

ГУО «Институт подготовки научных кадров
Национальной академии наук Беларуси»

Кафедра естественно-научных дисциплин



Е. Н. Макеева, С. Е. Дромашко

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

Учебно-методическое пособие

Минск
2013

ГУО «Институт подготовки научных кадров
Национальной академии наук Беларуси»

Кафедра естественнонаучных дисциплин

Е. Н. Макеева, С. Е. Дромашко

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

Учебно-методическое пособие

Минск
2013

УДК 575+663.1 (075.8)
ББК 28.04я73
М15

Рекомендовано к опубликованию Ученым советом
Института подготовки научных кадров НАН Беларуси
протокол № 1 от 23.01.2013 г.

Рецензенты:

А. А. Чиркин, доктор биологических наук, профессор, заведующий
кафедрой химии УО «Витебский педагогический университет
им. П.М. Машерова»

М. О. Холмецкая, кандидат биологических наук, заведующая
лабораторией детекции ГМО ГНУ «Институт генетики и цитологии
НАН Беларуси»

Макеева, Е. Н., Дромашко, С. Е.

М15 Современные технологии изучения геномной ДНК : учеб.-
метод. пособие / Е. Н. Макеева, С. Е. Дромашко. – Минск : ИПНК,
2013. – 66 с. : ил.

ISBN 978-985-6820-52-9.

В пособии описываются современные технологии изучения ДНК геномов (современные ДНК-биотехнологии). Рассматриваются этапы развития биотехнологии, дается описание ее разделов с уделением основного внимания генной инженерии как главному направлению биотехнологии. Подробно описываются методы и достижения генной инженерии на примере генетически модифицированных организмов. Закреплению знаний способствуют контрольные вопросы и задания для самоподготовки.

Пособие ориентировано на магистрантов, аспирантов, соискателей и студентов, изучающих проблемы современной биологии.

УДК 577.21
ББК 28.04я73

ISBN 978-985-6820-52-9

© Е.Н.Макеева, С.Е.Дромашко, 2013
© ГУО «Институт подготовки научных
кадров НАН Беларуси», 2013

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 СОВРЕМЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ – НАУКА И ТЕХНОЛОГИЯ.....	7
1.1 Возникновение биотехнологии.....	7
1.2 Разделы биотехнологии.....	7
Контрольные вопросы.....	10
2 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ – ОСНОВА СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ	11
2.1 Методы генетической инженерии	12
2.2 Достижения генетической инженерии	13
2.3 Генно-модифицированные организмы и их компоненты: продовольственное сырье и пищевые продукты	15
Контрольные вопросы.....	18
3 ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ	19
3.1 Современные методы изучения ДНК геномов на примере трансгенных растений.....	19
3.2 Инструментальная база современных технологий изучения ДНК геномов.....	28
3.3 Алгоритм исследования ДНК геномов	49
3.4 Алгоритм исследования ДНК геномов трансгенных растений.....	50
3.5 Качественные методы молекулярно-генетического анализа ДНК геномов растительных пищевых продуктов на наличие ГМИ.....	51
3.6 Количественный молекулярно-генетический анализ ДНК геномов растительных пищевых продуктов на наличие ГМИ.....	52
Контрольные вопросы.....	55

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ.....	57
СЛОВАРЬ ОСНОВНЫХ ТЕРМИНОВ.....	58
ЛИТЕРАТУРА.....	64

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология как наука является важнейшим разделом современной биологии, которая, как и физика, стала в конце XX в. одним из ведущих приоритетов в мировой науке и экономике. Всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в 80-х гг., когда переход в науке и практике к новым методологическим подходам обеспечил реальную возможность извлечь из этого максимальный экономический эффект. В традиционном, классическом, понимании биотехнология — это наука о методах и технологиях производства различных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов и процессов.

Термин "современная" биотехнология в противоположность "старой" биотехнологии применяют для различения биопроцессов, в которых используются современные методы генной инженерии и новая биопроцессорная техника по сравнению с традиционными. Например, обычное производство спирта в процессе брожения — "старая" биотехнология, но использование в этом процессе дрожжей, улучшенных методами генной инженерии с целью увеличения выхода спирта, — это уже современная биотехнология.

Современные технологии изучения геномной ДНК — ключевое направление как в научных исследованиях, так и в приборостроении. Результаты фундаментальных исследований внедряются в практику (сельское хозяйство, микробиологическая промышленность, биофармацевтика), но этот процесс происходил бы намного медленнее, если бы не параллельное развитие и совершенствование биологического приборостроения и разработка наборов реактивов (китов) для молекулярной биологии.

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для изучающих курсы «Современные проблемы биологии», «Геномика, медицинская биология и биотехнология» в магистратуре Национальной академии наук Беларуси.

Приведенная в пособии информация позволит углубить специальные знания магистрантов при изучении тем «Современные методы исследования генома», «Геном человека», «Современные подходы к изучению эволюции живых организмов», «Получение и использование трансгенных организмов. Генетически модифицированные организмы и проблемы биобезопасности».

Основная часть иллюстраций заимствована из статей и сайтов, приведенных в списках основной и дополнительной литературы, и интернет-ресурсов.

1 СОВРЕМЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ – НАУКА И ТЕХНОЛОГИЯ

1.1 Возникновение биотехнологии

Современная биотехнология – это новое научно-техническое направление, возникшее в 60–70-х гг. прошлого столетия. Ее можно определить как производственное использование целых живых организмов (микроорганизмы, растительные клетки, животные клетки), их частей (клеточные мембраны, рибосомы, митохондрии, хлоропласты) и продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач и получения ценных продуктов, а также создание живых организмов с необходимыми свойствами методами генной инженерии. Для этого в биотехнологических процессах используются такие биологические макромолекулы, как рибонуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) и белки (чаще всего ферменты).

Современная биотехнология на основе применения знаний и методов биохимии и генетики позволяет с помощью легкодоступных и возобновляемых ресурсов получать вещества для обновления промышленного производства.

С привлечением биотехнологии увеличилась производительность сельскохозяйственного производства настолько, что позволяет решать наиболее острую, продовольственную, проблему современного мира. Можно считать, что настоящая эра современной биотехнологии началась с публикации в 1973 г. статьи С. Козна и Г. Бойера (Stanley N. Cohen and Herbert W. Boyer), посвященной генетической модификации растений. С тех пор сельскохозяйственная биотехнология развивалась семимильными шагами. Современная сельскохозяйственная биотехнология позволяет получать продукты питания с улучшенными питательными и вкусовыми качествами, выращивать растения, естественным образом защищенные от вредителей и заболеваний и обладающие многими другими полезными для человека свойствами.

1.2. Разделы биотехнологии

Биотехнология охватывает широкий диапазон сфер, где она используется, вследствие чего в ней можно выделить разделы, перечисленные ниже.

1. Промышленная биотехнология (ПБ). В этом разделе условно выделяют следующие основные направления: биотехнология пищевых продуктов, препаратов для сельского хозяйства, препаратов и продуктов для промышленного и бытового использования, лекарственных

препаратов, средств диагностики и реактивов. ПБ включает также выщелачивание и концентрирование металлов, защиту окружающей среды от загрязнения, деградацию токсических отходов и увеличение добычи нефти.

2. Культивирование животных клеток. Признание идеи о том, что клетки тканей высших животных можно выделить из организма и затем создать условия для их роста и воспроизводства *in vitro*, относится к первым десятилетиям XX в. После того как стало известно, что подобные процессы реальны, наступил этап работ, начало которому положила демонстрация возможности выращивания и репродукции в таких клетках фильтрующихся инфекционных агентов – вирусов. Затем была показана практическая возможность получения в клетках животных больших количеств вирусного материала для изготовления вакцин. Следующим этапом стал период, когда разработали методы внедрения в клетки определенных генов и вызвали их экспрессию, а также была подтверждена возможность выращивания в культуре из одиночной клетки целой популяции.

3. Культуры растительных клеток. Культуры клеток высших растений имеют две сферы применения:

1. Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обусловило ведущую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и физиологии, молекулярной биологии и цитологии растений. Популяциям растительных клеток присущи специфические особенности: генетические, эпигенетические и физиологические. При длительном культивировании гетерогенной популяции идет размножение клеток, фенотип и генотип которых соответствуют конкретным условиям выращивания, т.е. можно рассматривать такой процесс как эволюцию популяции. Это в свою очередь позволило считать культуры клеток новой экспериментально созданной биологической системой со своими особенностями, которые интенсивно изучаются. Культуры клеток и тканей служат также адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения.

2. Рассмотрение культивируемых клеток высших растений как типичных, достаточно простых микрообъектов, размножаемых в культуре, позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии. Вместе с тем культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению.

Можно назвать несколько направлений создания новых технологий на основе культивируемых тканей и клеток растений:

1) получение биологически активных веществ растительного происхождения;

2) ускоренное клональное микроразмножение растений, позволяющее из одного экспланта получать от 10 тысяч до миллиона растений в год; причем все они будут генетически идентичны;

3) получение безвирусных растений;

4) получение эмбриокультуры и оплодотворение *in vitro* для преодоления постгамной несовместимости или щуплости зародыша и получения растений после проведения отдаленной гибридизации. При этом оплодотворенная яйцеклетка вырезается из завязи с небольшой частью ткани перикарпа и помещается на питательную среду. В таких культурах можно также наблюдать стадии развития зародыша;

5) использование антерных культур (культур пыльников и пыльцы) для получения гаплоидов и дигаплоидов;

6) мутагенез и селекция: тканевые культуры могут производить регенеранты, фенотипически и генотипически отличающиеся от исходного материала в результате соматонального варьирования. При этом в некоторых случаях можно обойтись без мутагенной обработки;

7) криоконсервация и другие методы сохранения генофонда;

8) иммобилизация растительных клеток;

9) соматическая гибридизация на основе слияния растительных протопластов;

10) конструирование клеток путем введения различных клеточных органелл;

11) генетическая трансформация на хромосомном и геномном уровнях;

12) изучение системы «хозяин – паразит» с использованием вирусов, бактерий, грибов и насекомых.

4. Генная, или генетическая, инженерия. Методы генной инженерии используются для преобразования клеток живых организмов на геномном уровне, придания им свойств, необходимых человеку.

На основании информации, изложенной выше, можно следующим образом представить области применения результатов геномных исследований в биотехнологии:

Медицина:

- улучшение диагностики и терапии;
- разработка превентивных мер;
- генная терапия.

Сельское хозяйство:

- чистые генетические линии животных и растений;
- разработка диагностических тест-систем;
- создание съедобных вакцин;
- повышение урожайности и качества стресс-устойчивых сортов сельскохозяйственных культур.

- Пищевая промышленность:
- систематика микроорганизмов;
 - улучшение питательных свойств пищевых продуктов;
 - разработка пищевых биологически активных добавок и ферментов.
- Экология:
- биологическая аккумуляция токсинов;
 - поддержка биологического и экологического баланса окружающей среды;
 - очистка территорий, загрязненных вследствие хозяйственной деятельности человека, техногенных или природных катастроф.

Контрольные вопросы

1. Что такое биотехнология?
2. Каково содержание термина «современная биотехнология»?
3. Назовите основные разделы биотехнологии.
4. Какие основные разделы включает промышленная биотехнология?
5. Что дала современная биотехнология сельскому хозяйству?
6. Как используются животные клетки в биотехнологических целях?
7. Какие сферы применения имеют культуры клеток высших растений?
8. Для чего используются методы генной инженерии?

2 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ – ОСНОВА СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Генетическая инженерия – конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур – рекомбинантных ДНК, т.е. искусственно созданных генетических программ. Это система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать в лабораторных условиях (в пробирке) искусственные генетические структуры в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК и переносить созданные конструкции генов в живой организм, в результате чего достигается их включение в геном и активное функционирование в организме и его потомстве. Рекомбинантные ДНК становятся составной частью реципиентного организма и придают ему новые уникальные генетические, биохимические и физиологические свойства.

Возможность прямой (горизонтальной) передачи генетической информации от одного биологического вида другому доказана опытами Ф. Гриффита с пневмококками (1928 г.). Однако генная инженерия как технология рекДНК начала свою историю с 1972 г., когда в лаборатории П. Берга (Станфордский университет, США) получили первую рекомбинантную ДНК (рекДНК), в которой были соединены фрагменты ДНК фага лямбда и кишечной палочки с кольцевой ДНК обезьяньего вируса SV40. Наиболее активно достижения генной инженерии внедряют в практику в 80-х гг. XX в., а с 1996 г. в сельском хозяйстве начинают использовать генетически модифицированные растения, коммерческое производство которых возросло к настоящему времени почти в сто раз.

С помощью генетической инженерии созданы также линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, и породы животных с полезными для человека признаками. Например, микроинъекция рекомбинантной ДНК, содержавшей ген соматотропина быка, в зиготу кролика позволила получить трансгенное животное с гиперпродукцией этого гормона. Полученные животные обладали ярко выраженной акромегалией.

Таким образом, задачей генной инженерии является генетическая модификация организмов, которая направлена в основном на:

- (а) придание растениям устойчивости к ядохимикатам (например, к определенным гербицидам);
- (б) придание растениям устойчивости к вредителям и болезням (например, Bt-модификация);
- (в) повышение продуктивности животных (например, быстрый рост трансгенного лосося);
- (г) придание организмам иных особенных качеств.

2.1 Методы генетической инженерии

Методы генетической инженерии основаны на получении фрагментов исходной ДНК и их модификации. Для получения исходных фрагментов ДНК разных организмов используется несколько способов:

- получение фрагментов ДНК из природного материала путем разрезания исходной ДНК с помощью специфических нуклеаз (рестриктаз); специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- прямой химический синтез ДНК, например, для создания зондов;
- синтез комплементарной ДНК (кДНК) на матрице мРНК с использованием фермента обратной транскриптазы (ревертазы).

Секвенирование очищенного фрагмента ДНК позволяет определить в нем порядок нуклеотидов и последовательность кодируемых аминокислот, а также границы изучаемого гена. Определение нуклеотидного состава фрагментов ДНК по классической методике ранее производилось с помощью радиоактивных зондов – молекул ДНК с заранее известной структурой, в состав которых входят радиоактивные изотопы фосфора или водорода. Если структура выделенного фрагмента хотя бы частично комплементарна структуре зонда, то происходит ДНК-ДНК-гибридизация, и на микрофотографии препарата появляется засветка от радиоактивного изотопа. В настоящее время для определения нуклеотидных последовательностей ДНК широко используют флуоресцентные метки как безопасные для здоровья человека.

Важным этапом генно-инженерных исследований является конструирование рекомбинантной ДНК, основанное на связывании комплементарных последовательностей одноцепочечных фрагментов и получения двухцепочечной гибридной ДНК. Затем эту рекомбинантную ДНК клонируют путем амплификации *in vitro* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или введением фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая затем воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий. После выделения рекомбинантной ДНК ее вводят в клетки или организмы при помощи векторов переноса ДНК. В состав вектора входит не менее трех групп генов:

1. Целевые гены, которые интересуют экспериментатора.
2. Гены, отвечающие за репликацию вектора, его интеграцию в ДНК клетки-хозяина и экспрессию требуемых генов.
3. Гены-маркеры (селективные, репортерные гены), по экспрессии которых можно судить об успешности трансформации (например, гены устойчивости к антибиотикам или гены, отвечающие за синтез белков, светящихся в ультрафиолетовом свете).

Для внедрения векторов в прокариотические или эукариотические клетки используют такие способы, как:

1. *Биотрансформация*: используются векторы, способные проникать в клетки. К биотрансформации относится и агробактериальная трансформация.
2. *Микроинъекции*: используются в том случае, когда клетки, подлежащие трансформации, достаточно крупные (например, икринки, пыльцевые трубки).
3. *Биобаллистика (биолистика)*: векторы «вбивают» в клетки с помощью специальных «пушек».

В качестве векторов часто используют плазмиды (небольшие кольцевые молекулы ДНК прокариотических клеток), а также ДНК вирусов. У эукариот в качестве векторов используют мобильные генетические элементы – участки хромосом, способные образовывать множество копий и встраиваться в другие хромосомы. В составе одного вектора можно комбинировать различные фрагменты ДНК, т.е. различные гены.

Векторы переноса с внедренными фрагментами ДНК различными способами вводят в прокариотические или эукариотические клетки и получают трансгенные клетки. В ходе размножения трансгенных клеток происходит клонирование требуемых фрагментов ДНК и, следовательно, генов, локализованных в этих фрагментах. Клонированные гены эукариот подвергают различным модификациям (например, добавляют перед ними определенные промоторы) для того, чтобы внедрить в клетки-продуценты. Основная проблема здесь состоит в том, чтобы чужеродные гены экспрессировались постоянно, а продукты их экспрессии не наносили ущерб клетке-хозяину.

2.2 Достижения генетической инженерии

Как уже отмечалось, цель прикладной генетической инженерии заключается в придании организмам свойств, полезных человеку, путем внедрения в их генетический аппарат специально сконструированных рекомбинантных молекул ДНК. Таким образом были получены так называемые «биологические реакторы» – микроорганизмы, растения и животные, продуцирующие, например, фармакологически значимые для человека вещества.

Методы генетической инженерии позволяют создавать ДНК-вакцины, проводить генетическую паспортизацию любого организма, диагностировать генетические заболевания с целью разработки в будущем методов генотерапии для тех видов заболеваний, которые не поддаются традиционному лечению.

Даже краткий перечень практических достижений современной генной инженерии, приведенный ниже, показывает, насколько важны полученные результаты:

- в последнее десятилетие бурно развивается направление получения трансгенных (модифицированных генно-инженерными методами) сортов сельскохозяйственных растений, которые уже во многих странах внедрены в коммерческое производство;
- набирает темпы направление получения трансгенных пород животных с заданными, ценными для человека признаками;
- созданы банки генов, или клонотеки, представляющие собой коллекции клонов бактерий. Каждый из этих клонов содержит фрагменты ДНК определенного организма (дрозофилы, человека и других), которые при необходимости могут быть использованы;
- на основе трансформированных штаммов вирусов, бактерий и дрожжей осуществляется промышленное производство инсулина, интерферона, гормональных препаратов. На стадии испытаний находится производство белков (например, позволяющих сохранить свертываемость крови при гемофилии) и других лекарственных препаратов;
- созданы трансгенные высшие организмы (растения, некоторые рыбы и млекопитающие), в клетках которых успешно функционируют гены организмов, относящихся к другим таксономическим группам – носителям нужного признака. Широко известны генетически модифицированные растения (ГМР), устойчивые к действию определенных гербицидов (глифосата, например), а также Bt-модифицированные растения, устойчивые к вредителям;
- разработаны методы клонирования строго определенных участков ДНК; так, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) используют практически во всех генно-инженерных экспериментах.

Генетическая инженерия относится к технологиям высокого уровня. В противоположность технологиям низкого уровня, высокие биотехнологии характеризуются большой наукоёмкостью, т.е. использованием рабочих систем, полученных с использованием самых современных методов экологии, генетики, микробиологии, цитологии, молекулярной биологии. Материалы, применяемые в высоких биотехнологиях, часто нуждаются в специальной подготовке, для проведения которой требуются особые и часто дорогие реактивы, а эффективная реализация технологий высокого уровня возможна только при использовании специального технологического оборудования, обслуживаемого квалифицированными специалистами. Расширение высокотехнологичного производства в свою очередь сопровождается его автоматизацией и компьютеризацией.

2.3 Генно-модифицированные организмы и их компоненты: продовольственное сырье и пищевые продукты

Технологии генетического модифицирования (ГМ-технологии) используются как в рамках обычного сельскохозяйственного производства, так и в других областях человеческой деятельности: в различных областях науки, при планировании и проведении природоохранных мероприятий, в здравоохранении, в промышленности. Любые технологии высокого уровня могут быть опасными для окружающей среды и человека, поскольку последствия их применения не предсказуемы на начальном этапе их исследования. Поэтому технологии генной инженерии, или ГМ-технологии, вызывают у населения вполне понятные опасения и открытое недоверие, а перед учеными стоит задача исследовать и оценить риски коммерческого использования трансгенных организмов для сохранения устойчивого биоразнообразия и здоровья человека.

Широкое применение современных методов генной инженерии в растениеводстве признается сегодня наиболее перспективным направлением в увеличении производства продовольственного сырья и пищевых продуктов. Выращивание растений, модифицированных генно-инженерными методами (ГМО) и обладающих новыми привнесенными признаками (устойчивость к пестицидам, вредителям, климатическим стрессам), выгодно экономически, поскольку требует значительно меньших ресурсов топлива, агрохимикатов и трудозатрат, чем для возделывания традиционных растений. Поэтому площади возделывания ГМО в мире за последние 12 лет возросли более, чем в 9 раз, а следовательно возросли и объемы сельскохозяйственной продукции, полученной на их основе.

Как сообщает Международная служба по освоению агробιοтехнологических разработок (ISAAA, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications), в 2012 г. страны мира отвели под ГМ-культуры 170,3 млн га, что составило более 11,5% всех пахотных земель планеты. Эта цифра увеличилась на 10,3 млн га по сравнению с 2011 г. Значимость этой цифры можно оценить, если сравнить их с данными Минсельхозпрода Республики Беларусь, согласно которым посевные площади в Беларуси составляют около 5 млн га.

По данным ISAAA в 2012 г. на мировом рынке были доступны 320 генетически модифицированных линий 25 видов растений, в том числе следующих трансгенных сельскохозяйственных культур (ТГК): 22 линии сои, 31 – картофеля, 121 – кукурузы, 3 – сахарной свеклы, 7 – риса, 11 – томатов, 34 – рапса, 1 – пшеницы, 2 – дыни, 3 – цикория, 4 – папайи, 1 – сладкого перца, 1 – льна, 48 линий хлопчатника.

Из них массово выращиваются соя, кукуруза, хлопчатник и рапс, которые занимают свыше 99% посевных площадей, занятых под ГМО.

Во избежание потенциального неблагоприятного воздействия продуктов питания, полученных на основе ГМО, на здоровье человека, животных, а также самих ГМО – на биоразнообразие естественной природы, при государственном регулировании генно-инженерной деятельности предусмотрены специальные ограничения допуска ГМ-растений на продовольственный рынок и на выпуск в окружающую среду новых трансгенных организмов.

По поручению ООН Всемирная продовольственная и сельскохозяйственная организация (ФАО) и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) проводят постоянный мониторинг генно-инженерных организмов и ежегодно публикуют отчеты по ГМО. В результате все ГМО, в отношении которых доказано отрицательное воздействие на здоровье человека, не допускаются к использованию, а уже использующиеся подлежат ликвидации. Исходя из принципа предосторожности, ГМО тщательно проверяются на пищевую и экологическую безопасность. Именно поэтому на третьем десятке лет существования трансгенных растений одобрение на их культивирование получило всего около двух с половиной сотен сортов (причём не все из них пищевые), хотя полевых испытаний разного рода проведено уже несколько десятков тысяч. В законодательствах всех стран введены положения, согласно которым продукты питания, содержащие генетически-модифицированные ингредиенты (ГМИ), соответствующим образом маркируются: в странах ЕС и РФ, например, маркируются продукты питания, в которых процент ГМИ превышает 0,9% (рисунок 1).

	Продукты, используемые в странах ЕС, а также в Российской Федерации и большинстве стран СНГ, обязательно маркируются при наличии содержания в них ГМИ более 0,9%
---	--

Рисунок 1 – Маркировка продукта, в котором выявлено наличие ГМИ

Несмотря на существенные различия в подходах к регулированию ГМО, во всех национальных системах биобезопасности разных стран, в том числе в Республике Беларусь, предмаркетинговый этап является определяющим в обеспечении безопасности импортируемых и экспортируемых ГМ-продуктов. В Беларуси этот этап включает проведение анализов всей поступающей в страну продукции из кукурузы и сои, а также содержащей их компоненты, на наличие трансгенной вставки, маркерами которой являются ДНК 35S промотора или NOS терминатора (рисунок 2). Таким образом осуществляется систематический контроль за оборотом продовольственного сырья и пищевых продуктов из ГМО или содержащих их компоненты, допущенных на рынок, а также за использованием специальной маркировки о наличии ГМО (маркировка «Без ГМО» допускается по желанию продавца).

LB	Промотор селек. Гена (35S)	Селект. Ген (NPTII)	Терм. посл. селективного гена (NOS, OCS)	Промотор трансгена (35S)	Трансген (Cry, EPSPS, Bar)	Терм.посл. трансгена (NOS)	RB
----	----------------------------	---------------------	--	--------------------------	----------------------------	----------------------------	----

Рисунок 2 – Типичная трансгенная вставка

Законодательство Республики Беларусь в отношении маркировки ГМ-продуктов и продовольственного сырья обеспечивает реализацию права граждан на получение достоверной информации о продовольственном сырье и пищевых продуктах, в том числе о содержании в них ГМ-ингредиентов (ГМИ). Контроль оборота на рынке страны продовольственного сырья и пищевой продукции, в том числе содержащей ГМИ, регулируется следующими нормативными актами:

1. Постановление Совета Министров Республики Беларусь «О некоторых вопросах информирования потребителей о пищевом сырье и пищевых продуктах» №434 от 28 апреля 2005 г.;
2. Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь и Госстандарта Республики Беларусь «Об утверждении перечня продовольственного сырья и пищевых продуктов, подлежащих контролю на наличие генетически модифицированных составляющих (компонентов)» №12/26 от 8 июня 2005 г.;
3. Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь «О государственной гигиенической регламентации и регистрации продовольственного сырья и пищевых продуктов, полученных из или с использованием генетически модифицированных источников» №116 от 2 сентября 2003 г.

В отличие от стран Европейского союза и Российской Федерации, где допускается отсутствие маркировки, если в продукте содержится ГМИ меньше 0,9%, в Республике Беларусь была установлена *беспороговая* система допустимых уровней ГМ-ингредиентов, согласно которой следовало маркировать все продукты, в которых обнаружены ГМИ. Однако после вступления Республики Беларусь в Таможенный союз в стране должны быть введены правила маркировки, соответствующие принятым в РФ.

Контрольные вопросы

1. Почему генетическая инженерия заняла центральное место среди других направлений биотехнологии?
2. Какие научно-исследовательские работы положили начало технологии рекомбинантной ДНК?
3. Что является основной задачей генетической инженерии?
4. Какой процесс лежит в основе методов генетической инженерии?
5. Назовите основные этапы получения рекомбинантной ДНК.
6. Какие генетические структуры часто используют в качестве векторов переноса ДНК? Какие группы генов обязательно должны входить в состав вектора переноса?
7. Перечислите способы внедрения векторов в прокариотические или эукариотические клетки.
8. Что понимают под термином «клонирование генов»?
9. Дайте краткую характеристику достижений генетической инженерии.
10. Биотехнология относится к технологиям высокого уровня. Что понимается под этим определением?
11. Какие преимущества имеют генно-модифицированные растения? А что вызывает опасения ученых и населения?
12. Какие требования предъявляются к маркированию ГМО-продуктов? Дайте сравнительный анализ этих требований в законодательствах разных стран.
13. Какую структуру имеет типичная трансгенная вставка?
14. Осуществляется ли в Беларуси контроль оборота на рынке продуктов питания, продовольственного сырья и кормов, содержащих ГМИ?
15. Где можно получить достоверную информацию о ГМО в Беларуси? В мире? (Назовите источники информации).

3 ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Любое научное исследование предполагает наличие изучаемого объекта и использование определенных методических приемов и оборудования, позволяющего применить эти приемы. В настоящее время исследователь располагает огромными возможностями в выборе методов и оборудования, которые определяют направления практической реализации научных идей и теорий в современной генетике, центром которой является геномика.

3.1 Современные методы изучения ДНК геномов на примере трансгенных растений

Все методы, используемые для детекции ГМО и генетически модифицированных ингредиентов, подразделяют на качественные и количественные.

Качественные методы основаны на детекции определенной трансгенной вставки, указывающей на наличие трансгенного события, произошедшего в геноме изучаемого объекта. Эти события условно называют «мишенью», которую выявляют во время проведения ПЦР между ДНК, выделенной из анализируемого продукта, и ДНК праймера, выбранного в зависимости от ДНК-мишени. В настоящее время перечень мишеней включает участки ДНК, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень ДНК-мишеней праймера и генов-маркеров

№ пп.	Участок ДНК, являющийся мишенью праймера, а также известные гены-маркеры	Исследуемая культура	Наименование линии с трансгенной вставкой
1.	35S промотор вируса мозаики цветной капусты <i>Cauliflower mosaic virus</i>	Соя, кукуруза	GTS40-3-2 и другие
2.	35S промотор вируса мозаики цветной капусты <i>Cauliflower mosaic virus</i> + терминатор нопалин-синтазы (Т-nos) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Кукуруза, соя	Bt11; Mon ₈₁₀ ; GA ₂₁
3.	Хлоропластный интрон tRNA-Lei у картофеля	Картофель	B33-INV
4.	35S промотор вируса мозаики норичника <i>Figwort mosaic virus</i>	Масличный рапс	GT73

Продолжение таблицы 1

5.	Ген неоминфосфотрансферазы II - <i>nptII</i>	Томат	Tomato Nema 282F
6.	Терминатор нопалин-синтазы <i>T-nos</i>	Соя; томат; кукуруза	GTS-40-3-2; Tomato Nema 282F; NK603
7.	Ген фосфинотрицин N-ацетилтрансферазы (<i>bar</i>) от <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Рис	Ms8; LLRICE62
8.	Участок (вставка) между последовательностью нуклеотидов, кодирующей хлоропластный промежуточный сигнальный пептид гена 2 (<i>CTP₂</i>) от <i>Arabidopsis thaliana</i> , и геном <i>CP₄ epsps</i> от <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Масличный рапс; кукуруза	GT73; NK603
9.	Участок между интроном 2 (<i>IVS₂</i>) гена алкоголь дегидрогеназы 1 (<i>adh1</i>) и геном фосфинотрицин N-ацетилтрансферазы (<i>pat</i>) от <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Кукуруза	Bt11
10.	Участок (вставка) между промотором кальциезависимой протеинкиназы (<i>P-CDPK</i>) кукурузы и синтетическим геном <i>cryIA(b)</i>	Кукуруза	Bt176
11.	Пограничная область между геном фосфинотрицин N-ацетилтрансферазы (<i>pat</i>) от <i>Streptomyces viridochromogenes</i> и терминатором CaMV T-35S	Кукуруза	T25
12.	Участок (вставка) между составным геном <i>cryIA(b)/cryIA(c)</i> и участком ДНК, связывающим составной ген с терминатором нопалин-синтазы (<i>T-nos</i>)	Рис	Bt ₆₃

Окончание таблицы 1

13.	Участок (вставка) между 35S промотором вируса мозаики цветной капусты (CaMV P-35S) и последовательностью нуклеотидов, кодирующей хлоропластный промежуточный сигнальный пептид (CTP) петунии садовой <i>Petunia hybrida</i>	Соя	GTS-40-3-2
14.	Участок (вставка) между копией гена полигалактуроназы (PG) от <i>Solanum lycopersicum L.</i> и терминатором нопалин-синтазы (<i>T-nos</i>)	Томат	Tomato Nema 282F
15.	5'-пограничный участок интеграции (IBR) между CaMV P-35S+вставка, соответствующая линии кукурузы MON ₈₁₀ , и основным геномом кукурузы	Кукуруза	MON ₈₁₀
16.	3'-пограничный участок интеграции (IBR) между терминатором гена E ₉ (<i>T-E₉</i>) + вставка, соответствующая линии GT ₇₃ масличного рапса, и основным геномом масличного рапса	Масличный рапс	GT ₇₃
17.	Ген инвертазы <i>ivr1</i>	Кукуруза	Bt ₁₇₆ ; Bt ₁₁
18.	Ген <i>hmgA</i> , кодирующий белки с доменом HMG (high mobility group proteins)	Масличный рапс	GT ₇₃
19.	Ген сахарозофосфатной синтазы (<i>SPS</i>)	Рис	₃ M, Balilla, Guangluai ₄ , Shennong ₂₆₅
20.	Ген лектина сои (<i>Lel</i>)	Соя	GTS40-3-2
21.	Ген LAT ₅₂ томата	Томат	LAT52
22.	Ген полигалактуроназы (<i>PG</i>) томата	Томат	Tomato Nema 282F

Для выявления этих мишеней разработаны наборы реагентов (киты), позволяющие быстро и качественно выделять ДНК из исследуемого продукта, очищать, амплифицировать и проводить её анализ путём электрофореза в агарозном геле. Сравнение со стандартными образцами (отрицательный контроль – отсутствие трансгенной вставки,

положительный контроль – наличие трансгенной вставки) указывает на наличие или отсутствие трансгенной вставки в анализируемом образце.

Количественные методы основаны на регистрации и количественной оценке продуктов искомым трансгенных вставок во время протекания ПЦР в режиме реального времени (PCR-RT). В настоящее время у разных культур трансгенных растений искомыми являются вставки, соответствующие трансгенным линиям, указанным в таблице 2.

Таблица 2 – Перечень наиболее часто используемых ДНК-мишеней при проведении ПЦР в режиме реального времени

№ пп.	Участок ДНК, являющийся мишенью праймера	Исследуемая культура	Наименование линии с трансгенной вставкой
1.	Участок между интроном 6 (IVS6) гена алкоголь дегидрогеназы 1 (<i>adh1-1S</i>) и синтетическим геном <i>cry IA(b)</i>	Кукуруза	Bt11
2.	3'-граница области интеграции вставки, соответствующей линии Bt11, и основным геномом кукурузы	Кукуруза	Bt11
3.	5'-граница области интеграции вставки, соответствующей линии Bt11, и основным геномом кукурузы	Кукуруза	Bt11
4.	Участок, соединяющий синтетический ген <i>cryIA(b)</i> и интрон N.9 фосфоенолпируват карбоксилазы	Кукуруза	Bt176
5.	Участок между вставкой, соответствующей генетической модификации 59122, и основным геномом кукурузы	Кукуруза	59122
6.	Участок между последовательностью нуклеотидов, кодирующей оптимизированный промежуточный пептид, и геномом кукурузы с точечной мутацией <i>epsps</i> (<i>mEPSPS</i>)	Кукуруза	GA21

Продолжение таблицы 2

7.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии GA21, и основным геномом кукурузы	Кукуруза	GA21
8.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии LY038, и основным геномом сорта кукурузы с маркерным геном <i>hmgA</i>	Кукуруза	LY038
9.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MIR604, и основным геномом сорта кукурузы с маркерным геном <i>adh1</i>)	Кукуруза	MIR604
10.	Пограничная область между интроном 1 гена кукурузы <i>hsp70</i> (ген <i>IVS-HSP</i>) и синтетическим геном <i>cryIA(b)</i>	Кукуруза	MON810
11.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON810 (гены <i>IVS-HSP</i> и <i>cryIA(b)</i>), и основным геномом кукурузы	Кукуруза	MON810
12.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON863, и основным геномом кукурузы	Кукуруза	MON863
13.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON88017, и основным геномом кукурузы	Кукуруза	MON88017
14.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON89034, и основным геномом кукурузы	Кукуруза	MON89034
15.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии NK 63 (ген <i>adh1</i>), и основным геномом кукурузы	Кукуруза	NK63

Продолжение таблицы 2

16.	Пограничный участок между геном фосфинотрил N-ацетилтрансферазы (<i>pat</i>) от <i>Streptomyces viridochromogenes</i> и терминатором CaMV T-35S (ген <i>zSSIb</i>)	Кукуруза	T25
17.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии T25, и основным геномом кукурузы с маркерным геном сорта <i>adh1</i>	Кукуруза	T25
18.	Участок между вставкой, соответствующей линии TC1507, и основным геномом кукурузы с маркерным геном сорта <i>hmgA</i>	Кукуруза	TC1507
19.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии 3272, и основным геномом кукурузы с маркерным геном сорта <i>adh1</i>	Кукуруза	3272
20.	Участок, включающий в себя последовательности нуклеотидов 3' <i>bla</i> и 5' <i>bla</i>	Соя	A2704-12
21.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии A5547-127, и основным геномом сои с маркерным геном сорта – геном лектина <i>Le1</i>	Соя	A5547-127
22.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии 305443, и основным геномом сои с маркерным геном сорта – геном лектина <i>Le1</i>	Соя	305443
23.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии 356043, и основным геномом сои с маркерным геном сорта – геном лектина <i>Le1</i>	Соя	356043

Продолжение таблицы 2

24.	Пограничный участок между последовательностью нуклеотидов, кодирующей хлоропластный промежуточный сигнальный пептид гена <i>epsps</i> петунии садовой <i>Petunia hybrida</i> и геном CP ₄ <i>epsps</i> (CP ₄ -EPSPS) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> – гены-мишени CTP и CP ₄ -EPSPS	Соя	GTS 40-3-2
25.	Пограничный участок между промотором 35S вируса мозаики цветной капусты <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> , и последовательностью нуклеотидов, кодирующей хлоропластный промежуточный сигнальный пептид гена <i>epsps</i> петунии садовой <i>Petunia hybrida</i> – ген-мишень CTP ₄	Соя	GTS 40-3-2
26.	5'-пограничная область между вставкой, соответствующей линии GTS 40-3-2, и основным геномом сои	Соя	GTS40-3-2
27.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии 89788, и основным геномом сои	Соя	89788
28.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии GNB 614, и основным геномом хлопка (маркерный ген сорта <i>adhC</i>)	Хлопок	GNB614
29.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии LLCotton25, и основным геномом хлопка (маркерный ген сорта <i>adhC</i>)	Хлопок	LLCotton25

Продолжение таблицы 2

30.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON531, и основным геномом хлопка (маркерный ген сорта <i>acp1</i>)	Хлопок	MON 531
31.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON ₁₄₄₅ , и основным геномом хлопка (маркерный ген сорта <i>acp1</i>)	Хлопок	MON 1445
32.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON15985, и основным геномом хлопка (маркерный ген сорта <i>acp1</i>)	Хлопок	MON15985
33.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии MON ₈₈₉₁₃ , и основным геномом хлопка (маркерный ген сорта <i>acp1</i>)	Хлопок	MON88913
34.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии 281-24-236, и основным геномом хлопка (маркерный ген-сорта – ген <i>SAH7</i>)	Хлопок	281-24-236
35.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии 3006-210-23, и основным геномом хлопка (маркерный ген сорта – ген <i>SAH7</i>)	Хлопок	3006-210-23
36.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии GT73, и основным геномом масличного рапса (маркерный ген сорта – ген <i>cruA</i>)	Масличный рапс	GT73

Окончание таблицы 2

37.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии Ms8, и основным геномом масличного рапса (маркерный ген сорта – ген <i>cruA</i>)	Масличный рапс	Ms8
38.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей Rf3 линии масличного рапса, и основным геномом масличного рапса (маркерный ген сорта - ген <i>cruA</i>)	Масличный рапс	Rf3
39.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии T45, и основным геномом масличного рапса (маркерный ген сорта – ген <i>cruA</i>)	Масличный рапс	T45
40.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии картофеля EN92-527-1, и основным геномом картофеля (маркерный ген сорта – ген <i>UGPase</i>)	Картофель	EN92-527-1
41.	3'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии LLRICE62, и основным геномом риса (маркерный ген сорта – ген <i>PLD</i>)	Рис	LLRICE62
42.	5'-пограничный участок между вставкой, соответствующей линии H7-1, и основным геномом сахарной свеклы (маркерный ген сорта – ген <i>GS</i>)	Сахарная свекла	H7-1

Для выделения ДНК и ее очистки используются те же наборы реагентов, которые применяются при проведении качественного анализа на наличие ГМ вставки, но в праймеры, применяемые для выявления трансгенных вставок, вставлены флуоресцентные метки, позволяющие при проведении ПЦР в режиме реального времени достаточно быстро определить наличие в данном продукте искомой трансгенной вставки по регистрации продукта(ов) амплификации, а также количественное соотношение трансгенной вставки и генома без нее. Эта величина имеет

ключевое значение для маркировки продовольственного сырья и продуктов питания, включающих ГМИ, или произведенных из ГМ сортов сельскохозяйственных растений или пород животных.

3.2 Инструментальная база современных технологий изучения ДНК геномов

Разрушение биологических объектов. Разрушение биологических объектов представляет собой первый этап эксперимента, и он может включать а) физическое и б) химическое (биохимическое) разрушение клеток или целых организмов.

Для разрушения клеток чаще всего применяют физические методы. При этом разрушение объекта раньше выполнялось с применением обычной ступки и пестика (растирание), затем появились приборы, которые эти объекты размельчают. Большинство животных клеток разрушается сравнительно легко, однако при разрушении растительных и бактериальных клеток зачастую приходится сталкиваться со значительными трудностями, связанными с наличием клеточных стенок. Физические методы разрушения клеток подразделяются в зависимости от того, происходит ли оно под действием сил трения между клетками и твердыми веществами (растирание клеток с твердыми материалами) или гидродинамически (разрушение клеток в жидких средах). Современная наука располагает богатым арсеналом размельчителей типа мельниц, вибрационных и ультразвуковых разрушителей тканей.

Растирание клеток с твердыми материалами. В современной модификации этот метод состоит в растирании клеток с песком или абразивным порошком в ступке при помощи пестика. В настоящее время благодаря появлению более мягких способов разрушения этот метод применяется для разрушения животных клеток довольно редко, однако им по-прежнему пользуются для разрушения растительных и бактериальных клеток. Желательно, чтобы абразивные частицы были как можно более острыми и имели такой же размер, что и растираемые клетки. Недостаток метода заключается в том, что при растирании клеток может нарушаться структура таких наиболее крупных органелл, как, например, хлоропласты.

Хорошие результаты дает *продавливание клеток, смешанных с абразивными частицами, через пресс Хьюза*. Влажные клетки с абразивными частицами помещают в трубку при температуре -5°C , а затем однократным ударом по поршню, создающим скачкообразное изменение давления, проталкивают клеточную массу через узкое отверстие диаметром около 0,25 мм. Модификацией этого метода является продавливание клеток при температуре -25°C ; роль абразивных частиц в этом случае выполняют кристаллы льда. Чтобы добиться

максимального разрушения бактериальных клеток, иногда приходится повышать давление до $5,5 \times 10^7$ Па. Клетки бактерий можно разрушать также и путем *механического встряхивания суспензий частиц с абразивным порошком* с частотой 300–3000 колебаний в минуту при помощи встряхивателя Микля, в который добавляются мелкие стеклянные бусинки диаметром от 50 до 500 мкм. Однако возникающая при встряхивании сильная вибрация часто вызывает разрушение клеточных органелл.

Разрушение клеток в жидких средах. Разрушение клеток, находящихся в суспензии, происходит либо при вращении лопастей или поршня (блендеры), либо при поступательном движении вверх и вниз поршня или шаров (гомогенизаторы).

Блендеры, как правило, имеют режущие лопасти, вращающиеся с большой скоростью. Количество и конструкция этих лопастей бывают разными, но все они обычно заострены под прямым углом друг к другу, а форма их обеспечивает хорошее перемешивание содержимого сосуда. Суспензию клеток помещают в специальный стакан, который имеет по всей высоте раструбы и в поперечном сечении выглядит как клеверный лист. Для поддержания низкой температуры в процессе гомогенизации стакан помещают в лед. Благодаря особому расположению лопастей и конструкции стакана в ходе фракционирования возникают гидродинамические силы. Метод достаточно универсален и широко применяется для фракционирования клеток, однако, при быстром вращении лопастей гомогенизаторов могут возникнуть некоторые нежелательные эффекты.

Большинство *гомогенизаторов* представляют собой прибор, состоящий из пестика с ручным (гомогенизаторы Даунса и Тёнбрэка) или механическим (гомогенизатор Поттера-Эльвегёйма) приводом, который вращается или движется вверх и вниз в стеклянном цилиндрическом сосуде. Зазор между пестиком и стенками сосуда должен оставаться постоянным, так как скорость разрушения клеток зависит не только от скорости вращения пестика, но и от соотношения между радиусами пестика и сосуда. Сосуд закрепляется неподвижно, поэтому скорость вращения суспензии изменяется от минимальной (у стенок сосуда) до максимальной (у поверхности пестика). Следовательно, чем меньше расстояние между этими поверхностями, тем выше градиент скорости. Возникающие при высоких скоростях силы достаточны для разрушения довольно тонких мембран животных клеток, однако растительные и бактериальные клетки гомогенизаторами не разрушаются. Эффективность гомогенизации в значительной степени зависит от наличия в измельчаемом материале сосудистой и соединительной ткани, для удаления которой образец перед гомогенизацией пропускают через специальную мясорубку с отверстиями диаметром 0,88 мм.

Полиморфоядерные лейкоциты разрушаются более мягкими методами – *при помощи пипетки*. Эозинофилы разрушают *путем быстрого пропускания под давлением через мелкорешетчатое сито*.

Разрушение клеток с помощью высокого давления. Этот метод применяется в основном для разрушения микробных клеток. Для этой цели применяются специальные прессы, например френч-пресс (French Press), в котором создается давление до $10,4 \times 10^7$ Па. Суспензию клеток загружают в камеру из нержавеющей стали при закрытом положении игольчатого клапана, посредством которого камера сообщается с внешней средой. Затем камеру переворачивают, открывают клапан и поршнем вытесняют из камеры воздух, после чего клапан снова закрывают, а камеру возвращают в исходное положение и устанавливают на неподвижном основании. С помощью гидравлического пресса создается требуемое давление на поршень; по достижении в камере определенного давления игольчатый клапан немного открывается, давление в камере несколько снижается, и в этот момент клетки лопаются. Вытекающую из выходного отверстия камеры клеточную массу собирают при открытом положении игольчатого клапана, поддерживая в камере постоянное давление. К сожалению, неизвестно, какие при этом силы возникают в камере и как им противостоят клетки и клеточные компоненты.

Разрушение с помощью ультразвука. Клетки можно разрушить также с помощью высокочастотных ультразвуковых колебаний. Механизм такого разрушения окончательно не выяснен, однако установлено, что при обработке клеточных суспензий ультразвуком в среде создается высокочастотное изменение давления. Основным недостатком ультразвукового метода является выделение значительного количества тепла. Чтобы избежать разогревания суспензии, сосуд с ней помещают в лед; конструкция сосуда такова, что жидкость непрерывно циркулирует и охлаждается у стенок. Некоторые сосуды помещают в холодильные камеры, однако далеко не всегда удается устранить местное нагревание.

Прочие методы включают разрушение клеток способом осмотического шока, переваривание клеточных стенок ферментами, например, лизоцимом или сложными ферментными препаратами, выделенными из улиток и содержащими целлюлазу, хитиназу и липазу. Для разрушения клеток некоторых видов успешно применяют замораживание и оттаивание, автолиз и обработку такими органическими растворителями, как, например, этилацетат и толуол.

Так как в большинстве случаев разрушение клеток сопровождается выделением тепла, а при высоких температурах многие ферменты инактивируются, то все процедуры по разрушению клеток и выделению клеточных органелл следует проводить при пониженных температурах.

Для этого все работы проводят в холодных комнатах при температуре около 0°C или охлаждают клеточные суспензии с помощью льда. Однако некоторые ферменты неустойчивы к холоду и при охлаждении утрачивают свою активность.

При гомогенизации разного рода биологических тканей возникает множество частных проблем, которые разрешаются в основном путем проб и ошибок. Достаточную воспроизводимость результатов можно получить лишь при тщательном контроле таких параметров, как температура, продолжительность и скорость разрушения клеток, а также применяемое рабочее давление. Идеальным считается гомогенат, который легко поддается дальнейшему фракционированию.

В современных лабораториях часто используют такие приборы, как TissueLaser II, выпускаемые компанией Qiagen (ФРГ), которые работают по принципу вибрационной мельницы. Они позволяют проводить разрушение и гомогенизацию любых биологических объектов (сухих, жидких и замороженных) и исключают кроссконтаминацию.

Среди компаний специализирующихся на выпуске разрушителей мельничного типа лидирующее положение занимает ряд производителей, некоторые образцы продукции которых представлены ниже, на рисунках 3–5.

	<p>Гомогенизатор HG-15A-Set Предназначен для измельчения пищевых, биологических продуктов и подготовки их к дальнейшему анализу. Аналоговый контроллер. 0–27000 об/мин. Предназначен для получения эмульсий и измельчения образцов в лабораторных условиях. Высокая скорость вращения измельчающих насадок позволяет добиться необходимого результата. Качественные материалы рабочих поверхностей обеспечивают продолжительную работу измельчающих насадок. Все модели защищены от перегрузки и перегрева. Гарантия производителя – 2 года.</p>
---	--

Рисунок 3 – Гомогенизатор фирмы ПромЭкоЛаб, РФ

	<p>Базовая модель MF 10 basic. Привод мельницы для тонкого измельчения (перемалывающая насадка заказывается отдельно). Универсальная мельница, предназначенная для продолжительной работы. К приводу мельницы можно присоединить две различные насадки. Насадки легко заменяются, что облегчает их очистку и повышает производительность устройства. Привод мельницы имеет значительную мощность (поверхность его легко очищается), и простую конструкцию. Технические характеристики: Диапазон скорости – 3000–6000 об/мин. Окружная скорость с режущей насадкой – 22,5 м/с. Окружная скорость с дробящей насадкой – 31,4 м/с. Рабочий цикл – 120 мин. работа/30 мин. пауза Габаритные размеры – 320×300×450 мм, вес – 11 кг. Допустимая температура окружающей среды – 5–40°С. Допустимая влажность – 80%. Класс защиты в соответствии с DIN 40050 – IP21. Напряжение/частота – 230 В/50–60 Гц.</p>
---	--

Рисунок 4 – Мельница лабораторная фирмы ИКА, поставляемая фирмой ИнфоЛаб (Infolab), РФ

	<p>Infinigen™ Tissue Mixer Mill – гомогенизатор для быстрого размельчения твердых, мягких и эластичных материалов, клеток биологических объектов, а также для выделения ДНК и РНК. Для этого используются емкости разных размеров, в которых происходит размельчение объектов. Гомогенизатор может быть использован для размельчения в жидкой и криогенной средах. Производительность: от 56 до 194 образцов за 2–4 мин. Размельчает биологические объекты любой твердости: от костей до бактериальных клеток. Защита от контаминации. Скорость вибрации может быть установлена в диапазоне от 100 до 1500 об/мин Время размельчения регулируется в пределах от 1 с до 99 мин. 99 с. К гомогенизатору прилагаются 2 штатива, 96 пробирок на 2,0 мл и две пробирки на 25 и 50 мл.</p>
---	--

Рисунок 5 – Гомогенизатор компании ActBio (США)

Для исследователей большое значение имеют не только технические характеристики гомогенизаторов, но их цена и сроки доставки. Два последних показателя имеют даже преобладающее значение, так как по техническим характеристикам большинство гомогенизаторов сходны.

Выделение ДНК. Для исследования геномной ДНК изучаемого образца необходимо ее выделить из него. Для этого используются ряд приемов и специальные реагенты.

Выделение ДНК ручным способом проводится во многих лабораториях, где нет необходимости проводить выделение ДНК из большого количества образцов, а тем более в одно время. Типовая методика такого типа выделения ДНК приводится в Инструкции по выявлению генетически модифицированных ингредиентов в растительном сырье и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси на основе СТБ ГОСТ Р 52173-2005 СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения (поправка ИУ ТНПА № 2-2010).

Однако внедрение молекулярно-генетических методов в современную медицину и биофармацевтическое производство потребовало новых методических решений для выделения ДНК из достаточно большого количества проб, а также одновременного создания приборов, автоматизирующих этот процесс.

Роботизированные станции выделения ДНК явились результатом совместной работы научных работников и инженеров в данной области и их начали выпускать несколько фирм. С биохимической стороны решение проблемы было найдено через создание реагентов, усиливающих у ДНК отрицательный заряд, а с инженерной стороны – были созданы модули и найдены частицы, адсорбирующие ДНК (в настоящее время – магнитные), с которых затем проводят элюцию ДНК соответствующим буфером. Была показана высокая степень чистоты ДНК, полученной на роботизированной станции, а также высокая производительность такой станции – в течение двух часов можно получить 48 образцов ДНК, готовых для амплификации. На этих же станциях можно выделять РНК и белки.

Среди компаний, выпускающих роботизированные станции, наиболее известными являются южнокорейские, американские, швейцарские (рисунки 6–10).

 <p>Компания Bioneer производит семейство автоматических роботизированных станций ExiPrep 16 для выделения нуклеиновых кислот и очистки белков, удобное и во многом уникальное решение для широкого круга пользователей.</p>	<p>Базовая модель станции оснащена магнитно-нагревательным элементом. Позволяет проводить быструю и качественную экстракцию ДНК/РНК из широкого спектра исходных материалов (клеточные культуры, ткани, растения, кровь).</p> <p>Продукция Bioneer характеризуется умеренными ценами и высоким качеством исполнения. Все приборы и реагенты производятся в соответствии с международными стандартами ISO9001, ISO13485 и сертифицированы для применения в Европе и США. Все процедуры в ExiPrep 16 проводятся в компактной закрытой камере оснащенной блоками УФ стерилизации, охлаждения и нагрева–намагничивания. Протокол осуществляет роботизированный восьмиканальный диспенсер.</p>
---	---

Рисунок 6 – Продукция компании Bioneer (Южная Корея)

	<p>Станция роботизированная Xiril (Neon 100 series) для выделения нуклеиновых кислот. Пробирки с образцами диаметром 12–16 мм или микропробирки (1,5 мл). Объем образца – от 200 мкл. Продолжительность цикла автоматического выделения: 1–2,5 часа (в зависимости от количества и типа исследуемых образцов).</p>
---	--

Рисунок 7 – Продукция компании Xiril (Швейцария)

	<p>The Freedom EVO 75 небольшая роботизированная станция, обладающая большой степенью функциональной лабильности. The Freedom EVO 75 (открытая платформа) разработана для выполнения часто повторяющихся операций с биологическими жидкими образцами современными химическими методами.</p> <p>Популярная автоматическая станция выполняет следующие операции:</p> <ul style="list-style-type: none"> • выделение нуклеиновых кислот; • ELISA реакции; • выполнение начальных этапов подготовки проб для ПЦР и реакций секвенирования; • раскапывание множества образцов; • многие другие функции.
---	---

Рисунок 8 – Продукция компании TECAN (Швейцария)


	<p>Promega Maxwell® 16 – автоматизированное выделение ДНК, РНК и рекомбинантных белков. Система выделения Promega Maxwell® 16 на основе магнитной сепарации с помощью частиц Magnesil®. Время выделения: 15–40 мин (зависит от протокола).</p> <p>Для лабораторий с низкой и средней производительностью: очистка от 1 до 16 образцов, содержащих ДНК, РНК или рекомбинантные белки. Отсутствие кроссконтаминации.</p> <p>Различаются два формата прибора: для стандартного объема выделения (300–600 мкл) и низкого объема выделения (20–100 мкл) – для получения нуклеиновых кислот с высокой концентрацией.</p> <p>Дополнительно: сканер штрих-кодов для отслеживания образцов (p/n AS3200); комплектация с возможностью программирования собственных методов FLexi®.</p>
--	--

Рисунок 9 – Продукция компании Promega (США)



Высокопроизводительная автоматизированная рабочая станция Biomek NX компании Beckman Coulter, Inc. (США). Может применяться для сборки реакций секвенирования и ПЦР, для очистки продуктов реакций секвенирования и ПЦР, для выделения и очистки геномной и плазмидной ДНК, РНК, белков, проведения скрининга в областях генетического, иммунологического, химического и биохимического анализа.



Автоматизированная станция Biomek NX, обладая одной рабочей рукой для переноса микропланшетов и пипетирования образцов, может работать с 96- и 384-луночными микропланшетами, стрипами, микропробирками, бутылочками, заполненными разным количеством образца, с герметически закрытыми бутылочками, наполненными опасными биологическими объектами.

В работе используются широко распространенные стандартные и специальные наборы реагентов известных производителей и стандартные наконечники. Предусмотрены позиции термостатирования, промывки планшетов и наконечников пипеток, позиции резервуаров реагентов, встряхиватели, позиции фильтрации, хранения отходов и использованных наконечников.

Система Biomek NX может применять 8-, 96- и 384-канальные 1–20 и 5–200 мкл пипетирующие устройства, 96- и 384-точечные системы 96–96, 96–384, 384–96, 384–384 высокоплотной репликации, 8-канальные игольчатые пипетирующие устройства. В станцию включены карусели, позиции хранения микропланшетов, реагентов и наконечников.

Биохимический робот Biomek NX/Beckman Coulter предназначен для высокопроизводительного выделения ДНК, а также для одновременного автоматического раскапывания 96 образцов ПЦР-смеси.

Рисунок 10 – Продукция компании Beckman Coulter, Inc. (США)



Zephyr® Molecular Biology Workstation – автоматизированная молекулярно-биологическая станция.

Надежное и простое устройство для работы с ДНК и РНК в современной лаборатории.

Настольная автоматизированная станция выполняет следующие операции:

- выделение ДНК;
- выделение РНК;
- выделение плазмид;
- очистка продуктов ПЦР;
- секвенирование продуктов ПЦР;
- очистка продуктов секвенирования и др.

Рисунок 11 – Продукция компании Caliper Life Sciences (Corporate Headquarters), США

Современное приборостроение в молекулярной биологии, геномике и протеомике открыло огромные возможности для исследователей и специалистов-практиков в изучении ДНК геномов всех типов живых организмов.

Особенно важно, что методы молекулярной биологии стали доступны для широкого использования в практической медицине, а анализ результатов генно-инженерной деятельности стал процессом в большей степени автоматизированным и хорошо контролируемым. Законодательно закрепленные требования к надзору и контролю за оборотом генетически модифицированной продукции на рынке страны стали выполнимы в лабораториях, оснащенных современным оборудованием.

Синтез олигонуклеотидов (праймеров). Важнейшим фактором для успешного проведения амплификации исследуемой ДНК, а также определения наличия трансгенной вставки при проведении ПЦР в режиме реального времени является присутствие в реакционной смеси праймеров со строго определенной последовательностью нуклеотидов. Для этого необходимо провести синтез молекул ДНК с заданной последовательностью нуклеотидов.

Химический синтез гена впервые осуществил в 1970 г. Гобинд Хорана (Har Gobind Khorana), США. В его лаборатории удалось химическим путем связать 77 дезоксирибонуклеотидов в цепочку ДНК, комплементарную к аланиновой транспортной РНК (т-РНК) пекарских дрожжей. Отрезки цепочки соединялись встык с помощью фермента лигазы. Две синтезированные нити соединялись химическими связями в спирализованную двухтяжевую структуру. Такой искусственно

созданный биополимер и стал геном аланиновой т-РНК, содержащейся в геноме дрожжей. Этот эксперимент – выдающееся достижение биоорганической химии. В последующие годы синтез первых генов, кодирующих пептиды и белки, был выполнен Гербертом Бойером (Herbert Boyer) и Александром Мэрхэмом (Alexander Markham) в 1977 г.

Получение синтезированных олигонуклеотидов является необходимым условием для современных молекулярно-генетических исследований и диагностики. Синтез ДНК и РНК остается одним из самых востребованных сервисов современной биотехнологии. Успешность такого биотехнологического производства во многом обусловлена простотой и надежностью синтезаторов олигонуклеотидов.

Первые коммерческие приборы, производящие автоматизированный синтез полипептидов, были разработаны на основе исследований Роберта Брюса Меррифилда (Robert Bruce Merrifield) в 1963 г. Они и сейчас используются в ряде исследовательских лабораторий и в фармацевтической промышленности. А в 1980 г. японец К.Итакура создал первый синтезатор генов. Вскоре после этого канадская компания BioLogicals выпустила синтезатор, сконструированный в Университете МакГилла (McGill University, Canada) в Монреале, способный в течение шести часов синтезировать 12-членный олигонуклеотид с заданной последовательностью. В 1981 г. был создан другой автомат, выпущенный фирмой Genetic Instruments. В 1982 г. цена этих и подобных приборов на американском рынке составляла 36000–39500 долларов. В настоящее время стоимость новых приборов составляет от 6000 до 10000 долларов, а бывшие в употреблении можно найти на вебсайте eBay, например, по цене ниже 1000 долларов.

Современные синтезаторы представляют собой удобные компактные инструменты, экономичные и надежные. Их выпускают многие компании США, стран ЕС и Российской Федерации (рисунки 11–13).

Кроме качественных характеристик и надежности этих приборов, немалое значение имеет и их стоимость. Наука никогда не была дешевой отраслью, и автоматизирование некоторых этапов подготовки проб намного повышает эффективность научных исследований.



Синтезатор ASM-800 предназначен для автоматического синтеза природных, вырожденных и модифицированных олигонуклеотидов (ДНК, РНК и их аналогов) фосфорамидным методом. Удобный и недорогой инструмент, который используется исследователями в различных областях. Прибор позволяет вести экономичный синтез природных и вырожденных ДНК, РНК, ДНК-РНК комплексов, фосфоротиоатных ДНК и ДНК с различными модификаторами (6-FAM, TET, HEX, биотин, Су 3, Су 5, и т. д.). Восемь различных олигонуклеотидов могут быть одновременно синтезированы за 3,5 часа. Синтезатор ДНК ASM-800 может быть успешно использован для синтеза олигонуклеотидов с длиной до 250 мономеров. Оригинальная конструкция синтезатора позволяет существенно снизить расход реактивов и растворителей.

Рисунок 12 – Синтезатор ДНК ASM-800 компании БИОССЕТ (РФ)



Синтезатор POLYGEN – модуль с 10 колонками:

- слайдер блок, мкл – 3;
- возможность работы в 2-х режимах с оптимизацией по скорости и точности:
 - расход реагента в 1 программе, мл – 0,6;
 - расход реагента во 2 программе, мл – 1,1;
- подключение к ПК – RS232;
- габариты, ШхГхВ, мм - 430×390×360;
- 10 олигосинтезов за один проход через колонку;
- 10 пар нуклеотидов за 6 мин.

Рисунок 13 – Синтезатор 10 фирмы POLYGEN GMBH (Германия)



Рисунок 14 – Высокопроизводительная модель ABI model 391 фирмы Applied Biosystems (США)

Аmplификация ДНК фрагментов. Многие в применении генно-инженерных технологий зависят от возможности получения большого количества копий конкретного фрагмента ДНК. Метод ПЦР является ключевой технологией, которая позволила осуществить революцию в биотехнологии – стало возможным получить многотысячное количество копий маленького образца ДНК, а затем проводить его анализ.

Аmplификацию проводят в приборах, которые называют или амплификаторами, или термоциклерами (англ. PCR Machine or PCR Thermocycler). Когда инструмент сконструирован для регистрации продуктов амплификации в режиме реального времени, то к названию добавляют определение «работающий в режиме реального времени» (англ. PCR-RT or PCR-Real Time).

Аmplификатор обеспечивает режим, необходимый для проведения ПЦР: периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1°C. Прибор производит определенное количество попеременных нагревов и охлаждений (термоциклов) в зависимости от используемого метода и повторяет их множество раз, добавляя в конце праймер ДНК. Копирование участков ДНК происходит тысячи раз. Для получения лучшего результата температурные режимы должны изменяться в течение минимального промежутка времени. В амплификаторе температура цикла может быть достигнута за несколько секунд, даже начиная с удаленных значений последней установленной точки. Необходимые изменения происходят с поддержанием идеальной однородности между различными точками блока. Кроме того, систему можно запрограммировать так, чтобы создать условия линейно и градиентно изменяющейся температуры по ширине блока. Таким образом достигается определение и оптимизация точек с наивысшим уровнем производительности.

Наибольшей популярностью пользуются компактные, надежные в эксплуатации и доступные по цене амплификаторы американских и германских фирм (рисунки 15–18).

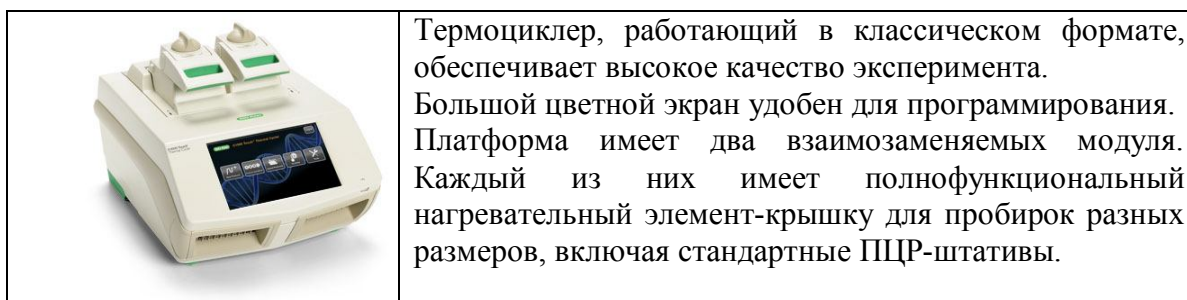


Рисунок 15 – Термоциклер C1000 Touch™ Thermal Cycler компании Bio-Rad (США)

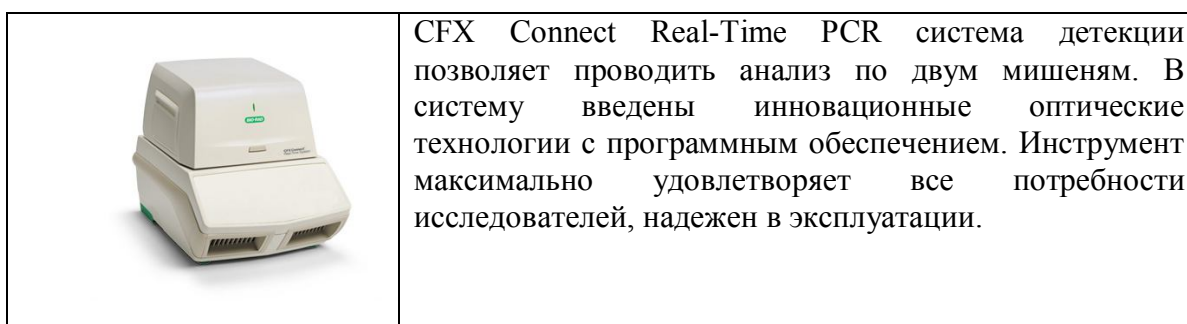


Рисунок 16 – Термоциклер CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System компании Bio-Rad (США)



Рисунок 17 – Скоростной амплификатор для ПЦР AlphaSC от Analytik Jena AG (Германия)

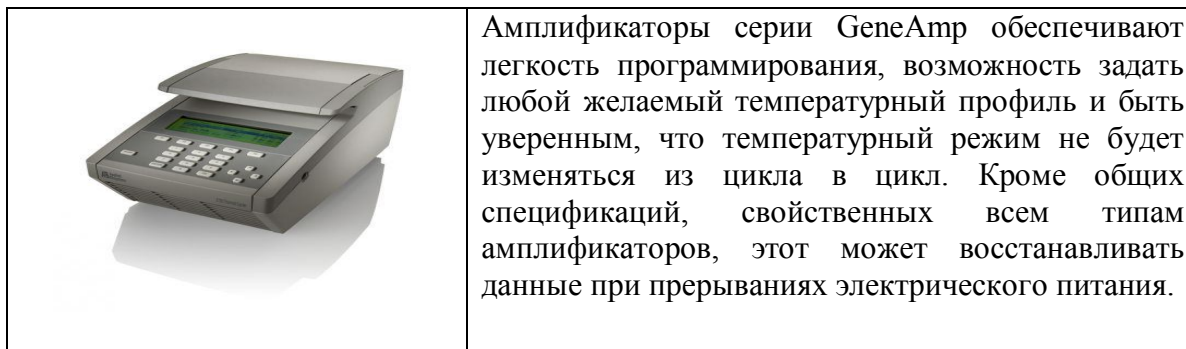


Рисунок 18 – ДНК-Амплификатор GeneAmp 2720 Thermal Cycler фирмы Applied Biosystems (США)

Аналитический процесс ПЦР-определения состоит из следующих этапов: Пробоподготовка → Выделение ДНК → Приготовление реакционной смеси → ПЦР → Обработка результатов.

Обработку результатов ПЦР проводят разными способами в зависимости от конечной цели эксперимента. По классическому методу проводят электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле и анализируют электрофореграммы для выявления компонентов, интересующих исследователя. При регистрации продуктов ПЦР в режиме реального времени используют программное обеспечение для обработки полученных результатов и их анализа. В тех случаях, когда продукты амплификации предполагают анализировать с помощью генетического анализатора, их подвергают реакции секвенирования по Сэнгеру, во время которой каждый нуклеотид метят особой флуоресцентной меткой, а затем пробы помещают в генетический анализатор – прибор, который позволяет определить последовательность нуклеотидов в изучаемом участке ДНК.

Метод ПЦР в режиме реального времени очень широко используется и в практических целях, например, он является основным при количественном определении ГМО и ГМИ в продовольственном сырье и продуктах питания.

Генетические анализаторы, или ДНК-секвенаторы. Анализ первичной структуры ДНК, т.е. установление последовательности нуклеотидных остатков в ее молекуле, в настоящее время основан на двух методах: химической дегградации (А. Максам и В. Гилберт, 1977) и полимеразного копирования с использованием терминирующих аналогов нуклеотидов (Ф. Сэнгер, 1977).

Эти методы позволяют одному исследователю точноопределять последовательность до 1000 нуклеотидов в неделю. В 1982–1985 гг. появилась возможность создать прибор для автоматического анализа

последовательности нуклеотидов в ДНК. Анализ ДНК позволяет, основываясь на генетическом коде, определить последовательность аминокислотных остатков в белках, синтез которых находится под контролем соответствующих генов.

Молекулярная геномика применяется для решения разнообразных задач медицины и медицинской генетики. Например, в ряде стран мира созданы информационно-консультативные генетические центры, а во Франции разработана и используется на практике компьютерная экспертная система Сезам (SESAM – Systeme Expert Specialisee aux Analyses Medicales) для определения склонности человека к различным заболеваниям. Она включает собственно экспертную систему оценки риска возникновения заболевания, основанную на многочисленных лабораторных (иммунологических, биохимических, серологических и генетических) тестах (более 80), программу для обучения врачей основам молекулярной медицины, медицинское консультирование по результатам лабораторных тестов и популярный справочник для населения.

Новое поколение технологий расшифровки последовательности ДНК, позволяющее осуществлять прочтение генетических текстов с беспрецедентной скоростью и производительностью, не только нашло широкое применение в биомедицинских исследованиях, но и стало предпосылкой для впечатляющих научных достижений.

Успехи современной биологии во многом определены стремительным прогрессом биологического приборостроения. Автоматизация рутинных процедур, миниатюризация, объединение различных модулей в интегрированные многофункциональные системы – всё это привело к стремительному увеличению производительности отдельного биологического эксперимента и, в целом, к поднятию исследований на качественно новый уровень. Активное использование конструкторских решений из других областей техники значительно облегчило и ускорило этот процесс.

Самым ярким примером прорыва в биологии, неосуществимого без соответствующего технологического обеспечения, является расшифровка геномов организмов разных таксономических групп. В Сэнгеровском институте (Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK), где была расшифрована значительная часть генома человека, имеется лаборатория размером с баскетбольный спортзал, набитая автоматическими секвенаторами, непрерывно работающими в формате микротитровальных плашек с 384 лунками. Автоматизация процесса секвенирования обеспечила прочтение 3253037807 пар оснований ДНК человека.

Невозможно представить современную биологию (не только молекулярную биологию и биохимию, но и систематику, теорию

эволюции, антропологию, медицину) без мегабайтов прочитанных последовательностей ДНК.

Классический подход к расшифровке последовательностей ДНК. Самый распространенный сегодня способ секвенирования ДНК – «метод терминации цепи», или «дидезоксиметод», разработанный в 70-х гг. прошлого века Фредериком Сэнгером. Дешевизна, точность, а также сравнительная простота автоматизации сделала этот метод своеобразным «золотым стандартом» определения последовательности нуклеотидных остатков ДНК. Так был расшифрован весь геном человека, и именно метод Сэнгера до сих пор является рутинным в повседневной лабораторной практике (рисунок 18).

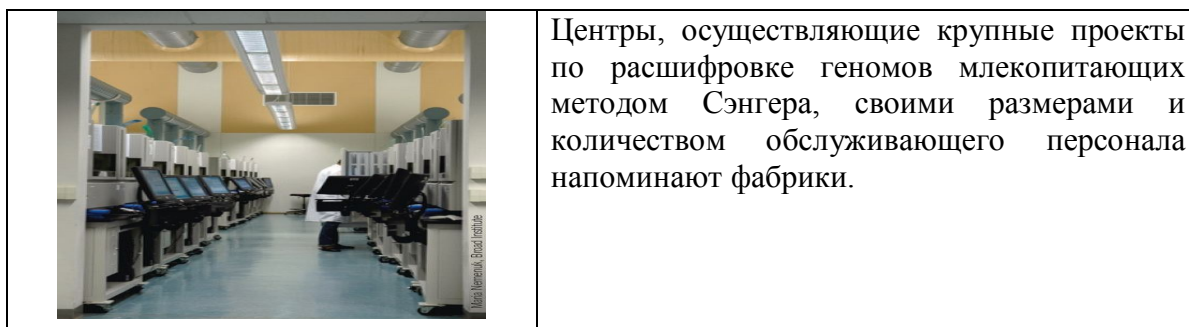


Рисунок 19 – Центр по расшифровке геномов млекопитающих методом Сэнгера

Сначала фрагменты ДНК, последовательность которых предстоит определить, многократно копируются (амплифицируются), затем нарезаются на короткие куски, которые служат матрицей для синтеза полностью комплементарных цепей ДНК. Синтез в общих чертах напоминает процесс копирования ДНК в живой клетке.

Особенность метода заключается в использовании химически модифицированных разновидностей четырех дезоксирибонуклеотидов, составляющих цепи ДНК. Каждая разновидность «помечена» флуоресцентной молекулой-маркером. Короткий фрагмент ДНК (праймер) инициирует синтез ДНК в определённой точке цепи ДНК-матрицы. Синтезирует комплементарную цепь особый фермент – ДНК-полимераза. При этом видоизменённые разновидности нуклеотидов (терминаторы), которые присутствуют в реакционной смеси в значительно меньших количествах, чем обычные нуклеотиды, обрывают синтез, когда один из них оказывается на конце растущей ДНК-цепи, так как терминаторы не имеют химической группы, к которой должен присоединяться следующий нуклеотид для продолжения цепи. В результате получается смесь, содержащая полный набор ново-синтезированных фрагментов ДНК, каждый из которых начинается в

одном и том же месте, но заканчивается во всех возможных положениях вдоль цепи ДНК-матрицы.

Современные автоматизированные секвенаторы разделяют эти фрагменты, пропуская всю смесь через тончайшие капилляры, наполненные гелем. Чем короче фрагмент, тем быстрее он движется в геле по капилляру под действием электрического поля. Этот процесс, называемый капиллярным электрофорезом, настолько эффективен, что фрагмент, только что вышедший из капилляра, оказывается ровно на один нуклеотид длиннее, чем предшествующий ему. По мере того как фрагмент появляется, он освещается лазером, что заставляет светиться меченый нуклеотид на его конце. Компьютер определяет разновидность этих нуклеотидов и регистрирует последовательность их появления, складывая «буквы» (нуклеотиды) в «текст» (последовательность ДНК). В случае расшифровки целого генома так нарабатываются миллиарды коротких «текстов», которые поступают в специальную программу, запускаемую на суперкомпьютерах. Программа находит места перекрывания «текстов» и, располагая их в нужном порядке, выстраивает полную последовательность генома.

Большинство новых технологических разработок направлено на миниатюризацию, мультиплексирование (в данном случае, параллельное соединение низкопроизводительных блоков системы для повышения общей производительности) и автоматизацию процесса секвенирования. Все они могут быть разделены на два класса: первый объединяет методы «секвенирования синтезом», в которых основания определяются по мере того, как они встраиваются в растущую цепь ДНК; ко второму классу относятся технологии расшифровки последовательности оснований единичной молекулы ДНК, например, чтение нуклеотидных остатков ДНК электронным или оптическим способом по мере того, как молекула «протискивается» через нанопору.

Достигнутый прогресс в процессе улучшения системы капиллярного электрофореза в сочетании с возрастающей автоматизацией и усовершенствованием программного обеспечения позволил снизить стоимость секвенирования в 13 раз с тех пор, как первые автоматические секвенаторы появились (в прошлом десятилетии). Самые современные высокопроизводительные секвенаторы в настоящее время – это пиросеквенаторы, инструменты, которые разрабатывает и внедряет компания 454 Life Sciences.

Технология, разработанная компанией 454 Life Sciences, называется пирозосеквенированием, или пирозосеквенированием. Сама идея пирозосеквенирования возникла ещё в начале 90-х гг. прошлого века, но опубликованный тогда метод не сумел вытеснить традиционный дидезокси-метод Сэнгера. Тогда разработчики технологии дополнили его возможностями современных нанотехнологий, и этот метод стал

методом пиросеквенирования ДНК в плотно сфабрикованных пиколитровых реакторах.

Весь геном, все молекулы ДНК случайным образом фрагментируются на кусочки по 300–500 пар оснований. Затем комплементарные цепи фрагмента разделяются, к каждой цепи фрагментов пришивается одинаковый для всех олигонуклеотид-«адаптер», который позволяет отдельным цепям налипать на пластиковые бусинки. При этом смесь разъединённых на комплементарные цепи фрагментов разбавляют таким образом, что любая бусинка получает лишь по одной индивидуальной цепи и оказывается заключённой в капельку, окружённую маслом и содержащую смесь для осуществления ПЦР в каждой капле эмульсии отдельно (так называемая эмульсионная ПЦР, эПЦР). Это приводит к «клональной амплификации» цепей ДНК – на поверхности бусинки удерживается уже не одна, а около 10 млн копий («клонов») уникальной ДНК-матрицы.

Далее эмульсия разрушается, образовавшиеся в ходе ПЦР двухцепочечные фрагменты ДНК разделяются, и бусинки, несущие одноцепочечные копии ДНК-матрицы, помещаются в лунки «предметного стекла» – слайда особой конструкции. Каждая лунка такого слайда образует отдельный пиколитровый «реактор», в котором и происходит реакция секвенирования.

Слайд представляет собой срез блока, полученного путём нескольких раундов вытягивания и сплавления оптических волокон. Объём таких «реакторов» – 75 пиколитров; плотность размещения на поверхности слайда – 480 лунок на квадратный миллиметр. Слайд несёт около 1,6 миллионов лунок, в каждую из которых попадает одна бусинка с ДНК-матрицей. Слайд помещается в проточную камеру таким образом, что над отверстиями лунок создаётся канал высотой 300 мкм, по которому в лунки поступают необходимые реактивы.

Помимо бусинок с ДНК-матрицей, в каждую лунку «насыпают» бусинок помельче с «сидящими» (иммобилизованными) на поверхности каждой из них ферментами, необходимыми для пирофосфатного секвенирования. Нуклеотиды (одного вида за раз) и другие реактивы, необходимые для реакции секвенирования, подаются последовательно в проточную камеру, куда помещается слайд. Каждый раз, когда в какой-либо лунке определённый нуклеотид встраивается в растущую цепь ДНК, в ней высвобождается молекула пирофосфата, которая является необходимым предшественником компонента другой ферментативной реакции. Эту реакцию катализирует особый фермент – люцифераза светлячка *Photinus pyralis*, но для её осуществления необходим аденозинтрифосфат (АТФ). Новообразованный пирофосфат превращается в лунке в АТФ под воздействием ещё одного фермента –

АТФ-сульфуриказы. И тогда люцифераза окисляет люциферин до оксильюциферина, а эта реакция сопровождается хемилюминесценцией – маленькой вспышкой света. Дно слайда находится в оптическом контакте с оптико-волоконным световодом, подключённым к прибору с зарядовой связью (CCD-сенсор; CCD – Charge Coupled Device). Этот световод позволяет регистрировать излучаемые фотоны со дна каждой индивидуальной лунки, в которой произошло встраивание известного нуклеотида. Общая схема пиросеквенирования представлена на рисунке 20.



Рисунок 20 – Схема пиросеквенирования

Связывая зарегистрированные от каждой лунки вспышки с типом нуклеотида, присутствующего в данный момент в проточной камере, компьютер последовательно отслеживает рост цепочек ДНК в сотнях тысяч лунок одновременно. Время протекания ферментативной реакции, производящей детектируемую «вспышку», составляет порядка 0,02–1,5 с. Следовательно, скорость реакции определяется скоростью массопереноса, что оставляет место для улучшений за счёт ускорения доставки реактивов. После поступления каждого нуклеотида в проточную камеру, она промывается раствором, содержащим фермент –

апиразу. Поэтому перед тем, как «запустить» в камеру следующий нуклеотид, из всех лунок удаляются любые нуклеотиды, оставшиеся там от предыдущего цикла.

Высокая точность расшифровки последовательности достигается тем, что система осуществляет многочисленные прочтения одного и того же фрагмента, что позволяет построить единую обобщённую (консенсусную) последовательность. Отдельные прочтения одного и того же участка ДНК выравниваются относительно друг друга исходя из интенсивности сигналов в момент протекания через камеру того или иного нуклеотида, а не на основе последовательности этих прочтений. Затем соответствующие сигналы усредняют и только тогда записывают полученную последовательность. Такой подход значительно улучшает качество расшифровки последовательности и позволяет оценить её качество.

Кроме оборудования фирмы 454 Life Sciences, сегодня на рынке предлагаются еще три коммерческих системы нового поколения для секвенирования ДНК:

- Roche (454) GS FLX Genome Analyzer, распространяемый *Roche Applied Sciences* (рисунок 21);
- секвенатор *Illumina Solexa 1G*;
- новейшая система SOLiD – от *Applied Biosystems* (рисунок 22).

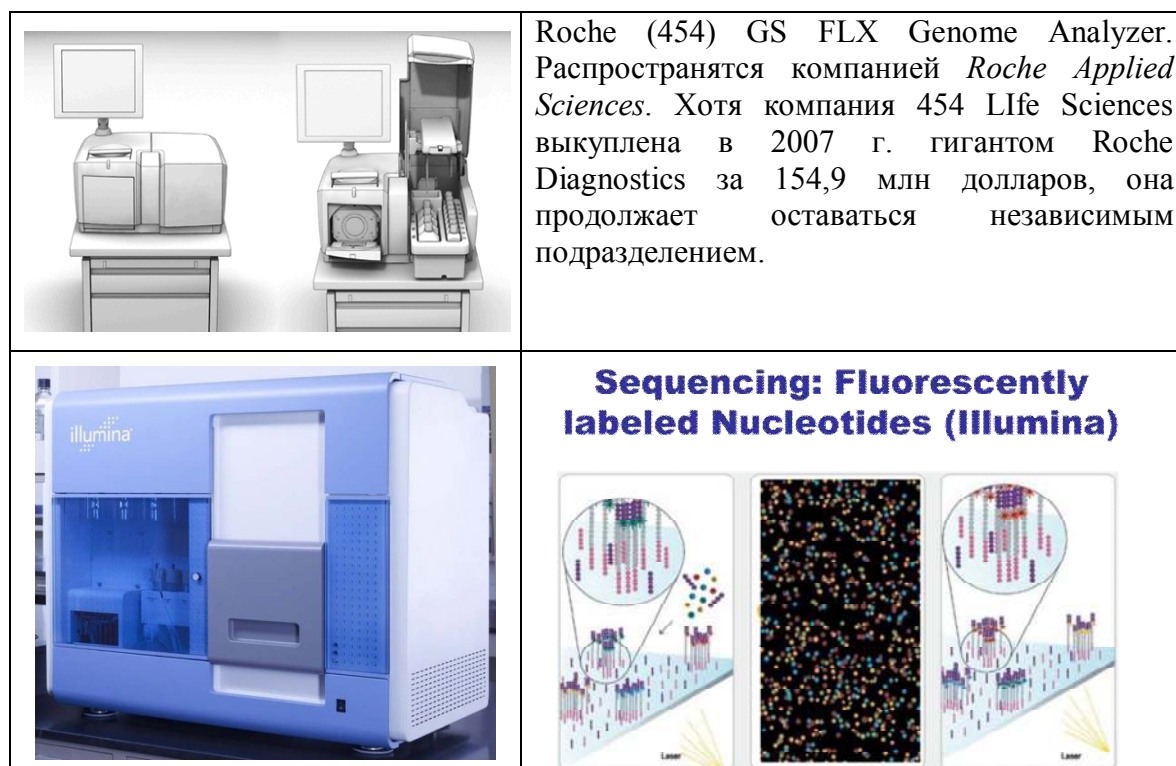


Рисунок 21 – Система для высокопроизводительного пиросеквенирования ДНК-секвенатор Roche (454) Genome Sequencer FLX

Интересное исследование, сочетающее в себе метагеномный анализ и «ДНК-палеонтологию», было проведено в конце 2005 г. – одного запуска инструмента Roche (454) GS20 оказалось достаточно для анализа 13 млн пар оснований последовательности генома 28-тысячелетнего мамонта.

	<p>Одна из миссий Queensland Centre for Medical Genomics – «разрабатывать и улучшать технологию рутинного анализа полной последовательности человеческого генома». Научных институтов, ориентированных на развитие «персонализированной медицины», с каждым годом становится все больше и больше. Такой современный прибор за один запуск (длительностью около 10 дней) способен прочесть до 300 миллионов пар нуклеотидов.</p>
<p style="text-align: center;">Sequencing: Fluorescently Labeled Nucleotides (ABI SOLiD)</p> 	

Рисунок 22 – Секвенаторы SOLiD компании Applied Biosystems (Life Technologies), США, в лаборатории Queensland Centre for Medical Genomics (Австралия)

Такой прорыв в области секвенирования сложных смесей ДНК позволяет изучать любую экосистему на уровне последовательностей ДНК. На клеточном уровне секвенирование нового поколения позволяет идентифицировать мутации в любом организме для всего генома. Так, были найдены аллели, отвечающие за устойчивость к антибиотику у *Mycobacterium tuberculosis*, а также идентифицированы все мутации в геноме размером в 9 млн пар оснований у штамма бактерии, эволюционировавшей в течение тысячи поколений. Эти исследования продемонстрировали не только способность новой технологии обнаруживать мутации и ошибки в опубликованных научных статьях, но и выявили также трудности, связанные с её использованием, как ошибки

прочтения гомополимерных последовательностей при пиросеквенировании (454) или быстрое уменьшение качества прочтения ближе к 3'-концу последовательности в системах с короткой длиной индивидуальных прочтений (Solexa или SOLiD от Applied Biosystem).

Новейшие системы для расшифровки ДНК, появление которых на рынке ожидается в течение ближайших лет, относятся уже к «третьему поколению» и основываются на анализе одиночных молекул. Они разрабатываются компаниями *VisiGen* и *Helicos*.

Новые методы секвенирования имеют практическое применение не только в биотехнологии растений и животных, но и в медицине. Например, в генетике раковых заболеваний специфические раковые аллели могут быть отслежены в тканях посредством высокопроизводительного секвенирования геномной ДНК в тех случаях, когда метод Сэнгера неэффективен. И здесь большим преимуществом нового метода является многократное прочтение последовательности.

3.3 Алгоритм исследования ДНК геномов

Алгоритм исследования ДНК геномов определяется следующими факторами:

- природой исследуемого объекта, его таксономической принадлежностью;
- используемой методической базой для достижения поставленной цели;
- имеющейся инструментальной базой для проведения качественных и быстрых анализов;
- финансовыми затратами на проведение исследования;
- навыками и умениями исследователя (человеческий фактор).

Каждый из этих факторов по важности равнозначен, но по-своему определяет выполнимость проекта (задания). Например, конечная цель исследования может быть не достигнута даже в том случае, когда объект хорошо изучен многими исследователями, а технические возможности проведения конкретной экспериментальной работы минимальны или очень дорогостоящие. Поэтому каждое планируемое исследование должно быть тщательно продумано методически и обосновано экономически, просчитано, исходя из возможных затрат на его проведение.

Современные компании, работающие в сфере биотехнологического (молекулярно-генетического) приборостроения, стремятся удешевлять стоимость предлагаемых ими инструментов, но снижение затрат на проведение экспериментов можно достигнуть и использованием дорогостоящих приборов в центрах коллективного пользования. Существование такого центра в Институте генетики и цитологии НАН

Беларуси (Центр коллективного пользования ГЕНОМ) является наглядным примером такой организации научно-исследовательских работ.

3.4 Алгоритм исследования ДНК геномов трансгенных растений

Для решения научно-практических задач в области биотехнологии и обеспечения биобезопасности генно-инженерной деятельности учитываются все перечисленные выше факторы. В 2006 г. был принят республиканский Закон о генно-инженерной деятельности. За ним последовали законодательные акты и регламенты, определяющие правила надзора и контроля оборота на рынке Беларуси ГМО и ГМИ, установившие беспороговую систему маркирования продовольственного сырья и пищевых продуктов. На этом основании в стране проводится тотальный скрининг импортируемого продовольственного сырья и пищевых продуктов на наличие генетически-модифицированных ингредиентов (ГМИ). Поставленную задачу невозможно было бы выполнить без создания специальных лабораторий по детекции ГМИ в составе уже имеющихся аналитических центров в системах Минздрава и Минсельхозпрода, а также в научно-исследовательских институтах Национальной академии наук Беларуси (например, ИГЦ НАНБ), так как для проведения анализов требуется специальное оборудование и реагенты.

При тестировании продуктов питания на наличие ГМО используются два метода: *качественный* и *количественный*. Качественный метод проводится по схеме: Отбор образцов → Пробоподготовка → Выделение ДНК → Подготовка реакционной смеси из ДНК, праймера и реагентов → ПЦР в классическом формате → Электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле → Анализ электрофореграммы → Оформление протокола о наличии/отсутствии ГМИ.

До вступления Республики Беларусь в Таможенный союз этого метода, в основе которого лежит принцип «есть–нет», было вполне достаточно для проводимого скрининга. Стандарты, принятые для членов Таможенного союза в области контроля оборота ГМО (ГМИ) в продуктах питания и кормах, устанавливают необходимость проведения количественного метода детекции ГМИ, так как в соответствии с этими стандартами маркированию подлежат те продукты питания и продовольственное сырье, в которых содержание ГМИ превышает 0,9%.

3.5 Качественные методы молекулярно-генетического анализа ДНК геномов растительных пищевых продуктов на наличие ГМИ

Анализ данных научных источников и созданной информационной базы ГМО показал, что наиболее часто при создании ГМ-растений используются регуляторные гены.

Таблица 3 – Частота встречаемости регуляторных и маркерных генов, используемых в скрининговом анализе ГМ растений

Ген	Нуклеотидные последовательности в праймеров	ГМО пищевых продуктов				
		внедренные в с/х всех стран мира	изъятые из оборота	зарегистрированные в РФ	незарегистрированные в РФ	все зарегистрированные
		113	10	17	24**	220
Только промотор 35S	5'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3' 5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'	27 (23,8)*	2 (20)	5 (88)	4	35 (16)
Только терминатор NOS	5' TAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3'	12 (10,6)	6 (60)	2 (11,8)	3	3 (10)
35S + NOS		71 (62,8)	2 (20)	10 (59)	5	88 (40)
Всего		110 (97,3)	10 (100)	17 (100)	12	145 (66)

Примечание: * цифра в скобках – процент от числа ГМ-линий в группе; ** для 8 линий данных нет

Качественный анализ наличия ГМИ в продовольственном сырье и пищевых продуктах может быть выполнен также и *методом ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентных меток.*

Выявление ДНК генетически модифицированных ингредиентов растительного происхождения методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает три этапа: экстракцию ДНК из образцов продуктов питания, ПЦР-амплификацию фрагментов ДНК и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Такой анализ позволяет обнаруживать следующие широко встречающиеся фрагменты ДНК у ГМ-растений: энхансера (E35S) и промотора (P35S) последовательности 35S вируса

мозаики цветной капусты, а также фрагмент терминатора гена нопалин-синтетазы из *Agrobacterium tumefaciens* (NOS). Эхансер и промотор 35S являются соседними областями в ряде трансгенных конструкций. Кроме того, определяется эндогенный контроль, т.е. ген, специфичный для растительного генома (нетрансгенного и трансгенного) как показатель присутствия в исследуемом образце присутствует ДНК растений.

3.6 Количественный молекулярно-генетический анализ ДНК геномов растительных пищевых продуктов на наличие ГМИ

В 2011 г. в Республике Беларусь вступили в действие законы и технические нормы Таможенного союза, членом которого она является. В рамках Таможенного союза предъявляются иные требования к контролю и надзору оборота импортируемых пищевых продуктов и кормов, в том числе к их тестированию на наличие генетически-модифицированных ингредиентов и, соответственно, маркированию товаров, поступающих в торговую сеть. По нормам Таможенного союза маркированию «ГМО» подлежат все продукты и корма, в которых процент содержания ГМИ превышает 0,9%. Следовательно, качественный анализ ДНК геномов пищевых продуктов и кормов может быть использован только для общего контроля и изучения, какую долю общего оборота составляют пищевые продукты и корма, включающие ГМИ. Для маркирования продовольственных товаров и кормов по нормам Таможенного союза необходимо проводить количественный молекулярно-генетический анализ ДНК геномов этих объектов. Описание этого метода представлено ниже.

Наиболее широко распространенным методом количественного определения содержания генетически модифицированных ингредиентов в пищевых продуктах и кормах является метод ПЦР в режиме реального времени.

Этот метод используют в классическом однопраймерном формате, а также в мультипраймерном, когда выбирают усложненные элементы, введенные в конкретные сорта ГМ-растений, состоящие из комбинаций праймеров на гены растений белков (сои, кукурузы и др.) и последовательностей трансгенов. С учетом элементов разного уровня сложности определяют алгоритм лабораторных исследований пищевых продуктов на наличие ГМО растительного происхождения.

Для многокомпонентного анализа признано рациональным совмещать этапы скрининга и идентификации, используя одновременно несколько генетических элементов, кодирующих различные растительные белки и белки трансгенов, в том числе с применением мультипраймерных вариантов ПЦР.

Для однокомпонентного варианта вполне достаточно проведения ПЦР в режиме реального времени и сравнительного количественного анализа продуктов ПЦР с использованием стандартных образцов (плюс- и минус-контроли), геномной ДНК и ДНК анализируемой пробы.

Для количественного определения ГМО в пищевых продуктах используют тест-системы, предусматривающие определение количества содержания чужеродной ДНК относительно геномной ДНК растений. Для получения результатов используется амплификационная часть исследуемого образца, калибровочные образцы и специальное программное обеспечение, позволяющее производить обработку получаемых в эксперименте данных.

Количественное определение ГМО растительного происхождения основано на расчёте отношения количества ДНК определенной линии ГМ-растения к общему количеству ДНК анализируемого растения, выраженного в процентах. В каждой тест-системе для количественного определения ГМО одновременно проводятся две независимые реакции в одной пробирке. Одна реакция позволяет обнаружить ДНК анализируемого растения (соя, кукуруза и др.). Другая реакция – обнаружить последовательность, специфичную для конкретной линии ГМ-растения.

Протекание каждой реакции детектируется с помощью специфического зонда. Для обнаружения ДНК анализируемого объекта (соя, кукуруза) используется зонд, меченый красителем R6G, а для обнаружения генетической вставки – красителем FAM или ROX в зависимости от типа прибора. Определение процентного содержания ГМО происходит с использованием калибровочных образцов (КО), которые представляют собой смеси ДНК растения дикого типа (0 % ГМО) и ДНК ГМ-линии (100 % ГМО) в определенном процентном соотношении. Разность значений пороговых циклов двух реакций для калибровочных образцов используется для построения калибровочной прямой. С помощью калибровочной прямой рассчитывается процентное содержание ДНК ГМО в анализируемых образцах.

«Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2» предназначена для количественного определения ДНК ГМ сои Roundup Ready™ (Monsanto Inc, линия GTS 40-3-2, устойчивая к глифосату). «Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ кукурузы MON 810» предназначена для количественного определения ДНК ГМ кукурузы YieldGard® Corn Borer Corn MON 810 (Monsanto Inc., линия устойчивая к кукурузному мотыльку). Тест-системы поставляются в вариантном исполнении в зависимости от модели прибора, используемого в лаборатории. Вариант исполнения определяется набором светофильтров прибора.

Для интерпретации результатов, полученных с помощью ПЦР в реальном времени, применяют метод относительного количественного определения (метод сравнения пороговых значений циклов амплификации (C_t)). Для случаев, когда эффективность амплификации чужеродной и нормировочной ДНК совпадает, используют формулу: $\Delta C_t = C_t$ (чужеродная ДНК) – C_t (нормировочная ДНК).

Расчет содержания чужеродной ДНК относительно нормировочной производят с использованием калибровочной прямой (строящейся на основании тестирования калибровочных образцов с известным соотношением чужеродной и нормировочной ДНК) одновременно с исследуемыми образцами. Калибровочную прямую строят следующим образом: по оси X откладывают ΔC_t , по оси Y откладывают десятичный логарифм процентного содержания чужеродной ДНК относительно нормировочной ДНК. Результаты обрабатываются в программе GMO Macros. Программное обеспечение позволяет выполнять приведенные выше вычисления в автоматическом режиме. Результатом эксперимента является построение калибровочной прямой, расчет ее параметров и определение процентного содержания ГМО в исследуемых образцах.

На рисунке 23 графически изображены кривые, полученные в результате обработки экспериментальных данных, с автоматическим выводением конечного результата – процентного содержания продукта, наработанного во время ПЦР трансгенной вставкой. Регистрация и учет результатов амплификации проводится автоматически во время реакции с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором ДТ-322. Анализ результатов производится автоматически после окончания программы амплификации. В столбце «% ГМО» для каждого образца отражаются результаты анализа в виде процентного содержания ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои. Линейный диапазон измерений составляет от 0,1% до 5% ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои. Если результат больше, чем 5%, то он трактуется как содержание ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои более 5%.

Если результат меньше 0,1%, то он трактуется так: содержание ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои составляет менее 0,1%. (Синим цветом на рисунке 23 выделен результат детекции ГМИ в соевом продукте «ТОФУ», в котором содержание ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК на уровне 0,9 %). Если этот показатель оказывается выше (0,95%, например), то такой продукт подлежит обязательной маркировке «Содержит ГМО».

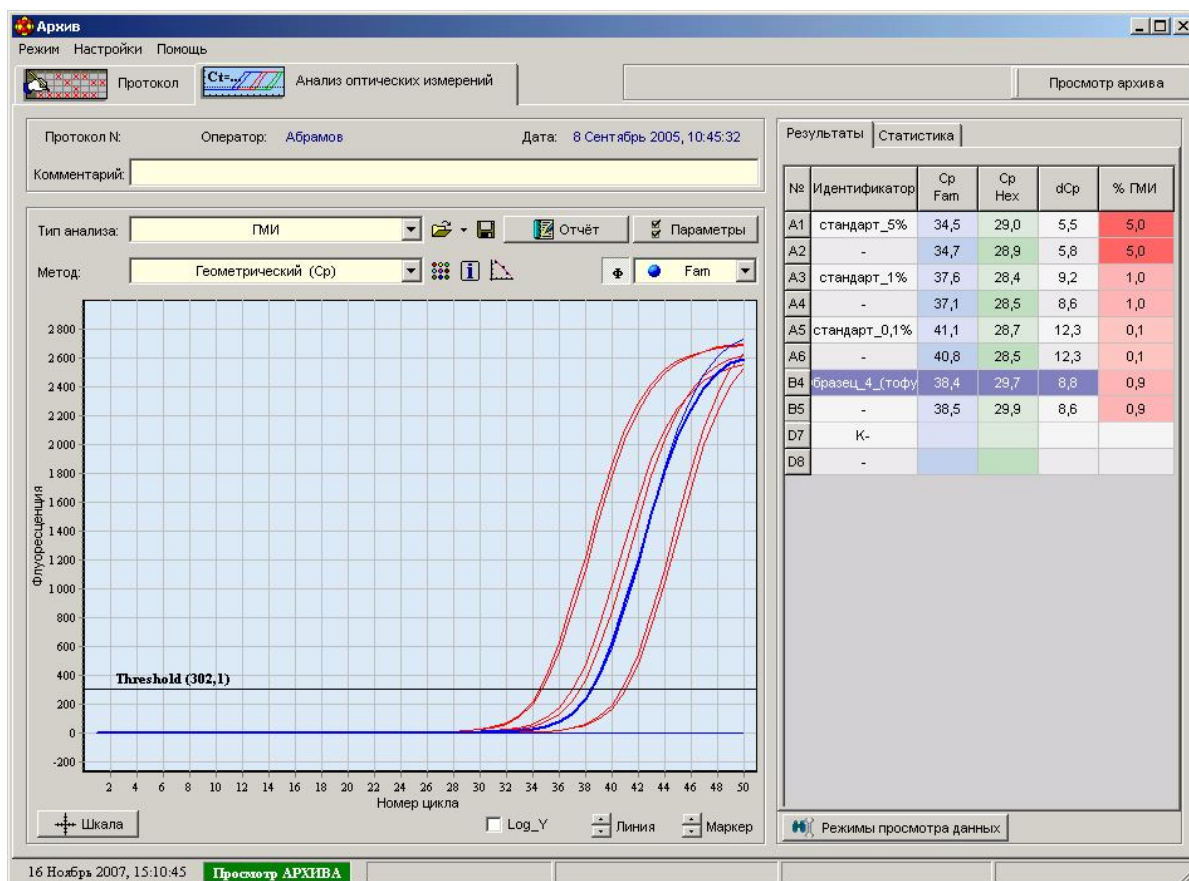


Рисунок 23 – Пример количественного определения ГМО с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», РФ)

Появление любого значения в колонке Ср каналов FAM или HEX для отрицательного контрольного образца свидетельствует о наличии контаминации. В этом случае результаты всей постановки эксперимента бракуют, и следует провести мероприятия по устранению контаминации.

Контрольные вопросы

1. Какие методы, на ваш взгляд, являются основными при изучении геномов?
2. Какие методы, на ваш взгляд, являются универсальными по их применимости к организмам любых таксономических групп?
3. Почему результаты изучения геномов трансгенных растений имеют важное значение:
 - для науки
 - для сельского хозяйства
 - для населения?
4. Кратко охарактеризуйте качественный метод изучения биологического материала на наличие ГМИ.

5. Кратко охарактеризуйте количественный метод изучения биологического материала на наличие ГМИ.
6. Какие пробы могут быть использованы и какой показатель является основным для:
 - положительного контроля
 - для отрицательного контроля?
7. Какие этапы изучения ДНК геномов требуют привлечения современного оборудования?
8. Какие способы разрушения биологических объектов вы знаете?
9. Какое основное условие должно соблюдаться при разрушении биологических объектов? Объясните, почему.
10. Назовите основные способы и методы выделения ДНК.
11. Какие компоненты входят в реакционную смесь, подготовленную для амплификации ДНК?
12. Чем отличается обычная амплификация фрагментов ДНК от амплификации в режиме реального времени?
13. Какие компании наиболее успешны на рынке оборудования для молекулярной биологии?
14. Какие регуляторные и маркерные гены, используемые при скрининговом анализе ГМ растений, встречаются наиболее часто?
15. Дайте краткое описание требований к анализу ДНК геномов растений пищевых продуктов на наличие ГМИ в Республике Беларусь.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Дать определение термина «биотехнология». Охарактеризовать основные цели и задачи современной биотехнологии. Назвать ее основные разделы.
2. Провести сравнительный анализ преимуществ и недостатков оборудования различных фирм.
3. Подготовить презентацию на тему «Современная биотехнология – прорыв в сфере практического использования результатов фундаментальных молекулярно-биологических исследований».
4. Подготовить реферат на тему «Геномные технологии: от теории к практике».
5. Дать сравнение методов Сэнгера и Максама–Гилберта.
6. Подготовить презентацию на тему «Современная инструментальная база молекулярно-биологических исследований и перспективы ее развития»
7. Подготовить реферат на тему «Трансгенные организмы как объекты изучения ДНК их геномов».
8. Охарактеризовать Национальную систему биобезопасности Республики Беларусь.
9. Написать реферат на тему «Анализ законодательства Республики Беларусь по обеспечению безопасности генно-инженерной деятельности, контроля и надзора за оборотом ГМО на национальном рынке».

СЛОВАРЬ ОСНОВНЫХ ТЕРМИНОВ

Ген * gene – физическая и функциональная единица наследственности; представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК, которая устанавливает последовательность аминокислот в определенном белке.

Ген маркерный * gene marker or marker – ген с известной хромосомной локализацией, имеющий четкое фенотипическое проявление (устойчивость к антибиотику или гербициду; ферментная активность и т.д.). Дает возможность локализовать другие гены.

Ген-мишень * gene target – 1) ген, подвергающийся искусственной сайт-специфической модификации; 2) клонируемый ген; 3) ген, интересующий исследователя.

Ген репортерный * reporter gene – ген, кодирующий легко выявляемый продукт, так как их экспрессия придает организму четко выраженные легко измеряемые характеристики. Вследствие этих свойств, некоторые репортёрные гены используются исследователями как селективные маркеры, присоединяют к регуляторным последовательностям других генов для исследования проявлений генов в культурах клеток, а также для того, чтобы определить уровень экспрессии гена в клетке или в популяции.

Ген структурный * structural gene - любой ген, кодирующий какую либо полипептидную цепь или молекулу РНК, включая регуляторные гены, которые кодируют продукты, определяющие экспрессию других С.г.

Генетическая, или геновая инженерия (современная биотехнология, по терминологии Картахенского протокола) * genetic engineering (modern biotechnology, in terms of Cartagena Protocol) – технология получения новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и переноса созданных конструкций генов в реципиентный организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства.

Генетический продукт * gene product – продукт экспрессии гена в виде биохимического соединения, РНК или белка. По количеству этого продукта судят об активности гена, т.к. увеличение его количества коррелирует с наличием аллелей, вызывающих формирование

определенного фенотипического признака (группы признаков) или болезнь.

Генная пушка * gene gun – особое устройство для обстрела клетки микрочастицами с прикрепленным к ним генетическим материалом (ДНК, РНК) с определенной нуклеотидной последовательностью.

Генно-инженерная деятельность * genetic engineered activities – деятельность, связанная с созданием, испытанием, использованием, ввозом и вывозом ГМО.

Генно-инженерный (трансгенный) организм (ГИО) * genetically engineered (transgenic) organism (GMO) – живой организм, содержащий новую комбинацию генетического материала, полученную с помощью генетической инженерии. В литературе и официальных документах используют для обозначения таких организмов и иные термины: «генетически модифицированный организм» (ГМО), «живой измененный организм» (ЖИО). ГИО является объектом изучения биобезопасности.

Генно-инженерные, трансгенные, генетически модифицированные продукты (ГМ-продукты) * genetically engineered or transgenic or genetically modified products or genetically modified foodstuffs (GM-products; GM-foodstuffs) – продукты питания, произведенные из ГМО или содержащие их; обработанные материалы, происходящие из ГМО и содержащие поддающиеся обнаружению и способные к воспроизводству молекулы ДНК, включающие трансгены.

Геном * genome – полный набор генов, определяющих все свойства организма. Представляет собой характеристику вида.

Генотип * genotype – совокупность генов организма. В более широком смысле Г. – это совокупность (система) всех наследственных задатков организма, его наследственная основа, включающая в себя ядерные и неядерные (цитоплазматические и пластидные) гены, находящиеся в сложном взаимодействии друг с другом.

Генотоксичность * genotoxicity – свойство химических, физических и биологических факторов повреждать структуру и нарушать функционирование генетического аппарата клеток.

ГМИ, генетически-модифицированные ингредиенты * GMI, GMC, genetically modified ingredients or genetically modified components –

генетически-модифицированные компоненты продуктов питания, сырья для их производства и кормов.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) * DNA (deoxynucleic acid) – носитель наследственной информации у живых организмов. Высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (аденин – А, гуанин – Г, цитозин – Ц и тимин – Т), аperiodическим чередованием которых кодируется генетическая информация.

ДНК экзогенная * exogenic DNA – используемые в экспериментальной работе фрагменты ДНК, которых нет в геноме исследуемого организма или клетки.

ЖИО, живой измененный организм * LMO, living modified organism – то же, что генетически модифицированный организм (см.).

Затравка * primer – короткая нуклеотидная последовательность (олигонуклеотиды, часто РНК), комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК. Образует свободный 3'-ОН-конец, используя который ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеиновой цепи.

Килобаза, Кб, тысяча нуклеотидов * kilobase, kb – единица, используемая для выражения размера нуклеиновых кислот: 1 кб = 1000 нуклеотидов, или пар оснований, в дуплексной ДНК.

Клонирование * cloning – использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, например гена, в клонирующий вектор, и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, например в клетку кишечной палочки.

Молекулярное клонирование * molecular cloning – размножение молекул ДНК в составе вектора.

Нуклеотид * nucleotide – азотистое основание (А, Т, Г или Ц), к которому присоединена одна или более фосфатных групп; присоединение происходит по 5'-углеродному атому сахарного кольца.

Пара оснований, п.о. * base pair, bp – пара нуклеотидов (оснований), удерживаемых вместе водородной связью, являющаяся элементарной единицей в двухцепочечной нуклеиновой кислоте. По количеству п.о.,

содержащихся в молекуле, определяются размеры молекулы нуклеиновой кислоты, гена, сайта, хромосомы, генома.

Плазмида * plasmid – экстрахромосомный (внехромосомный) генетический элемент, закрытая, кольцевая, автономно реплицирующаяся дуплексная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 килобаз и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку (1–3% клеточного генома). Количество копий П. может зависеть от факторов среды. П. обычно придают селективные преимущества клетке хозяина (например, устойчивость к антибиотикам). Конъюгативные П. имеют набор генов, обеспечивающих их перенос в другие клетки.

Праймер * primer – затравка (см.).

Промотор * promoter – активная последовательность ДНК длиной 80–120 п.о., расположенная перед сайтом инициации гена, с которым связывается РНК-полимераза и инициирует транскрипцию.

Рекомбинация * recombination – комбинация генов у потомков (молекул, клеток, организмов), отличающаяся от их комбинации у родителей. Это может быть связано с обменом последовательностей ДНК между двумя хромосомами или с новым взаимным расположением (ассоциацией) генов в рекомбинанте, возникающим вследствие перекомбинации не связанных генов, кроссинговера между сцепленными генами или внутрицистронного кроссинговера. Естественный процесс Р. используется в экспериментах *in vitro* для клонирования ДНК. В результате Р. на молекулярном уровне образуются рекомбинантные (гибридные) молекулы ДНК.

РНК (рибонуклеиновая кислота) * RNA (ribonucleic acid) – как правило, одонитчатый низкомолекулярный полинуклеотид, характеризующийся наличием в нем сахара (рибозы, см.) и пиримидина урацила (вместо тимидина в ДНК). У многих вирусов геном состоит из одно- и двухнитчатых РНК. У про- и эукариот функции РНК сильно различаются. РНК обеспечивает информационный поток (информационная и транспортная РНК), выполняет ферментативные функции (рибозимы) и служит в качестве структурного каркаса для субклеточных частиц (рибосомная РНК). Клеточная РНК состоит из рибосомной (рРНК, до 80–90% всей клеточной РНК), транспортной (тРНК, 6–8%) и информационной (иРНК, менее 2%). Возможно, в клетках РНК никогда не встречается в свободном виде, а всегда существует в комплексе с белками, образуя рибонуклеопротеиновые частицы. Кроме названных трех основных групп, имеется также большое

количество особых мелких РНК, например низкомолекулярная ядерная РНК. У эукариот молекулы РНК, как правило, транскрибируются в виде больших молекул (предшественников про-РНК), а затем путем сплайсинга и другие посттранскрипционных модификаций преобразуются в активные (зрелые) формы, имеющие меньшие размеры.

Секвенатор или генетический анализатор * sequencer or sequencer launcher or genetic analyser – прибор для определения последовательности аминокислотных остатков в белках и нуклеотидов в нуклеиновых кислотах.

Секвенирование * sequencing or sequence analysis – определение последовательности оснований в ДНК или РНК или аминокислот в белке. Секвенирование включает также изучение вторичной и третичной структуры макромолекул, выявляет присутствия консенсусных последовательностей и другие молекулярные характеристики с помощью компьютерного анализа.

Секвенирование генома, С.г. * genome sequencing, GS – идентификация и порядковая запись всех нуклеотидных пар генома. С.г. проводят современными методами химической дегградации ДНК Максама–Гилберта и синтеза ДНК на матрице в присутствии терминаторов синтеза по Сэнгеру. Они позволяют сравнивать геномы организмов разных уровней эволюционной лестницы и ближе подойти к пониманию эволюции генов. На основании С.г. разрабатывается банк данных и компьютерных программ для их считывания.

Синтез * synthesis – процесс образования сложного вещества из более простых путем одной или серии реакций (например, синтез белков, ДНК, РНК).

Технология рекомбинантных ДНК * recombinant DNA technology – методы получения новых последовательностей ДНК путем соединения *in vitro* (в пробирке) двух или более негомологичных молекул ДНК и внедрения их в клетки живых организмов.

Трансген * transgene – ген, перенесенный из одного организма в другой или клетку, генно-инженерная конструкция, включающая ген(ы), который(е) предполагается передать реципиентному организму, и генетические элементы, необходимые для его (их) переноса, инкорпорации в геном ядра или клеточных органелл и обеспечения активности в этом организме и его потомстве.

Трансгенный организм * transgenic organism – 1. Организм, в геном которого с использованием методов генной инженерии перенесена чужеродная ДНК, экспрессирующаяся в нем. 2. Организм, несущий в своем геноме рекомбинантный ген.

Экспрессионный вектор для растений * plant expression vector – плазмидный клонирующий вектор, сконструированный для эффективной транскрипции клонированных фрагментов ДНК и трансляции соответствующих транскриптов в растительных клетках. Такие векторы содержат конститутивный высокоактивный (сильный) промотор (например, *CaMV* 35S-промотор). Сразу за промотором вставляется соответствующий сайт клонирования и последовательность, терминирующая транскрипцию у растений. Любой чужеродный ген без промотора, клонированный в такой экспрессионный вектор, активно экспрессируется в трансгенных растениях.

Электропорация, электротрансформация * electroporation or electrotransformation – метод прямого переноса макромолекул (ДНК) в клетки путем пробивания клеточных мембран короткими (1 мсек) электрическими импульсами, во время которых молекулы ДНК успевают проникнуть в клетку. Они могут оставаться в цитоплазме или ядре и быстро деградировать, но могут и ковалентно интегрировать в геном ядра или органеллы. Электропорация используется для повышения частоты генетической трансформации.

ЛИТЕРАТУРА

1* Биотехнология. Принципы и применение / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. / Перев. с англ. под ред. акад. А.А. Баева. – М.: Мир, 1988. – 240 с.

2* *Блюм, Я.* Современные биотехнологии – вызов времени / Я.Блюм [и др.]. – Київ: РА NOVA, 2002. – 102 с.

3* *Глазко, В. И.* Генетически модифицированные организмы: от бактерии до человека / В. И. Глазко. – Київ: К.: Изд-во «КВИЦ», 2002. – 210 с.

4* *Глик, Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Изд. 2-е. / Перев. с англ. под ред. д-ра биол. наук Н.К. Янковского. / Б.Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир. – 2002. – 589 с.

5* *Дромашко, С. Е.* Генетически модифицированные организмы и проблемы биобезопасности: учеб.-метод. пособие / С. Е. Дромашко [и др.]. – Минск: Ин-т подгот. науч. кадров Нац. акад. наук Беларуси, 2011. – 70 с.

6* *Ермишин, А. П.* Биотехнологии. Биобезопасность. Биоэтика. / А.П. Ермишин [и др.]. – Минск: Тэхналогія. 2005. – 430 с.

7* *Картель, Н. А.* Генетика: Энциклопедический словарь / Н.А.Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Беларуская навука, 2011. – 992 с.

8* *Катлинский, А.В.* Курс лекций по биотехнологии / А.В.Катлинский [и др.]. – М., 2005. – 152 с.

9* *Рудишин, С. Д.* Основы биотехнологии растений: уч. пособие / С.Д. Рудишин. – Вінниця: МП «Запал», 1998. – 272 с.

10* *Рыбчин, В. Н.* Основы генетической инженерии (изд.2-е) / В.Н.Рыбчин. – СПб.: Издат. СПбГТУ. – 2002. – 525 с.

11* *Сассон, А.* Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. – М.: Мир. – 1987. – 411 с.

12* *Шевелуха, В. С.* Сельскохозяйственная биотехнология: учебн. пособие / В. С. Шевелуха [и др.] / Под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая школа. – 2008. – 709 с.

13** ГОСТ ИСО 21570-2009 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте» – Минск: БелГИСС, 2009. – 104 с.

14** Качественное и количественное определение генетически модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием тест-систем и оборудования производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Методические рекомендации МР 02. 028-08 / Издание официальное. – Москва, 2008. – 22 с.

15** *Колотовкина, Я. Б.* Методы идентификации и мониторинг трансгенных компонентов в продуктах питания / Я. Б. Колотовкина [и др.] // Докл. РАСХН. – 2008. – №. 5. – С. 44–47.

16** *Кунах, В. А.* Биотехнология растений для улучшения условий жизни людей / В. А. Кунах // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 28–39.

17** *Секан, А. С.* Современные методы молекулярного анализа генетически модифицированных растений / А.С.Секан, Б.В.Сорочинский // Біотехнологія. – 2011.– Т. 4, № 1. – С. 106–114.

18** *Скрябин, К. Г.* Комбинирование двух технологических платформ для полногеномного секвенирования человека // К. Г. Скрябин [и др.] // Acta Naturae. – 2009. – Vol. 3. – С. 113–119.

19** *Спиридонов, В. Г.* Валидация методики качественного и количественного определения генетически модифицированных зерновых культур методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // В. Г. Спиридонов, Л. М. Ищенко, С. Д.Мельничук // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 96–101.

20** СТБ ГОСТ Р 52173-2005 Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения. – Минск: БелГИМ, 2005. – 18 с.

21** *Чимленко, Ф. А.* Определение ГМО в продуктах питания. Сравнение методик выделения ДНК / Ф. А. Чимленко, Н. П. Минаева, Л. П. Сидорова // Методы и объекты химического анализа. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 28–37.

22** *Cheung, F.* Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology / F. Cheung [e. a.] // BMC Genomics. – 2006. – Vol.7. – P. 272.

23** Compendium of reference methods for GMO analysis. – JRC Reference Reports. – 2011. – 259 p.

24** *Fuller, C. W.* The challenges of sequencing by synthesis // C. W. Fuller [e. a.] // Nat. Biotechnol. – 2009. – Vol. 27. P. 1013–1023.

25** *Goldberg, S.M.* A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes / S. M. Goldberg [e. a.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – Vol. 103. P. 11240–11245.

26** *Green, R.E.* Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA / R. E. Green [e. a.] // Nature. – 2006. – Vol. 444. – P. 330–336.

27** *Poinar, H.N.* Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA / H. N. Poinar [e. a.] // Science. – 2006. – Vol. 311. – P. 392–394.

28*** *Афонин, А. А.* Генетическая безопасность / А. А. Афонин. – [Электронный ресурс] – «Общая и теоретическая биология: генетика,

эволюция, цитология, экология – учебно-методический комплекс (УМК)». – Режим доступа: <http://afonin-59-bio.narod.ru/>

29*** Натальин, П. 454-секвенирование (высокопроизводительное пиросеквенирование ДНК) / П. Натальин. – [Электронный ресурс] – «Биомолекула». – 2008. – Режим доступа: <http://www.biomolecula.ru/content/21>

30*** Прохорчук, Е. Код жизни: прочесть не значит понять / Е. Прохорчук. – [Электронный ресурс]. – «Биомолекула». – 2010. – Режим доступа: <http://www.biomolecula.ru/content/778>

31*** ИКА – лидер на рынке лабораторных и аналитических технологий. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ika.com/-Lab-Eq/Mills-Lab-mills-Grinding-mill-csp-194/>

32*** ISAAA Brief 44-2012: Slides & Tables. – [Electronic resource]. – International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. – 2013. – Mode of access: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/pptslides/default.asp>

33*** Labelling of GMO products: Freedom of choice for consumers. – [Electronic resource]. – GMO Compass. – January 25, 2007. – Mode of access: <http://www.gmo-compass.org/eng/regulation/labelling>

34*** Zel, J. How to reliably test for GMOs / J. Zel [e. a.]. – [Electronic resource]. – Springer, 2012. – Mode of access: <http://www.springer.com/978-1-4614-1389-9>

Условные обозначения:

* основная литература;

** дополнительная литература;

*** интернет-сайты.

Учебное издание

Макеева Елена Николаевна, **Дромашко** Сергей Евгеньевич

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

Учебно-методическое пособие

Редактор-корректор А. А. Сычѐв

Компьютерная верстка С. Е. Дромашко

Подписано в печать 05.04.2013. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 3,95. Уч.-изд. л. 3,58. Тираж 150 экз. Заказ 128.

ГУО «Институт подготовки научных кадров Национальной академии наук Беларуси»
ЛИ №02330/0552815 от 17.02.2010.
Ул. Кнорина, 1, 220049, г. Минск.

Типография РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по механизации сельского хозяйства»
ЛП № 02330/0150026 от 10.05.2007.
Ул. Кнорина, 1, корп. 3, 220049, г. Минск.