластоцисты, могут пролиферировать в культуре, сохраняя способность к дифференцировке в любые типы клеток, в т.ч. и в клетки зародышевой линии, при введении в другой эмбрион на стадии бластоцисты. Такие клетки называются плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками (ES – клетки).

Они являются наиболее универсальными и характеризуются следующими основными свойствами:

- тотипотентность — способность образовывать любую ткань организма;
- хоуминг — способность стволовых клеток, при введении их в организм, находить зону повреждения и фиксироваться там, исполняя утраченную функцию;
- теломеразная активность;
- наличие в цитоплазме мРНК всех генов, которые отвечают за раннее развитие зародыша.

В различных органах и тканях взрослого организма существуют частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро дозреть и превратиться в клетки нужного типа. Дифференцировку могут запускать как внутренние причины, так и внешние. Стволовые клетки таят в себе невиданные возможности: от регенерации поврежденных органов и тканей до лечения заболеваний, не поддающихся лекарственной терапии.

Стволовые клетки взрослого организма обеспечивают нормальное развитие, но клетки взрослых не такие универсальные как клетки эмбриона. Они могут стать таким типом клеток, который сохраняет специфику ткани, из которой были выделены.

По данным Международного общества по исследованию стволовых клеток (ISSCR), существует два типа стволовых клеток. Первый и самый распространенный вид носит название гемопоэтических стволовых клеток, которые образуют все типы кровяных клеток в организме. Вторая категория стволовых клеток у взрослых носит название стромальных стволовых клеток костного мозга или мезенхимальных стволовых клеток.

Хранилищем стволовых клеток организма служит костный мозг, где стволовые клетки находятся в окружении стромальных клеток, которые участвуют в передаче регуляторных сигналов. Стволовых клеток не так уж и много, но их найти в циркуляционной (периферической) крови.

Исследованиями в области молекулярной биотехнологии последних лет доказано возможность изменения процесса дифференциации клеток. Если до недавнего времени считали, что процесс развития оплодотворенной яйцеклетки происходит поэтапно с постепенной утратой полипотентности, то японский ученый Синья Яманака с соавторами (2006) установили возможность превращения дифференцированных клеток в стволовые, то есть в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) или IPS (induced pluripotent stem cells). Безусловно, это открытие стало величайшим достижением в клеточной инженерии.



Сегодня технология С. Яманаки дает возможность получать плюрипотентные клетки из специализированных клеток взрослого организма (чаще всего из фибробластов кожи), наделенные возможностями развиваться в клетки разных тканей и органов. Для этого в них нужно внедрить четыре гена - Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус., которые обычно работают в эмбриональных стволовых клетках. Эти гены перепрограммируют клеточный геном, возвращая клетку в эмбриональную стадию и в последующем из них можно получить любой тип клеток. Так, Д. Шриваставе получил сердечные миоциты из клеток кожи, а в 2010 г М. Вернига - из клеток кожи нейроны (2010 г.).

Технология отработана, но у нее есть недостатки: она довольно медленна и неэффективна для того, чтобы ее можно было использовать в практической медицине. О радикальном ее совершенствовании доложили ученые из Израиля под руководством доктора Якуба Ханна. Они совершили настоящий прорыв в технологии, добились того, что все исходные фибробласты стали превращаться в ИПСК. Этот прорыв чрезвычайно важен как для целей медицины, так и для лучшего понимания самого процесса перепрограммирования. До сего времени перепрограммирование зрелых фибробластов в стволовые клетки занимало свыше 4-х недель. Сложность состоит еще и в том, что этот процесс происходит несинхронно в разных клетках. Наконец, выход конечного продукта, то есть ИПСК, не превышает 1%. Причина, не дающая клеткам эффективно менять свою судьбу, оказалась в одном белке под названием MBD-3.

Данный белок всегда присутствует в любой клетке на любой стадии ее развития, но до сих пор ученые не знали его функций. Как выяснили исследователи, единственное время, когда белка MBD-3 нет в клетке, это первые три дня после оплодотворения, то есть те самые первые дни развития зиготы, когда она начинает делиться, образуя бластулу и которая образована эмбриональными стволовыми клетками. Уже, начиная с четвертого дня

развития, в клетках появляется белок MBD-3, и они постепенно утрачивают плюрипотентность и их развитие направляется по тому или иному пути.

В дальнейшем клетки образуют три зародышевых листка — эктодерму, энтодерму и мезодерму. Биологи предположили, что именно белок MBD-3 противостоит плюрипотентности. Они удалили его из клеток, в результате скорость и эффективность их перепрограммирования резко повысились. Необходимое для этого время сократилось с четырех недель до восьми дней. Клетки начали испытывать превращение синхронно. И его эффективность приблизилась к 100%.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Назовите этапы получения гибридных клеток.
2. Назовите возможности метода слияния клеток.
3. Расскажите о стволовых клетках.
4. Из каких этапов состоит метод трансплантации эмбрионов?
5. Способы получения и пересадки эмбрионов.
6. Расскажите об истории метода клонирования.
7. Методы получения трансгенных животных.
8. Расскажите о химерных животных.
9. Назовите достижения клеточной инженерии в отрасли животноводства.
10. Перспективы развития клеточной инженерии.

## **6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

В настоящее время с помощью биотехнологии мы получаем большое разнообразие веществ, так необходимых человеку. Основными из них являются алкалоиды, аминокислоты, антибиотики, антиметаболиты, антиоксиданты, белки, витамины, гербициды, инсектициды, коферменты, липиды, нуклеиновые кислоты, органические кислоты, пигменты, полисахариды, растворители, сахара, ферменты, нуклеотиды, эмульгаторы и др. Кроме того, биотехнология позволяет разрабатывать безотходные технологии, связанных с рядом проблем, в частности с нехваткой продуктов питания, энергии, охраной окружающей среды и т.д.

По многим направлениям биотехнологии новые современные технологии только зарождаются и необходимы большие субсидии и усилия в их дальнейшем развитии, но потенциал их огромен и разнообразен и нет сомнения, что они будут играть все возрастающую роль в промышленном производстве будущего.

До появления технологии рекомбинантных ДНК многие лекарственные препараты на основе белков человека удавалось получать только в небольших количествах, их производство обходилось очень дорого, а механизм биологического действия иногда был недостаточно изучен. Предполагалось, что с помощью новой технологии можно будет получать весь спектр таких препаратов в достаточных количествах.

Важным направлением биотехнологии стала разработка, производство и применение биопрепаратов.

Биопрепараты – средства биологического происхождения, их применяют для диагностики, профилактики и лечения неинфекционных, инфекционных и паразитарных болезней человека и животных. Как вам известно возбудители инфекционных болезней вызывают заболевание у всех видов с/х животных и растений. Если количество больных животных

будет уменьшено или болезнь будет ликвидирована, то соответственно возрастет и производство с/х продукции.

### **6.1 Вакцины**

Важным направлением в медицине и ветеринарии является использование трансгенных растений для получения вакцин. Для этого встраивают гены в растение, кодирующие белки возбудителей инфекционных болезней, индуцирующих выработку нейтрализующих антител. В настоящее время получены генетически модифицированные картофель, томаты, подсолнечник, салат, табак, рис и другие растения.

Вакцины производят с применением различных технологий для создания активного иммунитета у животных и человека. Обычно их применяют с профилактической и реже с лечебной целью, кроме того, вакцинация способствует формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам и тем самым защищает его от инфекции. В ответ на пероральное или парентеральное введение вакцины в организме вырабатываются антитела к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к его инаktivации (нейтрализации или гибели), блокирует и не позволяет развиваться заболеванию.

В настоящее время разработаны вакцины различных типов против многих инфекционных болезней. Проводятся исследования по созданию некоторых бактериальных вакцин и вакцин против паразитарных заболеваний, разрабатываются вакцины с помощью технологии рекомбинантных ДНК против вирусных заболеваний, таких как грипп, полиомиелит, гепатит, герпес.

Наиболее широко применяют вакцины против бактериальных (сибирская язва, бруцеллез, рожа свиней, сальмонеллез и др.) и вирусных (бешенство, классическая чума свиней, чума плотоядных, ящур и др.) болезней. А также ведется интенсивная работа по разработке вакцин против инфекционных болезней с применением генно-инженерных методов на основе мутантов, рекомбинантов возбудителей и ДНК-вакцин. Это еще раз

подчеркивает важную роль биотехнологии в борьбе с инфекционными болезнями сельскохозяйственных и диких животных.

Вакцины являются препаратами инаktivированных (убитых или их отдельных антигенов) и аттенуированными (живыми) или неvirulentными (ослабленными) микроорганизмами, они стимулируют иммунитет и обеспечивают устойчивость организма к патогенным микроорганизмам.

И в соответствии с природой специфического антигена вакцины делят на живые, неживые и комбинированные.

Живые вакцины получают из естественных штаммов микроорганизмов, они обладают ослабленной virulentностью, но содержат полноценный набор антигенов, и искусственных (аттенуированных) штаммов микроорганизмов. К живым вакцинам можно отнести также векторные, они полученные генно-инженерным способом и представляют собой вакцинный штамм, несущий ген чужеродного антигена (например, вирус оспенной вакцины со встроенным антигеном вируса гепатита В).

Неживые вакцины подразделяют на молекулярные (химические) и корпускулярные. Молекулярные вакцины конструируют на основе специфических протективных антигенов, они находятся в молекулярном виде, получены путем биосинтеза или химического синтеза. К этим вакцины можно отнести также анатоксины, которые представляют собой обезвреженные формалином молекулы токсинов, образуемых микробной клеткой (дифтерийный, столбнячный, ботулинический и др.).

Корпускулярные вакцины получают из цельных микроорганизмов, инаktivированных физическими (тепло, ультрафиолетовое и др. излучения) или химическими (фенол, спирт) методами (корпускулярные, вирусные и бактериальные вакцины) или из субклеточных надмолекулярных антигенных структур, извлеченных из микроорганизмов (субвирионные вакцины, сплит-вакцины, вакцины из сложных антигенных комплексов).

Молекулярные антигены в основном используют для получения синтетических и полусинтетических вакцин. Так, из моновакцин готовят

сложные препараты, они состоят из нескольких моновакцин и предназначены для иммунизации против одной инфекции. Такие вакцины поливалентные, они обеспечивают иммунитет одновременно против нескольких инфекций. Так, для профилактики полиомиелита применяют единый поливалентный препарат, он состоит из аттенуированных штаммов I, II, III серотипов вируса полиомиелита. Живые вакцины обычно используют однократно, неживые - чаще двукратно или трехкратно.

Существуют следующие виды вакцин:

- вакцина адсорбированная, антигены которой сорбированы на веществах, они усиливают и пролонгируют антигенное раздражение;

- вакцина антирабическая изготовлена из штамма фиксированного вируса бешенства в суспензии тканей головного мозга животных или в культуре клеток, предназначенная для предупреждения заболевания бешенством;

- ассоциированная вакцина – комбинированная, комплексная и поливакцина - препарат состоит из нескольких вакцин различного типа, предназначена для одновременной иммунизации против нескольких инфекционных болезней;

- живая вакцина - содержит жизнеспособные штаммы патогенного микроорганизма, ослабленные до степени, исключая возникновение заболевания, но при этом живая вакцина полностью сохраняет свои антигенные свойства и способствует формированию специфического иммунитета у привитого;

- вакцина поливалентная изготовлена на основе нескольких серологических вариантов возбудителя одной инфекционной болезни;

- убитая вакцина изготовлена из микроорганизмов, инактивированных воздействием физических или химических факторов;

- вакцина фенолизированная – эта убитая вакцина, изготовлена из микроорганизмов, инактивированных фенолом;

- вакцина формализированная – эта убитая вакцина, изготовлена из микроорганизмов, инактивированных формалином.

- вакцина химическая состоит из специфических антигенов, извлеченных из микроорганизмов и очищенная от балластных веществ;

- вакцина эмбриональная изготовлена из вирусов, выращенных на эмбрионах птиц (кур, перепелок);

- вакцина этеризованная - убитая вакцина, изготовлена из микроорганизмов, инактивированных эфиром.

Таким образом, вакцины состоят из действующего начала, т.е. специфического антигена; консерванта для сохранения стерильности (в неживых вакцинах); стабилизатора или протектора, для повышения сроков сохраняемости антигена; неспецифического активатора или полимерного носителя, для повышения иммуногенности антигена (в химических и молекулярных вакцинах). При конструировании вакцин в качестве антигенов используют: живые ослабленные (аттенуированные) микроорганизмы; неживые (инактивированные, убитые) цельные микробные клетки или вирусные частицы; извлеченные из микроорганизмов сложные антигенные структуры (протективные антигены); продукты жизнедеятельности микроорганизмов, т.е. вторичные метаболиты (токсины, молекулярные протективные антигены): антигены, полученные путем химического синтеза или биосинтеза с применением методов генетической инженерии.

Однако производство современных вакцин сталкивается с целым рядом ограничений:

- не все патогенные микроорганизмы удается культивировать, поэтому для многих заболеваний вакцины не созданы;

- для получения вирусов животных и человека необходима дорогостоящая культура животных клеток;

- титр вирусов животных и человека в культуре и скорость их размножения часто бывают очень низкими, что приводит к удорожанию производства вакцин;

- необходимо строго соблюдать меры предосторожности, чтобы не допустить инфицирования персонала;

- при нарушении производственного процесса в некоторые партии вакцины могут попасть живые или недостаточно ослабленные вирулентные микроорганизмы, что может привести к распространению инфекции;

- аттенуированные штаммы могут ревертировать к исходному штамму, поэтому необходимо постоянно контролировать вирулентность;

- некоторые заболевания нельзя предупреждать с помощью традиционных вакцин;

- большинство современных вакцин имеют ограниченный срок годности и сохраняют свою активность только при пониженной температуре, что затрудняет их использование.

В последнее десятилетие, с развитием технологии рекомбинантных ДНК, появилась возможность создать новое поколение вакцин, не обладающих недостатками традиционных вакцин, для их разработки применяют следующие методы генной инженерии:

- патогенный микроорганизм модифицируют, выделяют гены, ответственные за вирулентность, при этом сохраняется их способность вызывать иммунный ответ, такой микроорганизм можно безбоязненно использовать в качестве живой вакцины, поскольку выращивание в чистой культуре исключает возможность спонтанного восстановления целого гена;

- создают живые непатогенные системы переноса отдельных антигенных детерминантов неродственного патогенного организма, такая система переноса способствует развитию выраженного иммунного ответа на патогенный микроорганизм;

- если патогенные микроорганизмы не растут в культуре, то их можно изолировать, клонировать и преобразовать в гены тех белков, которые



содержат основные антигенные детерминанты и использовать эти белки как «субъединичные» вакцины;

- некоторые патогенные микроорганизмы действуют опосредованно, вызывая развитие аутоиммунной реакции на инфицированные клетки организма-хозяина. Для таких заболеваний можно создать систему уничтожения клеток-мишеней, сконструировав ген, кодирующий химерный белок, одна часть которого будет связываться с инфицированной клеткой, а другая - уничтожать ее. Эта система не является истинной вакциной, хотя она и будет действовать только на инфицированные клетки, устраняя саму причину развития аутоиммунной реакции.

Так как к вакцинам для животных предъявляются менее жесткие требования, поэтому первыми вакцинами, полученными с помощью технологии рекомбинантных ДНК, были вакцины против ящура, бешенства, дизентерии и диареи поросят. Также создаются и другие вакцины для животных, в скором времени могут появиться и рекомбинантные вакцины, они будут предназначены для человека.

Применение субъединичных вакцин, состоящих из высокоочищенных компонентов вириона, считается более безопасным, чем традиционных вакцин. Как правило, эти вакцины содержат неповрежденные патогенные микроорганизмы. Антитела, вырабатываемые в ответ на их введение, связываются с поверхностными белками патогенного организма запускают иммунный ответ. И так вакцины, содержащие лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма, называют субъединичными, для их разработки используется технология рекомбинантных ДНК. Однако такие вакцины имеют свои достоинства и недостатки.

Достоинства - препарат, содержит очищенный иммуногенный белок, он стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, что могло бы вызывать нежелательные побочные эффекты в организме.

Недостаток - очистка специфического белка стоит дорого, а форма выделенного белка может отличаться от той, которую он имеет (оболочки), что может привести к изменению антигенных свойств.

Накопленная информация в последние годы о молекулярных механизмах антигенов позволяет устранить недостатки, моделировать вакцинный процесс, избирательно активируя разные отделы иммунной системы. Основной целью разработки вакцин нового поколения, являются идентификация и характеристика индивидуальных антигенов инфекционного агента, которые вызовут защитный иммунный ответ.

Основным свойством вакцин является создание активного поствакцинального иммунитета, который по своему характеру и конечному эффекту соответствует постинфекционному иммунитету, иногда он отличается от него лишь количественно. Вакцинальный процесс при введении живых вакцин сводится к размножению и генерализации аттенуированного штамма в организме привитого и вовлечению в процесс иммунной системы. Хотя по характеру поствакцинальных реакций при введении живых вакцин вакцинальный процесс напоминает инфекционный, однако он отличается от него своим доброкачественным течением.

Вакцины при введении в организм вызывают ответную иммунную реакцию, которая в зависимости от природы иммунитета и свойств антигена может носить выраженный гуморальный, клеточный или клеточно-гуморальный характер. Эффективность применения вакцины определяется иммунологической реактивностью, она зависит от генетических и фенотипических особенностей организма, от качества антигена, дозы, кратности и интервала между прививками. Поэтому для каждой вакцины разрабатывают схему вакцинации.

## **6.2 Антибиотики**

Всестороннее изучение механизмов заболевания позволяет разработать препараты целенаправленного действия. Одним из таких препаратов являются антибиотики, они подавляют размножение широкого

ряда бактерий и микроорганизмов без заметного действия на организм человека и животных, что сыграло в дальнейшем огромную роль.

Интенсивно антибиотики начали использовать примерно с 1945 г. после применения пенициллина. В дальнейшем спектр антимикробных препаратов расширился, их стали широко использовать в медицине, ветеринарии, а также в животноводстве для увеличения веса с/х животных и птиц, для борьбы с болезнями растений, в качестве инсектицидов.

Антибиотики, которые действуют на ряд микроорганизмов, называются антибиотиками с широким спектром. В противоположность им стрептомицин и пенициллин имеют узкий спектр действия, поскольку эффективны только против некоторых видов бактерий.

Однако с повышением устойчивости бактерий к антибиотикам появилась проблема, т.к. факторы устойчивости расположены в плазмиде и могут легко передаваться от одной бактерии к другой. С открытием данного феномена послужило основой для разработки нового метода переноса генов, он широко используется в генетической инженерии. Применение генетической инженерии позволило получить новые штаммы-продуценты с высокой продуктивностью, лучшей стабильностью и дало возможность синтезировать новые антибиотики. Практика показывает, что поиск новых антибиотиков необходимо проводить постоянно, поскольку бактерии очень быстро приобретают устойчивость к ним. Наиболее актуальные задачи, связанные с разработкой, производством и применением антибиотиков это:

- создание и разработка способов преодоления антибиотико-резистентности микробов;
- изыскание природных и создание полусинтетических антибиотиков, эффективных в борьбе со стафилококковой, синегнойной и другими инфекциями;
- поиски других видов организмов – продуцентов антибиотиков;
- получение новых антибиотиков путем направленного биосинтеза и подбора соответствующих мутантов и рекомбинантов.

Стимулом к дальнейшим исследованиям являются два основных фактора – большое значение антибиотиков в медицине и ветеринарии, низкая стоимость сырья, идущего на их изготовление. Эта отрасль производства в отличие от других не испытывает конкуренции со стороны химического производства. Однако проблемы, вынуждают изыскивать новые подходы в борьбе с инфекционными болезнями.

Одним из наиболее перспективных путей в борьбе с некоторыми заболеваниями можно считать создание и широкое применение пробиотиков. Пробиотики - это живые микроорганизмы, их используют в терапевтических целях, а также как пищевые продукты и биологически активные добавки. Большая часть пробиотиков, используемых в настоящее время, создана на основе бактерий рода *Bacillus*.

### **6.3 Ферменты**

Ферменты – это биологические молекулы, синтезируемые живыми клетками. В каждой клетке имеются сотни различных ферментов. Они сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их широко применяют в различных областях, в частности в с/х, легкой, пищевой и фармацевтической промышленности, в генно-инженерных исследованиях. С их помощью осуществляются многочисленные химические реакции. В большинстве случаев получение ферментов – аэробный процесс. Источниками ферментов могут быть животные, растения и микроорганизмы. В каждой клетке имеются сотни различных ферментов. Они сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их традиционно широко применяют в практике. С их помощью осуществляются многочисленные химические реакции. Ферменты как биокатализаторы обладают рядом уникальных свойств:

- все ферменты представляют собой глобулярные белки;
- информация о них, как и о других белках, закодирована в ДНК;

- они увеличивают скорость реакции, но сами в этой реакции не расходуются;

- их присутствие не влияет ни на природу, ни на свойства конечного продукта (или продуктов) реакции;

- очень малое количество фермента вызывает превращение больших количеств субстрата, в среднем ферменты способны катализировать около 1000 реакций в секунду;

- активность ферментов меняется в зависимости от кислотности, температуры, давления, а также от концентрации как субстрата, так и самого фермента;

- ферменты снижают энергию активации катализируемой реакции;

- в молекуле фермента есть активный центр, который вступает в контакт с субстратом. Этот активный центр имеет особую форму;

- катализируемая ферментами реакция обратима;

- ферменты высокоспецифичны, т. е. один фермент катализирует обычно только одну реакцию

Особенности получения ферментов:

- тщательное соблюдение стерильности, так как они при производстве в отличие от спиртов, кислот и антибиотиков не подавляют постороннюю микрофлору;

- биосинтез ряда ферментов подавляется катаболитами (например, глюкоза ингибирует синтез  $\alpha$ -амилазы);

- большую опасность представляют протеазы, так как они гидролизуют ферменты, большинство из которых являются белками.

Ферменты как биокатализаторы обладают рядом уникальных свойств:

- все ферменты представляют собой глобулярные белки;

- информация о них, как и о других белках, закодирована в ДНК;

- они увеличивают скорость реакции, но сами в этой реакции не расходуются;

- их присутствие не влияет ни на природу, ни на свойства конечного продукта (или продуктов) реакции;

- очень малое количество фермента вызывает превращение больших количеств субстрата, в среднем ферменты способны катализировать около 1000 реакций в секунду;

- активность ферментов меняется в зависимости от кислотности, температуры, давления, а также от концентрации как субстрата, так и самого фермента;

- ферменты снижают энергию активации катализируемой реакции;

- в молекуле фермента есть активный центр, который вступает в контакт с субстратом. Этот активный центр имеет особую форму;

- катализируемая ферментами реакция обратима;

- ферменты высоко специфичны, т. е. один фермент катализирует обычно только одну реакцию.

Применение ферментных препаратов во много раз ускоряет производственные процессы, увеличивает выход продукции, обеспечивает более экономичное использование с/х сырья и достигаются существенное снижение себестоимости продукции.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Ферменты и их применение.
2. Иммобилизация ферментов.
3. Применение иммобилизованных ферментов.
4. Назовите источники ферментов.
5. На какие виды подразделяются вакцины?
6. Охарактеризуйте и с какой целью используют вакцины?
7. Методы получения вакцин.
8. Охарактеризуйте и область применения антибиотиков.
9. Значение и способы получения антибиотиков.
10. Положительные и отрицательные стороны использования антибиотиков.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: Академия. – 2003. -
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. – М.: Мир. - 2002. – С.57 – 64.
3. Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экологическая генетика. - 2007. - Т.5. - №2. - С.12 – 24.
4. Шестаков С.В. Вклад метагеномики в развитие биотехнологии // Биотехнология. - 2011. - №6. - С.8 – 22.
5. Ярмоц Г.А., Саткеева А.Б., Ярмоц Л.П. Использование природных кормовых добавок для повышения продуктивности животных// Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. - 2016. - №4. - С.16-25.
6. Кудряшова А.В., Саткеева А.Б. Факторы, влияющие на овогенез млекопитающих// Материалы международной конференции «Актуальные вопросы науки и хозяйства: новые вызовы и решения». – Тюмень: ГАУСЗ. – 2019. - С.22-25.
7. Щедрина Н., Саткеева А.Б. Гистогенез новообразований у домашних животных // Материалы международной конференции «Актуальные вопросы науки и хозяйства: новые вызовы и решения». – Тюмень: ГАУСЗ. – 2019. - С.45-48.
8. Сидорова К.А., Осколкова М.В., Татарникова Н.А. Опасности микробиологического загрязнения молока // Материалы международной научно-практической конференции «Интеграция науки и практики для развития Агропромышленного комплекса». – Тюмень: ГАУ СЗ. - 2018. - С.151-155.
9. Сидорова К.А., Татарникова Н.А., Кочетова О.В., Драгич О.А., Череменина Н.А., Юрина Т.А., Швец Н.И., Драбович Ю.А. Санитарно-

экологическая оценка пищевой продукции на ГМО // Естественные и технические науки. - 2020. - № 1 (139). - С.56-60.

10. Сидорова К.А., Козлова С.В., Череменина Н.А., Дорн Г.А., Драгич О.А. Гигиенические основы питания: учебное пособие. – Тюмень: ГАУ СЗ. - 2018. – 124 с.

11. Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т.17. - № 4/2. – С.972-984.

12. Четвертакова Е.В. Биотехнология. – Красноярск: Краснояр.ГАУ. - 2010. – 90 с.

13. Огурцов А.Н., Близнюк О.Н., Масалитина Н.Ю. Основы генной инженерии. – Харьков: НТУ «ХПИ». – 2018. – Ч.1. – 288 с.

14. Огурцов А.Н. Молекулярная биотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты. - Харьков: НТУ «ХПИ». – 2012. – 432 с.

15. Endovicki R.V., Sidorova K.A., Pashayan S.A. The level of chemical elements in red and white clover // В сборнике: III International Scientific Conference: AGRITECH-III-2020: Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies. Сер. "IOP Conference Series: Earth and Environmental Science" Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations. - 2020. - С.52062.

16. Kochetova O.V., Kostarev S.N., Sidorova K.A., Ermolina S.A., Sereda T.G. Morphometric indexes of a wall of arterial vessels of various bodies at animals // В сборнике: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. conference proceedings. Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations. - 2020. - С.52023.

17. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск: Сиб.унив.изд-во. – 2008. – 514 с.



Размещается в сети Internet на сайте ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья  
<https://gausz.ru/nauka/setevye-izdaniya/2023/satkeeva.pdf>  
в научной электронной библиотеке eLIBRARY, ИТАР-ТАСС, РГБ,  
доступ свободный

Издательство электронного ресурса  
Редакционно-издательский отдел ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья.  
Заказ № 1165 от 28.09.2023; авторская редакция.  
Почтовый адрес: 625003, Тюменская область, г. Тюмень, ул. Республики, 7.  
Тел.: 8 (3452) 290-111, e-mail: [rio2121@bk.ru](mailto:rio2121@bk.ru)

ISBN 978-5-98346-119-2



9 785983 461192