

## I. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ И КЛОНИРОВАНИЯ

**Генная инженерия** – это отрасль молекулярной биологии и генетики, целью которой является получение с помощью лабораторных приемов организмов с новыми, не встречающимися в природе, комбинациями генов.

В основе генной инженерии лежит возможность целенаправленного манипулирования с фрагментами нуклеиновых кислот.

Эти эксперименты стали возможными благодаря:

- установлению универсальности генетического кода;
- успехам генетической энзимологии, которая предоставила набор ферментов, позволяющих получать в изолированном виде отдельные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты, осуществлять *in vitro* синтез фрагментов нуклеиновых кислот и объединять их информации.

**В 1938 г.** Г. Шпеманн использует ядра клеток зародыша саламандры для клонирования идентичных близнецов.

**1945 - 1950 гг.** - выращиваются первые клеточные культуры животных.

**1953 г.** - Р. Бриггс и Т. Кинг сообщили об успешной разработке метода «нуклеотрансфера» - переноса ядра клетки в гигантские икринки африканской шпорцевой лягушки «ксенопус».

**В 50-е годы XX века** выращены первые клеточные культуры человека; проводится искусственное оплодотворение домашнего скота с помощью замороженной спермы; обнаружены плазмиды бактерий.

**1970 г.** – Г. Смит и В. Арбер выделили рестриктазу.

**1972 г.** - П. Берг получил *in vitro* рекомбинантную ДНК, состоящую из фрагментов ДНК вируса обезьян sv-40, ДНК бактерии *E. coli* и ДНК фага  $\lambda$ .

**1973 год** - Л. Шетлз из Колумбийского университета Нью-Йорка заявил, что он готов произвести на свет первого «бэби из пробирки», после чего последовали запреты Ватикана и пресвитерианской церкви США.

**1975 год** - Ф. Сэнгер предложил первый прямой метод определения последовательности ДНК.

**1975 год** - Э. Саузерн и Р. Дейвисом разработали метод, который позволяет идентифицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения.

**1977 год** - Дж. Коллинзом и Б. Холманом разработан метод клонирования ДНК с использованием космид.

**1977 год** - А. Максамом и У. Гилбертом разработан метод секвенирования ДНК.

**1978 г.** - создан генно-инженерный инсулин, который практически полностью идентичен естественному белку. Это открытие позволило спасти миллионы жизней больных диабетом.

**1978 г.** - синтезирован генно-инженерный гормон роста человека.

**1978 г.** - рождение в Англии Луизы Браун, первого ребенка «из пробирки».

**1979 г.** - завершена публикация серии статей о работах профессора Оксфордского университета Дж. Гердона, в ходе которых было клонировано более 50 лягушек. Из их икринок удалялись ядра, после чего в оставшийся «цитоплазматический мешок» пересаживалось ядро соматической клетки. Впервые в науке на место ядра яйцеклетки с гаплоидным набором хромосом было внесено диплоидное ядро соматической клетки.

**1981 г.** – К. Илмензе и П. Хоппе получили серых мышей, перенеся ядра клеток серого зародыша в цитоплазму яйцеклетки, полученной от черной самки, после чего эмбрионы были перенесены в белых самок, которые и выносили потомство.

4 января **1985 года** в одной из клиник Лондона родилась девочка у миссис Коттон - первой суррогатной матери («бэби Коттон», как называли девочку, была зачата не из яйцеклетки миссис Коттон). Был вынесен парламентский запрет на эксперименты с человеческими эмбрионами старше 14 дней.

**1986 г.** - создана генно-инженерная вакцина против гепатита В и генно-инженерный интерферон против различных вирусных заболеваний и злокачественных новообразований.

**1987 г.** - первые полевые испытания генетически модифицированных сельскохозяйственных растений (томат, устойчивый к вирусным заболеваниям).

**1990 г.** - начало международного проекта по созданию генетической карты человека (Human Genom Project). Цель проекта заключалась в выяснении последовательности нуклеотидов во всех молекулах ДНК клеток человека. Одновременно должна быть установлена локализация всех генов, что помогло бы выяснить причину многих наследственных заболеваний и этим открыть пути к их лечению. Для того чтобы последовательно приближаться к решению проблемы картирования генов человека, было сформулировано пять основных задач: 1) завершить составление детальной генетической карты, на которой были бы помечены гены, отстоящие друг от друга на расстоянии, не превышающем в среднем 2 млн. оснований (1 млн. оснований принято называть мегабайтом); 2) составить физические карты каждой хромосомы (разрешение 0.1 Мб); 3) получить карту всего генома в виде охарактеризованных клонов (5

тыс. оснований в клоне или 5 Кб); 4) завершить к 2004 году полное секвенирование ДНК; 5) нанести на полностью завершённую секвенсовую карту все гены человека (к 2005 году). Ожидалось, что, когда все цели будут постигнуты, исследователи определят все функции генов и разработают методы биологического и медицинского применения полученных данных.

**1990 г.** - проведена успешная генная терапия, спасшая жизнь четырёхлетней девочке, с нарушением иммунитета.

**1993 г.** - генетически изменённые продукты допущены на прилавки магазинов мира.

**1993 г.** - К. Мюллис за разработку метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

**1997 г.** - Я. Уилмут и К. Кэмпбелл в институте Рослин Эдинбурга из эмбриона клонируют животное - шотландская «овечка Долли».

**1997 г.** - журнал «Сайенс» сообщает о рождении шести овец, полученных по рослинскому методу. Три из них, в том числе и овечка Полли, несли человеческий ген «антигемофильного фактора IX».

**В 1998 г.** - успешно выращиваются эмбриональные стволовые клетки; создана полная генетическая карта животного (секвенирование генома «Круглого червя»).

**1998 г.** - французские ученые объявили о рождении клонированной телочки.

**2001 г.** - создана первая полная генетическая карта сельскохозяйственного растения (риса).

**2002 г.** – почти полностью расшифрован геном человека. Главная стратегическая задача будущего (после полного анализа генома человека) была сформулирована следующим образом: изучить однонуклеотидные вариации ДНК в разных органах и клетках отдельных индивидуумов и выявить различия между индивидуумами.

Анализ таких вариаций даст возможность не только подойти к созданию индивидуальных генных паспортов людей, что в частности даст возможность лечить болезни, но и определить различия между популяциями. А также выявлять географические районы повышенного риска, что поможет давать рекомендации о необходимости очистке территории от загрязнения и выявить производства, на которых есть большая опасность поражения геномов работающего персонала.

## II. МЕТОДЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

**Цель генной инженерии** - конструирование генетических структур по намеченному плану (создание организмов с новой генетической программой, путем переноса генетической информации из одного организма в другой).

### **Этапы методов генной инженерии:**

1. Получение генетического материала.
2. Анализ и использование фрагментов ДНК
3. Ферментативное встраивание *in vitro* фрагментов ДНК из любого источника в ДНК, способную реплицироваться автономно (вектор).
4. Введение рекомбинантных ДНК в клетку-реципиент (чаще всего вводят в *E. coli* - «рабочую лошадку генетической инженерии»). В *E. coli* рекомбинантные молекулы ДНК реплицируются, размножая в своем составе клонируемый фрагмент ДНК.
5. Селекция клонов клеток, содержащих молекулы гибридной ДНК.

### **1. Получение генетического материала**

#### **1.1. Химико-ферментативный синтез генов.**

*In vitro* синтезируют короткие (8-16) одноцепочечные фрагменты ДНК, которые затем соединяют с помощью лигаз и отжигают (дают возможность образоваться двухнитевым молекулам ДНК). Для этого метода ген должен быть **секвенирован** (расшифрована нуклеотидная последовательность).

К. Мюллис (1980) разработал метод, который получил название **полимеразной цепной реакции (ПЦР)**. Использование методики ПЦР позволяет амплифицировать (размножить) ДНК или ее фрагмент *in vitro*, увеличивая количество копий **в миллионы раз за несколько часов**. ПЦР осуществляют в пробирке с помощью специального термостабильного фермента ДНК-полимеразы (**Таg-полимеразы**), набора четырех нуклеотидов А, Т, Г и Ц и коротких **олигонуклеотидных затравок-праймеров**. Фермент Таg-полимераза выделен из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, отличается устойчивостью к высокой температуре

**Праймеры** - это короткие, длиной в 20-30 нуклеотидов, одноцепочечные фрагменты ДНК, **комплементарные 3'-концевым последовательностям копируемой ДНК-матрицы**. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопирован Таg-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к **3'-концам праймеров** и достраивающей их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рис. 1).

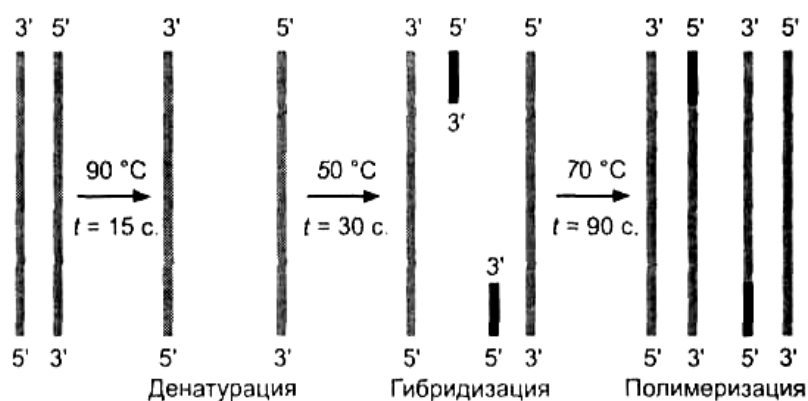


Рис. 1. Последовательные стадии одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- **Денатурация.** Инкубационную смесь, в которой содержится образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90 °С. При этом в течение 15 секунд происходит разрушение водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы образуется две одноцепочечные.
- **Гибридизация праймеров.** Температуру снижают до 50 °С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта стадия длится около 30 секунд.
- **Полимеризация.** Инкубационную смесь опять нагревают до температуры 70°С. При этой температуре Таг-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течение 90 секунд.

В результате количество ДНК удваивается. При температуре 70 °С гибриднаймер-ДНК не денатурирует, а Таг-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины  $10^6$ .

В последние годы создан специальный прибор - **амплификатор**, с помощью которого все три стадии ПЦР производятся автоматически.

## 1. 2. Ферментативный синтез сложных генов.

Практически все иРНК эукариот на своих 3'-концах содержат **последовательность poly(A)**. Эта поли(А)последовательность предоставляет прекрасную возможность для синтеза ДНК комплементарной мРНК. Если смешать с иРНК **короткие oligo(dT)**, они будут гибридизоваться с poly(A) и послужат затравками для работы фермента **обратная транскриптаза** (рис. 2). Этот фермент использует РНК как матрицу для синтеза **комплементарной**

тарной цепи ДНК, или кДНК (сДНА). Необходимо отметить, что она соответствует только **структурной части гена**, которая кодирует его белковый продукт, а **регуляторные части гена** в кДНК не представлены.



Рис. 2. Синтез двухцепочечной кДНК на мРНК. С Poly(A) «хвостом» иРНК гибридизуют короткий фрагмент oligo(dT), который служит затравкой для ревертазы. Она использует иРНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК. Оставшуюся иРНК разрушают NaOH, и с помощью, ДНК-полимеразы завершают синтез второй цепи ДНК

Гены, синтезированные с помощью ревертазы не могут функционировать в клетках. При переносе в бактерию, к структурным генам присоединяют промотор оперона, вследствие чего, ген (транскриптон) начинает работать.

### 1. 3. Выделение природных генов с помощью рестриктаз.

Рестриктазы вызывают гидролиз ДНК с образованием «липких либо тупых (ровных) концов». Они действуют на ДНК любых организмов, если в ней есть распознаваемые сайты (обычно распознают строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4-6 пар нуклеотидов). Эти участки называются *палиндромные*.

Сейчас в генной инженерии существует более 500 рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах.

№	рестриктаза	Сайты распознавания и места разреза ДНК
1.	<b>Hae III</b>	$5' - \text{Г Г} \downarrow \text{Ц Ц} - 3'$ $3' - \text{Ц Ц} \uparrow \text{Г Г} - 5'$
2.	<b>Bam HI</b>	$5' - \text{Г} \downarrow \text{Г А Т Ц Ц} - 3'$ $3' - \text{Ц Ц Т А Г} \uparrow \text{Г} - 5'$

3.	<b>Eco R I</b>	$5' - \Gamma \downarrow \text{A A T T Ц} - 3'$ $3' - \text{Ц T T A A} \uparrow \Gamma - 5'$
4.	<b>Hind III</b>	$5' - \text{A} \downarrow \text{A Г Ц T T} - 3'$ $3' - \text{T T Ц Г A} \uparrow \text{A} - 5'$
5.	<b>Sma I</b>	$5' - \text{Ц Ц Ц} \downarrow \text{Г Г Г} - 3'$ $3' - \text{Г Г Г} \uparrow \text{Ц Ц Ц} - 5'$
6.	<b>Hpa II</b>	$5' - \text{Ц} \downarrow \text{Ц Г Г} - 3'$ $3' - \text{Г Г Ц} \uparrow \text{Ц} - 5'$

Рестриктаза **Sma I** при расщеплении по середине узнаваемого участка нуклеотидных пар образует в ДНК двухнитевые (*тупые*) концы (рис. 3).

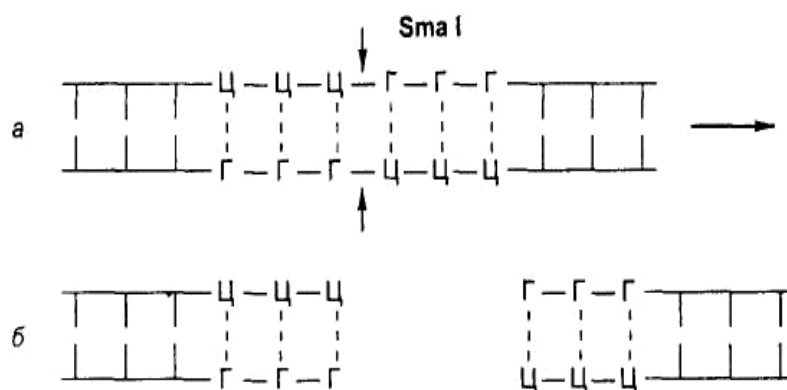


Рис. 3. а - схема действия рестриктазы Sma I на двухцепочечную ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; б - фрагменты ДНК с тупыми концами после разрезания ферментом Sma I

Рестриктаза EcoR I при разрезе уступом образует в ДНК одностебельные (*липкие*) концы (рис. 4).

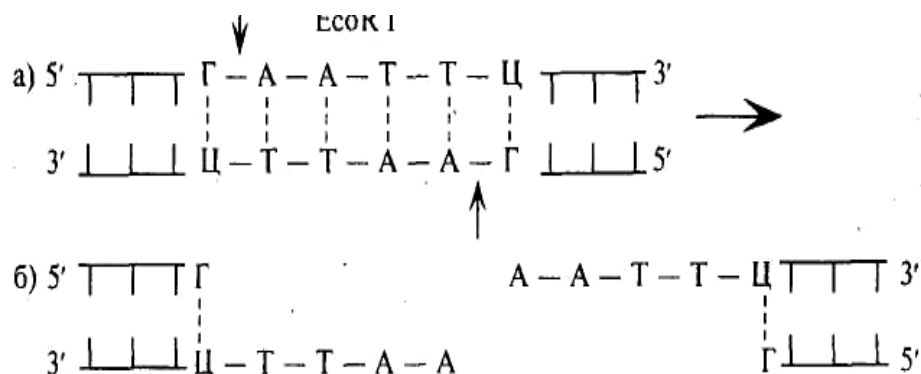


Рис. 4. Образование «липких концов» рестриктазой EcoR I

Выделение гена с помощью рестриктаз имеет ряд недостатков:

- не всегда можно подобрать рестриктазы, позволяющие вырезать из ДНК именно тот участок, в котором содержится интересующий ген;

- в составе вырезанного фрагмента ДНК могут оказаться интроны, и рекомбинантные ДНК не смогут экспрессироваться в прокариотических клетках, из-за отсутствия способности к процессингу и сплайсингу.

## 2. Анализ и использование фрагментов ДНК

При помощи набора ферментов рестрикции можно получать фрагменты ДНК организмов любых видов. В ходе проведения исследований с различными фрагментами ДНК необходимо определить их размер или выделить данный участок ДНК из смеси. Фрагменты ДНК можно разделить методом **электрофореза в агарозном геле**.

ДНК, обработанную рестриктазами, помещают в лунки застывшего агарозного геля (рис. 5), который помещается в специальную камеру для электрофореза, где создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают перемещаться. Скорость продвижения фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно выделить из геля без повреждений и потери их свойств.

После электрофореза гель окрашивают красителем этидиум бромидом, связывающимся с ДНК. Затем гель помещают под ультрафиолетовый свет, под действием которого хорошо видны окрашенные в красный цвет, расположенные на различном расстоянии друг от друга светящиеся фракции ДНК. Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК.

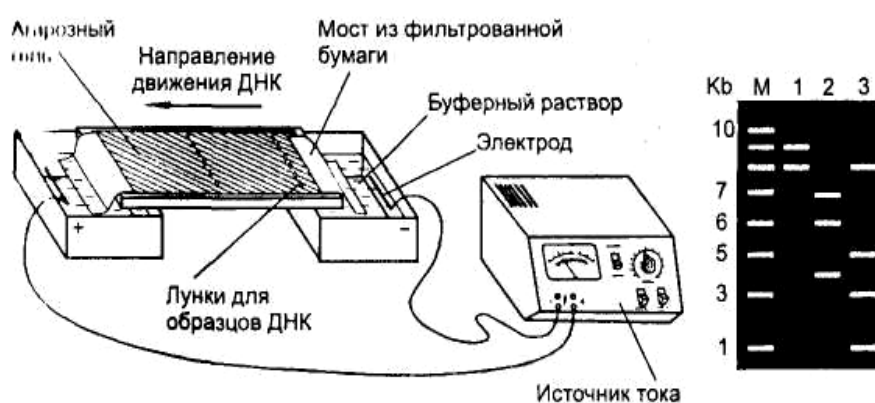


Рис. 5. Камера для электрофореза ДНК в агарозном геле и электрофореграмма ДНК, окрашенная этидиум бромидом и помещенная под УФЛ (М - маркеры; 1,2,3 - образцы ДНК, обработанные рестриктазами)

Таким образом, электрофорез в агарозном геле позволяет **разделить**, а затем легко **извлечь** любые рестрикционные фрагменты ДНК в чис-



том виде. Анализируя электрофоретические **спектры ДНК на геле** можно составить генетические рестрикционные карты расположения участков ДНК для разных видов. Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК **вируса SV-40**.

В 1975 году разработан метод (рис. 6), позволяющий **идентифицировать** конкретные **гены** и другие **рестрикционные фрагменты ДНК** после их электрофоретического разделения. Сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, **денатурируются до одноцепочечных молекул**, а затем весь электрофоретический спектр ДНК **отпечатывается (blotting)** за счет капиллярных сил на приложенной к гелю **нитроцеллюлозной мембране (пленке)**, после чего фиксируется высокой температурой. Затем мембрана помещается в специальный буфер, содержащий **радиоактивно меченый ДНК-зонд** - короткую специфическую последовательность ДНК.

Зонд способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. Затем к нитроцеллюлозной мембране, содержащей все полученные фрагменты ДНК прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (авторадиограмме) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Это метод получил название **Саузерн-блот гибридизации** в честь разработавшего его Э. Саузерна.

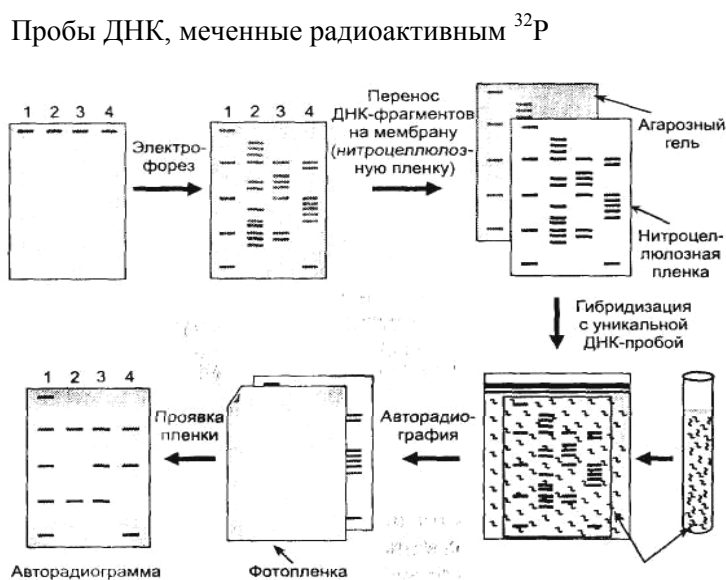


Рис. 6. Этапы Саузерн-блот гибридизации

Сейчас получено огромное количество различных **ДНК-зондов (проб)**, которые успешно используются в Саузерн-блот анализе.

### 3. Включение генов в автономно реплицирующуюся векторную молекулу и создание рекомбинантной ДНК.

**Вектор** - небольшая автономно реплицирующаяся молекула ДНК, которая обеспечивает размножение и работу встроенного в них определенного гена.

Векторные молекулы должны:

- содержать *ori репликациии* (*origin* – точка начала репликации) и автономно реплицироваться;
- стабильно наследоваться клеткой-хозяином;
- содержаться в большом числе копий в клетке;
- обладать достаточной емкостью, позволяющей клонировать в их составе крупные гены;
- содержать «удобные» сайты рестрикции;
- содержать *маркеры*, по которым можно вести отбор клеток, воспринявших клонированный сегмент ДНК и сам маркер;

Наибольшее применение из систем вектор-хозяин имеют те, где в роли хозяина выступают *бактерии E. coli*, а в роли вектора – **плазмиды**.

**Плазмиды** имеют малые размеры, могут быть выделены из клетки в неповрежденном состоянии. Первым вектором стала **плазида pSC 101** (размер 9100 п.н., количество копий - 6 на нуклеоид, детерминирует устойчивость к тетрациклину, есть 1 сайт расщепления для рестриктазы EcoR I).

Свойства плазмид использованы для создания и клонирования гибридных (рекомбинантных) ДНК (рис.7).

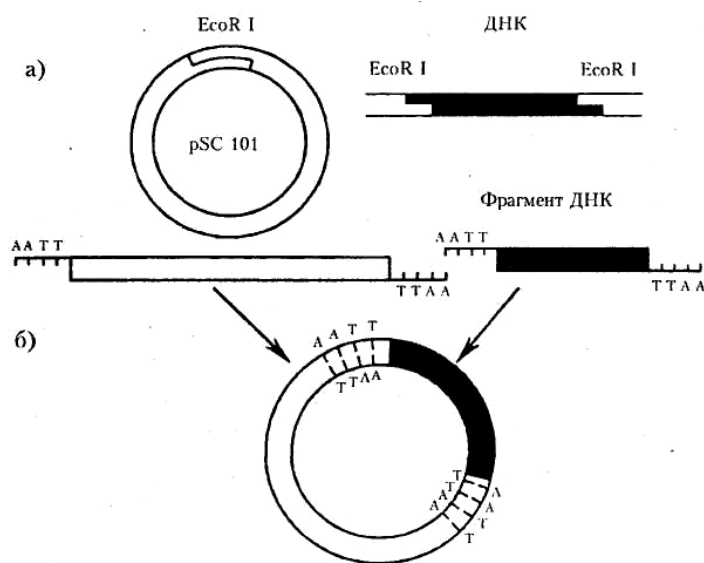


Рис. 7. Этапы введения фрагмента чужеродной ДНК в плазмидный вектор pSC 101 с помощью рестриктазы EcoR I: а) образование «липких концов» рестриктазой EcoR I; б) введение фрагмента чужеродной ДНК в плазмидный вектор pSC 101.

В последнее время для *E. coli* используется плазмида pBR 322 (рис.8). Этот вектор присутствует в клетках в большом числе копий, содержит 2 селективных маркера (устойчивость к ампициллину и тетрациклину), поэтому его легко обнаружить в бактериях, если их выращивать на среде с этими антибиотиками. Внутри плазмиды есть сайты рестрикции для нескольких рестриктаз. Плазмиды используются для клонирования генов, не превышающих 10 000 п. н.

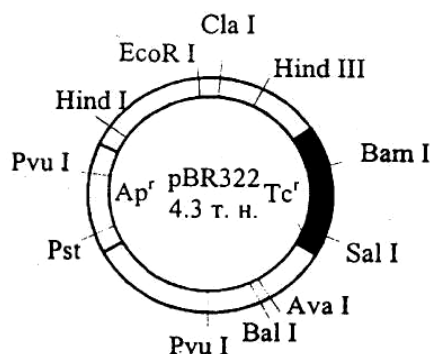


Рис. 8. Плазмида pBR 322

Успешно применяется еще один класс плазмидных векторов, относящихся к типу pUC. У этой плазмиды величиной 2,7 кб селекционным маркером является ген резистентности к ампициллину ( $amp^r$ ). Кроме того, имеется репортерный ген **lac-Z**, в котором расположен полилинкер, или участок множественного клонирования длиной около 200 нуклеотидных пар, содержащий 10 сайтов рестрикции (рис. 9). В результате **инсерции (вставки)** чужеродной ДНК в полилинкер нарушается работа гена **lac-Z** в плазмиде. Колонии бактерий, содержащие нормальные и поврежденные вставкой гены, легко различаются, если поместить клетки в чашки Петри на среду, содержащую субстрат **X-Gal**, который расщепляется ферментом  $\beta$ -галактозидазой (продукт гена **lac-Z**). Если есть трансформированные бактериальные клетки, то можно предположить, успешно прошло клонирование вставленной в плазмиду pUC18 чужеродной ДНК или нет.

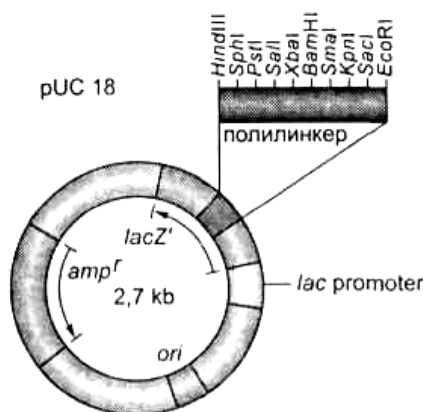


Рис. 9. Плазмида pUC 18

Для клонирования крупных фрагментов ДНК используют **фаговые векторы, космиды и фазмиды**.

**Фаговые векторы** - это фаговые частицы, содержащие рекомбинатную ДНК. Для *E. coli* векторы сконструированы на основе **фага  $\lambda$  и фага M13**.

**Фаг  $\lambda$**  содержит двухцепочечную ДНК размером 48 500 п. н. Она упакована в головку в виде линейной молекулы с однонитевыми комплементарными концами (**липкие концы**). После проникновения в клетку липкие концы взаимно спариваются, молекула замыкается в кольцо и сшивается ДНК-лигазой. Места спаривания липких концов получили название ***cos*-сайтов**. В составе векторов на основе **фага  $\lambda$**  можно клонировать фрагменты длиной 15 000 п. н.

**Фаг M13** содержит одноцепочечную ДНК. Когда фаговая ДНК проникает в *E. coli*, она реплицируется с образованием двухцепочечных промежуточных продуктов, которые накапливаются в клетках (100-200 копий). Промежуточный продукт выделяют и используют как вектор для клонирования.

**Космиды** - это искусственные конструкции, созданные на основе плазмид и фага  $\lambda$ . Космида имеет последовательность *ori*, позволяющую ей реплицироваться в *E. coli*, **селекционный маркер *amp<sup>r</sup>***, полилинкер (сайт множественного клонирования) и *cos*-сайты, встроенные из фага  $\lambda$  (рис. 10).

*Cos*-сайты представляют собой расположенные на обоих концах молекулы ДНК фага  $\lambda$  комплементарные одноцепочечные участки величиной 12 нуклеотидов, благодаря которым линейная форма фага, соединяясь со своим соседом через *cos*-сайт, образует длинную цепь из сотен фаговых ДНК, или **конкатамер**.

Ферменты, катализирующие упаковку фаговой ДНК, узнают в конкатамере два *cos*-сайта, находящихся на расстоянии 35-45 кб, выщепляют расположенную между ними ДНК и упаковывают ее в головку фага. Поэтому, когда в небольшую космиду, несущую *cos*-сайты, встраивается чужеродная ДНК размером 35-45 кб, молекула достигает необходимой длины, чтобы упаковаться в фаговую частицу. Затем полученные фаги, несущие вставленную чужеродную ДНК, вводятся в клетки *E. coli* для последующего размножения.

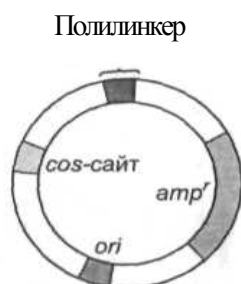


Рис. 10. Структура космиды, объединяющей свойства фага и плазмиды.

**Фазмиды** - это гибридные векторы, способные развиваться и как фаг, и как плазмида, так как содержат все гены, необходимые для литического цикла, а также гены нужные для репликации плазмиды. Емкость фазмид меньше, чем космид, и сопоставима с таковой для фаговых векторов.

Для других видов прокариот сконструированы «**челночные векторы**». Их особенность состоит в способности к репликации в разных клетках-хозяевах. Использование таких векторов удобно для клонирования генов и анализа их продуктов (одни и те же гены получают возможность реплицироваться и экспрессироваться в разных организмах).

Основным вектором для клонирования генов животных является *геном вируса SV 40*. **Вирус sv-40**, вирус обезьян – это полиомавирус, геном которого состоит из кольцевой двунитчатой молекулы ДНК размером в 5,2 кб, содержащей 5 генов. Впервые был обнаружен у зеленой африканской обезьяны (зеленой мартышки) *Cercopithecus aethiops*. Инфицирует культивируемые клетки приматов, исключая человека. Размножение вируса приводит к образованию до 100 000 вирусных частиц в одной клетке, что позволяет использовать вирусную ДНК в качестве эффективного вектора в генной инженерии.

Для растительных клеток, которые не содержат собственных плазмид, векторами часто служат *геномы вирусов растений и плазмида pTi*.

#### **4. Введение рекомбинантных ДНК в клетку-реципиент и включение ее в хромосомный аппарат.**

Для этого используют следующие методы:

➤ **конъюгация** - у бактерий может происходить передача генетического материала при прямом межклеточном контакте. Генетический материал передается лишь в одном направлении. Способность бактерии быть донором ( $F^+$ ) связана с наличием фактора  $F$ , который при конъюгации передается из одной клетки в другую. Фактор  $F$  представляет собой плазмиду размером - 60 000 п.н.;

➤ **трансдукция** - передача ДНК от клетки-донора клетке реципиенту может происходить при участии бактериофагов;

➤ **трансформация** - передача генов при помощи свободной растворимой ДНК (плазмидами), выделенной из клеток-доноров;

➤ **трансфекция** - инфекция фагами  $\lambda$ ,  $\psi$  X174 и T4, соответствующая генетической трансформации;

➤ **компетенция** - способность клеток поглощать ДНК из окружающей среды;

➤ **микроинъекция молекул ДНК** в клетки животных;

➤ **применение липосом для введения ДНК в клетки животных.**

Липосомы - это замкнутые пузырьки воды, окруженные одним или несколькими слоями липидов. Заключенные в липосомы нуклеиновые кислоты защищены от воздействия нуклеаз и легко проникают в клетки животных в результате слияния липосом с клеточной мембраной или поглощения их фагоцитозом.

### **5. Селекция клонов клеток, содержащих молекулы гибридной ДНК**

Отбирают трансформированные клетки, в геном которых включен переносимый ген, а в дальнейшем - клонируют (размножают клетки с рекомбинантной ДНК) и получают клон клеток с заданными свойствами.

## **II. Применение генной инженерии в медицине**

### **1. Генная дактилоскопия**

В геноме каждого человека имеется **минисателлитная ДНК, которая представляет** последовательность, короткие (9-64 нуклеотидные пары), среднеповторяющиеся, тандемно организованные, высоко-вариабельные последовательности ДНК. **Тандемный повтор** – это организация двух или более расположенных рядом одинаковых последовательностей в пределах двуничейной молекулы ДНК. Возможны 2 типа их ориентации - прямые повторы (голова к хвосту: 5' - ЦГААТЦ ГТТАТЦГ ГТТАТЦГ АЦГГТ - 3') или не прямые повторы (голова к голове: 5' - ЦГААТЦ ЦТТАТЦГ ГЦТАТТГ АЦЦГТ - 3'). Тандемные повторы в области кодирующих генов могут вести к тандемно повторяющимся аминокислотным последовательностям.

В цепочке ДНК таких **минисателлитов** (обычно насыщенных ГЦ последовательностями) может быть от одной до нескольких тысяч. У людей имеется много различных минисателлитных цепочек, расположенных в разных хромосомах. В совокупности они образуют набор минисателлитных ДНК, различающихся по длине в результате неравного кроссинговера. Короткий, тандемно повторяющийся минисателлит, является хорошим генетическим маркером для анализа сцепления в рестриктах ДНК.

Каждый человек считается уникальным по набору полос, выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах. Метод анализа фрагментов минисателлитной ДНК получил название **генной дактилоскопии (фингерпринт ДНК)**, так как для каждого человека характерен присущий

только ему вариант набора tandemно повторяющихся последовательностей, как и отпечатков пальцев.

### Технология генной дактилоскопии.

Сначала из клеток выделяют ДНК и с помощью рестриктаз нарезают ее на фрагменты разной длины. Среди фрагментов, естественно, будут те, которые содержат **вариабельные минисателлиты**. Далее проводится Саузерн-блот анализ. Все полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в геле, и **фракции, содержащие минисателлитную ДНК**, выявляются с помощью специального меченого зонда, комплементарного к звену из 13 повторяющихся нуклеотидов. Так как зонд радиоактивен, он засвечивает рентгеновскую пленку только в определенных местах, давая картину из нескольких десятков чередующихся темных фракций, соответствующих отдельным минисателлитам. Метод фингерпринта **минисателлитной ДНК** обладает высокой чувствительностью и анализ можно проводить на одной капле крови или на нескольких волосных луковицах.

Методы анализа рестрикционных фрагментов ДНК дали возможность **секвенировать фрагменты ДНК**. Метод секвенирования ДНК по **Максаму-Гилберту (1977 г.)** менее чем за год установил последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб).

Один из концов фрагмента ДНК, последовательность которого нужно секвенировать, помечают  $^{32}\text{P}$  (рис. 11). **Препарат меченой ДНК** делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений.

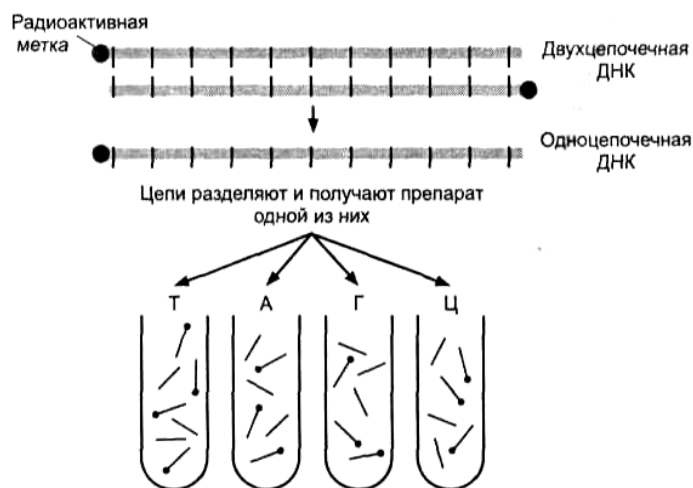


Рис. 11. Подготовка фрагмента ДНК к секвенированию

При обработке этих поврежденных молекул **пиперидином**, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. Получается набор меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Так если остатки гуанина находятся на расстоянии 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов от меченого конца (рис. 12), то обработка данной цепи ДНК реагентами, разрушающими гуанин, приведет к образованию меченых фрагментов длиной 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов.

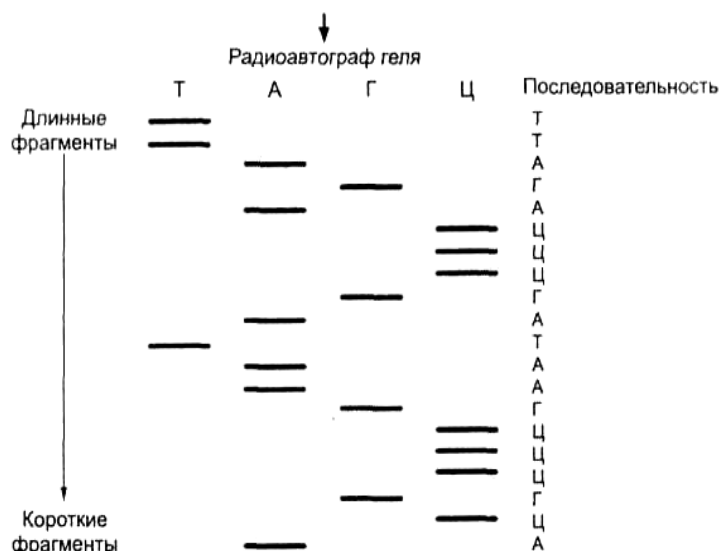


Рис. 12. Секвенированные фрагменты ДНК

Наборы таких фрагментов, образующихся при каждой из четырех реакций, подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле, при этом фрагменты ДНК разделяются в соответствии с размерами. Затем проводят радиоавтографию геля. Набор полос, регистрируемых на рентгеновской пленке, «читают» и определяют нуклеотидную последовательность ДНК (АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ).

В последние годы вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК используется флюорисцентные красители разного цвета для каждого из четырех нуклеотидов, и четыре смеси электрофорезируются вместе.

## 2. Получение лекарственных препаратов и вакцин

Более 350 препаратов и вакцин, разработанных с помощью биотехнологий, широко используются в медицине:

- **антикоагулянты** - активирует плазмин, участвует в рассасывании тромбов; эффективен при лечении инфаркта миокарда.
- **VIII фактор крови** - ускоряет образование тромбов, эффективен для лечения гемофилии А.



- **эритропоэтин** - стимулирует образование эритроцитов. Применяют для лечения анемии у больных с почечной недостаточностью.
- **ростовые факторы** - стимулируют дифференциацию и рост различных типов клеток, применяют для ускорения заживления ран.
- **соматотропин** - применяют при лечении карликовости.
- **инсулин** - используется для лечения сахарного диабета.
- **интерферон** - препятствует размножению вирусов, используется для лечения некоторых форм раковых заболеваний.
- **лейксины** - активируют и стимулируют работу различных типов лейкоцитов, применяются для лечения ран, СПИДа, раковых заболеваний.
- **моноклональные антитела** - используются в диагностических целях, а также для адресной доставки лекарств, токсинов, радиоактивных и изотопных соединений к раковым клеткам.
- **энкефалины и эндорфины** – вещества используются для лечения психических заболеваний, улучшают настроение, память.

### **3. Генная терапия**

В 1989 году в США предпринята попытка применить в клинической практике генную терапию для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИД). В настоящее время генная терапия ТКИД проходит завершающую стадию клинических испытаний.

Наиболее обнадеживающие результаты ожидают в тех случаях, когда заболевание обусловлено дефектом одного гена.

Важнейшей технологической задачей генной терапии является разработка системы переноса или адресной доставки корректирующего генетического материала к клеткам-мишеням в организме больного, в которых имеется дефектный ген.

Разрабатывается метод, когда введенный ген не заменяет дефектный, а компенсирует его функцию, встраиваясь в хромосому в другом месте.

#### **Методы генной терапии:**

##### **1. Использование антисмысловых олигонуклеотидов (АСОГ).**

Это короткие последовательности нуклеотидов, комплементарные отрезкам и-РНК или ядерной ДНК. Связываясь с мишенью (промотор или и-РНК), АСОГ блокируют синтез патологического белка.

##### **2. Применение рибозимов** - полирибонуклеотидов, обладающих

ферментативной (рибонуклеазной) активностью. Наличие специфической

последовательности нуклеотидов в рибозимах, позволяет вставлять в них нуклеотиды, комплементарные и-РНК вирусом и разрушать их.

**3. Разработка методов внедрения новых генов в ядерную ДНК соматических клеток для лечения опухолевых заболеваний** (больным вводят их же опухолевые клетки с генами фактора некроза опухолей или с генами интерлейкинов, активирующих лимфоциты и макрофаги) (рис. 13).

#### Интерлейкин-12 генная терапия

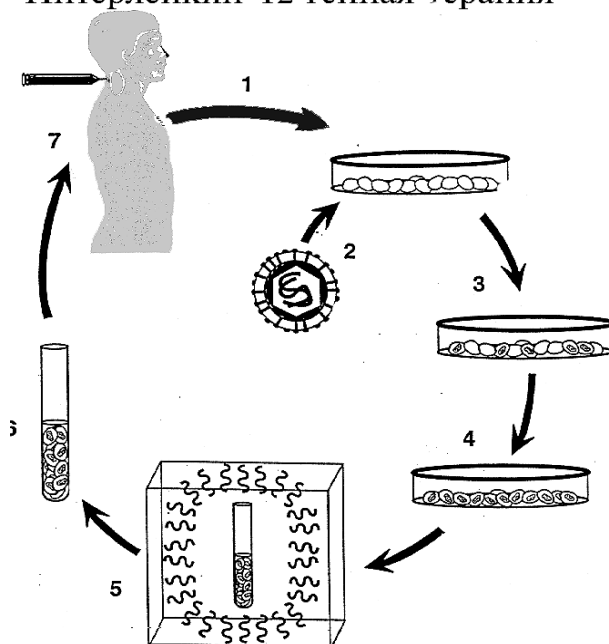


Рис. 13. Генная терапия опухолевых заболеваний

1. Взятие фибробластов и культивирование их на питательной среде;
2. Ретровирус с геном IL-12, ответственным за синтез интерлейкина-12 добавляют в питательную среду с фибробластами;
3. Ген IL-12 внедряется в генетический материал фибробластов;
4. Отбор фибробластов, продуцирующих интерлейкин-12 и образование культуры клеток;
5. Под действием излучения выделяют генетически измененные фибробласты.
6. Из этих фибробластов формируют вакцину;
7. Введение вакцины в опухоль еженедельно в течение 4 недель.

### III. ОСНОВЫ КЛОНИРОВАНИЯ

**Клонирование** – получение идентичных потомков (клеток и организмов) при помощи бесполого размножения. Термин «клон» происходит от греческого слова «*klon*», что означает веточка, побег, отпрыск.

Воспроизводство организмов полностью повторяющих исходную особь, возможно только в том случае, если генетическая информация матери будет без каких-либо изменений передана потомкам. Но при естественном половом размножении этому препятствует мейоз. У многих животных яйцеклетка в силу гаплоидности не может развиваться в новый организм. Для этого необходимо оплодотворение. Организм, развившийся из оплодотворенной яйцеклетки, приобретает признаки, которые определяются взаимодействием материнской и отцовской наследственности. Следовательно, при половом размножении не могут быть получены клоны.

Как же вопреки этой строгой закономерности заставить клетку развиваться только с материнским диплоидным набором хромосом? Теоретически решение этой биологической проблемы уже найдено.

### **Клонирование растений**

Клонирование, прежде всего, изначально относится к вегетативному размножению. Клонирование растений черенками, почками или клубнями известно уже более 4 000 лет. Начиная с 70-х гг. прошлого столетия для клонирования растений стали широко использовать небольшие группы, и даже соматические клетки.

У растений в отличие от животных по мере их роста, в ходе клеточной специализации (дифференцировки) клетки не теряют тотипотентные свойства и способность реализовывать всю генетическую информацию. Поэтому практически любая растительная клетка, сохранившая в процессе дифференцировки ядро, может дать начало новому организму. Эта особенность растительных клеток лежит в основе многих методов генетики и селекции.

При вегетативном размножении и при клонировании гены не образуют новых комбинаций, как в случае полового размножения, а сохраняются в полном составе в течение многих поколений. Именно поэтому организмы, входящие в состав определённого клона имеют одинаковый набор генов и фенотипически не отличаются.

Клетки животных, дифференцируясь, лишаются тотипотентности, и в этом, одно из существенных отличий от клеток растений. Именно это и является главным препятствием для клонирования животных.

### **Клонирование тутового шелкопряда**

Сто лет назад русский зоолог А.А. Тихомиров впервые открыл, что яйца тутового шелкопряда в результате различных химических и физических воздействий начинают развиваться без оплодотворения. Однако это партеногенетическое развитие рано останавливалось, потому что такие эмбрионы погибали еще до выхода личинок из яиц.

Б.Л. Астауров в 30-е гг. XX века подобрал термическое воздействие, которое одновременно активизировало неоплодотворенное яйцо к развитию и блокировало мейоз (превращение диплоидного ядра яйцеклетки в гаплоидное). Развитие таких яиц заканчивалось выходом личинок, повторяющих генотип матери и ее пол. Количество вылупившихся партеногенетических гусениц находилось в зависимости от жизнеспособности матери. У «чистых» пород выход гусениц не превышал 1%, в то время как у значительно более жизнеспособных межрасовых гибридов оно достигло 40-50%.

Б.Л. Астауров смог повысить жизнеспособность новых клонов, но довести до обычного уровня другие количественные признаки ему не удалось: например, масса партеногенетических коконов не превышала 82% от массы нормальных коконов такого же генотипа. Позднее были установлены причины партеногенетической депрессии, разработаны методы, которые позволили накапливать «гены партеногенеза», выведены новые высоко жизнестойкие клоны самок, а позднее и партеногенетических (андрогенетических) самцов. Выход гусениц достиг 90%, а их жизнеспособность повысилась до 95-100.

### **Клонирование амфибий**

Возможность клонирования эмбрионов позвоночных впервые была показана в конце 40-х - начале 50-х гг. прошлого века в опытах на амфибиях. Российский эмбриолог Г.В. Лопашов разработал метод пересадки (трансплантации) ядер в яйцеклетку лягушки. Работы Г.В. Лопашова были незаслуженно забыты.

В 50-х гг. XX века американские эмбриологи Р. Бриггс и Т. Кинг выполнили сходные опыты, разработав микрохирургический метод пересадки ядер эмбриональных клеток с помощью тонкой стеклянной пипетки в лишённые ядра клетки (энуклеированные клетки). Они установили, что если брать ядра из клеток зародыша на стадии бластулы, то примерно в 80% случаях зародыши благополучно развивались дальше и превращались в обычного головастика. Если же брать ядра из клеток зародыша на стадии гастрюлы,

то оперированные клетки развивались нормально лишь менее чем в 20% случаев.

Большой вклад в решение проблемы клонирования земноводных внес английский ученый Дж. Гердон. В опытах с южноафриканской жабой *Xenopus laevis* в качестве донора ядер он использовал не зародышевые клетки, а вполне специализировавшиеся клетки эпителия кишечника плавающего головастика. Ядра яйцеклеток-реципиентов не удалялись хирургическим путем, а разрушались ультрафиолетовыми лучами. В большинстве случаев реконструированные яйцеклетки не развивались, но примерно десятая часть из них образовывала эмбрионы, 5% из этих эмбрионов достигали стадии бластулы, 2,5% стадии головастика и только 1% развивалось в половозрелые особи. Появление нескольких взрослых особей в таких условиях могло быть связано с тем, что среди клеток эпителия кишечника развивающегося головастика довольно длительно присутствуют первичные половые клетки, ядра, которых могли быть использованы для пересадки.

Позже Дж. Гердон модифицировал эксперимент. Поскольку большинство реконструированных яйцеклеток с ядром клетки кишечного эпителия погибают до завершения стадии гастролы, он извлек из них ядра на стадии бластулы и снова пересадил их в новые энуклеированные яйцеклетки («серийная пересадка»). Число зародышей с нормальным развитием после этого увеличилось, и они развивались до более поздних стадий по сравнению с зародышами, полученными в результате первичной пересадки ядер.

Затем Дж. Гердон с коллегами (1970 год) стали культивировать *in vitro* клетки почки, легкого и кожи взрослых животных и использовать их в качестве доноров ядер. Примерно 25% первично реконструированных яйцеклеток развивались до стадии бластулы. При серийных пересадках они развивались до стадии головастика. Таким образом, было показано, что клетки 3-х разных тканей взрослого позвоночного содержат ядра, которые обеспечивают развитие до стадии головастика.

М. Ди Берардино и Н. Хофнер использовали для трансплантации ядра эритроцитов лягушки *Rana Pipiens*. После серийной пересадки таких ядер 10% реконструированных яйцеклеток достигали стадии плавающего головастика. Однако даже с помощью многократных серийных пересадок (более 100 клеточных циклов) реконструированные яйцеклетки дальше стадии головастика не развивались.

Таким образом, донорами ядер могут стать лишь зародыши на ранних стадиях развития. Подобные эксперименты правильнее называть клонированием эмбрионов амфибий, так как в этом случае размножают бесполом путём не взрослых животных, а их зародышей.

Дифференцировка сопровождалась инактивацией неработающих генов, поэтому клетки теряли тотипотентность. У одних клеток происходило репрессирование генома, у других разрушалась ДНК, а в некоторых случаях разрушалось ядро. Однако наряду с дифференцируемыми клетками, культивируемыми *in vitro*, клеточные популяции содержали малодифференцируемые стволовые клетки, которые и можно было использовать как доноры ядер для клонирования.

Опыты с амфибиями показали, что ядра различных клеток одного и того же организма генетически идентичны и в процессе дифференцировки постепенно теряют способность обеспечивать развитие реконструированных яйцеклеток, однако серийные пересадки ядер и культивирование клеток *in vitro* в какой-то степени увеличивают эту способность.

### **Неудачные эксперименты по клонированию мышей**

Работа методически оказалась довольно трудной, прежде всего, потому что объем яйцеклетки млекопитающих примерно в тысячу раз меньше, чем амфибий. Однако эти трудности были успешно преодолены. Экспериментаторы научились успешно микрохирургическим путем удалять пронуклеусы из зигот мыши и пересаживать в них клеточные ядра ранних эмбрионов. Однако полученные разным способом зародыши развивались лишь до стадии бластулы.

В 1977 году появилось сенсационное сообщение П. Хоппе и К. Илмензе о том, что они получили 7 взрослых самок мышей, пять из которых имели только материнский, а две отцовский геном. Их успех был связан с тем, что, удаляя один пронуклеус, они удваивали число хромосом другого, обрабатывая яйца специальным веществом, затем выращивали полученные диплоидные зародыши *in vitro* до стадии бластулы и пересаживали в матку самки-реципиента для дальнейшего развития.

Казалось, что можно будет быстро получить млекопитающих со 100% гомозиготностью по всем признакам. Однако результаты П. Хоппе и К. Илмензе подтвердить не удалось. Оказалось, что полученные любым способом диплоидные андрогенетические и гиногенетические зародыши мышей погибают.

Значительно усовершенствовав методы извлечения ядер и введения их в клетку, Дж. МакГрат и Д. Солтер провели серию экспериментов и сообщили, что высокий выход живых мышей получен только тогда, когда в качестве доноров ядер использовались зиготы. В том случае, когда донорами были ранние эмбрионы, тогда реконструированные яйцеклетки, как и прежде, развивались только до стадии бластулы.

Метод МакГрата-Солтера стал широко использоваться разными экспериментаторами. К. Манн и Т. Ловел-Бадж выделяли пронуклеусы яиц, активированных к партеногенезу, и пересаживал их в энуклеированные зиготы мышей. В этих случаях эмбрионы погибали на ранних стадиях. Если же пронуклеусы получали из оплодотворенных яиц и пересаживали в партеногенетические и лишённые ядра яйца, то такие зародыши развивались нормально до рождения.

М. Сурани с сотрудниками установили, что если добавить женские пронуклеусы из зиготы мыши к гаплоидному набору хромосом яйцеклетки, то нормального развития не происходит, добавление же мужского ядра приводит к нормальному развитию. Рекомбинация женского и мужского пронуклеусов из ранних оплодотворенных яйцеклеток мышей обеспечивает нормальное развитие, а комбинация 2-х мужских или 2-х женских пронуклеусов останавливает развитие эмбриона. Таким образом, для нормального развития млекопитающих требуется два набора хромосом – отцовский и материнский.

Гибель партеногенетических (гино- и андрогенетических) зародышей млекопитающих связана с различной активацией в онтогенезе материнского и отцовских геномов. Механизм, регулирующий эти функциональные различия, был назван геномным импринтингом.

Таким образом, многие эксперименты доказывают, что в эмбриогенезе у мышей клеточное ядро рано теряет тотипотентность, активизацией генома зародыша происходит уже на стадиях двух клеток. У других млекопитающих, в частности у кроликов, овец и крупного рогатого скота, активизация первой группы генов в эмбриогенезе происходит позднее, на 8-16 клеточной стадии.

### **Клонирование кроликов и коров**

Американские ученые под руководством Р.Стика, используя метод МакГрата-Солтера, показали возможность клонирования эмбрионов кроликов и получили 6 живых кроликов из 164 реконструированных яйцеклеток (3,7%), пересадив ядра 8-клеточных эмбрионов одной породы в лишённые

ядра яйцеклетки кроликов другой породы. Фенотип, родившихся, полностью соответствовал фенотипу донора.

Работа с реконструированными яйцеклетками крупных домашних животных, коров или овец, идет несколько по-другому. Их сначала культивируют не *in vitro*, а *in vivo* - в перевязанном яйцеводе овцы - промежуточного (первого) реципиента. Затем их оттуда вымывают и трансплантируют в матку окончательного (второго) реципиента - коровы или овцы соответственно, где их развитие происходит до развитого детеныша.

Р. Стик и его сотрудники использовали щадящий метод извлечения ядра без прокалывания мембраны яйцеклетки, пересаживали в зиготы так называемые кариопласты – мужской и женский пронуклеусы вместе с окружающей их цитоплазмой, а также ядра 2-, 4- или 8-клеточных эмбрионов коровы. Сначала пронуклеусы центрифугировали, чтобы освободить пронуклеусы от окружающих их гранул желтка, после чего ядра были хорошо видны под микроскопом, что значительно облегчало их удаление. При помощи манипулятора и заостренной стеклянной пипетки извлекали один из бластомеров вместе с ядром из ранних зародышей и переносили его в энуклеированную зиготу.

Реконструированные зародыши были помещены в агаровый цилиндр и пересажены в перевязанный яйцевод овцы. Через пять дней культивирования их вымывали, освобождали от агара и исследовали. Реконструированные зародыши в этом случае развивались только в тех случаях, где зиготы в зиготы пересаживали пронуклеусы: 17% таких зародышей достигли стадии морулы или бластулы. 2 зародыша были пересажены второму реципиенту - в матку коровы и развитие их завершилось рождением живых телят. Если в качестве доноров использовали ядра 2-, 4- и 8-клеточных зародышей, то реконструированные яйцеклетки не развивались даже до стадии морулы.

С. Вилландсену удалось получить четырех генетически идентичных бычков холстейской породы в результате пересадки в реципиентные яйцеклетки ядер бластул одного 32-клеточного зародыша. Большинство ядер сохраняют тотипотентность на 32-клеточной стадии, а значительная их часть 64-клеточной стадии, обеспечивая нормальное развитие реконструированных яйцеклеток до стадии морулы в яйцеводе. После пересадки в матку коров - окончательных реципиентов, как полагает автор, они могут и дальше нормально развиваться.



Итальянские ученые, используя в качестве доноров ядер 16-64-клеточные зародыши коров, трансплантировали 463 реконструированных зародыша в матку синхронизированных реципиентов и получили 92 живых теленка. Семь из них были генетически идентичны, представляя собой клон, полученный в результате пересадки ядер клеток одного донорского эмбриона.

Таким образом, клеточные ядра зародышей крупного рогатого скота долго сохраняют тотипотентность и могут обеспечить полное развитие реконструированных яйцеклеток. Методические трудности клонирования зародышей крупного рогатого скота практически решены, хотя остается основная задача – найти донорские ядра, обладающие тотипотентностью, для клонирования взрослых животных.

### **Клонирование овец**

С. Вилландсен в 1986 году показал, что эмбрионы овец на 16-клеточной стадии развития сохраняют свою тотипотентность. Реконструированные яйцеклетки, содержащие ядра бластомеров 16-клеточных зародышей, развивались нормально до стадии бластулы в перевязанном яйцевом агаровом цилиндре), а после освобождения от агара, пересаживали в матку овцы - второго реципиента - еще на 60 дней. В другом случае донорами служили ядра 8-клеточных зародышей и были получены 3 живых ягненка, фенотип которых соответствовал породе овцы-донора.

В 1989 году Г. Смит и Я. Уилмут трансплантировали ядра клеток 16-клеточного эмбриона и ранней бластулы в энуклеарные неоплодотворенные яйцеклетки овец. В первом случае было получено 2 живых ягненка, фенотип которых соответствовал породе овец - доноров ядер. Во втором случае один полностью сформировавшийся ягненок погиб во время родов. Его фенотип также соответствовал породе-донору.

В ходе дифференцировки эмбриональных клеток происходит инактивация некоторых важных для развития генов, и в результате ядра бластулы уже не могут репрограммироваться в цитоплазме яйцеклетки и обеспечить нормальное развитие реконструированного зародыша. Поэтому, по мнению авторов, в качестве доноров ядер лучше использовать 16-клеточные эмбрионы или культивированные *in vitro* линии эмбриональных клеток, ядра которых обладают тотипотентностью.

Позднее, в 1993-95 гг., получен клон овец - пять идентичных животных, донорами ядер которых была культура эмбриональных клеток. Клеточ-

ную культуру получали следующим образом: выделяли микрохирургическим путём эмбриональный диск из 9-дневного овечьего эмбриона (бластулы) и культивировали клетки *in vitro*. Сначала клеточная культура напоминала культуру стволовых дифференцированных эмбриональных клеток, но вскоре, после 2-3 пассажей, клетки становились уплотненными и морфологически сходными с эпителиальными. Эта линия клеток из 9-дневного зародыша овцы была обозначена как TNT4. Чтобы донорское ядро и реципиентная цитоплазма находилась на сходных стадиях клеточного цикла, останавливали деление культивируемых клеток TNT4 на определённой стадии ( $G_0$ ) и ядра этих клеток пересаживали в энуклеированные яйцеклетки (на стадии метафазы II). Реконструированные эмбрионы заключали в агар и трансплантировали в перевязанные яйцеводы овец. Через 6 дней эмбрионы вымывали из яйцеводов промежуточных реципиентов и исследовали под микроскопом. Отбирали те, которые достигали стадии морулы и бластулы и пересаживали их в матку овцы - окончательного реципиента, где развитие продолжалось до рождения. Родилось 5 ягнят (самок), из них две погибли вскоре после рождения, третья в возрасте десяти дней, а две оставшихся нормально развивались и достигли 8-9-месячного возраста. Фенотипически все ягнята были сходны с породой овец, от которой получали исходную линию клеток TNT4. Это подтвердил и генетический анализ.

В 1997 году Я. Уилмут сообщил, что в результате использования донорского ядра клетки молочной железы овцы было получено клональное животное - овца по кличке Долли. В этой работе использовались не только эмбриональные, но и фибробластоподобные клетки (фибробласты – клетки соединительной ткани) плода и клетки молочной железы взрослой овцы. Клетки молочной железы получали от 6-летней овцы породы Финн Дорсет, находящейся на последнем триместре беременности. Все три типа клеточных культур имели одинаковое число хромосом - 54.

Эмбриональные клетки использовали в качестве доноров ядер на 7-9 пассажах культивирования, фибробластоподобные клетки плода на 4-6 пассажах и клетки молочной железы на 3-6 пассажах. Деление клеток всех трех типов останавливали на стадии  $G_0$  и ядра клеток пересаживали в энуклеированные ооциты на стадии метафазы II.

Выход морул и бластул в серии опытов с культурой клеток молочной железы, был втрое меньше, чем в двух других сериях, когда в качестве доноров ядер использовали фибробласты плода или эмбриональные клетки.

Число живых ягнят в сравнении с числом пересаженных в матку окончательного реципиента морул или бластул было также в 2 раза ниже.

В серии опытов с клетками молочной железы из 277 реконструированных яйцеклеток был получен только один живой ягненок, что говорит об очень низкой результативности таких экспериментов (0,36%).

Анализ генетических маркеров всех семи родившихся в трех сериях экспериментов живых ягнят показал, что клетки молочной железы были донорами ядер для 1, фибробласты плода - для 3 и эмбриональные клетки - для 4 ягнят.

Овца Долли развилась из реконструированной яйцеклетки, донором ядра которой была культивируемая клетка молочной железы. Долли фенотипически не отличается от овец этой породы, но сильно отличается от овцы-реципиента породы шотландская черномордая. Анализ генетических маркеров подтвердил этот результат. Успех этой работы связан с использованием длительных клеточных культур, так как после многих пассажей в культуре клеток могли быть отобраны малодифференцированные стволовые клетки, которые вероятно и были использованы как доноры ядер. Большое значение имел тот факт, что авторы, учитывая результат своих прошлых работ, синхронизировали стадии клеточного цикла яйцеклеток реципиента и яйцеклеток донора.

Своей работой Я. Уилмут с коллегами продемонстрировали, что ядра клеток молочной железы взрослой овцы могут быть при определённых условиях репрограммированы цитоплазмой ооцита и дать развитие новому организму. Полученные данные заставили по-новому посмотреть на процесс клеточной дифференцировки. Этот процесс, как оказалось, не носит необратимый характер. Совершенно ясно, что цитоплазматические факторы способны инициировать развитие нового организма на основе генетического материала ядра взрослой полностью дифференцированной клетки. Таким образом, биологические часы могут быть повернуты вспять, и развитие организма может начаться из генетического материала взрослой дифференцированной клетки, что противоречит раннее общепринятой биологической догме.

Если результаты работ Я. Уилмута и соавторов окончательно подтвердятся и будет повышен коэффициент выхода живых животных при использовании в качестве доноров ядер клеток взрослых животных, то это может иметь значение как в биотехнологии животных и животноводстве.

Клонирование позволит сохранить не только генотип ценных и выдающихся в производственном отношении животных, но и размножать их.

### **Клонирование человека**

В обсуждении вопроса о клонировании человека следует выделить два аспекта: методический и этический.

Методически (технически) клонирование взрослых млекопитающих разработано недостаточно, поэтому ставить вопрос о клонировании человека еще рано. Для этого необходимо расширить исследования, включив в него кроме овец представителей и других видов животных. Я. Уилмут с сотрудниками планируют продолжить свои работы на коровах и свиньях. Такие работы необходимы, чтобы установить, не ограничивается ли возможность клонирования взрослых млекопитающих особенностями или спецификой какого-либо одного или нескольких видов.

Есть два разных вида клонирования: репродуктивное и терапевтическое.

Целью репродуктивного клонирования является получение целостного организма — «клона» (копии) того организма, от которого взята ДНК. Эта ДНК вносится в лабораторных условиях в яйцеклетки, лишённые своих собственных ядер. Таким образом, вместо сперматозоида, который добавляет к генетическому набору яйцеклетки при оплодотворении свой набор хромосом, при клонировании все 46 хромосом принадлежат той особи, от которой взята проба ДНК. В случае успешного клонирования яйцеклетка с «чужой» ДНК начинает делиться, образуя через 4-5 дней предэмбриональную колонию (бластоцисту), содержащую примерно 100 клеток. Эти клетки образуют 2 слоя, внутренний, который состоит из так называемых стволовых клеток, способных при своей дальнейшей дифференциации образовывать все ткани будущего эмбриона. Подсаженные в матку «суррогатной» матери и прижившись в ней, эти бластоцисты могут превратиться в эмбрионы и стать основой беременности, которая завершится полноценными родами. Все полученные таким способом особи являются не потомками двух родителей, а копией (клоном) только одной особи - «донора» ДНК.

Можно ли таким путем получить клонированного человека? Этот вопрос волнует не только врачей, при его обсуждении возникают технические, медико-биологические, религиозно-этические проблемы.

Репродуктивное клонирование запрещено во многих странах, и этот запрет оправдан по очень многим причинам, главная из которых состоит в отсутствии обоснованной социальной потребности в получении таким путем человека, который явно будет обладать непредсказуемыми свойствами. Так в частности, плод, рожденный «суррогатной» матерью в результате введения в яйцеклетку ДНК 30-летнего мужчины, будет по всем параметрам новорожденным младенцем, возраст клеток которого будет равен 30 годам. Репродуктивное клонирование человека в настоящее время совершенно неприемлемо, и его запрещение оправдано.

При терапевтическом клонировании, в отличие от репродуктивного, не ставится задача получить целостный организм. Его целью является получение линии человеческих клонированных эмбриональных стволовых клеток, чтобы с их помощью лечить различные заболевания: диабет, последствия инсультов и инфарктов, болезни Паркинсона и Альцгеймера, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз и др.

В 1998 году удалось выделить стволовые клетки. Для получения клонированных эмбрионов было использовано 176 ооцитов. В каждый ооцит, после удаления собственного генетического материала, была трансплантирована соматическая фолликулярная клетка. Все клонированные эмбрионы имели женский генотип и были генетической копией той женщины, фолликулярные клетки которой были использованы. Только 25% клонированных эмбрионов смогли развиваться до стадии бластоцисты, и лишь 20 из них удалось использовать для получения линии стволовых клеток. В результате этого эксперимента была получена и исследована всего одна линия эмбриональных стволовых клеток, генетически идентичная организму донора.

Все стволовые клетки независимо от происхождения и источника выделения обладают несколькими уникальными свойствами:

1. Они неспециализированы – не имеют тканеспецифичных структур, позволяющих выполнять специализированные функции.
2. Способны к пролиферации – к длительному размножению и продукции большого числа клеток.
3. Способны к дифференцировке – процессу специализации клеток.
4. Способны к асимметричному делению, т. е. из каждой стволовой клетки при митозе образуются две дочерние, одна из которых идентична родительской и остается стволовой, другая дифференцируется в специализированные клетки.

5. Путем миграции к зоне повреждения они способствуют регенерации.

*Существуют следующие возможности для получения стволовых клеток:*

1. Наряду с костным мозгом исследователи все чаще обнаруживают в органах и тканях человека взрослые стволовые клетки. Преимущество состоит в том, что донором клеток является сам пациент и, таким образом, созданные на основе этих клеток новые органы иммунологически совместимы и последующее их отторжение иммунной системой маловероятно (невозможно). Недостаток же заключается в том, что потенциал этих стволовых клеток пока не достаточно точно изучен. Кроме того, процесс выделения (дифференциации) и размножения этих клеток сложен.

2. Другим источником могут служить бластоцисты – оплодотворенные яйцеклетки на очень ранней стадии процесса деления. Из них можно выделить зародышевые стволовые клетки, которые являются более универсальными, нежели взрослые стволовые клетки. Однако при использовании метода искусственного оплодотворения возникает опасность, что иммунная система реципиента может не «принять» полученные из этих тканей стволовые клетки, (как чужеродные), и возникнет их последующее отторжение как чужеродной ткани.

3. Иначе обстоит дело при терапевтическом клонировании. Здесь ядро дифференцированной клетки самого пациента помещается в яйцеклетку, из которой предварительно было удалено ядро. Из эмбриональных стволовых клеток выращенной на этой основе бластоцисты впоследствии реконструируются ткани для пациента. Так как донор и реципиент - идентичны (один человек), то отторжение не наступает.

Таким образом, стволовые клетки могут обеспечить человека полностью совместимой трансплантационной тканью. Первоначально планируется имплантировать клетки в организм для восстановления дефектов тканей, вызванных болезнью, например, восстановление сердечной мышцы после инфаркта. В будущем планируется выращивать из стволовых клеток полностью работоспособные ткани.

Почему клонирование является неотъемлемой частью этого процесса? Клонирование позволяет создать ткани и органы с полностью идентичным генетическим материалом. Главная проблема трансплантологии - отторжение пересаженных органов и тканей из-за иммунного конфликта. Клонирование полностью решает эту проблему - клетки имплантанты имеют тот

же генотип, и иммунная система признает их за «свои». Это снимает проблему поиска генетически подходящих доноров.

Первые этапы обоих видов клонирования идентичны: в безъядерные яйцеклетки вносится ДНК какого-либо организма (при попытках репродуктивного клонирования человека - того, чья «копия» воспроизводится, при терапевтическом - пациента). «Оплодотворенные» этой ДНК яйцеклетки - в случае успешного клонирования - начинают делиться и достигают стадии 100 - клеточной бластоцисты (4-5 дни после начала деления). Здесь пути репродуктивного и терапевтического клонирования расходятся: при попытках «получить» человека бластоцисты должны подсаживаться в матку женщины, а при желании вылечить донора ДНК - разрушаются с таким расчетом, чтобы получить взвесь клеток, которые образуют внутренний слой бластоцисты. Эти и есть стволовые клетки, из которых при дифференциации возникают и развиваются все без исключения ткани будущего эмбриона. Именно поэтому взвесь таких клеток, введенная в ткань больного человека, теоретически может «превратиться» в нормальные элементы этой ткани и заместить дефект, вызванный патологическим процессом. Эти клетки содержат тот же хромосомный набор, что и пациент, и не будут подвержены отторжению при посадке в его организм.

Против терапевтического клонирования есть много противников, которые считают, что эмбрион, даже если это одна клетка, представляет собой полноценную человеческую жизнь и уничтожение его или опыты над ним недопустимы. Однако в природе имеются случаи клонирования человека, это монозиготные близнецы - настоящие клоны с одним и тем же геномом, возникающие при разделении зиготы на ранней стадии развития.

Эмбрион млекопитающих, в том числе и человека на самых ранних стадиях развития, у человека, по крайней мере, до стадии 8 бластомеров, может быть без видимых отрицательных последствий разделен на отдельные бластомеры, из которых могут развиваться идентичные по своему генотипу особи, по аналогии с монозиготными близнецами, то есть из одного 8-клеточного эмбриона могут родиться 8 абсолютно идентичных мальчиков или девочек.

В ближайшее время главная задача исследователей, работающих в области клонирования - это создание культивируемых *in vitro* линий мало дифференцированных клеток, характеризующихся высокой скоростью деления. Ядра таких клеток должны обеспечить полное нормальное развитие ре-

конструированных яйцеклеток, формирование морфологических признаков, но и нормальное функционирование клонированного организма.

Необходимо существенно повысить выход жизнеспособных реконструированных эмбрионов и взрослых клонированных животных, выяснив, как влияют методологические приемы на продолжительность жизни, функциональные характеристики и плодовитость животных.

Таким образом, говорить о клонировании человека можно лишь с теоретической точки зрения. В сущности, речь идет даже не о клонировании, а о получении копии отдельного индивида, поскольку термин клонирование предполагает получение большого количества особей.

В настоящее время вероятность отрицательных последствий клонирования человека значительно велика, поэтому Федерация научных экспериментальных обществ биологов США в октябре 1997 года объявила мораторий на эксперименты по клонированию человека. Когда усовершенствуется метод клонирования, и можно будет клонировать человека, тогда необходимо будет регламентироваться строгими рамками и правилами, касаясь возможно только медицинских проблем, например, бесплодия.

29 декабря 2005 года группа экспертов из Сеульского университета объявила о предварительных результатах независимого расследования по делу профессора Ву Сук Хванга, считавшегося «отцом» терапевтического клонирования. Ву Сук Хвангом и его коллегами были опубликованы 2 работы в журнале «Science» в 2004 и 2005 гг. по клонированию эмбриональных стволовых клеток, взятых у пациентов. Экспертиза сохранившегося биоматериала установила, что клеточные линии от 2005 года не имеют никакого отношения к клонированию стволовых клеток.

## **V. МОРАЛЬНО-ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ КЛОНИРОВАНИЯ**

С этической стороны клонирование человека вызывает еще больше возражений. Во-первых, становление человека как личности базируется не только на наследственности, оно определяется также семейной, социальной и культурной средой. При клонировании индивида невозможно воссоздать условия воспитания и обучения, которые формируют личность.

Во-вторых, при бесполом размножении изначально жесткая запрограммированность генома предопределяет меньшее разнообразие взаимодействия организма с окружающими изменчивыми условиями среды.



В-третьих, практически все религиозные учения настаивают на появлении человека на свет - в «руках» высших сил, что зачатие и рождение должны происходить естественным путем.

При широком распространении практики клонирования пропадет основное различие между людьми как субъектами и предметами для искусственного манипулирования. Это будет иметь определенные психологические и социальные последствия. Одним из возможных последствий будет то, что богатые люди смогут получить дополнительные преимущества для своих детей, ведущие к генетическому улучшению правящей элиты. Есть основания опасаться использования генной инженерии в евгенических целях.

В настоящее время исследуется возможность создания запаса замороженных клонированных клеток в национальном банке тканей. Это позволит получить определенные запасы тканей, которые могут быть созданы для трансплантации и лечения неизлечимых болезней.

Пробы тканей будут браться у новорожденных, и храниться до возникновения потребности в них. В момент рождения из пуповины будет извлечены стволовые клетки, заморожены и закрыты в частном «банке» для хранения крови на протяжении 25 лет. Стоимость процедуры – около 2 000 евро. Кровь пуповины, так же как и плаценты содержит стволовые клетки, аналогично костному мозгу, эти клетки могут использоваться для восстановления тканей больных органов - настоящие запасные части для человеческого тела. Стволовые клетки из пуповины могут использоваться для пересадки в случае совместимости и другим лицам, в частности членам той же семьи. Терапевтическое клонирование принимается учеными и врачами, но учитывая способы получения стволовых клеток, с весьма значительными оговорками.

#### *Способы получения стволовых клеток:*

- 1) пересадка ядер клеток взрослого организма в донорские яйцеклетки и выделение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из полученных таким образом эмбрионов;
- 2) выделение ЭСК из абортивного материала;
- 3) выделение из организма клеток (костного мозга) и «обращение» их в состояние ЭСК;
- 4) отделение части клеток от развивающегося эмбриона.

Два последних способа не вызывают нравственных возражений, но, по крайней мере в настоящее время, технически неосуществимы.

Противники терапевтического клонирования считают, что созданные таким образом эмбрионы, в экспериментальных целях - скорее товар, чем люди. Их владельцы - доноры генетического материала вряд ли принимают решения, исходя из интересов эмбрионов. Есть мнение, что в этом типе исследований человека нет необходимости, так как стволовые клетки взрослого организма обладают тотипотентными свойствами и могут давать начало другим типам стволовых клеток.

Терапевтическое клонирование человека невозможно примирить с современными нормами исследований организма человека. Термин «терапевтический» по определению подразумевает лечение болезни. Получение же клонированных стволовых клеток эмбрионов в ближайшие годы будет служить только исследовательским, а не лечебным целям. Сам процесс клонирования человека может привести к болезням, а не к их излечению, в частности - к снижению качества стволовых клеток вследствие неспецифических генетических дефектов.

Терапевтическое клонирование человека морально допустимо лишь при условии, если рассматривать эмбрион как скопление клеток. основополагающий этический вопрос заключается в моральном статусе эмбриона человека.

Самая большая проблема клонирования заключается в том, что в этой области до сих пор царит законодательный вакуум. С одной стороны в Швеции, Англии и США разрешены исследования яйцеклеток человека и оплодотворенных эмбрионов. В Швеции эти исследования разрешены и ведутся на законных основаниях, начиная с 1991 года, а в Англии – с 2001 года. При этом эмбрион может находиться в лаборатории только две недели, после чего он должен быть уничтожен; запрещается также после использования в исследовательских целях имплантировать его в матку женщины или привносить в эмбрионы генетические изменения. С другой стороны, ВОЗ и Совет Европы призвали к запрещению клонирования людей. В марте 2004 года на Генеральной Ассамблее ООН принята резолюция о запрете всех форм клонирования человека. Эту резолюцию поддержали более 80 государств, 34 – голосовали против, а 36 – воздержались.

Таким образом, репродуктивное клонирование человека недопустимо по совокупности морально-этических и медико-биологических причин. Запрет на клонирование людей вполне оправдан и необходим. Но получение методом клонирования стволовых клеток для лечения тяжелейших и неизлечимых заболеваний является приемлемым.

чимых другими методами заболеваний - терапевтическое клонирование является главной надеждой мировой медицины.

Судя по всему, терапевтическое клонирование человека постепенно входит в нашу жизнь, становится ее непреложным фактом.

## VI. ПРИМЕРЫ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ

**Задача 1.** Имеется последовательность из 39 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦАТГ-3'

3'-ГГААТЦЦГГАЦТГААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТГААГТГТАЦ-5'

Каким способом, и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

**Решение.** В данной последовательности ДНК имеется два участка распознавания: ГААТТЦ для рестриктазы **EcoR I** и ГГЦЦ для **Hae III**. Поэтому искомая ДНК может быть разрезана в двух местах с образованием трех различных фрагментов следующих последовательностей:

- 1) 5'-ЦЦТТАГГ-  
3'- ГГААТЦЦ-
- 2) - ЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГ-  
- ГГАЦТГААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТГАА-
- 3) -ААТТЦАЦАТГ-3'  
- ГТТАЦ-5'

**Задача 2.** Рестриктаза **Hind III** разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ. Какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?

**Решение.** Нам необходимо рассмотреть только одну цепочку ДНК, поскольку обе цепочки имеют одинаковые, симметричные последовательности, хотя и разнонаправленные. Частота встречаемости фрагмента из 6 нуклеотидных пар для **Hind III** составит  $(1/4)^6 = 1/4096$ , так как вероятность для одного нуклеотида (допустим, А) занять конкретное место в цепочке ДНК составляет 1/4, а таких мест имеется 6. Следовательно, среднее расстояние между участками разрезания рестриктазой **Hind III** составит около 4 тысяч нуклеотидных пар (4 тысячи баз или 4 килобазы).

**Задача 3.** Гаплоидный геном человека содержит около  $3 \times 10^9$  нуклеотидных пар (н.п.) ДНК. Если разрезать ДНК рестриктазой **EcoR I**, узнающим гексамерную последовательность ГААТТЦ, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

**Решение.** Исходя из предположения, что четыре нуклеотида А, Т, Г, Ц находятся в равных количествах и распределяются в ДНК случайным образом, вероятность для любого из четырех нуклеотидов занять конкретное место в цепочке составляет 1/4. Вероятность для двух нуклеотидов (напри-

мер, А Г) занять конкретное место составит  $1/4 \times 1/4 = (1/4)^2$ , а вероятность для специфической гексамерной последовательности будет равна  $(1/4)^6 = 1/4096$ . Следовательно, **EcoR I** будет разрезать молекулу ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. Если молекула ДНК разрежется  $n$  раз, то в результате получается  $n + 1$  фрагмент. Гаплоидный геном из  $3 \times 10^9$  нуклеотидных пар содержит около 732 422 ( $3 \times 10^9/4096$ ) мест разреза для рестриктазы **EcoR I**. Если бы полный геном ДНК человека состоял из одной молекулы, то **EcoR I** могла бы разрезать его на  $732\,422 + 1$  фрагмент. Так как места разрезов распределены по 23 хромосомам, то в результате полного расщепления ДНК человека рестриктазой **EcoR I** должно получиться  $732422 + 23$  рестрикционных фрагмента.

**Задача 4.** Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

- 1) 5'-АГЦАТАЦТГТГААТТЦАЦА-3'  
3'-ТЦГТАТГАЦАЦТТААГТГТ-5'
- 2) 5'-АТГААТТЦТТАГЦАТАЦ-3'  
3'-ТАЦТТААГААТЦГТАТГ-5'

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

**Решение.** На первом этапе необходимо разрезать представленные фрагменты ДНК с помощью подходящих рестриктаз. В данном случае можно использовать рестриктазу **EcoR I**, которая разрежет ДНК двух видов на 4 новых фрагмента 1, а); 1,б) и 2,а); 2,б) с липкими концами ААТТ и ТТАА:

- |                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| 1,а) 5'-АГЦАТАЦТГТГ | 1,б) ААТТЦАЦА-3'       |
| 3'-ТЦГТАТГАЦАЦТТАА  | ГТГТ-5'                |
| 2,а) 5'-АТГ         | 2,б) ААТТЦТТАГЦАТАЦ-3' |
| 3'-ТАЦТТДА          | ГААТЦГТАТГ-5'          |

В ходе второго этапа необходимо соединить нужные нам фрагменты 1,а) и 2,б). В результате, выступающие липкие концы соединятся между собой водородными связями в силу комплементарности.

5'-АГЦАТАЦТГТГ А-А-Т-Т-ЦТТАГЦАТАЦ-3'  
3'-ТЦГТАТГАЦАЦ-Т-Т-А-А ГААТЦГТАТГ-5'.

Окончательное соединение фрагментов 1,а) и 2,б) двух молекул ДНК производит ДНК-лигаза, которая «сшивает» между собой сахарофосфатные остовы обоих фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК.

**Задача 5.** Кольцевая плаزمида **pSC 101** несет только один участок расщепления рестриктазой **EcoR I**. Какой из приведенных ниже фрагментов ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦПТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦАТГ-3'

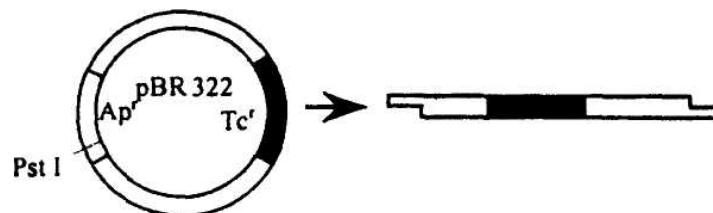
3'-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦЦПТАТЦАЦАЦТТАГПТАЦ-5'

**Решение.** Поскольку плаزمида **pSC 101** несет один участок расщепления рестриктазой **EcoR I**, то в нее можно встроить только тот фрагмент ДНК, который также может быть разрезан рестриктазой **EcoR I**. Поэтому из двух фрагментов двухцепочечной ДНК, приведенных выше, в плазмиду **pSC 101** можно встроить лишь первый, так как только он содержит участки разрезания для **EcoR I**.

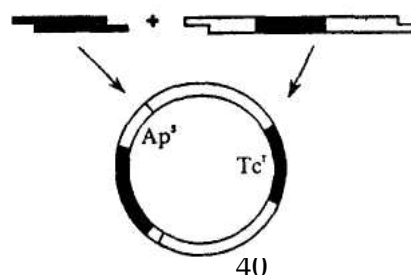
**Задача 6.** При помощи рестриктазы **Pst I** получен фрагмент двухцепочечной ДНК с липкими концами. Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду **pBR 322**? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду **pBR 322**?

**Решение.** Данный фрагмент ДНК можно встроить в плазмиду **pBR 322**, поскольку она несет участок расщепления рестриктазой **Pst I**.

На первом этапе под действием рестриктазы **Pst I** получают линейную молекулу плазмиды:



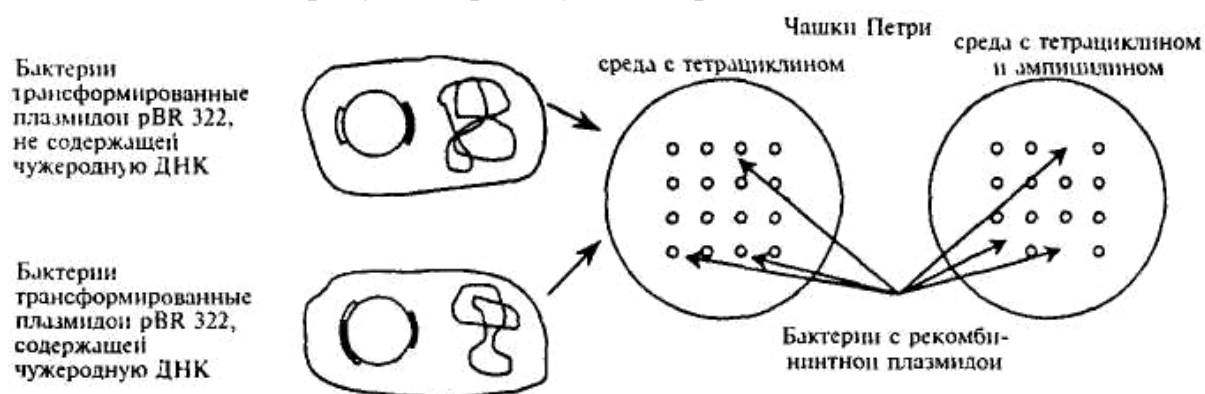
На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы плазмиды с фрагментом ДНК с последующим сшиванием ферментом лигазой.



Так как сайт рестрикции для **Pst I** находится в гене устойчивости (резистентности) к ампициллину, то при вставке чужеродной ДНК по месту разреза будет нарушена целостность гена *Ap*. Соответственно исчезнет признак устойчивости к ампициллину, кодируемый данным геном. Для того, чтобы подтвердить наличие чужеродной ДНК, гибридную плазмиду вводят в бактерию.



Трансформированные плазмидой бактерии помещают в чашку Петри на среду, содержащую только тетрациклин. Затем переносят реплику (отпечаток) колоний на среду, содержащую и тетрациклин, и ампициллин.



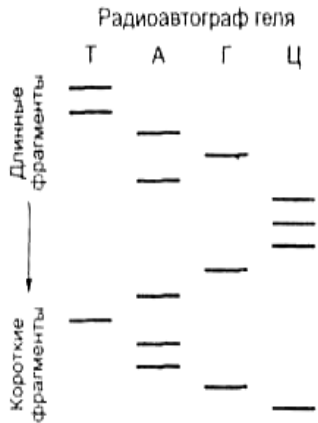
Если бактериальные колонии растут на среде содержащей тетрациклин, но не растут на среде с двумя антибиотиками, то это означает, что данные бактерии несут плазмиды с чужеродной ДНК, встроенной в ген устойчивости к ампициллину. Иными словами, встроить данный фрагмент в плазмиду **pBR 322** при помощи рестриктазы **Pst I** удалось.

**Задача 7.** Образцы ДНК человека, обработанные рестриктазами, проанализированы методом фингерпринта с использованием радиоактивно меченого зонда, комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК. Схематическое изображение радиограммы проведенного фингерпринта ДНК представлено на рисунке. Определите у одного или двух человек была взята ДНК для анализа?

**Решение:** в каждом спектре образцов ДНК, представленных на рисунке насчитывается по 10 фракций. Поскольку только одна фракция у двух образцов полностью совпадает, а по девяти фракциям есть отличия, можно

утверждать, что ДНК<sub>1</sub> и ДНК<sub>2</sub> взяты для фингерпринта у двух неродственных людей.

**Задача 8.** Нуклеотидная последовательность короткого рестрикционного фрагмента ДНК длиной 15 нуклеотидов, секвенирована методом Максама-Гилберта. На основе спектра, представленного на радиограмме (см. рисунок), определите нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК.



**Решение:** чтение нуклеотидной цепочки начинается с радиоактивно меченого конца. Чем короче радиоактивный фрагмент на геле, тем ближе искомый нуклеотид расположен к началу цепочки. Поэтому самый короткий радиоактивный фрагмент и, соответственно, первый нуклеотид располагаются в самой нижней части геля. На данной радиограмме это нуклеотид Ц, второй - Г, третий и четвертый - А, пятый - Т, шестой - А и т.д. вверх по радиоавтографу геля. Таким образом, нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК из 15 нуклеотидов по результатам секвенирования, следующая: **ЦГААТАГЦЦАГАТТ**.

## VII. ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

**Задача 1.** Имеется последовательность из 27 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'- ЦТГААТТАГГАТЦЦАГГЦААТАГТГТГ -3'

3'-ГАЦТТААТЦЦТАГГТЦЦГТТАТЦАЦАЦ-5'.

Каким способом, и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

**Задача 2.** Имеется последовательность из 24 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'-ТЦАГААТГЦТГГЦЦААГТАЦТТАГ-3'

3'-АГТЦТТАЦГАЦЦГГТТЦАТГААТЦ-5'.

Каким способом, и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

**Задача 3.** Ниже приведены две последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

а) 5'-АЦТЦАГААТТЦАЦТЦГ-3'

б) 5'-ГЦЦТЦАТТЦГААГЦЦТА-3'



**Задача 4.** Ниже приведены три последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

- а) 5'-ТАГГЦТААГЦТТАЦЦГАТ-3'
- б) 5'-ЦГААТАТТТЦЦГГАТГАА-3'
- в) 5'-АГГТЦЦТТАТЦЦГАТААТТ-3'.

**Задача 5.** Рестриктаза Нра II разрезает ДНК по последовательности ЦЦГГ. Какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?

**Задача 6.** Рестриктаза EcoR I разрезает ДНК по последовательности ГААТТЦ. Как часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК?

**Задача 7.** Если последовательность нуклеотидов в ДНК распределяется случайным образом, то какова будет средняя длина фрагмента при разрезании рестриктазами, узнающими последовательность из 8 нуклеотидов?

**Задача 8.** Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено при разрезании человеческой ДНК рестрикционным ферментом Sma I?

**Задача 9.** Гаплоидный геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae*, состоящий из одной хромосомы, содержит около  $13,5 \times 10^6$  нуклеотидных пар ДНК. Если вы порежете эту ДНК ферментом EcoR I, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

**Задача 10.** Геном *Escherichia coli*, представляющий собой одну кольцевую ДНК, содержит около  $4,7 \times 10^6$  н. п. Его разрезали ферментом Nae III. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

**Задача 11.** Геном *Drosophila melanogaster*, состоящий из четырех хромосом, содержит около  $10^8$  нуклеотидных пар ДНК. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено, если вы разрежете эту ДНК ферментом EcoR I?

**Задача 12.** Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

- 1) 5'-АААГЦТТЦТГААТЦЦГАТЦГ-3'  
3'-ТТТЦГААГАЦТТАГГЦТАГЦ-5'
- 2) 5'-ГТАЦТЦАГАТЦЦТАГГАТААГЦТТ-3'  
3'-ЦАТГАГТЦТАГГАТЦЦТАТТЦГАА-5'.

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

**Задача 13.** Опишите последовательные этапы получения гибридной ДНК из представленных ниже фрагментов.

5'-ТАЦТАТЦЦГГАГТАГГАТЦЦТ-3'

3'-АТГАТАГГЦЦТЦАТЦЦТАГГА-5'

5'- ЦГГАТЦЦТАГАТТЦЦАТА-3'

3' -ГЦЦТАГГАТЦТААГГТАТ- 5'.

**Задача 14.** Ниже приведен фрагмент ДНК. Можно ли встроить его в плазмиду pSC 101?

5'-АГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦА-3'

3'-ТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5'.

**Задача 15.** Ниже приведены два одноцепочечных фрагмента ДНК. Какой из них в двухцепочечном варианте можно использовать для встраивания в плазмиду pSC 101?

а) 5'-ГГЦЦТГААТТЦААГЦАТАГТГТГААТТЦАА-3'

б) 5'-ТЦЦГГАЦТТААТТГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-3'.

**Задача 16.** Кольцевая плазида pBR 322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из ниже приведенных фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду при помощи известной вам рестриктазы?

5'-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГАТТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТГТЦААТГ-3'

3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГААЦАГТТАЦ-5'.

**Задача 17.** Какой из ниже приведенных фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в плазмиду pBR 322?

1) 5'-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5'

2) 5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3'

3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГААГТГТАЦ-5'.

**Задача 18.** Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК:

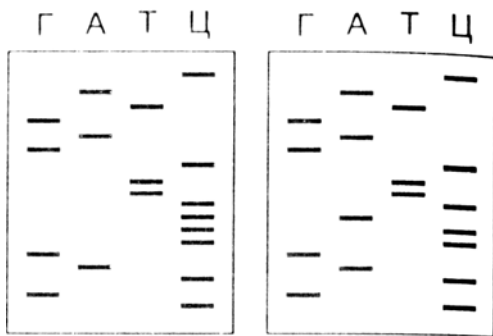
5'-ТАГГАТЦАТТАААТАГТГГАТЦЦГТ-3'  
 3'-АТЦЦТАГГТААТТТАТЦАЦЦТАГГЦА-5'.

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду рВR 322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду рВR 322?

**Задача 19.** В плазмиду рВR 322 встроен фрагмент чужеродной ДНК. Трансформированные такой плазмидой бактерии растут на питательной среде с ампициллином, но не растут на питательной среде, содержащей тетрациклин. Какой известной вам рестриктазой можно вырезать чужеродную ДНК из плазмиды?

**Задача 20.** Установлено, что различные мутации в гене, кодирующем трансмембранный белок родопсин, вызывают различные формы наследственного заболевания пигментной ретинопатии, которое характеризуется прогрессирующей потерей зрения. Проведено секвенирование гена родопсина фрагмента ДНК нормального и мутантного гена, ответственного

за синтез родопсина. Результаты секвенирования представлены на рисунке.



Можно ли, основываясь на результатах секвенирования фрагмента ДНК, определить изменения в белке родопсине, приводящие к аутосомно-доминантному заболеванию пигментная ретинопатия?

## VIII. ОТВЕТЫ

1. Рестриктазой **Vam I** (есть один сайт ГГАТЦЦ) на два фрагмента.
2. Рестриктазой **Hae III** с образованием двух фрагментов.
3. Рестриктаза **EcoR I** может разрезать фрагмент а).
4. Фрагменты а) и б) могут быть разрезаны рестриктазами **Hae III** и **Hra II** соответственно.
5. Частота встречаемости четырехнуклеотидного фрагмента ЦЦГГ составит  $(1/4)^4 = 1/256$ . Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании **Hra II** равна 256 нуклеотидных пар.
6. Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании **EcoR I** составит 4096 нуклеотидных пар.
7. Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании рестриктазами, узнающими восьминуклеотидную последовательность, составит  $65 \cdot 536$  нуклеотидных пар.
8.  $732 \cdot 422 + 23 = 732 \cdot 445$  фрагментов.
9.  $3296 + 1 = 3297$ .
10. 18 359.
11.  $24 \cdot 414 + 4 = 24 \cdot 418$ .
12. С помощью **Hind III** можно разрезать оба фрагмента ДНК с образованием липких концов АГЦТ, которые затем соединятся за счет водородных связей, а окончательную сшивку произведет ДНК-лигаза.
13. **Vam I** может разрезать фрагменты ДНК с образованием липких концов, а ДНК-лигаза скрепит их в одну молекулу.
14. Нет, поскольку во фрагменте отсутствует сайт для **EcoR I**.
15. а).
16. Второй.
17. Оба. Первый – при помощи рестриктазы **EcoR I**, а второй - при помощи рестриктазы **Hind III**.
18. При помощи рестриктазы **Vam I**. Бактерии, трансформированные такой плазмидой, не будут расти на средах, содержащих тетрациклин.
19. Трансформированные бактерии не растут на средах, содержащих тетрациклин, поэтому можно предположить, что в плазмидной ДНК вставкой поврежден ген устойчивости к этому антибиотику. Следовательно, нужный фрагмент из плазмиды можно «вырезать» при помощи рестриктазы **Vam I**.
20. Да, можно. Исходя из схематического изображения секвенированных фрагментов ДНК, установлено, что мутантный ген родопсина вместо кодона ЦЦЦ содержит кодон ЦАЦ. Вследствие этого, в родопсине вместо аминокислоты **пролин** появилась аминокислота **гистидин**, что и привело к пигментной ретинопатии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белясова Н.А. Биохимия и молекулярная биология. - Мн.: Книжный дом, 2004 – 415 с.
2. Генетика: Энцикл. словарь /Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Мн.: Тэхналогія, 1999. – 448 с.
3. Гончаренко Г.Г. Основы генетической инженерии: учеб. Пособие. Мн.: Выш шк., 2005. – 183 с.
4. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. - М.: Мир. - 2000. – 469 с.
5. Конюхов Б.В. Долли – случайность или закономерность?//«Человек». – 1998. - №3. – С. 54 – 91.
6. Корочкин Л.И. Клонирование животных.//Соросовский образовательный журнал. – 1999. - №4. – С. 125 – 208.
7. Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г. Сборник задач с решениями по генетике. – Мн.: «Сэр-Вит». – 2004. – 144 с.
8. Ратнер В.А. Молекулярная генетика: принципы и механизмы. - Новосибирск: Наука.- 1997. – 256 с.
9. Струнников В.А. Клонирование животных: теория и практика. //«Природа». – 1998. - №7. – С. 104 – 183.
10. Ресурсы всемирной компьютерной сети Internet.

## Содержание

<b>I. История развития генной инженерии и клонирования (А.П. Веремейчик)</b> .....	3
<b>II. Методы генной инженерии (В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов)</b> .....	6
Получение генетического материала.....	6
Анализ и использование фрагментов ДНК .....	10
Включение генов в автономно реплицирующуюся векторную молекулу и создание рекомбинантной ДНК .....	11
Введение рекомбинантных ДНК в клетку-реципиент и включение ее в хромосомный аппарат.....	15
Селекция клонов клеток, содержащих молекулы гибридной ДНК .....	16
<b>III. Применение генной инженерии в медицине (В.Э. Бутвиловский, В.В. Давыдов)</b> .....	16
Генная дактилоскопия .....	16
Получение лекарственных препаратов и вакцин .....	18
Генная терапия .....	19
<b>IV. Основы клонирования (А.П. Веремейчик)</b> .....	20
<b>V. Морально-этические проблемы клонирования (А.П. Веремейчик)</b> .....	34
<b>VI. Примеры решения задач (В.Э. Бутвиловский)</b> .....	38
<b>VII. Задачи для самоконтроля (В.В. Давыдов)</b> .....	42
<b>VIII. Ответы к задачам (А.П. Веремейчик)</b> .....	46
<b>Литература</b> .....	47