

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Академия наук Республики Башкортостан

*К столетнему юбилею
Нобелевских премий
и к 50-летию открытия
двойной спирали ДНК*

А.В. Чемерис, В.А. Вахитов

НОВАЯ СТАРАЯ ДНК

**Уникальные черты самой главной молекулы,
или почему ученые разных специальностей
в последнее время обращают на ДНК
все больше внимания**

Уфа – 2002

УДК 577
ББК 28.07
Ч42

А.В. Чемерис, В.А. Вахитов. НОВАЯ СТАРАЯ ДНК. Уникальные черты самой главной молекулы, или Почему ученые разных специальностей в последнее время обращают на ДНК все больше внимания / Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. – Уфа, 2002. – 80 с.

За более чем столетнюю историю изучения о ДНК накоплена масса сведений, часть из которых нашли свое отражение в данной брошюре. Наибольшее внимание уделено результатам исследований последних десятилетий, ставших возможными благодаря открытию двойной спирали ДНК, разработке методов клонирования, секвенирования, олигонуклеотидного синтеза, сайт-направленного мутагенеза, полимеразной цепной реакции, за которые в разные годы были присуждены Нобелевские премии. Приводятся подходы и перспективы дальнейшего изучения и использования молекул ДНК в различных отраслях науки и человеческой деятельности.

Брошюра предназначена широкому кругу биологов, исследователям, работающим в других областях естествознания и в гуманитарной сфере – научным сотрудникам, преподавателям, аспирантам, студентам, а также учащимся старших классов.

Под редакцией
доктора биологических наук профессора В.А. Вахитова

Рецензенты:
кандидат биологических наук С.М. Бикбулатова
кандидат биологических наук Ф.Р. Гималов

Утверждено к печати
Ученым советом Института биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук

Оглавление

| | |
|---|----|
| Вместо предисловия | 4 |
| Мендель, Мишер, Морган и другие | 6 |
| ДНК и Нобелевские премии | 7 |
| Двойная спираль | 8 |
| Генетический код | 9 |
| От РНКового мира к ДНКовому | 11 |
| Химический синтез ДНК | 12 |
| Клонирование и секвенирование ДНК | 13 |
| Метод ПЦР и новая эра в исследовании ДНК | 18 |
| Сайт-направленный мутагенез | 20 |
| Секвенирование полных геномов организмов | 21 |
| Биоинформатика | 24 |
| ДНК-чипы | 28 |
| «Новая» ПЦР | 30 |
| ДНК древняя и не только | 33 |
| ПЦР – некоторые аспекты теории метода | 37 |
| ПЦР и новая судебная медицина и криминалистика | 40 |
| Генетические штрих-коды организмов | 42 |
| ДНК-компьютинг | 47 |
| ДНК-шаффлинг | 50 |
| ДНК и наноструктуры | 53 |
| Простые и модифицированные олигонуклеотиды | 57 |
| Генотерапия | 64 |
| ДНК-вакцины | 67 |
| Заказной синтез олигонуклеотидов и заказное секвенирование ДНК | 72 |
| Другие исследования молекул ДНК | 74 |
| Digitally yours, DNA (вместо заключения) | 75 |
| Благодарности | 77 |

Вместо предисловия

К написанию данной брошюры авторов подвигло сразу несколько обстоятельств, среди которых, помимо юбилейных дат, их собственный, как молекулярных биологов, интерес к структурно-функциональной организации различных генов и, следовательно, к ДНК; все более широкое применение анализа ДНК в судебной медицине и криминалистике; четко наметившаяся в последние годы тенденция к использованию обычных либо модифицированных олигонуклеотидных блоков в качестве лекарственных препаратов, диагностических средств, проводников электричества, всевозможных наноструктур и наномеханических устройств; развитие ряда других направлений исследований молекул ДНК, включая молекулярную археологию, молекулярную палеонтологию и ДНК-компьютинг, бывших ранее в своих классических вариантах весьма далекими от биологии.

Другой причиной такого рассмотрения различных особенностей молекул ДНК явилось желание авторов подготовить некий междисциплинарный труд, который мог бы быть полезен разным исследователям, поскольку перспективные новые направления рождаются, главным образом, именно на «стыках наук». Причем авторы предлагают рассматривать этот материал в качестве своеобразного приглашения к совместным исследованиям молекул ДНК и посему ими было сочтено возможным в ходе его написания неоднократно обратиться к собственным результатам последних лет, которые были получены при выполнении ряда проектов по грантам РФФИ, РФФИ-Агидель, INTAS, по заданиям АН РБ и в рамках Программы государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации.

Поскольку, в процессе подготовки этой брошюры было проанализировано около 300 экспериментальных и обзорных публикаций, а также значительное количество интернетовских web-страниц, то указать их в виде списка цитируемой литературы просто не представлялось возможным, и было решено отказаться от него совсем. Также из-за экономии места в ходе изложения этого материала приходилось, помимо собственных, ограничиваться лишь кратким описанием наиболее важных результатов, полученных огромной армией ученых, посвятивших себя исследованию ДНК. По этой же причине пришлось обойтись без иллюстраций, которые, безусловно, способствовали бы лучшему восприятию изложенного материала, но при этом увеличили бы объем статьи, по меньшей мере, вдвое. Поэтому авторы предлагают всем заинтересованным читателям задавать возникающие вопросы по электронной почте через действующий почтовый ящик с простым и кратким адресом – DNA@anrb.ru.

Наряду с обычной ДНК, исследуемой ныне с помощью целого ряда современных методов, рассматриваются здесь и синтезированные химическим путем ее «новые» модифицированные аналоги, часть из которых как бы даже и не ДНК вовсе, да и выполняемые ими функции кардинально отличаются от таковых, изначально предусмотренных для нее Природой. Что касается, например, древней ДНК, всюю фигурирующей в научной литературе под таким уже ставшим привычным словосочетанием, то, несмотря на ее возраст, исчисляющийся подчас не одним десятком миллионов лет, эту «старую» ДНК можно вполне считать «новой», поскольку обнаружение и исследование ее особенностей стало доступно достаточно недавно. И выведенное в заголовок определение «новая старая» ДНК, на наш взгляд, довольно полно отражает описанные ниже как важные черты, так и проистекающие из них возможности самой главной молекулы, каковой ДНК, бесспорно, может считаться. Более того, если вспомнить, что один из классиков пусть не совсем верно и сильно упрощенно, но определял жизнь как способ существования белковых тел, то с позиций сегодняшнего дня можно сказать, что «ДНК – (основная) молекула жизни!»

Прежде чем перейти к рассмотрению непосредственно уникальных особенностей ДНК, видимо, стоит немного напомнить историю ее открытия и очень кратко проследить процесс получения различных о ней сведений, послуживших отправными точками к широкомасштабным исследованиям, приведшим к нынешнему состоянию дел в этой области человеческих знаний.

Мендель, Мишер, Морган и другие

В 1866 г. чешский священник Г. Мендель опубликовал работы по наследованию окраски цветков садового гороха, где им была высказана мысль, что за наследование физических свойств организма отвечают некие «элементы», которые мы сегодня называем генами. Хотя это открытие в то время не могло иметь к молекулам ДНК какое-либо отношение (поскольку, что такое ДНК, да и что такое ген просто не было известно), оно заложило определенные основы для последующего изучения наследственности и, соответственно, генов. Тогда их природа была просто загадочна. Спустя 3 года, в 1869 г. швейцарским врачом Ф. Мишером в ядрах лейкоцитов человека была впервые обнаружена названная им «нуклеином» особая субстанция (уже затем переименованная Р. Альтманом в нуклеиновую и позже в дезоксирибонуклеиновую кислоту), функция которой была также абсолютно не ясна. Вопросы хранения и передачи наследственной информации всегда крайне интересовали ученых и уже с самого начала века двадцатого стали проводится интенсивные исследования, направленные на выяснение их закономерностей. В этой связи нельзя не упомянуть американского ученого Т. Моргана*, который опубликовал результаты своих первых экспериментов в области генетики в 1909 г. и внес огромный вклад в развитие этой науки, что было отмечено Нобелевской премией 1933 г., присужденной ему за открытие функций хромосом как носителей наследственности.

На протяжении долгих лет осуществлялись многочисленные попытки выделить то самое вещество клетки, те самые «элементы», в которых заложена генетическая информация. На роль таких молекул поочередно выдвигались различные биополимеры. Весьма долгое время предпочтение отдавалось белкам, большое разнообразие которых обеспечивалось участием в их формировании до 20 аминокислот. Что касается ДНК, то существовало мнение о невозможности кодирования ею всего существующего биоразнообразия только из-за того, что в состав ДНК входит, как было показано в 20-х гг. XX столетия биохимиком П. Левеном, всего-навсего 4 типа структурных единиц, названных им нуклеотидами. Более того, долгое время считалось, что нуклеиновые

* Т. Морган в нашей стране одно время приобрел такую известность, что его имя стало даже нарицательным и использовалось в негативном контексте. Та же «участь» постигла в те годы и Г. Менделя, а российских ученых-генетиков, находившихся тогда на передовых рубежах науки уничижительно называли «морганисты-вейсманисты-менделисты».

кислоты представляют собой монотонные полимерные молекулы с однообразным строгим чередованием входящих в их состав мономеров-нуклеотидов. Прошло достаточно много времени, пока, благодаря элегантным экспериментам О.Эвери и его коллег, выполненным в 1943 г., удалось доказать, что именно ДНК – этот сравнительно просто организованный биополимер – и есть вещество наследственности. В опытах с бактериофагами, будущими Нобелевскими лауреатами 1969 года М.Дельбрюком, А.Херши и С.Лурия в середине 40-х гг. еще более убедительно было показано участие ДНК в передаче наследственной информации.

ДНК и Нобелевские премии

Первые же исследования, указывающие на роль ДНК как носителя генетической информации, тотчас привели к огромному росту интереса к самой молекуле ДНК и к особенностям ее функционирования в живой клетке. Последовавшие за этим события позволяют сделать вывод, что интерес этот, за прошедшие без малого шесть десятилетий, не только не уменьшился, но и постоянно растет. В качестве одного из доказательств тому можно привести многочисленные Нобелевские премии, которые были присуждены ученым разных стран за открытия, или напрямую касающиеся расшифровки “тайн” ДНК, или тесно с ней связанные. Пожалуй, найдется не так много сложных молекул, которые бы достаивались чести столько раз (как ДНК) быть упомянутыми в традиционных лекциях Нобелевских лауреатов. Дополнительной причиной обращения в данной статье к Нобелевским премиям служит их столетний юбилей, отмечаемый всей мировой общественностью в декабре 2001 г.

Некоторые из этих, имеющих отношение к ДНК, Нобелевских премий, согласно действующим номинациям были присуждены за исследования в области химии, другая часть – за исследования по физиологии и медицине. И это вполне справедливо, поскольку ДНК, будучи гигантским биополимером, безусловно, является химической молекулой, а с другой стороны ДНК – вещество наследственности – хранящая в себе сведения о живой материи и определяющая особенности жизнедеятельности (или физиологии) того или иного организма.

Полный список Нобелевских лауреатов, удостоенных подобной чести за свои исследования, так или иначе связанные с ДНК, был бы весьма

внушительен и вряд ли здесь необходим, поскольку желающие могут разыскать их на web-странице Нобелевского комитета (www.nobel.se), доступной посредством интернета. Упомянутые же ниже наиболее ключевые (по отношению к ДНК) Нобелевские премии составляют лишь некоторую часть и охватывают исследования структуры ДНК, особенности ее функционирования, химический и ферментативный синтез молекул ДНК, а также методы лабораторного обращения с ней.

Двойная спираль

Наверное, одним из самых важных открытий прошедшего столетия в биологии, за которое в 1962 г. была присуждена Нобелевская премия, можно считать установление весной 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК в виде известной сегодня, наверное, чуть ли не каждому двойной спирали. Так, молекула ДНК в наиболее типичной В-конфигурации представляет собой двойную закрученную плектонемически (т. е. требующую обязательного раскручивания при ее разделении на составные части) правую спираль, образованную двумя полинуклеотидными цепями, расположенными антипараллельно в 5'→3'- и 3'→5'-направлениях соответственно, где цифры отражают нумерацию атомов углерода в дезоксирибозном кольце азотистых оснований ДНК, между которыми и происходит формирование фосфодиэфирных связей. Принято считать, что один полный виток такой спирали имеет размер около 34 ангстрем и в него укладывается приблизительно 10 нуклеотидов, а диаметр двух цепей ДНК при этом составляет 20 ангстрем. Пожалуй, главной из уникальных черт этой молекулы как раз и следует считать ее двуцепочечную организацию. Причем, при формировании двойной спирали действует принцип комплементарности, согласно которому аденинам одной цепи соответствуют тимины другой, а гуанинам одной – цитозины другой и наоборот. Эти соотношения известны как правила Чаргаффа, который в 1950 г. показал, что ДНК включает равные количества определенных азотистых оснований и вывел для двуцепочечной ДНК следующие закономерности: $A = T$, $G = C$; $A + G = C + T$; $A + C = G + T$. Важность этого открытия, хотя и была оценена не сразу, тем не менее, непреходяща, поскольку все нынешние работы с ДНК, независимо, молекулярная ли это биология либо, как будет видно из дальнейшего изложения, другая, казалось бы, далекая от нее дисциплина, так или иначе построены на принципе комплементарности азотистых оснований,

который, безусловно, можно считать второй уникальной чертой этой молекулы.

Параллельно с анализом структуры ДНК изучались особенности ее ферментативного синтеза, приведшие в 1958 г. к обнаружению, в том числе, фермента ДНК-полимеразы. В 1959 г. С.Очоа и его ученику А.Корнбергу были присуждены Нобелевские премии «за открытие механизмов биологического синтеза рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот». Хотя в настоящее время в молекулярной биологии более широкое применение находят несколько иные ДНК полимеразы с улучшенными свойствами (либо позже обнаруженные в природе, либо слегка измененные или даже сконструированные исследователями), сами принципы ферментативного построения новых молекул ДНК *in vitro* остались неизменными. И уникальную возможность саморазмножения молекул ДНК при определенных условиях в системе *in vitro* с учетом комплементарности азотистых оснований также смело можно отнести к одной из ее важных черт.

С изучением ферментативного биосинтеза ДНК тесно переплетались работы по исследованию процесса репликации. Элегантными экспериментами Ф.Сталя и М.Мезелсона в 1958 г. с помощью аналитического ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия молекул ДНК, меченных тяжелыми изотопами углерода и азота, был доказан полуконсервативный характер репликации «двойной спирали». Хотя за эту работу и не была присуждена Нобелевская премия, справедливости ради, следует отметить, что Ф.Сталь на нее все же номинировался, что само по себе уже говорит о весомости его открытия. Многие современные методы основаны на эксплуатации этого принципа, который также можно отнести к уникальным свойствам молекулы ДНК.

Генетический код

После того, как стала известна структура ДНК, весьма важно было понять, как именно в этой молекуле записывается наследственная информация. Было ясно, что для существующего количества аминокислот дуплетный код маловат, а триплетный – более чем достаточен, в связи с чем допускалось, что генетический код перекрывается, но тогда должны были бы быть определенные ограничения на соседство некоторых аминокислот в белках.

Значительную роль в решении данного вопроса сыграл наш бывший соотечественник физик Г.А.Гамов, который проанализировал все известные к тому времени аминокислотные последовательности белков и в 1957 г. пришел к выводу, что код должен быть триплетным. Немало ученых разных стран (среди которых были внесшие наибольший вклад англичанин Ф.Крик, а также американец индийского происхождения Х.Г.Корана) занялись впоследствии расшифровкой генетического кода. С помощью многочисленных экспериментов удалось подтвердить, что код действительно триплетен и установить *какие* тройки нуклеотидов *что* кодируют. В 1968 г. Х.Г.Коране вместе с еще двумя учеными была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине «за расшифровку генетического кода и выяснение его роли в синтезе белков». В поздравительной речи представитель Каролинского института П.Рейхард сравнил нуклеиновые кислоты и белки с языками, а их составные элементы – с буквами алфавита. Он отметил: «Химическая структура нуклеиновых кислот определяет химическую структуру белка, а алфавит нуклеиновых кислот – алфавит белков. Генетический код – это словарь, благодаря которому возможен переход с одного алфавита на другой». С позиций сегодняшнего дня можно считать, что это скорее специальная обеспечивающая транслитерацию программа-переводчик, тем более что в настоящее время под «генетическим словарем» начинают понимать нечто иное, чего в ходе дальнейшего изложения нам еще предстоит коснуться.

Поскольку число возможных комбинаций триплетов из 4 нуклеотидов составляет 64 (4^3), то совершенно ясно, что такой код для 20 аминокислот избыточен, и некоторым аминокислотам соответствует более чем один триплет, да и сигнал терминации трансляции, как, оказалось, кодируют три триплета. Интересно отметить, что для всех живых организмов генетический код универсален, что подтверждает общность происхождения всего живого на нашей планете и даже небольшие отличия триплетного кодирования в митохондриальных геномах, касающиеся преимущественно терминирующих кодонов, не дают права думать иначе, а лишь свидетельствуют, что код эволюционировал. Так, считается, что когда-то для кодирования, вероятно, небольшого числа просто организованных аминокислот было достаточно двухбуквенного генетического кода, обеспечивающего существование 16 (4^2) различных вариантов кодонов. Неким подтверждением этому служит то, что ныне для большинства аминокислот третий нуклеотид в триплетном кодоне мРНК (или в антикодоне тРНК ?) не особенно важен.

От РНКового мира к ДНКовому

В этой небольшой главке, пожалуй, будет уместно обратиться к исследованиям, направленным на восстановление событий пребиотической истории, когда на нашей планете существовали лишь весьма простые химические вещества, построенные, в том числе, из атомов водорода, углерода, азота и кислорода. Известный российский ученый А.И.Опарин еще в 1924 г. в своем знаменитом труде «Происхождение жизни» рассмотрел процессы, которые могли привести к синтезу неких соединений (которые мы сегодня называем органическими) и переходу к первым жизненным формам. Уже в наши дни была весьма убедительно продемонстрирована принципиальная возможность синтеза из упоминаемых в своем труде и Опариним цианистоводородной кислоты, аммиака и других соединений – азотистых оснований (пиримидинов и пуринов). Сборка этих мономерных звеньев в полинуклеотидные цепочки, вероятно, происходила на своеобразных твердых фазах, которыми могли служить слюда и некоторые типы глин. Моделируя условия примитивной Земли, современными химиками было показано, что благодаря высокой реакционной способности метилурацила может образовываться большое число разнообразных его производных, в чем они усматривают вовлечение через них молекул ДНК и белков в процессы примитивного размножения. Возможно, что среди первых полимерных молекул на нашей планете были просто устроенные полирибонуклеотиды, поскольку известно, что урацил входит в состав именно рибонуклеиновых кислот.

Таким образом, на заключительном этапе пребиотического существования Земли и, может быть, в самом начале биотической жизни господствовал так называемый РНКовый мир. Дополнительным доказательством этому служат обнаруженные у некоторых молекул РНК каталитические свойства, благодаря чему они получили название рибозимов. Это открытие было также отмечено Нобелевской премией, присужденной американскому ученому Т.Чеху в 1986 г. Считается, что некоторые сохранившиеся у молекул РНК каталитические свойства (которых раньше было, вероятно, значительно больше) – это некий атавизм – и более подходящие для этой цели, возникшие позднее белковые молекулы смогли у них эти свойства перенять. С течением времени некоторые молекулы РНК смогли сохранить, помимо своих кодирующих свойств, еще и наследственные, но появившиеся молекулы ДНК, как более удобные для передачи информации потомству,

постепенно превратили жизнь на нашей планете в ДНКовый мир. И даже некоторые существующие в природе РНК-содержащие вирусы для своего размножения с помощью специального фермента, о котором еще будет сказано особо, переходят в форму ДНК.

Химический синтез ДНК

Огромный вклад в дело химического синтеза олигонуклеотидных блоков с заданной последовательностью внес уже упоминавшийся Х.Г. Корана, которому вместе с коллегами пришлось преодолеть многочисленные трудности. Так, 60-е и начало 70-х годов двадцатого столетия были периодом фосфодиэфирного синтеза, который позволил сдвинуть весь этот пласт, но оказался непригоден для широкого использования из-за своей крайней медлительности, поскольку средняя скорость наращивания олигонуклеотидной цепи этим методом составляла одно звено в месяц. Более того, осуществить подобный процесс мог только высококлассный химик, обладавший к тому же адским терпением. С появлением в начале 70-х гг. фосфотриэфирного метода, скорость синтеза заметно возросла, что постепенно превратило процесс получения олигонуклеотидов в довольно рядовое событие.

Произошедшее изменение химии синтеза вместе с сопровождавшим его процессом автоматизации и использованием полимерных носителей в виде твердой фазы довершили начатое дело и привели к еще более широкому вовлечению олигонуклеотидов в молекулярно-биологические эксперименты. Здесь можно усмотреть некую аналогию природных процессов с только зарождавшимся в самом начале 60-х годов в ходе расшифровки генетического кода олигонуклеотидным синтезом и уже нынешним состоянием дел в этой области. И если мысленно еще раз вернуться к нашей пребиотической планете, то становится очевидным резкий скачок, который мог произойти при осуществлении синтеза на тогдашних природных твердых фазах, потребовавший, однако, предварительной наработки мономеров для повышения их общей концентрации, необходимой для обеспечения эффективной полимеризации. Можно также предполагать, что с накоплением исходных мономеров, и затем полинуклеотидных молекул подобные процессы, вероятно, заметно ускорились, а с появлением у первых полимеров первичных каталитических свойств они стали идти во много раз быстрее. Так, в качестве примера практически несопоставимого по

времени химического синтеза ДНК с помощью самого быстрого сейчас Н-фосфонатного подхода (обеспечивающего присоединение очередного нуклеотида в зависимости от его типа за 35-50 сек) и ферментативного построения ДНК, можно привести скорость полимеризации ДНК ДНК-полимеразой фага Т4, способной по принципу комплементарности включать в новую цепь приблизительно 15 тысяч (!) нуклеотидов за 1 мин.

Продолжавшееся на протяжении 70-х годов совершенствование химии синтеза олигонуклеотидов завершилось в начале 80-х революционным переходом к фосфорамидитному методу. Благодаря использованию данных высокорекреакционных соединений трехвалентного фосфора, скорость синтеза и его эффективность возросли настолько, что один цикл синтеза, занимавший прежде целый месяц, сократился до нескольких минут на звено, а конечный выход олигонуклеотидов приблизился к количественному. По существу, методология синтеза, пожалуй, больше не нуждается в каких-либо усовершенствованиях, полностью обеспечивая потребности молекулярных биологов и других исследователей в олигонуклеотидах заданной последовательности, дополнительным доказательством чему служит то, что олигонуклеотидный синтез в настоящее время с помощью автоматических синтезаторов ДНК способен осуществлять даже непрофессиональный химик. На плечи же высококласных специалистов теперь легла задача по разработке методов синтеза различных модифицированных олигонуклеотидов и их производных, использование которых позволяет решать молекулярным биологам (и не только им) совершенно новые грандиозные задачи. Однако чтобы при данном изложении не сильно нарушать хронологический порядок развития исследований, связанных с ДНК, придется на время отойти от рассмотрения олигонуклеотидов и их с ними и вернуться в лоно классической молекулярной биологии.

Клонирование и секвенирование ДНК

Расшифровка генетического кода дала молекулярным биологам ключ к переводу белковых текстов в последовательности РНК, ДНК и наоборот, но последнее могло осуществляться только теоретически, поскольку самих текстов ДНК еще не было. Главным препятствием для определения нуклеотидных последовательностей молекул ДНК был их огромный размер и невозможность получения небольших дискретных фрагментов ДНК, пригодных для секвенирования. Значительно

меньший размер РНК и наличие определенных классов этих молекул, а также выявление специфических рибонуклеаз, расщепляющих их в строго определенных местах, обусловили успехи в определении нуклеотидных последовательностей именно этих нуклеиновых кислот. Так, в 1965 г. была расшифрована первичная структура аланиновой тРНК, за что в 1968 г. Р.Холли совместно с М.Ниренбергом и тем же Х.Г.Кораной и получили Нобелевскую премию.

Важность же определения нуклеотидных последовательностей ДНК тем более не вызвала никаких сомнений. Однако отсутствие производительных методов секвенирования ДНК делало решение этой проблемы малореальным, в связи с чем оно многими учеными откладывалось тогда на следующее столетие. Так, уже упоминавшийся выше Э.Чаргафф в 1968 г. писал, что «... чтение последовательности ДНК может стать задачей XXI века ...». Однако стремительное развитие молекулярной биологии привело во второй половине семидесятых годов к долгожданной возможности определения нуклеотидных последовательностей достаточно длинных фрагментов ДНК. Этим событиям предшествовал целый ряд важных открытий. Очень большое значение для всей молекулярной биологии имело обнаружение ферментов рестрикции (без которых нынешняя молекулярная биология просто немыслима!), позволяющих расщеплять молекулы ДНК в строго определенных для каждого фермента местах с образованием так называемых «липких» или «тупых» концов. Важность этого открытия была подчеркнута присужденной в 1978 г. Нобелевской премией сразу трем ученым: В.Арберу, Д.Натансу и Г.Смиту. Несколько дольше за исследования метилтрансфераз, являющихся неотъемлемой частью системы рестрикции-модификации, пришлось ждать Нобелевскую премию Р.Робертсу, удостоенному ею вместе с двумя другими учеными в 1993 г. Причем, так случилось, что в настоящее время именно под его руководством поддерживается очень важная для молекулярных биологов база данных по рестрикционным эндонуклеазам и метилазам. Раз уж речь зашла о ферментах нуклеинового обмена, то попутно можно заметить, что обнаружение в 1970 г. фермента ревертазы или обратной транскриптазы, осуществляющей синтез молекулы ДНК по матрице РНК при репликации у некоторых вирусов (о чем уже упоминалось выше) также вылилось для Д.Балтимора и Г.Темина в Нобелевскую премию 1975 г. И если протекание процесса обратного обычной транскрипции путем синтеза цепи ДНК по цепи РНК и нельзя считать уникальной особенностью ДНК, то, по крайней мере, можно рассматривать его как интересное свойство этой молекулы, дающее

экспериментатору возможность клонировать так называемую кДНКовую копию молекул РНК.

Обнаруженные в те же годы ферменты ДНК лигазы позволили «сшивать» расщепленные рестрикционными эндонуклеазами фрагменты ДНК с векторными последовательностями бактериальных плазмид или бактериофагов и получать таким образом рекомбинантные клоны на основе клеток бактерии кишечной палочки *Escherichia coli*, являющейся «главным» микроорганизмом в арсенале молекулярного биолога. Так, технология рекомбинантных ДНК позволила нарабатывать интересные исследователя фрагменты ДНК в ощутимых количествах, достаточных для проведения с ними необходимых экспериментов, а саму возможность ферментативного «сращивания» концов фрагментов ДНК (происходящего, помимо отдельных случаев, согласно принципа комплементарности), равно как и специфическое расщепление с помощью рестрикционных эндонуклеаз, все же можно рассматривать как уникальные черты этой молекулы. (Справедливости ради следует отметить, что эти ферментативные превращения ДНК происходят под действием обладающих каталитической активностью белков и роль самой ДНК здесь вторична.) Важность получения рекомбинантных молекул ДНК, способных к репликации в чужеродном организме, была по достоинству оценена Нобелевским комитетом, присудившим в 1980 г. американскому ученому П.Бергу Нобелевскую премию, что абсолютно не может вызывать каких-либо сомнений, поскольку этот подход оказал грандиозное воздействие на все дальнейшее течение молекулярной биологии.

Таким образом, целая череда знаменательных событий в молекулярной биологии привела к долгожданной возможности определения последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК. Получение с помощью предложенных методов секвенирования ДНК совершенно новых сведений в виде генетических текстов, ранее недоступных, оказало настолько значительное влияние на развитие не только самой молекулярной биологии, но и общей биологии и других смежных областей знаний, что заставило по-новому взглянуть на планирование и проведение экспериментов, на адекватность получаемых результатов поставленным задачам, вызвала к жизни разработку соответствующего компьютерного обеспечения и пр. Словом, вся биологическая наука и связанные с ней дисциплины получили благодаря этим методам очень мощный импульс. Поэтому вполне оправданным выглядит решение Нобелевского комитета о присуждении в том же 1980 г. Нобелевской премии по химии У.Гилберту и Ф.Сэнгеру

за разработку ими в 1977 г. методов секвенирования ДНК путем химической дегградации и ферментативного построения, соответственно. (Хотя это и не имеет отношения к ДНК, как к главному здесь предмету рассмотрения, все же справедливости ради следует отметить, что Ф.Сэнгер является одним из немногих ученых – дважды лауреатов Нобелевской премии, а первая премия была присуждена ему еще в 1958 г. за вклад в изучение структуры белков и, в частности, инсулина.)

Так, в результате разработки производительных методов секвенирования ДНК у ученых-биологов появилась возможность получать принципиально новые данные в виде конкретных последовательностей нуклеотидов каких-либо генов, прочих фрагментов ДНК или целых геномов. Можно сказать, что, появившись, секвенирование ДНК перевело биологическую науку (или по крайней мере, ее часть, исследующую молекулы ДНК) в группу так называемых точных наук, поскольку неким стандартом является в настоящее время наличие не более одной ошибки на 10000 определяемых нуклеотидов, что соответствует 99,99% точности.

В основе метода секвенирования ДНК путем химической дегградации лежит ограниченное расщепление меченного фрагмента ДНК под действием специфических реагентов. Непременным условием проведения секвенирования этим методом является наличие фрагмента ДНК, меченного только по одному концу. Секвенирование ДНК по Сэнгеру, называемое также методом секвенирования путем терминации цепи, основано на принципе ферментативного построения новой комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице при происходящем в разных местах цепи ДНК ингибировании ее дальнейшего роста. Оба эти метода секвенирования, ставшие уже классическими, кардинально различаясь в своих подходах при подготовке меченных фрагментов ДНК, требуют разделения продуктов реакции по размеру с помощью высоковольтного электрофореза в полиакриламидном геле высокого разрешения, способного в достаточно широком диапазоне разделять молекулы ДНК, отличающиеся между собой по длине всего на один нуклеотид. Все составляющие процесса секвенирования ДНК как тем, так и другим методом, за годы, прошедшие с момента их разработки, подверглись сильной модификации и производительность сегодняшнего секвенирования просто поражает, а главным прорывом было, конечно же, применение автоматических секвенаторов ДНК, рассчитанных на детекцию флуоресцентной метки и прямое занесение получаемых результатов в компьютер.

Определяемые в ходе секвенирования нуклеотидные последовательности в виде так называемых ДНКовых текстов, повлекли за собой разработку специализированных компьютерных программ по их анализу, поскольку обращение с такими большими массивами данных без помощи компьютеров стало просто невозможным. Потребовались пакеты прикладных программ, позволяющих проводить целый ряд необходимых операций по всевозможному анализу секвенированных фрагментов ДНК, начиная от занесения последовательности нуклеотидов в компьютер до выявления особенностей кодируемых ими белков. Другим аспектом исследования секвенированных молекул ДНК стали вопросы хранения полученных данных и обеспечение широкого доступа ученых к уже известным нуклеотидным последовательностям. В результате были образованы специализированные базы данных, ставящие главной целью сбор и хранение нуклеотидных последовательностей. Сначала – GenBank в США, потом – EMBL в Европе, а затем DDBJ – в Японии. И поскольку эти базы данных сейчас регулярно обмениваются между собой поступающей к ним информацией, то независимо от места занесения любая последовательность нуклеотидов какого-либо фрагмента ДНК становится доступной через любой из этих банков. Так, например, GenBank, начинаясь с хранения единичных последовательностей, вырос вместе с остальными до огромных хранилищ, и по состоянию на начало июня 2002 г. в них содержалась информация о 17 с лишним миллионах последовательностей ДНК, состоящих в сумме из более чем 20 миллиардов нуклеотидов. Считается, что в последнее время количество секвенированных молекул ДНК каждое полугодие увеличивается приблизительно на треть.

Здесь, видимо, уместно будет заметить, что в этом объединенном Международном банке данных DDBJ/EMBL/GenBank имеется и относительно скромный вклад авторов, которые вместе с коллегами в течение 1988 – 2002 гг. зарегистрировали более 80 нуклеотидных последовательностей генов и различных фрагментов ДНК вирусов, бактерий, растений и животных общей протяженностью свыше 40 тысяч нуклеотидов. Интерес к секвенированию ДНК вылился для авторов в разработку прогрессивной тетра/окта стратегии секвенирования протяженных фрагментов ДНК, основанной на использовании специально сконструированного фагмидного вектора pSequoiaT12, а также в написание объемной монографии «Секвенирование ДНК», вышедшей в 1999 г. в издательстве «Наука», и ставшей даже «бестселлером», отчасти потому, что она явилась первой и остается пока единственной книгой такого рода в России.

Необходимость хранения очень больших массивов данных, увеличивающихся с огромной быстротой, а также насущная потребность в их постоянном просмотре и анализе, привели к тому, что именно молекулярные биологи в числе первых стали эксплуатировать возможности, предоставляемые интернетом. Так, в настоящее время, кроме вышеупомянутых трех основных первичных банков по нуклеотидным последовательностям существует еще множество различных баз данных, преследующих какую-либо конкретную цель, включая тематические подборки журналов по так называемым наукам о Жизни с полнотекстовым доступом ко многим статьям, аналогов которых практически не имеется в других дисциплинах. Причем весьма важно то, что почти все эти базы данных свободны для просмотра всеми желающими.

Метод ПЦР и новая эра в исследовании ДНК

В годы бурного развития методов секвенирования ДНК в 1985 г. произошло еще одно чрезвычайно важное событие, за которое в 1993 г. К.Мюллис получил Нобелевскую премию по химии. Им был разработан метод амплификации фрагментов ДНК с помощью, так называемой полимеразной цепной реакции или сокращенно ПЦР. Причем эта аббревиатура за последние годы стала носить настолько массовый характер, что еще немного и сможет соперничать с самим термином «ДНК». Здесь надо сказать, что появление метода ПЦР было предопределено всем ходом развития молекулярной биологии. Так, в его основе лежит уже упоминавшаяся уникальная возможность саморазмножения молекул ДНК, которая может быть воспроизведена в системе *in vitro* с помощью ДНК полимеразы и мономерных блоков – нуклеотидов, которые данный фермент, «соблюдая правила Чаргаффа», встраивает во вновь синтезируемую цепь ДНК. Однако, механизм действия фермента таков, что он может начать синтез новой цепи по матрице из первой цепи только при условии наличия хоть небольшого участка двуцепочечной ДНК, который формируется за счет происходящего по принципу комплементарности так называемого отжига специально приготовленного олигонуклеотида, или иначе праймера.

Основными компонентами ПЦР, в ходе которой амплифицируется (многократно умножается) определенный интересующий исследователя участок молекулы ДНК, являются, во-первых, сама исходная ДНК;

во-вторых, избыточное количество специально подобранной пары олигонуклеотидных праймеров, ограничивающих выбранный участок ДНК; в-третьих, фермент термостабильная ДНК полимераза и, в-четвертых, «строительный материал» в виде смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов. Первым этапом каждого цикла является нагрев реакционной смеси до 95°C (или около того) и он предназначен для денатурации цепей ДНК (как исходных, так и вновь синтезированных). Во время следующего этапа, проводимого обычно при температуре около 50 – 60°C, происходит отжиг олигонуклеотидных праймеров на одноцепочечной ДНК. Далее следует повышение температуры до оптимальной для проявления ферментативной активности используемой термостабильной ДНК полимеразы (обычно 72 – 75°C), во время чего происходит так называемое удлинение праймеров и построение таким образом новых комплементарных цепей ДНК. Цикл на этом завершается. Для возобновления процесса и начала нового цикла опять необходимо наличие в реакционной смеси одноцепочечных молекул ДНК, что достигается кратковременным повышением температуры до тех же 95°C. После отжига праймеров на денатурированной одноцепочечной ДНК, происходящего с понижением температуры, эти вновь образовавшиеся комплексы служат для фермента матрицами с затравкой. Цепной же данная реакция названа потому, что продукты, наработанные ДНК полимеразой в ходе предыдущих циклов, используются в последующих.

Начиная с третьего цикла, происходит экспоненциальная амплификация именно целевых фрагментов ДНК, ограниченных с обеих сторон праймерами. В то же время с каждым новым циклом в цепную реакцию вовлекаются вновь синтезированные по гетерогенным матрицам целевые ампликоны, накопление которых уже затем происходит также экспоненциально. Так, например, после 25 циклов количество подобных ампликонов превысит исходное количество молекул ДНК более чем в миллион раз. При этом одновременно в арифметической прогрессии увеличится и число гетерогенных матриц, комплементарных цепям исходного фрагмента ДНК, однако, таковые будут составлять ничтожную часть, которой, как правило, просто пренебрегают. Впрочем, процесс накопления продуктов в ходе ПЦР достаточно сложен, подчиняется своим внутренним законам и не совсем строго соответствует теоретически ожидаемому количеству амплифицированных фрагментов ДНК.

Столь подробное по сравнению с остальными лишь упомянутыми здесь методами молекулярной биологии описание ПЦР (которое мы в

дальнейшем еще не раз продолжим) вызвано тем, что этот подход был довольно легко освоен и взят на вооружение представителями различных научных дисциплин (причем даже имеющих на первый взгляд весьма далекое отношение к биологии вообще) и с его помощью ими были получены интересные результаты, которые станут предметом рассмотрения в ходе последующего изложения.

Открытие возможности избирательной амплификации определенных участков ДНК с помощью ПЦР произвело по существу революционный переворот в умах и взглядах исследователей. Значительный пересмотр претерпели подходы к секвенированию ДНК, которое теперь взяли на вооружение, например и геносистематики (ботаники, зоологи), использующие его для выяснения вопросов филогении и эволюции. До появления метода ПЦР можно было секвенировать только рекомбинантные молекулы ДНК и в связи с достаточной сложностью методов клонирования, получение таких рекомбинантных ДНК и их последующее секвенирование было доступно лишь молекулярно-биологическим лабораториям. Амплификация же определенных фрагментов ДНК с помощью специфических праймеров и ДНК полимеразы, приводящая за короткий промежуток времени к наработке значительных количеств нужных участков ДНК, явилась мощной и доступной альтернативой методу клонирования. Таким образом, многие лаборатории, ранее и не помышлявшие о секвенировании ДНК ввиду сложности подготовительных этапов, стали активно использовать этот метод в своих исследованиях. Что касается тех, кто и так раньше владел методами секвенирования ДНК, то они также взяли на вооружение метод ПЦР-секвенирования и занялись разработкой его различных модификаций.

Сайт-направленный мутагенез

Нобелевскую премию 1993 г. по химии вместе К.Мюллисом получил и М.Смит за разработку метода сайт-направленного мутагенеза. Сайт-направленный мутагенез позволил целенаправленно изменять различные гены и через это оказал самое серьезное влияние на современную молекулярную биологию. Так, например, несмотря на то, что этот метод не имеет прямого отношения к определению последовательностей нуклеотидов в ДНК, его появление способствовало, в том числе, и заметному прогрессу в этой области путем создания новых улучшенных векторов и ферментов (ДНК полимераз). Используя метод

сайт-направленного мутагенеза, нами, в частности, сконструирован уже упоминавшийся выше уникальный фагмидный вектор нового поколения, предназначенный для производительного секвенирования крупных фрагментов ДНК.

Принцип сайт-направленного мутагенеза весьма прост и заключается в отжиге на клонированном фрагменте ДНК, который предполагается изменить, специально синтезированного олигонуклеотида, подобранного так, что в его средней части должен находиться измененный (желаемый) нуклеотид, отличающийся от комплементарного тому, что находится в мутагенизируемой последовательности. Не желая вдаваться в методические тонкости этой процедуры, скажем лишь, что сайт-направленный мутагенез позволяет одновременно заменять не только единичный нуклеотид или их группу, но и образовывать делецию или наоборот вставку из нескольких нуклеотидов, причем их протяженность может быть довольно большой и зависящей, главным образом, от общей длины синтезированного олигонуклеотида. Благодаря появлению этого метода произошел кардинальный пересмотр стратегий мутагенеза, поскольку ранее исследователям приходилось тратить уйму времени на поиск среди мутагенизированных химическими агентами рекомбинантных клонов тех, что содержали именно нужный вариант.

Секвенирование полных геномов организмов

Метод ПЦР и прочие новшества не только привели к резкому увеличению числа секвенированных молекул ДНК, но и внесли свой вклад в повышение производительности самого метода секвенирования, что послужило основанием для того, чтобы исследователи смогли “замахнуться” на определение полных геномов свободноживущих организмов. Так, в 1995 г. впервые было сообщено о секвенировании всей ДНК бактерии *Haemophilus influenzae*, размер которой составил 1 миллион 830 тысяч 137 пар нуклеотидов. В выполнении этого проекта приняло участие 40 ученых из 4 исследовательских центров США, но основная нагрузка выпала на долю сотрудников Института геномных исследований и его директора Дж.К.Вентера. Весьма примечательно, что второй руководитель проекта Г.Смит, ранее получивший Нобелевскую премию за открытие рестрикционных эндонуклеаз, обнаружил эти ферменты за четверть века до этого именно у данного вида микроорганизма. Так что бактерия *H.influenzae*, уже дважды

открывшая для молекулярной биологии новые перспективы, может по праву этим «гордиться». В последующие годы подобные результаты посыпались как из рога изобилия и считается, что в настоящее время секвенировано свыше 400 геномов прокариотических организмов, информация о значительной части которых доступна другим исследователям через интернет в виде последовательностей нуклеотидов и их аннотаций.

Первым эукариотическим организмом, практически полная последовательность нуклеотидов генома которого была определена в 1996 г. (остались несеквенированными лишь некоторые повторяющиеся участки), стали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Это явилось результатом усилий армады ученых и лаборантов из более чем 600 человек, работающих в лабораториях и крупных исследовательских центрах стран Западной Европы, США и Японии. В результате выполнения этого проекта было определено свыше 12 миллионов пар нуклеотидов. Помимо дрожжей, ныне известны нуклеотидные последовательности полных геномов червячка нематоды (97 млн пн), растения семейства крестоцветных арабидопсиса, или иначе резуховидки Таля (125 млн пн), сразу двух подвидов риса – *indica* (466 млн пн) и *japonica* (пока 420 млн пн, составляющих 93% полного генома), а также 2 черновых варианта генома человека (свыше 3 млрд 200 млн пн каждый), причем один из них расшифрован огромной армией ученых из нескольких стран, а другой – исследователями американской компании Celera Genomics, возглавляемой уже упоминавшимся Дж.К.Вентером. Полным ходом идет секвенирование еще очень многих геномов высших организмов, среди которых геномы рыбы, мыши, собаки, обезьяны. Идет подготовка к секвенированию генома персика, интерес к которому вызван, во-первых, тем, что это важная плодовая культура, уступающая по площади насаждений лишь яблоне и груше, во-вторых, персик – древесное растение и, следовательно, в нем есть комплекс генов, отсутствующих у травянистых видов, и, наконец, размер его генома оказался неожиданно мал и по предварительным оценкам составляет всего около 200 млн пн.

Не вызывает сомнений, что секвенирование полных геномов различных организмов будет продолжаться и станет одной из важнейших задач молекулярных биологов наступившего столетия. Дальнейшее развитие необходимой для этого техники (включая разработку новых подходов к секвенированию ДНК, создание соответствующих приборов, компьютерного обеспечения) сделает со временем решение таких задач привычным делом. По некоторым

оценкам к 2030 г. секвенирование полных геномов отдельных индивидуумов станет вполне доступным и стоимость его против сегодняшних 300 – 500 млн долларов США, требующихся для выполнения подобного проекта, составит всего-то около 1000 долларов. Таким образом тогда откроется дорога к персональной медицине, при которой каждый пациент будет вправе рассчитывать на абсолютно индивидуальный подход, основанный, в том числе, на достижениях такой довольно молодой науки как фармакогеномика, отдельным направлениям которой в нашей лаборатории в последнее время стало уделяться должное внимание.

В то же время, помимо непосредственного секвенирования полных геномов, все большее значение приобретает так называемая функциональная геномика, направленная на выяснение механизмов функционирования отдельных генов и их взаимодействия в составе целого организма. Именно в этом случае секвенирование геномов даст те сведения, которые от него ожидают, поскольку отдельные новые гены, которые становятся известны в результате «прочтения» какого-либо полного генома, могли бы быть клонированы и секвенированы обычным путем и не они представляют собой главную цель подобных проектов. Но, учитывая огромный объем уже сейчас известной информации, в которой еще необходимо долго разбираться, можно представить, что пройдет довольно много времени, пока станет детально известен механизм слаженного функционирования всех генов хоть какого-нибудь относительно просто устроенного свободноживущего организма с небольшим геномом. Приближение к такому полному пониманию взаимодействия всего ансамбля генов лежит через постепенное выяснение основных принципов и особенностей функционирования геномов. Необходимым этапом служит обнаружение *in silico* (т. е. в компьютере на уровне ДНК) всех потенциальных белковых продуктов, составляющих по аналогии с геномом так называемый протеом исследуемого организма, после чего необходимо каким-то образом определить функции этих еще гипотетических белков. Здесь надо отметить, что в настоящее время секвенирование ДНК является несравненно более производительным, чем определение последовательности аминокислот в белках и поэтому последнее не носит массовый характер и производится сейчас только в каких-то отдельных особых случаях.

Биоинформатика

Было бы неправильным, если бы мы обошли вниманием такое новое направление исследований, как биоинформатика, которая уже привлекла к решению стоящих перед ней задач большую армию квалифицированных программистов. При этом биоинформатика просто «обречена» на бурное развитие, поскольку сведения о геномах, транскриптомах и протеомах накапливаются столь быстро, что этим специалистам надо только успевать осуществлять их анализ. Так, помимо выявления *in silico* реальных и гипотетических белков, не меньший интерес представляет обнаружение регуляторных участков, управляющих работой генов. Среди них наибольшее внимание исследователей привлекают промоторы и прочие регуляторные элементы, от которых во многом и зависит слаженное функционирование всего генного ансамбля. Несмотря на то, что в настоящее время уже появились специализированные базы данных, аккумулирующие информацию о типах промоторов, следует сказать, что поиск таковых является не совсем простым делом, особенно если представить огромные и в значительной степени еще малопонятные тексты из последовательностей нуклеотидов, которые для этого надо детально анализировать. И чтобы у читателя создалось правильное (насколько это возможно) представление о стандартном ДНКовом тексте, рискнем здесь привести небольшую его часть: CCGCGTGCCATGGA AAAACAGGGCAA AAGCACAGACGATCCAC GATCCGTACACGGACGTGTGCACGTACCAACAACGTGGACAAGG TGTTCGGGAAAAACGGCCCATGATCCATGGAAATTGCGCCTGAGC TAGCTCCCAAAGGGCCAAAAACGATGCCATGGCGGGCAA AACAT ATGTCATGGCAAAAAAACCTGCCACGACAACGTTTCAAAAACAGT GTACCCCTCCTTCACAAACTGAAGGGCAGGGTTCCCAACGGGGG СТААААСССТСAGGТАСТАТGGGGGAGGAGGGGTССТСССGGTT GGGCGTATGGAАСТСGGGTGGTTTTTTCGTATGAAAAACGCCCGTT TTCGCGTAGCCCAАСТССТТСССААСGTTGCCTCGGATGTCCCGTC.

Следует заметить, что при написании нуклеотидной последовательности ДНК (обычно одной цепи) ее принято приводить в направлении 5'→3', причем для тех случаев, когда это известно, указывают так называемую РНК-подобную цепь. Как можно видеть, в данной последовательности нуклеотидов нет свойственных типичному тексту разбиений на слова, отсутствуют знаки препинания, из-за чего он просто не подлежит обычному прочтению. Причем, длина этой последовательности ДНК составляет всего-то 400 знаков-нуклеотидов!

Для сравнения, скажем, что данная брошюра (которую, надеемся, все же можно читать) состоит только из 175 с лишним тысяч знаков, включая пробелы, тогда как относительно небольшой геном почвенной бактерии *Bacillus subtilis* содержит более 4 миллионов пар нуклеотидов, а геном человека – свыше 3 миллиардов! Поэтому, чтобы компьютеры могли «читать» и анализировать такие протяженные последовательности нуклеотидов, создаются специально для этого предназначенные компьютерные программы.

В одной недавней статье американских авторов велась речь о составлении ими «словаря» для геномов, в который они пока включили информацию о 1200 генных «словах» и 6000 регуляторных участках эукариотического генома дрожжей. Можно предположить, что скоро появится (как часть биоинформатики) новая наука – молекулярная лингвистика, задачей которой будет расшифровка ДНКовых текстов и нахождение в них условных «слов», «знаков препинания» и пр. Наверное, это будет сделать потруднее, чем составить словарь какого-нибудь древнего языка, хотя бы из-за несопоставимого объема данных. Правда, на первый взгляд кажется, что ДНКовый «алфавит», состоящий всего из четырех «букв», слишком мал и «написанные» им тексты должны легко поддаваться разгадке. Однако вся трудность заключается в том, что тексты-то уж очень большие, да и видимые пробелы между «словами» отсутствуют. При этом количества возможных комбинаций из этих четырех нуклеотидов в них составляют гигантские числа. Например, для каких-нибудь условных бактериальных геномов размером по 2 миллиона пар нуклеотидов существует $4^{2000000}$ (где 4 – это типы азотистых оснований: аденин, гуанин, тимидин и цитидин) или приблизительно $10^{1200000}$ вариантов перебора нуклеотидов. Впрочем, эти варианты существуют только теоретически. Ввиду общности происхождения всего живого и как показывают уже имеющиеся данные, эти бактерии будут непременно иметь некие общие гомологичные участки, заметно уменьшающие число реальных комбинаций сочетаний четырех нуклеотидов. Более того, некоторая гомология нуклеотидных последовательностей для эволюционно консервативных генов обнаруживается даже между представителями всех трех ветвей жизни на Земле: архебактериями, эубактериями и эукариотами. И если продолжить аналогию с языками, то можно отметить, что как во многих из них есть сходные однокоренные слова, так и в геномах различных организмов (подчас даже далеко отстоящих друг от друга на эволюционной лестнице) есть некие совпадающие высококонсервативные последовательности, свидетельствующие, во-

первых, об общности их происхождения, а во-вторых, позволяющие предполагать выполнение ими одинаковых функций. Причем, как и в языках, так и в ДНК эти слова/мотивы могут передаваться и/или сохраняться не целиком, а лишь своими корнями, фрагментами.

В качестве небольшого примера позволим себе еще раз вернуться к приведенной выше секвенированной нами и принадлежащей промоторной области генов рибосомных РНК диплоидной пшеницы *Triticum urartu* нуклеотидной последовательности, вернее, к подчеркнутой ее части. Так, последовательность ССТСАГГТАСТАТGGGGGAG, как оказалось, представляет собой весьма важную область промотора рДНК, включающую стартовый нуклеотид транскрипции (определенный нами экспериментально и выделенный жирным шрифтом), но имеющая ряд принципиальных отличий от аналогичной последовательности ССТСГГГТАТАГТАГГГ-АГ промоторной области локуса *NotB2* из субгенома В мягкой пшеницы *T.aestivum*, нуклеотидная последовательность которого была нам доступна ранее из опубликованных статей и баз данных. Можно видеть, что несмотря на довольно заметную гомологию (и самого этого участка, и особенно прилегающих областей, что и позволило нам его идентифицировать!), в них имеются замены сразу пяти нуклеотидов (один из которых – стартовый), а также делеция одного нуклеотида (отсутствие которого у мягкой пшеницы показано в виде дефиса), приводящих к наличию у диплоидной пшеницы несколько измененного канонического ТАТА-бокса (хотя и являющегося обязательным элементом промоторов, узнаваемых РНК полимеразой II, но также типичного и для большинства промоторов рДНК растений, транскрибируемых РНК полимеразой I) и тем самым оказывающего заметное влияние на эффективность транскрипционного процесса и на проявление у этих близкородственных видов злаков так называемого феномена ядрышкового доминирования.

Таким образом, из вышеизложенного можно видеть, что одним из главных подходов при анализе нуклеотидных последовательностей и попытках определить функциональную роль конкретных элементов генома служит сравнение таковых *in silico* (с целью поиска гомологичных участков и определенных мотивов исследуемых фрагментов ДНК) с подобными участками других организмов.

Сравнение нуклеотидных последовательностей широко применяется для построения филогенетических деревьев и установления родственных отношений между подвидами, видами, родами, а также между таксонами более высокого ранга. Следует заметить, что

помимо нуклеиновых кислот для выяснения вопросов эволюции и систематики применяется сравнительный анализ и аминокислотных последовательностей различных белков, однако в силу вырожденности генетического кода и ряда других причин использование для этих целей молекул ДНК (вернее, нуклеотидных последовательностей конкретных генов или каких-либо прочих фрагментов ДНК) выглядит предпочтительнее. Особое доверие вызывают филогенетические деревья, построенные на основе дивергентных участков высококонсервативных генов. Так, например, сочетание высокой эволюционной консервативности последовательностей, кодирующих непосредственно сами рибосомные РНК, и заметной вариабельности разделяющих их спейсерных областей рДНК (при общей функциональной значимости и крайней важности данной генетической системы) позволяет с достаточной надежностью реконструировать происходившие эволюционные события.

В частности, серьезный интерес представляет выяснение филогении пшениц и их ближайших сородичей эгилопсов. Несмотря на то, что на протяжении всего XX столетия с помощью различных подходов и методов проведено огромное число исследований, направленных на установление филогенетического статуса пшениц и их диких сородичей, полной ясности в эволюционных взаимоотношениях в пшенично-эгилопсном альянсе до сих пор нет. Известно, что основной хлебный злак мягкая гексаплоидная пшеница *T.aestivum* является довольно сложным образованием, состоящим из трех родственных субгеномов, два из которых, как считается, принадлежат представителям рода *Aegilops* и только один – роду *Triticum*. Мягкая пшеница, таким образом, как минимум на треть (без учета плазмона) больше эгилопс, нежели пшеница, хотя это довольно условно. Важность определения истинных доноров пшеничных субгеномов заключается в том, что роды *Triticum* и *Aegilops* представлены, по крайней мере, двенадцатью различающимися диплоидными геномами, но в процессе эволюции полиплоидных пшениц Природой было использовано не более 6 геномов и практически лишь 3 из них в настоящее время кормят человечество. Причем, от каких именно диплоидных видов они произошли — не до конца ясно! А поскольку при образовании в естественных условиях, например, нынешних мягкой и твердой пшениц мог происходить выбор только среди вариантов, возникающих лишь в результате совместного произрастания, то, следовательно, для генетиков и селекционеров остался еще некий простор для дальнейшей работы по вовлечению в скрещивание других оказавшихся незадействованными видов. Но для

этого надо точно знать — какие виды уже послужили донорами составных геномов природных полиплоидных форм! И то, что мягкая пшеница появилась, по некоторым воззрениям, всего около десяти тысяч лет назад (что для эволюции — просто мгновение!) также свидетельствует о возможности подбора новых, еще более удачных сочетаний родительских геномов.

Сравнительный анализ определенных нами нуклеотидных последовательностей промоторных областей рДНК всех известных диплоидных пшениц и произошедших от них так называемых А-субгеномов основных полиплоидных форм показал, что в образовании последних участвовала диплоидная пшеница *T. sinskajae*, которая раньше даже близко не рассматривалась в качестве потенциального донора. Таким образом, полученный результат в виде сравнения секвенированных последовательностей нуклеотидов ДНК в данном случае привел по существу к настоящему открытию, поскольку кардинально меняет некоторые из устоявшихся принципиальных воззрений на филогению и систематику пшениц, что, несомненно, окажет самое серьезное влияние на все последующее развитие генетико-селекционных исследований этих крайне важных злаков.

ДНК-чипы

Другим мощным способом анализа геномов служит молекулярная гибридизация с использованием биочипов, или ДНК-чипов, с появлением которых связан новый бум в молекулярной биологии. Корни их создания уходят в середину 60-х гг. XX столетия, когда С.Спигельманом был разработан метод гибридизации нуклеиновых кислот на мембранных фильтрах, служивших твердой фазой. В 1975 г. Э.Саузерн сильно преобразовал этот метод, связав его с гель-электрофорезом и дав, таким образом, мощный толчок изучению структурной организации генов и прочих фрагментов ДНК. Но в обоих этих подходах исследуемые молекулы ДНК фиксировались на мембранных фильтрах, тогда как меченные зонды находились в растворе. В конце 80-х гг. практически одновременно учеными Югославии (Р.Дрманач и Р.Црквеняков), России (А.Д.Мирзабеков) и Великобритании (У.Бэйнс и Э.Саузерн) были предложены новые методы секвенирования ДНК посредством гибридизации, ставшие непосредственными предшественниками ДНК-чипов, поскольку в некоторых его тогдашних вариантах зонды фиксировались на подложке,

а меченая исследуемая ДНК находилась в растворе. Для секвенирования ДНК *de novo* этот метод оказался лишь ограниченно годен, но для детекции мутаций или поиска каких-то последовательностей в ДНК исследуемых организмов благодаря своей скорости, массовости и одновременно миниатюрности оказался незаменим. Так, по завершению происходящей по принципу комплементарности молекулярной гибридизации олигонуклеотидов биочипа с радиоактивно или флуоресцентно мечеными молекулами ДНК либо РНК производится детекция наличия меченых молекул в ячейках, на основе которой строится паттерн гибридизации, позволяющий или оценивать экспрессию отдельных генов либо целых генных систем, или производить диагностику опасных инфекций и болезней.

К сожалению, не все технические трудности на пути победного шествия ДНК-чипов уже преодолены, и предстоит большая работа по их миниатюризации, разработке более удобных и дешевых способов их изготовления, включая синтез новых модифицированных олигонуклеотидов с соответствующими реакционными группами, а также повышение воспроизводимости и достоверности результатов. Однако не исключено, что первой из будущих Нобелевских премий за исследования особенностей молекул ДНК (которые рано или поздно вновь будут присуждены), скорее всего будет премия по химии с приблизительной формулировкой «за разработку и внедрение ДНК-чипов». Однако с учетом того, что согласно положения о Нобелевских премиях одна ежегодная премия в каждой номинации может делиться не более чем между тремя учеными, можно уже сейчас прогнозировать трудности, которые у Нобелевского комитета при выборе самых достойных кандидатур в этом случае неизбежно возникнут.

В настоящее время существует сразу несколько кардинально различающихся технологий изготовления ДНК-чипов, каждая из которых имеет как свои достоинства, так и недостатки. Наиболее типичный ДНК-чип представляет собой пластинку-носитель (чаще всего – стекло) площадью около 1 см², на которой в определенном порядке расположены ячейки, содержащие иммобилизованные олигонуклеотиды с уникальной последовательностью оснований или какие-либо другие одноцепочечные фрагменты ДНК, причем количество ячеек может достигать 1 млн, а размер их сторон ныне обычно не превышает 10 микрон. Здесь надо сказать, что в самое последнее время в литературе стали появляться упоминания о еще только разрабатываемых наночипах, которые должны будут безусловно

снизить расход реактивов и одновременно повысить чувствительность.

Поскольку в данной статье мы взяли на себя смелость упоминать собственные результаты, то относительно ДНК-чипов можем сказать, что вместе со своими коллегами из БашГУ еще только приступаем к разработке таковых. Они будут предназначены для решения некоторых частных задач, и по понятным причинам мы пока вынуждены скрывать важные детали, однако хочется верить, что создаваемые нами ДНК-чипы будут принадлежать к новому поколению олигонуклеотидных чипов с улучшенной детекцией результатов молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот и одновременно с повышенной достоверностью получаемых результатов. Но для этого придется еще немало потрудиться.

«Новая» ПЦР

Несмотря на то, что использование ДНК-чипов для медицинской диагностики уже началось, все же этот подход правильнее пока считать делом будущего, хотя, возможно, не такого и далекого. В настоящее время подобные задачи решаются чаще всего с помощью все той же ПЦР, в которой определенный участок какого-либо гена или просто известного фрагмента ДНК «ограничивается» соответствующими специфичными олигонуклеотидными праймерами и путем ферментативного построения новых цепей ДНК за относительно короткий промежуток времени происходит его амплификация, приводящая в зависимости от числа циклов к увеличению в миллиард и более раз именно той искомой последовательности ДНК. Считается, что для осуществления ПЦР теоретически даже может быть достаточно одной молекулы ДНК, правда в этом случае число циклов должно быть заметно увеличено. В результате такой амплификации у исследователя появляется возможность довольно легко детектировать путем гель-электрофореза (или каким-либо иным способом) интересующий его фрагмент ДНК.

Более того, чувствительность метода ПЦР настолько велика, что сама становится проблемой. Так, во избежание ложнопозитивных результатов необходимо применять строжайшие меры по предотвращению загрязнения самих образцов, реагентов, лабораторной посуды и даже воздуха рабочей зоны молекулами ДНК. Однако, эти трудности вполне преодолимы, и простота метода ПЦР (мнимая, конечно, поскольку существуют весьма сложные модификации этого метода) ныне сделала его широко доступным. И здесь можно усмотреть

своеобразную аналогию с химическим синтезом олигонуклеотидов, который, как уже упоминалось выше, с помощью специального прибора ДНК-синтезатора и поставляемых наборов реагентов теперь способен осуществлять и непрофессиональный химик. Точно также благодаря появлению приборов ДНК-амплификаторов и реактивов к ним (включая синтезированные на ДНК-синтезаторах олигонуклеотидные праймеры) ПЦР-анализ может проводить экспериментатор, не имеющий глубокой молекулярно-биологической подготовки. Молекулярные же биологи продолжают разрабатывать все новые и где-то даже изощренные варианты метода ПЦР, направленные, прежде всего на решение сугубо научных, фундаментальных задач.

Здесь надо сказать, что ПЦР ныне совсем не та, за которую К.Мюллис получил Нобелевскую премию. Наиболее принципиальным отличием можно считать использование в настоящее время термостабильных ДНК-полимераз, выдерживающих повышенную температуру и сохраняющих свою ферментативную активность в течение всего процесса амплификации, в отличие от применявшегося первое время фермента – так называемого Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I бактерии кишечной палочки *Escherichia coli*, который приходилось добавлять каждый раз после очередного этапа денатурации, что резко усложняло всю процедуру. Среди широко используемых сейчас термостабильных ДНК-полимераз первой была так называемая *Taq* полимеразы, выделенная и очищенная из экстремально термофильного микроорганизма *Thermus aquaticus* в 1980 г. российским ученым А.С.Калединым и его коллегами. Впоследствии множество подобных ферментов было получено как из других эубактерий, так и из архебактерий. Большинство генов этих ферментов клонировано и для них были определены нуклеотидные последовательности, включая клонированный и секвенированный в нашей лаборатории ген *Tfl* полимеразы из термофильного микроорганизма *Thermus flavus*, обитающего в горячих источниках Камчатки. Тем не менее, на наш взгляд, лучшие ДНК-полимеразы для молекулярно-биологических исследований еще не найдены. Говорить так нам позволяет тот факт, что из известных на сегодня ДНК-полимераз наибольшую процессивность (т.е. способность осуществлять полимеризацию ДНК от момента «посадки» фермента на матрицу до его диссоциации) имеют фаговые ДНК-полимеразы, среди которых уже упоминавшаяся ДНК-полимераза фага T4, один из основных ферментов для секвенирования ДНК – «секвенеза», или, правильнее сказать, ДНК-полимераза фага T7, а также ДНК-полимераза фага f29,

характеризующаяся настолько высокой процессивностью, что с ее помощью становится возможным путем изотермической амплификации в системе *in vitro* даже «копировать» полные геномы микроорганизмов в виде их протяженных фрагментов. Однако, все эти ферменты принадлежат бактериофагам мезофильных микроорганизмов и неспособны выдерживать высокие температуры, используемые в ПЦР. В то же время, если есть ферменты нуклеинового обмена у бактериофагов мезофильных бактерий, то почему не может быть таковых и у термофилов? Можно предположить, что фаговые ДНК-полимеразы термофильных бактерий будут обладать уникальными свойствами, которые позволят методу ПЦР достичь новых рубежей, превратив его, тем самым, в еще более мощный инструмент в руках молекулярных биологов.

Изменилась и сама аппаратура для проведения ПЦР. Так, в настоящее время массой фирм производится множество различных моделей ДНК-амплификаторов, отличающихся не только дизайном, но и прочими важными характеристиками. Если ранее обязательным этапом ПЦР-анализа было электрофоретическое разделение продуктов реакции, то в последнее время активно разрабатывается так называемая ПЦР в режиме реального времени, рассчитанная на детекцию ПЦР-ампликонов уже в ходе самой реакции в одном и том же приборе за счет применения флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных праймеров. Другими аспектами модернизации метода ПЦР являются заметное сокращение временных интервалов протекания всех стадий реакции, длившейся ранее несколько часов (25 – 35 стандартных циклов), а также миниатюризация специальных пробирок и уменьшение реакционных объемов, которые обычно составляли (и пока еще составляют) от 20 до 100 микролитров. Однако в последнее время появились сообщения о проведении ПЦР уже в субмикролитровых объемах, и в этой связи нельзя не упомянуть одну недавнюю работу американских авторов, где объем реакционной смеси был равен всего 160 нанолитрам (что составляет, для сравнения, приблизительно 1/500 часть обычной дождевой капли), а продолжительность всей реакции (сокращенная до 10 циклов) не превышала 4-х минут без потери разрешающей способности самого метода.

Постоянно растущий интерес к ПЦР со стороны большой армии ученых разных специальностей, вносящих свою лепту как в молекулярно-биологическую составляющую метода, так и в его техническое оснащение, вполне объясним, поскольку ПЦР – это на самом деле еще и многомиллиардный бизнес, складывающийся, в

первую очередь, из уже упоминавшейся медицинской диагностики, а также из некоторых других (о которых будет упомянуто чуть далее) аспектов коммерческого применения метода ПЦР. Можно с уверенностью считать, что ПЦР-диагностика является одним из наиболее ярких примеров внедрения результатов фундаментальной биологической науки в практику. Именно фундаментальная наука, благодаря ряду открытий, сделанных с помощью целого арсенала методов, за счет гигантского и многолетнего труда исследователей обеспечила как саму возможность осуществления ПЦР, так и предоставила сведения о молекулярных основах конкретных болезней. Причем за многие открытия и разработанные методы, легшие в основу ПЦР и способствовавшие получению новых знаний об организации генов и геномов, были вручены Нобелевские премии, в том числе, и упомянутые здесь. На долю же прикладной науки осталось технологическое совершенствование метода ПЦР, поскольку, если снизить расход реактивов и сократить время всего процесса, включая стадию детекции, то ожидаемая прибыль может стать значительно выше.

ДНК древняя и не только

Пожалуй, одним из главных достоинств метода ПЦР является его относительная доступность и, как следствие, широкое применение в исследованиях, на первый взгляд, далеко отстоящих от молекулярной биологии. Наглядным тому подтверждением может служить появившееся в последние годы новое направление, объединившее такую гуманитарную дисциплину, как археология с естественно-научной молекулярной биологией. Можно говорить, что появилась уже молекулярная археология, задачей которой является выделение ДНК из найденных при раскопках каких-либо содержащих ее древних объектов и исследование этой важной молекулы наследственности с помощью ПЦР. При этом интерпретация получаемых молекулярно-биологических результатов носит типично исторический характер.

Помимо костных останков, молекулярная археология анализирует и другие биологические образцы из захоронений. Так, например, исследование с помощью ПЦР ДНК древних зерен пшеницы позволяет проследить характер распространения и возделывания тех или иных видов пшеницы, что может дать новые знания о наших предках, ранее просто недоступные. Причем, следует отметить неплохую сохранность

подобной древней ДНК, позволившую, например, в лаборатории авторов провести ПЦР-амплификацию фрагментов генов рибосомных РНК из обугленных зерен пшеницы двухтысячелетней давности. Причем сама по себе умеренно высокая температура (такая как, например, вызвавшая обугливание зерен) может привести лишь к тепловой денатурации цепей ДНК, что, отнюдь, не сделает ее непригодной для проведения ПЦР, поскольку первый этап этой реакции как раз и заключается в превращении двуцепочечной ДНК за счет повышенной температуры в одноцепочечную. Здесь надо сказать, что упомянутая амплификация ДНК из обугленных биологических материалов не есть какой-то единичный случай и, в частности, в Англии работает группа ученых, получившая массу интересных результатов и специализирующаяся именно на анализе древней ДНК пшениц, выделенной ими как из обугленных, так и из более древних образцов, датированных даже 7 – 8 веками до нашей эры.

Не желая быстро расставаться с пшеницами, отдельные гены которых являются объектами наших исследований на протяжении не одного десятка лет, хотим задержать внимание читателей еще на одном применении метода ПЦР, связанном с пищевой промышленностью. Так, анализ качества пищевых продуктов, включая их возможное загрязнение патогенной микрофлорой, составляет немалую толику коммерческого использования метода ПЦР. Мы же, исследуя особенности структурно-функциональной организации генов рибосомных РНК различных видов пшениц и их диких сородичей, обратили внимание на их определенные отличия, позволившие подобрать так называемые дискриминирующие олигонуклеотидные праймеры, способные с помощью ПЦР избирательно амплифицировать и таким образом идентифицировать соответствующий ген или его фрагмент. В связи с тем, что существующие методы анализа сырья, идущего на изготовление макаронных изделий высокого качества, включают целый ряд весьма трудоемких этапов и не дают при этом однозначного ответа на вопрос – есть ли в макаронной крупке (семолине) из твердой пшеницы примесь муки мягкой пшеницы (которая заметно снижает качество готовых изделий), нами был разработан быстрый способ определения загрязнения семолины путем детекции на уровне ДНК с помощью ПЦР со специфическими олигонуклеотидными праймерами D-субгена, наличие которого является характерной особенностью именно мягкой пшеницы. Проведенные эксперименты показали высокую чувствительность этого подхода и возможность обнаружения в семолине ничтожного присутствия (до 0,1%) муки мягкой

пшеницы, что позволило на данный способ детекции подать заявку на получение патента РФ.

Благодаря своей сверхвысокой чувствительности метод ПЦР нашел применение и в гидрогеологии. Так, например, с его помощью норвежские ученые смогли проследить особенности перемещения подземных вод после того как в водоносный горизонт было специально введено 70 л раствора синтетической ДНК. Причем для достижения концентрации около 10^{11} молекул на 1 мл потребовалось менее 1 мг ДНК. Несмотря на высокое разбавление природными водными потоками, из проб, бравшихся в разных местах исследуемой территории, в их экспериментах для детекции внесенной ДНК оказалось достаточным использовать в ПЦР в качестве источника ДНК всего по 3 мкл воды.

Возвращаясь к описанию древней ДНК, можно заметить, что в отличие от археологии, обращающейся в своих исследованиях лишь к свидетельствам голоценового и плейстоценового периодов, палеонтология восстанавливает отдельные черты и более удаленных от нас геологических эпох. Благодаря ПЦР молекулярная биология способна исследовать ДНК не только из кайнозоя, но и из мезозоя и, как следствие, уже появилось устойчивое словосочетание «молекулярная палеонтология». Однако, несмотря на относительную способность ДНК сохраняться в отживших свое биологических тканях (что можно считать если не уникальной особенностью данного типа молекул, то, по крайней мере, весьма удобным обстоятельством для исследования древних образцов), все же из-за происходящего окисления и гидролиза молекулы ДНК в них со временем разрушаются. Что же касается других основных биополимеров, то и белки, и полисахариды абсолютно не подходят на роль молекул – «свидетелей старины». Первые – как минимум по причине весьма быстрой деградаци и нарушения индивидуальной третичной (или четвертичной) структуры, по которой теоретически и могла быть возможна их детекция с помощью антител. Вторые – просто даже из-за отсутствия тех самых индивидуальных особенностей. ДНК же обладает целым набором черт, ставящих ее в этом вопросе «вне конкуренции». Так, даже перестав со временем быть цельной молекулой, ДНК еще продолжает хранить свои конкретные индивидуальные черты и сохраняет уникальную возможность служить матрицей для ферментативного построения новых комплементарных цепей. И самое главное – ДНК в системе *in vitro* под действием фермента ДНК полимеразы способна многократно самоумножаться, достигая количества, пригодного для дальнейшего анализа.

Теоретические расчеты показали, что ДНК старше 100 тысяч лет должна быть сильно фрагментирована, да еще и модифицирована (т.е. дезаминирована, лишена отдельных азотистых (преимущественно пуриновых) оснований и пр.), что делает ее, по крайней мере, малопригодной для проведения ПЦР. Однако очень многое зависит от условий внешней среды, в которые попали растительные или животные останки. Так, их нахождение во влажной атмосфере, присутствие бактерий, обладающих своими ферментными системами деградации ДНК, очень быстро разрушит ДНК до отдельных нуклеотидов, тогда как обезвоживание, например, приведет к значительному повышению сохранности и целостности молекул ДНК. Низкая температура также замедляет течение различных реакций деградации, и найденные, в частности, в условиях вечной мерзлоты останки мамонтов из плейстоцена, датируемые приблизительно 50 тысячами лет, служат хорошим источником ДНК для молекулярных палеонтологов.

Еще лучшим природным консервантом является янтарь, и попавшие в капельки смолы различные насекомые, во-первых, сами по себе великолепно сохранились до наших дней, да и их ДНК вполне пригодна для ПЦР-анализа. По этой причине самой старой амплифицированной древней ДНК является ДНК жука-долгоносика, жившего в меловом периоде и обнаруженного в янтаре, возраст которого радиоуглеродным анализом был определен в 120-135 млн лет. В литературе встречаются также сообщения об анализе ДНК других насекомых из олигоценового периода, заключенных в янтарь 25 – 35 млн лет назад. Остается только сожалеть, что капли смолы никогда не были так велики, чтобы в них смогли завязнуть более крупные представители тогдашней фауны. По этой причине исследователям, например, динозавров можно надеяться лишь на сохранность молекул ДНК в найденных окаменелостях.

В литературе имеется чуть ли не единственное сообщение об успешной амплификации относительно короткого фрагмента ДНК из останков динозавра, жившего приблизительно 80 млн лет назад в период позднего мела. Причем из осуществленных в ходе выполнения той работы почти 3000 попыток проведения ПЦР, удалось только 9, в которых оказались амплифицированы участки митохондриальной ДНК длиной по 174 пн. Определение нуклеотидных последовательностей этих участков и их сравнение с аналогичными областями митохондриального генома других видов животных показало, что организм, которому они принадлежали, на эволюционной лестнице теоретически должен занимать место где-то между рептилиями и млекопитающими, подтвердив тем самым, что это действительно настоящая ДНК

настоящего динозавра. Столь веские доказательства принадлежности амплифицированной ДНК динозавру были нужны, во-первых, из-за сомнений в возможности сохранения в найденных костных останках такого внушительного возраста хоть крошечных количеств мало-мальски пригодной для ПЦР ДНК, а во-вторых, из-за опасений, что могло произойти загрязнение препаратов чужеродной ДНК. Однако сравнение нуклеотидных последовательностей рассеяло все сомнения. В этой связи нельзя не отметить еще большие трудности, подстерегающие ученых при ПЦР-анализе ДНК останков древних людей, поскольку при загрязнении древней ДНК, скажем, ДНК лаборанта сравнительный анализ амплифицированных и секвенированных нуклеотидных последовательностей (принадлежащих, возможно, уже лаборанту) может просто ввести экспериментатора в заблуждение. Чтобы исключить подобные конфузы при исследовании, например, ДНК неандертальца, немецкими авторами были предприняты все мыслимые меры предосторожности, позволившие избежать попадания чужеродной ДНК в исследуемый образец.

Из наиболее древних представителей растительного царства, фрагменты ДНК которых удалось амплифицировать и секвенировать, сообщается об участках хлоропластных геномов магнолии и болотного кипариса, росших в миоцене около 17 млн лет назад. Что касается древних микроорганизмов, то их следы не могли бы быть найдены вовсе, если бы опять-таки не янтарь и не попавшие в него насекомые. Так, из кишечника олигоценовой пчелы была выделена ДНК, ПЦР-анализ которой показал ее принадлежность бактериям рода *Bacillus*. И, видимо, настало время дать некоторые пояснения, на основании чего учеными было заявлено, что это именно ДНК бацилл. Наверное, это было нужно сделать раньше, например, при первом описании метода ПЦР, но там главное внимание было уделено стадиям процесса амплификации.

ПЦР – некоторые аспекты теории метода

Специфичность протекания ПЦР зависит от массы обстоятельств, среди которых не последнюю роль играет и длина олигонуклеотидных праймеров (не говоря уже об их последовательности!). Обычно используемые для ПЦР праймеры варьируют по длине от 15 до 22 нуклеотидных звеньев, впрочем, они могут быть как значительно короче, так и заметно длиннее. При этом количества возможных комбинаций всех четырех нуклеотидов в олигонуклеотидах определенной длины

составляют гигантские числа и, в частности, для 15-ти и 22-х звенных праймеров они равны 1073741824 (4^{15}) и 17592186044416 (4^{22}). Другими словами, теоретически существует свыше миллиарда вариантов перебора (различного расположения по отношению к друг другу) любых нуклеотидов как в праймерах длиной 15 звеньев, так и в произвольно выбранных участках геномной ДНК такой длины какого-либо организма. Например, если при должном масштабе химического синтеза 15-звенного олигонуклеотида в каждом цикле в реакционную колонку одновременно добавлять равные количества всех четырех нуклеотидов-мономеров, то в силу случайности выбора при присоединении очередного азотистого основания заключительный продукт будет представлять собой практически эквимолярную смесь из 1073741824 типов праймеров: 5'-CCCAGTCCCGACGCC-3', 5'-CCCAGTCCCGACGCT-3', 5'-CCCAGTCCCGACGCG-3', 5'-CCCAGTCCCGACGCA-3', 5'-CCCAGTCCCGACGAC-3' и еще 1073741819 других вариантов (жирным шрифтом выделены нуклеотиды, по которым приведенные праймеры отличаются от оказавшегося здесь условно первым).

Что касается геномной ДНК, то ситуация с теоретической представленностью в ней участков из различных комбинаций даже 15 нуклеотидов несколько сложнее. Так, например, вероятность присутствия в геноме человека, имеющего размер около 3 млрд 200 млн пн какого-то одного конкретного 15-нуклеотидного мотива равна всего 3 случаям на каждую цепь. В почти 17-ти млрд пн геноме мягкой гексаплоидной пшеницы такой мотив может встретиться уже соответственно 32 раза. В то же время, необходимо помнить, что это только теоретически, а на самом деле в этих геномах такой мотив реально может встретиться как множество раз (например, если окажется составной частью повторяющейся ДНК), так и ни разу, и очень многое зависит от последовательности нуклеотидов в нем.

Не менее важен и так называемый GC-состав как всего генома анализируемого организма (который может варьировать у микроорганизмов, например, в очень широких пределах – от 30 до 70% GC-пар), так и самих праймеров. Но если начать здесь учитывать зависимость частоты встречаемости тех или иных мотивов с определенными последовательностями нуклеотидов в них от возможных вариаций содержания в геномах AT- и GC-пар, то это настолько усложнит рассмотрение вопроса, что пришлось бы выйти далеко за рамки данной статьи.

Для проведения ПЦР в ее классическом варианте на разных цепях ДНК подбираются два места, расположенные относительно недалеко

друг от друга, к которым синтезируются комплементарные им олигонуклеотидные праймеры соответствующей длины, зависящей от ряда обстоятельств. Так, если рассмотреть вариант проведения ПЦР, рассчитанной на амплификацию, например, фрагмента геномной ДНК мягкой пшеницы размером 500 пн, ограниченных парой 15-звенных олигонуклеотидных праймеров (каждый из которых теоретически может иметь на данной ДНК по 32 места отжига), то вероятность амплификации ложного фрагмента, совпадающего по размеру с основным, крайне мала. К этому выводу можно прийти, если принять во внимание, что из теоретически 62-х оставшихся мест отжига этих праймеров хотя бы пара должна быть расположена друг от друга на схожем расстоянии (т.е. в данном случае – на расстоянии 500 пн), при этом еще на разных цепях и в правильной ориентации, обеспечивающей амплификацию! И это в геноме, размер которого около 17 млрд пн, и который можно условно разбить на два с лишним миллиарда 15-ти нуклеотидных участков! А с учетом того, что такие условные участки неизбежно будут перекрываться, то их даже теоретическое число просто не поддается подсчету. С другой стороны, в маленьком геноме (например, какой-нибудь бактерии), который меньше пшеничного в 10000 раз, имеется и во столько же раз меньшее число этих условных 15-ти нуклеотидных участков, однако, вероятность нахождения в этом геноме дополнительных мест (помимо тех, что подбирались для какой-то конкретной задачи специально) для отжига выбранных 15-звенных праймеров практически равна нулю.

Таким образом, возвращаясь к обнаружению через ПЦР со специфическими праймерами бактериальной ДНК из олигоценовой пчелы, следует отметить, что геносистематиками уже подобраны соответствующие участки геномов, позволяющие на основе сравнения их нуклеотидных последовательностей с высокой степенью достоверности идентифицировать различные организмы. Для бактерий такими наиболее часто используемыми идентификаторами служат гены 16S рРНК, характеризующиеся как высокой эволюционной консервативностью в целом, так и одновременно заметной вариабельностью отдельных участков, сравнительный анализ которых и позволил авторам той работы определить, что они имели дело с ДНК бацилл, а не какой-нибудь другой бактерии.

Сделанные выше весьма грубые подсчеты указывают на очень высокую теоретическую специфичность ПЦР, однако на практике она будет иметь место лишь при отжиге олигонуклеотидных праймеров в условиях 100%-ного спаривания, которое сильно зависит от

температуры и некоторых других факторов. Так, проведение ПЦР при оптимальной для выбранных праймеров температуре теоретически обеспечит как специфичность отжига, так и эффективность самого процесса наработки ампликонов. Повышение температуры отжига (до определенных пределов), с одной стороны, создаст более строгие условия и повысит вероятность отжига праймеров только при полном их спаривании с геномной ДНК, а с другой стороны, может уменьшить выход целевого продукта. Превышение критического температурного предела приведет уже к невозможности отжига праймеров. По этой причине не будут образовываться необходимые для проведения ПЦР олигонуклеотидные затравки на одноцепочечных матрицах ДНК и, следовательно, сама ПЦР просто не произойдет. Использование же субоптимальных температур отжига позволит праймерам отжигаться при наличии одного-двух или даже нескольких неспаренных азотистых оснований, что сразу снизит специфичность процесса. Так, если для каждого из пары 15-звенных олигонуклеотидных праймеров имеется приблизительно по 32 места отжига на двух цепях пшеничной ДНК, то при возможности их отжига с одним неспаренным нуклеотидом, представленность таких участков в ДНК возрастет в 4 раза, поскольку фактически они будут соответствовать 14-звенным праймерам. При отжиге 15-членного олигонуклеотида с образованием 3-х неспаренных нуклеотидных пар такой праймер можно рассматривать уже как 12-звенный. И в этом случае таких участков отжига на ДНК мягкой пшеницы будет около 4000. Таким образом, результатом проведения ПЦР при температурах ниже оптимальной может быть возросшее число мест отжига праймеров и, соответственно, увеличенное число амплифицируемых фрагментов ДНК и, как следствие, потеря специфичности. Впрочем, амплификация при пониженных температурах (равно как и при чересчур высоких) может и не произойти вовсе, но причины будут совсем иные, связанные, в первую очередь, с возможным образованием вторичных структур самими праймерами и их практически полным исключением из реакции.

ПЦР и новая судебная медицина и криминалистика

Несмотря на определенные сложности в подборе оптимальных условий проведения ПЦР, они вполне преодолимы, и данный метод продолжает оставаться высокоспецифичным и очень удобным для детекции определенных генов или прочих фрагментов ДНК. Так,

например, с помощью ПЦР с праймерами, специфичными для различных полиморфных ДНК-локусов человеческого генома, производится разрешение спорных случаев отцовства, что во многих странах уже принимается судом в качестве непреложного доказательства. Если ранее на основании сравнения групп крови ребенка и потенциального отца можно было при определенных условиях только подтвердить предположение об отцовстве, а уверенно констатировать можно было лишь обратное, то теперь при помощи анализа ДНК с очень высокой степенью достоверности, приближающейся к абсолютной, можно установить истину.

Благодаря своей чувствительности ПЦР активно применяется в тех случаях, когда экспериментатор ограничен в количестве исходного материала. Подобное случается, в частности, в криминалистике, когда подчас по обнаруженным на месте преступления крохотным ДНК-содержащим следам становится возможным провести анализ полиморфизма ДНК и изобличить преступника. В качестве примера можно привести сообщение, в котором говорилось о поимке преступника и доказательстве его вины, ставшим возможным после анализа ничтожного количества ДНК, выделенной из принадлежащих ему невидимых глазом кожных чешуек, оставленных им на шарфе, которым он задушил свою жертву.

Из экзотических примеров использования метода ПЦР, немного связанных с судебными разбирательствами, можно указать его применение для подтверждения подлинности чьей-то подписи, когда графологическая экспертиза неубедительна. Правда, в этом случае, в чернила, используемые подписантом, необходимо заранее добавить некую ДНК, которая при использовании соответствующих праймеров приведет к амплификации фрагмента ДНК определенного размера, служащего доказательством подлинности. Источником ДНК для анализа в этом случае будут служить соскобленные с исследуемой подписи еле видимые частички чернил, которых будет вполне достаточно. Само собой разумеется, что информацию и о последовательностях праймеров, и о самой ДНК, добавленной в чернила, надо хранить в секрете. Учитывая приводимые выше теоретические цифровые доказательства специфичности ПЦР, свидетельствующие о практической невозможности случайного совпадения, можно быть уверенным в достоверности такого анализа. Более того, даже в случае добавления в другие чернила, которыми будет подделываться подпись, какой-либо ДНК, обеспечивающей при амплификации с подходящими к ней праймерами наработку аналогичного по размеру фрагмента ДНК, у

подписанта еще остается возможность доказать недостоверность такой лжеподписи путем секвенирования нуклеотидных последовательностей получаемых ампликонов и их сравнения с истинным, которые совпасть просто не могут, если только не были выкрадены сами ДНК-содержащие «правильные» чернила, что сделать, впрочем, куда проще, чем заниматься подделкой ДНК и подбором праймеров.

Генетические штрих-коды организмов

На основе картин электрофоретического разделения ПЦР-продуктов уже довольно давно создаются специфические базы данных ДНК преступников, в которых накапливаются сведения об особенностях их ДНК, называемые по аналогии с отпечатками пальцев ДНК-фингерпринтами. К сожалению, и сами базы данных весьма далеки от совершенства, и хранящаяся там информация требует принципиально нового (цифрового!) подхода к их формированию. Который бы, на наш взгляд, обеспечил не просто возможность визуального сличения (далеко не всегда однозначного!) электрофоретических картин фрагментов ДНК, выделенной из найденных следов-улик, и ДНК подозреваемого, но и позволил бы идентифицировать личность преступника, исходя из сравнительного анализа ДНК-содержащего материала, обнаруженного на месте преступления, ведя настоящий поиск по базам данных, где информация о ДНК населения должна храниться или в виде своеобразных генетических штрих-кодов или быть представлена в какой-то другой цифровой форме. В этом случае правоохранительные органы, даже еще не задержав преступника, по крайней мере, будут знать, кого им следует разыскивать.

Нам представляется абсолютно реальным создание со временем подобных баз данных (как национальных, так и мировых), где соответствующая информация о любом человеке будет храниться, начиная с момента рождения и даже после его смерти. Причем, анализ молекул ДНК, выделенных, например, из капли крови, будет осуществляться путем довольно простой, относительно дешевой и быстрой процедуры, обеспечивающей тем не менее абсолютную индивидуальность того члена общества, которому она принадлежит. Возможно, что в будущем и в паспортах граждан на основе полиморфизма их собственной ДНК появится полоска персонального генетического штрих-кода, который будет «сопровождать» их всю жизнь. Что касается неизбежных возрастных изменений ДНК,

связанных, в первую очередь, с метилированием цитозиновых остатков, нам представляется, что довольно легко сделать так, что они не будут влиять на генетический штрих-код. Причем, человек может взять другую фамилию, изменить внешний облик, сменить даже пол, но его ДНК останется прежней.

Помимо случаев, связанных с уголовно-наказуемыми деяниями, генетический штрих-код может найти также применение при определении принадлежности неподдающихся визуальному опознанию человеческих останков, которые, к сожалению, неизбежно будут появляться в результате пожаров, взрывов и прочих техногенных или природных катастроф, а также возможных терактов и военных действий. Вероятно, на первых порах подобные базы данных должны пополняться преимущественно информацией о контингенте лиц, чья профессиональная деятельность связана с повышенным риском. Уже сейчас в трудных случаях на основе все тех же молекул ДНК в специальных лабораториях производится идентификация тел погибших, однако используемые пока методы весьма дорогостоящи и не всегда достоверны. В настоящее время можно только гадать, сколько же времени потребуется для разработки сначала соответствующего подхода, позволяющего анализировать молекулы ДНК человека и переводить их в цифровые данные, а затем и дешевой, удобной технологии этого процесса, но то, что это обязательно произойдет в обозримом будущем сомнений не вызывает.

Быть может, такая уверенность основана на том, что самими авторами уже совершен некоторый прорыв в генетической паспортизации бактерий на основе полиморфизма их ДНК, выявляемого рестрикционными эндонуклеазами. Принципиальным отличием данного способа паспортизации (который оговоримся сразу – не подходит для эукариотических организмов, поскольку для них требуется нечто иное, над чем мы также работаем) является точное (до 1 нуклеотида) определение размеров рестриктазных фрагментов ДНК в секвенирующем геле, позволяющее таким образом проводить «оцифровку» достаточной для однозначной идентификации части генома любой бактерии. Так, присвоив каждой видимой на радиоавтографе секвенирующего геля полосе анализируемой бактериальной ДНК соответствующее цифровое значение, равное размеру этого рестриктазного фрагмента в нуклеотидах, можно представить полученную информацию об исследуемом штамме в виде такого графического изображения, как генетический штрих-код, визуально напоминающий ставшие уже привычными штрих-коды

промышленных товаров. Основываясь на полученных результатах по генетической паспортизации различных бактерий, авторами данной статьи совместно с сотрудниками Института биологии УНЦ РАН и финскими коллегами подана заявка на получение международного патента. При этом анализируемый нами диапазон длин рестриктазных фрагментов ДНК, исходя из теории вероятности, в определенных условиях может обеспечить свыше гугола (10^{100}) комбинаций, что делает их случайное совпадение для любых микроорганизмов практически невозможным, особенно, если принять во внимание, что наша Вселенная оценивается в очень грубом приближении как состоящая всего из 10^{80} элементарных частиц.

Присвоение штаммам микроорганизмов (в дополнение к их общепринятым характеристикам) уникальных генетических «паспортов» по существу открывает новую страницу в микробиологии и поднимает на новый уровень эпидемиологические исследования, изучение бактериального биоразнообразия, оценку биогеографического распространения штаммов микроорганизмов и пр. Так, паспортизация патогенной микрофлоры и, в том числе, возбудителей опасных болезней позволит быстро идентифицировать штамм микроорганизма, вызвавшего заболевание, и более эффективно провести курс лечения, а также принять в конкретной ситуации самые действенные меры по локализации очагов инфекции, что приобретает особую актуальность в связи со случаями биотерроризма. Отдельный интерес представляют собой штаммы-суперпродуценты ценных биотехнологических продуктов, ввиду необходимости их патентования, и здесь применение генетических штрих-кодов может оказаться чрезвычайно полезным для полноценной защиты авторских прав.

Если принять во внимание то обстоятельство, что, по сравнению с полумиллионом (а то и миллионом) видов насекомых, для бактерий описано всего лишь около 5000 видов, то можно считать, что об окружающем нас повсюду, но невидимом нашему невооруженному глазу мире микроорганизмов мы, к сожалению, знаем пока довольно мало или даже крайне мало, поскольку, по некоторым оценкам, бактерий насчитывается более миллиарда видов, что, впрочем, на наш взгляд, уже неправдоподобно много. Как бы там ни было, бактериям принадлежит довольно важная роль в биосфере, а необходимость поддержания биоразнообразия всего живого является одной из главнейших задач и одновременно обязанностей, стоящих перед человечеством. И кроме морально-этической существует еще и экологическая сторона, поскольку возможное нарушение баланса тех или иных экосистем в

результате хозяйственной деятельности человека может приводить и к серьезным нежелательным последствиям. Но целенаправленное сохранение существующего видового состава предполагает предварительное исследование организмов, ставящее целью определение их таксономического статуса и других характеристик, чтобы знать *что* необходимо сохранять.

Таким образом, проблема поддержания биоразнообразия состоит как в самом сохранении всего живого, так и в его постоянном изучении, идентификации, что представляет не менее сложную задачу, особенно для таких групп организмов, как бактерии. И здесь анализ полиморфизма ДНК может сыграть значительную роль, тем более, что очень грубый подсчет возможного числа отдельных микроорганизмов (не штаммов!) показывает, что одновременно их на нашей планете может быть в виде индивидуальных бактериальных клеток всего-то (если придерживаться американской системы обозначения больших чисел) от септиллиона до нониллиона «особей», а теоретическое число комбинаций рестриктазных фрагментов ДНК разного размера (из удобного для анализа диапазона), на основе которых и возможно создание генетических «портретов» бактерий, таково, что при выборе тех или иных параметров штрих-кодов случайное совпадение данных характеристик микроорганизмов можно ожидать с частотой один случай на дециллионы (имеются в виду не один-два дециллиона, а классы чисел – дециллион, ундециллион, додециллион и т.д.) бактериальных изолятов.

И здесь, по-видимому, надо еще раз вспомнить об уникальных чертах молекул ДНК, к которым можно, безусловно, отнести их полиморфизм и обеспечение за счет него гигантского количества комбинаций фрагментов ДНК, образующихся, например, под действием рестрикционных эндонуклеаз. Вообще под полиморфизмом ДНК (который, впрочем, может выявляться различными способами, но их перечисление и тем более описание выходит за рамки данной статьи) понимается наличие у молекул ДНК, принадлежащих группе близкородственных организмов, замен отдельных нуклеотидов либо их блоков при очень высоком или почти полном совпадении всей остальной последовательности нуклеотидов. Применительно к людям считается, что отдельные особи отличаются между собой преимущественно так называемыми однонуклеотидными заменами (single-nucleotide-polymorphism) или сокращенно SNP (которые принято произносить как «снип»), встречающимися приблизительно в их геномах через каждые 500 – 1000 пн. Таким образом, с учетом размера человеческого генома можно считать, что два разных индивида (несостоящие в кровном

родстве) будут отличаться между собой, по крайней мере, не менее чем 1 миллионом снипов.

Помимо бактерий и людей генетические штрих-коды на основе полиморфизма ДНК могут найти свое применение и для других групп организмов. Например, благодаря присвоению неповторяющихся уникальных генетических штрих-кодов создаваемым сортам растений, породам животных и прочим организмам, будет легче осуществлять защиту авторских прав. Причем, такие штрих-коды могут служить дополнительными идентификаторами «живого» товара. Подобно тому, как предложенный Г.Лаурером и впервые примененный летом 1974 г. в супермаркете американского города Трой из штата Огайо так называемый Universal Product Code или UPC (более известный в России как штрих-код), кроме дополнительных удобств при обслуживании покупателей и всестороннего контроля за товаром, позволил также существенно упорядочить мировую торговлю, выступая даже своеобразным символом качества, то можно ожидать, что и генетические штрих-коды потенциально способны оказать положительное воздействие, служа неким дисциплинирующим фактором, либо, если первое не помогло, то и доказательным аргументом при пресечении попыток бесконтрольного пользования биологическими организмами, являющимися объектами чужой интеллектуальной собственности, в том числе, и в международном масштабе. В частности, при возникновении трудных (спорных) случаев с выплатой роялти за предоставленное право «эксплуатации» тех или иных биологических объектов, генетические штрих-коды могут оказаться очень кстати, ввиду того, что их просто невозможно подделать, поскольку для этого надо изменить ДНК. Надо заметить, что, несмотря на заметное визуальное сходство обычного UPC и генетического штрих-кода, принципы их формирования абсолютно различны. Так, если за первым скрываются сведения о типе товара, стране-производителе и прочей связанной с производством и продажей информацией, то генетический штрих-код несет в себе сведения об отдельных особенностях полиморфизма молекул ДНК, принадлежащих, например, определенному сорту растений, породе животных или бактериальному штамму-суперпродуценту, и при этом эти сведения достаточны для их однозначной идентификации.

ДНК-компьютинг

Весьма неожиданным выглядит использование метода ПЦР для компьютерных вычислений, известных ныне как «ДНК-компьютинг». В англоязычной литературе этот термин появился в 1994 г. после пионерской работы американского математика-шифровальщика Л.Адлемана, в которой тот с помощью набора 20-звенных олигонуклеотидов и таких молекулярно-биологических методов как ПЦР и гель-электрофорез решил так называемую задачу коммивояжера, заключающуюся в выборе маршрута между городами, при условии, что каждый пункт необходимо посетить только единожды. Справедливости ради, следует отметить, что впервые предположение о возможности осуществления вычислений на молекулярном уровне в своем известном докладе, посвященном вопросам миниатюаризации, сделал Нобелевский лауреат по физике Р.Фейнман еще в 1959 г. Что касается эксперимента Л.Адлемана, то надо сказать, что сразу после опубликования его работы последовала мощная критика, поскольку им была выбрана сильно упрощенная модель данной задачи всего для 7 городов, решаемая даже на листке бумаги. Однако если увеличить число городов до ста, то она становится практически нерешаемой, поскольку, используя стандартный алгоритм, будет необходимо выполнить 10^{147} действий, на которые суперкомпьютер с триллионом операций в секунду должен будет затратить таковых 10^{135} , тогда как считается, что наша планета существует всего-то около 10^{17} секунд. А для решения этой задачи для тех же 100 городов с использованием молекулярного вычисления потребуется слишком много ДНК. Так, одна группа исследователей подсчитала, что даже для 23 городов олигонуклеотидов будет необходимо так много, что их общий вес достигнет приблизительно 1 кг, а для 70 городов – такой ДНК потребуется уже свыше тонны. Для сравнения можно сказать, что для проведения обычной ПЦР хватает нанограммовых количеств олигонуклеотидных праймеров.

Несмотря на то, что основные вычислительные шаги в ДНК-компьютинге (ПЦР, гель-электрофорез) достаточно длительны и по скорости операций обычные компьютеры опережают их на несколько порядков, благодаря массивному параллелизму, обеспечиваемому тем, что в реакционной пробирке манипуляции со всеми молекулами ДНК совершаются одновременно, молекулярный компьютер в пересчете на секунду по общему числу операций легко превосходит нынешние суперкомпьютеры, не говоря уже о том, что последние объединяют в себе тысячи процессоров, тратят массу электроэнергии и занимают

значительные площади в сотни квадратных метров, тогда как непосредственно для ДНК-компьютинга достаточно обычного лабораторного стола.

Поскольку при решении комбинаторных задач, аналогичных упомянутой выше, молекулярный компьютер за счет возможности организации в пробирке триллионов параллельных вычислений теоретически имеет преимущества перед компьютерами с кремниевыми чипами, ДНК-компьютинг продолжает активно развиваться. Вслед за Л.Адлеманом Р.Липтон показал принципиальную возможность решения с его помощью и других так называемых NP- и NPC-проблем, относящихся к труднорешаемым задачам с нечеткой логикой. Есть предложения вместо олигонуклеотидов использовать двуцепочечную ДНК плазмид, и в этом случае центральным звеном («процессором») служит забуференный раствор специально приготовленной плазмиды, что позволило этим авторам назвать данный процесс «плазмидным компьютерингом». Активно разрабатываются также иные способы молекулярных вычислений путем формирования «шпильчатых» структур одноцепочечными ДНК и «кнутовой» ПЦР. Группа Р.Липтона пошла еще дальше и предложила решение модельной задачи перемещения шахматных коней при помощи другого типа нуклеиновых кислот, а именно РНК, которую они расщепляли специфическими РНКазами.

Таким образом, уже сейчас разработано несколько способов ДНК-компьютинга, основные из которых можно подразделить на «генерирующие» и «вычитающие». К первым относятся молекулярные вычисления путем построения с помощью лигирования и амплификации «правильной» последовательности из олигонуклеотидов, вторые же рассчитаны на ту же амплификацию, но после удаления «неправильных» последовательностей из имеющегося набора путем их расщепления рестрикционными эндонуклеазами или в случае РНК – РНКазами. Общей же чертой этих разных подходов является то, что в основе данных компьютерных вычислений лежит принцип «гибридизационной логики» или, другими словами, уникальная способность молекул ДНК спариваться по принципу комплементарности, о которой в ходе данного повествования уже многократно говорилось.

Отдельный интерес представляет ДНК-компьютинг в связи с вопросами криптографии, являющейся сегодня важнейшей составляющей безопасности всех информационных систем, от сотовой связи до управления банковскими счетами. И по оценкам некоторых

специалистов, глобальное расширение всемирных компьютерных сетей, которые скоро, наверное, пронизуют все пространство, неминуемо заставит человечество осваивать криптографию как способ выживания в XXI веке. Но кто-то вынужден шифровать, а кому-то требуется вершить обратный процесс! При этом считается, что для взлома ныне используемых шифров необходима продолжительная работа суперкомпьютера, тогда как молекулярное вычисление теоретически способно решить подобную задачу за относительно короткое время.

Несмотря на то, что будущее ДНК-компьютинга выглядит несколько туманно, все же многие специалисты склоняются к мысли, что в перспективе возможно создание гибридных компьютеров, которые могли бы быть основаны на традиционных кремниевых чипах, но для решения специфических задач имели бы, условно говоря, ДНК-сопроцессор. Если такие машины и создадут, то их по аналогии с суперкомпьютерами, вероятно, должны будут называть уже «гиперкомпьютерами». Однако до этого исследователям еще надо решить целый комплекс теоретических и технических проблем.

Памятуя о том, что мы позволили себе некое прогнозирование связанных с молекулами ДНК Нобелевских премий, то, как бы то сейчас ни было, исключать потенциальную возможность их присуждения в будущем за разработку и внедрение ДНК-компьютинга, видимо, нельзя, а уж по какой из номинаций они будут вручены – решить, скорее всего, будет не так просто.

Надо сказать, что определенные надежды по решению NP- и NРC-проблем одно время возлагались на квантовые компьютеры, но с их созданием тоже не все обстоит гладко. При этом в молекулярном вычислении уже достигнуты некоторые успехи. Так, в частности, группа японских ученых построила первый (как они сами пишут) ДНК-компьютер, в котором осуществление необходимых молекулярно-биологических реакций происходит на твердой фазе, что, с одной стороны, ведет к заметному снижению числа требуемых молекул ДНК, а с другой – способствует повышению воспроизводимости результатов и дает возможность автоматизировать весь процесс. Здесь надо сказать, что, будучи молекулярными биологами, авторы данной статьи не могут не видеть ряда трудностей, в настоящее время подстерегающих молекулярных компьютерщиков при выполнении ими экспериментальных процедур в виде обычных ПЦР, рестриктазного расщепления, гель-электрофореза, являющихся одновременно и важнейшими элементами молекулярного вычисления. Успешное

продвижение ДНК-компьютинга во многом зависит как от дальнейшего развития самих методов молекулярной биологии, так и в еще большей степени от автоматизации различных стадий молекулярного вычисления, а также миниатюризации существующей техники. Причем начинающий уже воплощаться переход на наноуровень может стать ключевым моментом для дальнейшего развития ДНК-компьютинга. Помимо уже упоминавшегося выше использования нанолитровых объемов для ПЦР, человечеству предстоит переход на всестороннее применение наноструктур, о которых мы, впрочем, поговорим особо чуть ниже, так как сначала, пожалуй, стоит задержать внимание читателя на еще одном достаточно новом и интересном методе.

ДНК-шаффлинг

Метод искусственной эволюции белков *in vitro*, специально разработанный для получения их измененных форм путем комбинирования фрагментов генов двух или большего числа гомологичных белков, получил название «ДНК-шаффлинг» (от одного из значений английского слова *shuffle* – «тасовать»). Интересно отметить, что этот метод был предложен американцем В.Стеммером в том же 1994 г., что и ДНК-компьютинг, и имеет с последним немало общего. Как и при ДНК-компьютинге, в ДНК-шаффлинге в ходе двухраундовой ПЦР-амплификации на первом этапе, идущем без участия праймеров, происходит процесс удлинения фрагментов ДНК после их отжига друг с другом путем ферментативной «достройки» новых цепей. Однако, в отличие от ДНК-компьютинга, в этом случае вместо конкретных олигонуклеотидов одинаковой длины, в реакцию вовлекается гетерогенная смесь образуемых под действием ультразвука или ДНКазы относительно коротких фрагментов ДНК, принадлежащих генам белков, подвергаемых искусственной эволюции. И поскольку в результате такого фрагментирования ДНК разрушается случайным образом, то число комбинаций, возникающих в ходе ПЦР при шаффлинге, может быть, как и при ДНК-компьютинге, весьма значительным. Поэтому, в силу необходимости некоторого предварительного прогнозирования на ДНК уровне результатов ДНК-шаффлинга, в ряде теоретических статей предлагаются варианты математического моделирования этого процесса с учетом влияния таких факторов, как длина фрагментов ДНК, температура их отжига, количество тасуемых родительских генов и их сходство, характер

распределения перекрытий вдоль длины восстанавливаемых последовательностей.

Если в классическом ДНК-компьютинге к искомому результату молекулярного вычисления приходят, либо рассчитывая размер амплифицированных фрагментов ДНК, либо через определение их нуклеотидных последовательностей (одна из которых в случае решения задачи должна состоять из «правильного» набора олигонуклеотидов), то целевые продукты шаффлинга выявляют фенотипически путем клонирования в подходящем векторе всего пула химерных молекул ДНК, образующихся в ходе второго раунда ПЦР с соответствующими праймерами, и высева рекомбинантных клонов на бакто-агар с хромогенным или иным субстратом, позволяющим визуально контролировать изменение работы фермента.

Пожалуй, ДНК-шаффлинг – самый мощный на сегодняшний день инструмент для осуществления быстрой и направленной эволюции генов, ставший, благодаря своей относительной простоте, необычайно популярным, свидетельством чему служат как заметно увеличивающийся в последние годы поток оригинальных работ, выполненных с помощью этого метода, так и разработка все новых его вариантов. В качестве одного из примеров вышесказанному можно привести интересную работу японских ученых, которыми был проведен ДНК-шаффлинг гена мезофильного фермента ксиланазы В из *Streptomyces lividans* и его термостабильного аналога из *Thermomonospora fusca*, кодирующего ксиланазу А, в результате чего была существенно увеличена термостабильность мезофильного фермента без снижения его энзиматической активности. Несомненный интерес представляют также работы, в ходе которых происходит превращение одного фермента в другой с одновременным улучшением характеристик нового варианта по сравнению с диким типом. Так, в частности, из бета-галактозидазы *E.coli* посредством нескольких раундов шаффлинга и скрининга на хромогенном субстрате была получена бета-фукозидаза, показавшая тысячекратное (!) увеличение субстратной специфичности. Эти результаты наглядно демонстрируют огромные возможности метода ДНК-шаффлинга, который в процессе искусственного совершенствования и/или создания новых белков способен творить буквально чудеса.

По существу успешный исход ДНК-шаффлинга во многом зависит как от выбора объекта, который необходимо улучшить, и самой стратегии его проведения, так и от удобства скрининга (под которым понимается массовость анализа, являющаяся почти неизменным

условием эффективного шаффлинга) новых белков с измененными ферментативными свойствами. В этом плане, например, циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТазы), как уникальные и, с точки зрения исследователя, не вполне совершенные (в силу своей нестрогой специфичности действия) бактериальные ферменты, представляют собой довольно интересные и в то же время весьма удобные объекты для осуществления их искусственного эволюционирования *in vitro*, поскольку, с одной стороны, можно вполне рассчитывать на создание химерных ферментов, отличающихся по структуре от родительских и при этом *отличных* (в обоих смыслах этого слова) по свойствам. А с другой – при работе с ЦГТазами можно уже на начальной стадии вполне успешно проводить массовый скрининг рекомбинантных бактерий путем их высева на агар с добавлением крахмала и за счет окрашивания последнего парами возгоняющегося кристаллического йода отбирать выросшие колонии с крахмалгидролизующей активностью, образующие ясно видимое гало. Еще одной причиной повышенного интереса к ЦГТазам служит то, что получаемые из крахмала под их действием циклодекстрины (представляющие из себя кольцевые молекулы, состоящие из 6-, 7- и 8-ми остатков глюкозы) находят довольно широкое применение в различных отраслях. Однако промышленный выход разных типов циклодекстринов в каждом конкретном случае напрямую зависит от используемого штамма, выбранного для наработки этого фермента. Причем, с точки зрения технолога, все известные ныне ЦГТазы далеки от совершенства, поскольку любая из них превращает крахмал в неоднородную смесь альфа-, бета- и гамма-циклодекстринов, присутствующих в ней в различных пропорциях, что заметно затрудняет их очистку. Учитывая все вышесказанное, а также то, что ранее в лаборатории авторов из разных штаммов микроорганизмов близких родов *Bacillus* и *Paenibacillus* были клонированы и секвенированы гены бета- и альфа-ЦГТаз, в настоящее время нами начаты эксперименты по их ДНК-шаффлингу с целью получения новых форм ферментов, продуцирующих увеличенное количество более труднодоступных альфа- и особенно гамма-циклодекстринов, и при этом обладающих как повышенной термостабильностью, так и более высокой степенью конверсии субстрата.

Завершая краткое описание ДНК-шаффлинга, нельзя не упомянуть о совсем недавно предложенном американскими учеными из фирмы *Maxugen* геномном шаффлинге. В качестве удачного примера использования данного метода можно привести создание специалистами

этой фирмы штамма лактобацилл, способного расти при гораздо более низком рН среды, чем его родительские формы и при этом еще и продуцировать увеличенное количество молочной кислоты. В геномном шаффлинге обмен генетической информацией между различными штаммами бактерий или низших эукариот происходит через слияние их протопластов. Таким образом, этот метод по существу имитирует происходящие в природе события. При использовании геномного шаффлинга с одной стороны, происходит резкое ускорение естественного эволюционного процесса, а с другой – в такое искусственное слияние и рекомбинацию геномов могут быть вовлечены и такие родственные микроорганизмы, которые занимают разные экологические ниши и за счет этого не имеющие возможности «обмениваться» между собой генетическим материалом обычным путем. Причем, при осуществлении геномного шаффлинга у исследователей нет необходимости работать в системе *in vitro* с конкретными генами, что значительно упрощает и ускоряет создание штаммов-суперпродуцентов. Как следствие этого в ближайшем будущем можно ожидать массовое применение геномного шаффлинга и генерацию различных штаммов микроорганизмов, обладающих измененными в лучшую сторону качествами. Более того, поскольку в геномном шаффлинге фактически не применяются классические методы генной инженерии, основанные на введении дополнительных генов антибиотикоустойчивости, то полученные таким образом измененные культуры микроорганизмов считать генетически модифицированными веских оснований нет. По крайней мере, созданные с помощью геномного шаффлинга штаммы не подпадают под действующие ограничения, хотя, справедливости ради, следует отметить, что разработанные правила были приняты раньше, чем появился этот метод.

ДНК и наноструктуры

Если попытаться очень кратко охарактеризовать вторую половину прошедшего столетия, то, например, применительно к электронике можно сказать, что она развивалась с приставкой «микро». Однако бурное развитие науки последних десятилетий показывает, что нанотехнологии, ранее просто недостижимые, уже начинают проникать в нашу жизнь и можно смело утверждать, что наступивший век будет веком нанотехнологий, причем не только в области электроники. И это совсем не фантастика, тем более что сама Жизнь на нашей планете как

раз и обеспечивается процессами, протекающими на наноуровне. Хорошим примером наноансамбля из полсотни белков и нескольких молекул рРНК могут служить белоксинтезирующие «фабрики» клетки – рибосомы. Причем надо заметить, что формирование самих рибосом происходит путем так называемой самосборки, поскольку все эти белки за счет стехиометрии «знают» свое место на каркасе, образуемом молекулами рРНК, которые в свою очередь располагаются в пространстве также определенным образом, заданным последовательностью нуклеотидов в них. Таким образом, способность к самосборке является очень важным свойством биополимеров, обеспечивающееся их структурой. В этой связи такой биополимер, как ДНК, с точки зрения нанотехнологий, представляет наибольший интерес. Но прежде чем приступить к описанию достигнутых учеными успехов в научных дисциплинах, имеющих приставку «нано», необходимо подчеркнуть, что, следуя и общему названию этой статьи и данной главки, мы сознательно не касаемся здесь многочисленных достижений в нанотехнологиях, которые не связаны с ДНК.

Выбор молекул ДНК в качестве нанообъектов исследований отнюдь не случаен и обусловлен целым комплексом факторов. Во-первых, несмотря на гигантскую длину нативной ДНК, диаметр двойной спирали в ее В-конфигурации равен всего 20 ангстремам или 2 нанометрам. Во-вторых, ввиду того, что ДНК – в норме двуцепочечная молекула с комплементарным расположением нуклеотидов, ее отдельные одноцепочечные фрагменты способны к самосборке. В-третьих, исходя из последовательности нуклеотидов каждой из цепей, возможно *in silico* рассчитать геометрию образующихся из них структур в виде двуцепочечных молекул ДНК. В-четвертых, уже имеются коммерчески доступные ферменты так называемого нуклеинового обмена (рестрикционные эндонуклеазы, лигазы, топоизомеразы), с помощью которых из синтезированных олигонуклеотидных блоков можно формировать пространственные трехмерные наноструктуры. В-пятых, ДНК – довольно прочная молекула. И, наконец, как мы уже упоминали в предыдущих главках и еще раз коснемся в следующей, химический синтез ДНК в виде обычных либо модифицированных олигонуклеотидов разработан настолько хорошо, что наработать этот биополимер в нужных количествах и с заданной структурой не составляет особых проблем. Что касается, других биополимеров, то пригодность, например, белков для построения наноструктур с заданной геометрией выглядит на сегодняшний день гораздо более проблематичной. И тому сразу несколько причин, главная из которых заключается в том, что из-за

большого числа сильно различающихся между собой (по сравнению с нуклеотидами) аминокислот, входящих в состав белков, не представляется возможным точно прогнозировать пространственную структуру последних. Однако нельзя исключать того, что в будущем анализ последовательности аминокислот *in silico* будет позволять однозначно рассчитывать вторичную, третичную и даже четвертичную структуры белков. Хотя надо сказать, что белки имеют и другие «недостатки», среди которых можно отметить их меньшую «прочность» как биополимеров.

Своим применением в качестве строительных блоков при создании наноструктур олигонуклеотиды «обязаны» американскому ученому Н.Симану, который еще в начале 80-х годов прошлого столетия стал исследовать не совсем обычные олигонуклеотиды и с успехом продолжает делать это поныне. Настоящая ДНК представляет собой линейную неразветвленную молекулу, но на стадии репликации, носящей полуконсервативный характер, возникает так называемая репликативная вилка и ДНК в этот момент является уже не линейным, а разветвленным полимером. Однако некое подобие репликативной вилки можно создать с помощью трех олигонуклеотидов, если одна половина последовательности нуклеотидов в первом из них будет гомологична второму, а другая половина – третьему. Аналогичным образом должны быть подобраны последовательности для второго и третьего олигонуклеотидов из этой связки. В этом случае при температуре отжига из таких олигонуклеотидов будет формироваться простейшая разветвленная наноструктура в виде трехлучевой звездочки. Увеличивая путем специального подбора последовательностей нуклеотидов число мест ветвления, возможно, создавать весьма сложные конструкции. Причем, если олигонуклеотиды будут иметь на своих концах определенным образом подобранные «липкие» участки, то с помощью ДНК-лигазы такие олигонуклеотиды можно «сшивать» сначала в основные строительные блоки, из которых затем можно будет создавать весьма объемные наноструктуры в виде решеток, кубов, октаэдров, многогранных катенанов, ротаксанов и др. Проверка соответствия реальной конформации таких наноконструкций теоретически предсказанным осуществляется с помощью атомно-силового микроскопа.

Помимо чисто ДНКовых структур в последние годы стали появляться сообщения о композитных наноматериалах. Так, например, в опытах других американских авторов в результате объединения модифицированного фуллерена с ДНК, молекула последней сильно

изменила свою конфигурацию и за счет эффекта конденсирования диаметр двойной спирали стал составлять от 15 до 30 нм вместо обычных двух. Интересным примером композитных наноконструкций может служить упаковка 13 нм частиц золота, присоединенных через тиогруппу к олигонуклеотидам, протекающая заданным образом за счет формирования на первом этапе по принципу комплементарности двуцепочечных фрагментов ДНК, которые затем после очередного этапа олигомеризации могут позволить достичь еще более плотной упаковки золотых частиц.

Еще одно весьма перспективное применение олигонуклеотиды или даже целые молекулы ДНК могут найти в качестве молекулярной нанопроволоки. Так, в частности, были проведены уникальные эксперименты, в которых к двум расположенным на расстоянии чуть более 10 мкм друг от друга пластинам с золотыми токопроводящими поверхностями была через тиогруппы присоединена ДНК фага лямбда. Особенностью довольно длинных (приблизительно 48,5 тпн) молекул ДНК фага лямбда являются находящиеся на ее концах 12-звенные одноцепочечные комплементарные участки, способные при определенных условиях «залипать» друг на друга с формированием двуцепочечной структуры, что в данном случае вызывало замыкание цепи. Причем, стоило немного изменить условия как происходило «плавление» данных липких концов, и электрическая цепь из молекул ДНК размыкалась. Подобную конструкцию уже можно считать неким прообразом нановыключателя. Однако токопроводящие свойства ДНК оставляют желать лучшего, что позволяет рассматривать эту молекулу лишь как полупроводник и поэтому подобные ДНК-проволочки решили покрыть металлическим серебром, что привело к заметному увеличению проводимости. Кроме этого в литературе имеются сообщения о палладиевой металлизации молекул ДНК, ряд статей посвящен замене имино протонов азотистых оснований цинком, кобальтом или никелем, что также повлекло за собой повышение токопроводимости таких олигонуклеотидов.

Более сложный выключатель, являющийся по существу уже наномеханическим устройством, недавно предложен тем же Н.Симаном и соавт. Принцип данного устройства основан на переходе В-формы ДНК в ее Z-форму, которая, будучи левозакрученной молекулой, по своей пространственной конфигурации кардинально отличается от В-формы. Причем если расстояние между азотистыми основаниями в В-форме ДНК составляет около 0,34 нм, то в Z-форме оно несколько больше (0,37 нм) и подобный переход приводит к заметному изменению конформации

соответствующей наноструктуры. Для демонстрации работоспособности такого устройства из олигонуклеотидов была сооружена соответствующая довольно сложная наноструктура, в средней части которой к концам дважды перекрученных олигонуклеотидов были присоединены флуоресцентные красители. А поскольку переход ДНК из В-формы в Z-форму сопровождался изменением пространственного расположения флуорохромов, то его можно было контролировать измерением интенсивности свечения последних, зависящем от эффективности переноса свободной энергии, в свою очередь зависящем от расстояния между ними.

Завершая описание ДНКовых наноструктур, следует подчеркнуть, что массовый переход технологий на наноуровень, несомненно, произведет настоящую революцию в технике, поскольку созданные с их помощью сложнейшие устройства будут настолько миниатюрны, что, например, вся электроника современного авиалайнера, как считают, сможет уместиться на кончике мизинца. Более того, некоторые оптимисты полагают, что наносхемы будут собираться сами собой из подготовленных наноструктур, высвободив значительное время по их укладке. Однако нам представляется, что в настоящее время в области нанобиотехнологий пока что идет процесс накопления информации, которая в будущем вероятно должна будет дать отдачу. И пусть на сегодняшний день эксперименты с созданием наноструктур и наноустройств на основе молекул ДНК выглядят где-то даже малопонятными, не исключено что через какое-то время на их основе будут действительно готовиться наносхемы и наноустройства. В этой связи особенно перспективными кажутся опыты по использованию молекул ДНК в качестве нанопроводников электричества. И во многом от того насколько быстро состоятся подобные технологические прорывы зависит присуждение (или неприсуждение) Нобелевской премии, например, за вклад отдельных лиц в развитие нанобиотехнологии.

Простые и модифицированные олигонуклеотиды

В данной главке мы предлагаем вернуться к молекулярной биологии, и хотим еще раз задержать внимание читателей на обычных и модифицированных олигонуклеотидах, без которых данная наука уже просто немислима. Так, помимо использования олигонуклеотидов в качестве праймеров при проведении ПЦР, синтезируемые химическим

путем, они находят в молекулярной биологии еще массу применений. Выше уже упоминался сайт-направленный мутагенез, в котором как раз центральным элементом служит мутагенизирующий олигонуклеотид. Не редкость, когда в экспериментах по молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот в качестве гибридизационных зондов выступают олигонуклеотиды. Практически не обходятся сейчас без олигонуклеотидных затравок и при секвенировании ДНК. Надо сказать, что во всех этих методах химически синтезированные олигонуклеотиды образуют с исследуемой ДНК двойную спираль, и в системе *in vitro* «узнаются» ДНК полимеразы, что уже само по себе неоспоримо свидетельствует об их соответствии природному полимеру.

Более того, химический синтез олигонуклеотидов, сопряженный с молекулярно-биологическими процедурами, является хорошим примером превращения «неживой» материи в «живую» в виде, например, «изготовления» функционально активного гена какого-нибудь белка. И если ферментативное построение ДНК, будь то в живой клетке или в системе *in vitro*, заключается в последовательном присоединении к растущей цепи обычных дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, то, надо сказать, что при химическом синтезе этот процесс выглядит совсем иначе. Так, в ДНК-синтезаторе шаг за шагом из заранее синтезированных мономерных звеньев, представляющих собой те же азотистые основания, но с защищенными реакционно-способными группами (N⁶-бензоил-5'-диметокситритил-2'-дезоксирибоаденозин-3' (bb-цианэтил, N,N-диизопропиламино)-фосфоамидит, N⁴-бензоил-5'-диметокситритил-2'-дезоксирибозитидин-3' (bb-цианэтил, N,N-диизопропиламино)-фосфоамидит, N²-изобутирил-5'-диметокситритил-2'-дезоксирибогуанозин-3' (bb-цианэтил, N,N-диизопропиламино)-фосфоамидит и 5'-диметокситритилтимидин-3' (bb-цианэтил, N,N-диизопропиламино)-фосфоамидит), «растят» олигонуклеотидную цепь, длину которой редко делают большой по причине уменьшения выхода конечного продукта, неизбежно нарастающего с каждым очередным шагом синтеза. Ввиду этого, составлять намеченные гены блочным способом из относительно коротких олигонуклеотидов получается проще. Так, в результате отжига по принципу комплементарности специально подобранных друг для друга перекрывающихся одноцепочечных олигонуклеотидов формируется уже протяженный участок двуцепочечной ДНК, который после нескольких ферментативных процедур становится готовым для его клонирования в подходящем бактериальном векторе. После еще целого ряда этапов в руках экспериментатора (а точнее – на чашке

Петри) появляются рекомбинантные колонии *E.coli*, несущие в своей плазмиде фрагмент не просто чужеродной ДНК, а ДНК, синтезированной химическим путем. Таким образом, из поочередно вступающих в реакцию синтеза ДНК исходных N-защищенных мономеров получается почти сразу пригодная для клонирования и способная к репликации в живой клетке самая обычная ДНК. Причем, если на этапе конструирования гена или во время его химического синтеза, а также в процессе клонирования не было допущено каких-либо неточностей, то такой искусственный ген будет не только реплицироваться в составе векторной ДНК, но и окажется транскрипционно-активным, приводя в итоге к наработке нужного экспериментатору белкового продукта.

Конечно, далеко не всегда молекулярные биологи прибегают к химическому синтезу генов. Причины этого бывают разные. Либо ген, который надо клонировать уж слишком велик, либо проще получить копию нужного гена с помощью ПЦР, либо обычное клонирование может и так дать быстрый и надежный результат. Равно как и необходимость химического синтеза генов связана с рядом обстоятельств. Например, важной причиной для химического синтеза какого-нибудь не очень большого гена может быть не оптимальный подбор кодонов в нем. Так, если, скажем, бактериальный ген определенного белка необходимо «перенести» в другой организм и получить, например, трансгенное растение с новым желательным признаком, то в ряде случаев может возникнуть необходимость изменения некоторых кодонов с целью повышения эффективности трансляции данной мРНК в растительных клетках и, соответственно, увеличения количества целевого белкового продукта. Тогда как, и обычное, и с применением ПЦР клонирование воспроизведет оригинальную природную последовательность нуклеотидов данного гена, тем самым, сохранив кодоны неизменными. Правда, можно затем с клонированным геном провести сайт-направленный мутагенез с целью «исправления» отдельных кодонов, но такой путь не всегда оправдан.

Еще одной причиной, по которой экспериментаторы бывают вынуждены обращаться к химическому синтезу генов – это когда им (в частности, из данных литературы) известна некая нуклеотидная последовательность или только последовательность аминокислот интересующего их белка, но отсутствует исходный биологический материал (в виде самого организма, его тканей, гербарного материала, семян и пр.), который в силу ряда причин им негде взять и соответственно не из чего *чего* клонировать.

Другой причиной химического синтеза может быть желание исследователей создать искусственный ген, аналогов которого просто нет в природе. В качестве примеров последней ситуации можно привести конструирование российскими учеными под руководством М.П.Жирпичникова гена искусственного белка (представляющего, в первую очередь, теоретический интерес) альбегетина, названного так потому, что при формировании его вторичной структуры образуются одна альфа-спираль и две бета-складки, а также наши эксперименты по созданию гена псевдофитохелатина. Дело в том, что фитохелатины, выполняющие весьма важную роль по детоксикации экологически опасных тяжелых металлов, будучи нематричными пептидами, не имеют напрямую кодирующих их генов, а синтезируются из трипептида – глутатиона, выступающего их предшественником. При этом фитохелатины довольно широко распространены среди растений и дрожжей. Их особенностью является то, что они характеризуются высоким содержанием остатков цистеина и наиболее типичным считается фитохелатин со следующей последовательностью аминокислот – (гамма-GluCys)_nGly, где n = от 2 до 11. Несмотря на то, что структура фитохелатинов была раскрыта немецкими исследователями еще в 1989 г., прошло целое десятилетие, прежде чем были осуществлены попытки создания для них синтетических генов. Безусловно, неким препятствием в умах ученых для этого служила гамма-связь между остатками глутаминовой кислоты и цистеина, поскольку при матричном синтезе белка, как известно, образуются альфа-связи, и по своей конформации такие пептиды должны сильно различаться. Однако проведенный недавно американскими авторами анализ комплексов кадмия, ртути и свинца с (гамма)фитохелатином и (альфа)фитохелатином показал значительное сходство образующихся структур, что позволяет надеяться на возможность использования синтетических псевдофитохелатинов в качестве молекул, связывающих тяжелые металлы, в том числе, и в трансгенных растениях.

Исходя из этих данных, мы приступили сначала к конструированию, химическому синтезу, клонированию, а затем и секвенированию гена псевдофитохелатина. Для этого были синтезированы соответствующие комплементарные друг другу олигонуклеотидные блоки протяженностью по 37 нуклеотидов каждый, с которыми после их отжига друг с другом и некоторых ферментативных процедур, лигирования с фагмидным вектором и трансформации бактерий, были получены рекомбинантные клоны, секвенирование которых показало, что часть из них содержат искомый ген, кодирующий небольшой белок

со следующей аминокислотной последовательностью – MetGluCysGluCysGluCysGluCysGly. В настоящее время ведется работа по получению несущих данный псевдофитохелатиновый ген трансгенных растений табака, которые предполагается исследовать пока в качестве модельных объектов. В то же время теоретически тканеспецифичная экспрессия этого гена может позволить снизить содержание кадмия и прочих тяжелых металлов в листьях табака (за счет того, что эти вредные соединения будут накапливаться в корнях и стебле) и таким образом несколько «оздоровить» табачные изделия для курильщиков, что в таком случае будет носить уже практический характер. Другое применение в наших экспериментах ген псевдофитохелатина должен найти при конструировании генно-инженерных штаммов клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, способных инфицировать корни бобовых растений в присутствии повышенных концентраций кадмия.

Как уже отмечалось выше, методология олигонуклеотидного синтеза разработана настолько хорошо, что трудно ожидать какого-либо еще существенного прогресса в этой области. Однако, это относится, главным образом, к синтезу обычных олигонуклеотидов, которые после процедур очистки и ферментативного фосфорилирования от натуральной ДНК отличаются разве что размером. Что касается синтеза модифицированных олигонуклеотидов, то здесь имеется огромный простор для химиков-синтетиков по созданию все новых их вариантов. В то же время особенность синтеза модифицированных олигонуклеотидов заключается не в самом химизме реакций присоединения очередных мономеров в ДНК-синтезаторе, а, главным образом, в использовании соединений различной природы (выбор которых диктуется целым рядом причин и условий) при синтезе исходных фосфорамидитов.

Поскольку полинуклеотидные цепи, составляющие ДНК, образуются за счет соединения в единое целое дезоксирибоз и остатков фосфорной кислоты (формирующих так называемые фосфодиэфирные связи), а также азотистых оснований, то в процессе химического синтеза олигонуклеотидов оказывается возможным в любой из этих трех компонентов вносить определенные изменения. Однако, чтобы с помощью ДНК-синтезатора «изготовить» модифицированный по тому или иному компоненту олигонуклеотид необходимо предварительно синтезировать содержащий новую группу соответствующий фосфорамидит, называемый синтоном, или просто купить его, так как уже существует немало фирм, занимающихся не только заказным

синтезом (о котором отдельно поговорим чуть ниже) конкретных олигонуклеотидов, но и продажей исходных реагентов для него.

Надо сказать, что та или иная модификация олигонуклеотидов предназначена для решения различных задач. Так, например, некоторые изменения образующих остов ДНК фосфодиэфирных связей (или даже полная их замена как таковых чем-то другим) ныне производится, главным образом, для медицинских и фармацевтических целей, более подробно которых коснемся в следующей главке. В то же время некоторые из этих модификаций фосфодиэфирных связей, дезоксирибозы и самих пуринов и пиримидинов (или даже синтез олигонуклеотидов с отсутствующими отдельными азотистыми основаниями) служат для исследования механизмов и стереоспецифических аспектов протекания биохимических реакций, нуклеотид-белкового узнавания и пр.

Отдельный интерес представляют олигонуклеотиды с так называемыми универсальными азотистыми основаниями, которыми могут служить 5-нитроиндол или 3-нитропиррол, поскольку они способны образовывать типичные водородные связи с любым из обычных пуринов или пиримидинов, не нарушая таким образом двойную спираль ДНК. Такое необходимо, в частности, когда точная последовательность нуклеотидов какого-либо гена известна не полностью (что может быть вызвано разными причинами, рассматривать которые здесь кажется нам излишним). В этом случае предпочтительнее в праймеры для ПЦР или секвенирования ДНК «вставить» универсальные основания вместо синтеза так называемых «вырожденных» олигонуклеотидов, которые представляют собой практически эквимольярную смесь двух или большего числа вариантов олигонуклеотидов, как, например, 5'-CCCAGTCCCGACGCC-3', 5'-CCCAGTCCCGATGCT-3', 5'-CCCAGTCCCGAGCG-3', отличающихся по одному или по нескольким нуклеотидам (выделенным здесь жирным шрифтом). Обобщенная последовательность такой смеси праймеров может быть записана как 5'-CCCAGTCCCGA(C/T/G)GCC-3' или иначе как 5'-CCCAGTCCCGABGCC-3', поскольку, согласно действующим правилам, нуклеотиды С, Т и G, встречающиеся в разных образцах в одном и том же месте, принято обозначать символом «В». Для синтеза такого «вырожденного» олигонуклеотида на нужной стадии в реакционную колонку вместо одного фосфорамидита должна быть подана в равном соотношении уже смесь всех трех этих мономеров. Некоторым недостатком подобного набора праймеров является то, что только один вариант из них (т.е. в данном случае – третья часть всех

праймеров) будет демонстрировать с секвенируемой, амплифицируемой или анализируемой ДНК 100%-ное спаривание.

Еще одним типом модифицированных олигонуклеотидов являются флуоресцентно-меченые. Так, для секвенирования молекул ДНК применяются олигонуклеотиды, несущие на своем 5'-конце различные флуорохромы. Отдельный класс формируют секвенирующие ET-праймеры (ET – Energy Transfer), представляющие собой олигонуклеотиды, меченные сразу двумя разными с перекрывающимися спектрами флуоресценции красителями, один из которых выступает донором, а другой акцептором. Такая система красителей, рассчитанная на возбуждение лазером красителя-донора и резонансный перенос энергии от него на акцепторный флуорохром, значительно повышает квантовый выход последнего.

При осуществлении ПЦР в режиме реального времени детекция наработки ампликонов также производится за счет флуоресценции ПЦР-продуктов, оказывающихся мечеными, поскольку используемые праймеры изначально содержали по два флуорохромных красителя. Причем меченные таким образом праймеры, не ставшие затравками при амплификации фрагментов ДНК, сами по себе не «светятся» из-за эффекта гашения, возникающего по причине того, что за счет образования данными олигонуклеотидами специально «запрограммированной» для них вторичной структуры, флуоресцентные красители оказываются чересчур сближены друг с другом. Однако стоит праймерам «отжечься» на матрице ДНК, как их собственная вторичная структура перестает существовать и становится возможен перенос энергии с сопровождающим его свечением.

Так, в настоящее время использование флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов ограничивается, главным образом, автоматическим секвенированием ДНК, проведением ПЦР в режиме реального времени, а также анализом экспрессии генов с помощью ДНК-чипов. При этом можно уверенно прогнозировать, что, по крайней мере, для последних двух подходов применение меченных флуорохромами олигонуклеотидов будет расти весьма быстрыми темпами. В особенности следует ожидать увеличения объема медицинских анализов, где использование флуоресцентных ДНК-чипов в будущем станет совсем обычным делом.

Наконец, существуют различные постсинтетические модификации олигонуклеотидов. Так, в частности, по завершению синтеза олигонуклеотида, при условии, что его 5'- или 3'-концы были «снабжены» определенными реакционно-способными группировками, у экспериментатора появляется возможность «пришить» какую-либо

функциональную молекулу, среди которых наиболее часто оказывается биотин, предназначенный для последующего связывания такого олигонуклеотида через стрептавидин, например, с магнитными частицами.

Отдельный класс олигонуклеотидных молекул составляют так называемые дендримеры. Их особенностью является то, что они представляют собой разветвленные структуры, образуемые за счет использования во время синтеза специальных фосфорамидитных синтонов – дублеров или тремлеров, уже из названия которых можно догадаться, что они дают возможность продолжать синтез в двух или трех направлениях соответственно. Причем последовательное присоединение подобных синтонов позволяет получать весьма сильно разветвленные молекулы. Дендримеры могут состоять как из одного олигонуклеотида, к 5'-концу которого добавляются разветвители с линкерами в виде тимидилатов, так и, напротив, разветвители могут предшествовать 3'-концам олигонуклеотидов. Если первый тип дендримеров рассчитан на их применение в качестве зонда в молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот с целью увеличения чувствительности (за счет большего числа пригодных для мечения концов олигонуклеотидной молекулы) данного метода, то второй тип дендримеров предлагают использовать для формирования все тех же наноструктур с заданной геометрией.

Генотерапия

Внимательный читатель скорее всего заметил, что в ходе написания данной статьи авторы волей-неволей концентрировали свое внимание на различных аспектах применения ПЦР и неразрывно связанных с этим мощным методом олигонуклеотидных праймеров. Однако сделанное чуть выше описание отдельных наноструктур и наномеханических устройств показало, что олигонуклеотиды используются не только в качестве затравок при ферментативном построении новых цепей ДНК, а также в клонировании и секвенировании. Другое оригинальное применение олигонуклеотидов связано с их использованием в качестве фармацевтических препаратов.

В связи с недостатком места, мы коснемся здесь лишь тех вариантов генотерапии, которые связаны с применением олигонуклеотидов. Так, в настоящее время существует, по крайней мере, три варианта использования олигонуклеотидов для блокирования работы

«ненужного» гена или предотвращения появления кодируемого им белкового продукта. Считается, что олигонуклеотиды могут работать на трансляционном уровне (т.е. взаимодействуя с мРНК), на транскрипционном уровне (взаимодействуя с конкретным геном) и на пре-транскрипционном уровне (взаимодействуя с соответствующими факторами транскрипции).

Два первых подхода называют еще «антисмысловыми», поскольку они основаны на использовании одноцепочечных олигонуклеотидов в противоположной ориентации. Так, с помощью «антисмысловой» технологии, заключающейся в отжиге на мРНК комплементарного какой-то ее части олигонуклеотида, происходит почти полное блокирование процесса трансляции данной мРНК, за счет чего кодируемый ею фермент или какой-то другой белок практически не вырабатывается. Таким образом, можно частично исправить вредную мутацию, не допустив появления в клетках дефектного белка или хотя бы резко снизив его количество. Использование подобного олигонуклеотида на транскрипционном уровне рассчитано на его взаимодействие с двойной спиралью ДНК путем инвазии и образования так называемых триплексных структур, которые мешают процессу транскрипции и следовательно ведут к неоявлению соответствующих мРНК.

Что касается осуществления генотерапии на пре-транскрипционном уровне, то данный вариант даже не допускает начала транскрипции за счет того, что необходимые для этого процесса транскрипционные факторы связываются с двуцепочечными олигонуклеотидами, имитирующими регуляторные участки (так называемые цис-элементы) промоторной области, и для работы настоящего гена их уже просто не хватает.

Еще одно не менее интересное применение олигонуклеотидов может заключаться в получении с их помощью, пусть и в мизерном количестве, исправленного варианта белкового продукта дефектного гена. Данный подход, конечно, возможен, только в тех случаях, когда произошли мутации лишь единичных нуклеотидов. Так, за счет инъекции одноцепочечного олигонуклеотида с «правильной» последовательностью и в «смысловой» ориентации происходит его взаимодействие путем инвазии с участком ДНК, который надо исправить, и РНК полимеразы, как это ни кажется неправдоподобным, в очень незначительном количестве случаев при транскрипции дважды «перескакивает» с истинной кодирующей цепи на данный олигонуклеотид и обратно. Результатом таких событий явится образование какого-то небольшого

числа копий молекул мРНК, кодирующих уже нормальный белок, количества которого может вполне хватить на выполнение каталитических или иных функций. В качестве примера потенциальных возможностей данной технологии служит известное из литературы исправление мутации в гене тирозиназы у мышей-альбиносов, приводящее к видимому глазом фенотипическому проявлению в виде возникновения у последних в обработанной зоне волосяного покрова темной окраски.

Общим требованием для всех этих вариантов генотерапии является сохранение введенных олигонуклеотидов в клетке в течение относительно длительного времени. К сожалению, из-за быстрого разрушения различными экзо- и эндонуклеазами обычные олигонуклеотиды практически не пригодны для таких целей и поэтому применяют их модифицированные аналоги. Поскольку нуклеазы, ведущие деполимеризацию молекул ДНК, атакуют преимущественно фосфодиэфирные связи, то наибольшей устойчивостью характеризуются модифицированные олигонуклеотиды, у которых азотистые основания соединены между собой как-то иначе, чем в природном полимере и, следовательно, данные ферменты их попросту «не узнают».

Наиболее известными и часто используемыми среди модифицированных олигонуклеотидов служат их разнообразные тиопроизводные. Так, существуют варианты, где атом серы заменяет атом кислорода в разных положениях остатка фосфорной кислоты. Синтезированы и олигонуклеотиды с заменами на атомы серы гидроксильных групп в 3'- или 5'-положениях дезоксирибозы. Созданы также олигонуклеотиды, имеющие вместо фосфодиэфирных связей N3'-O5' или наоборот O3'-N5'-фосфорамидные связи. Но если данные соединения все же довольно близки по своей структуре к настоящим нуклеиновым кислотам, то созданные датскими учеными под руководством П.Нильсена в начале 90-х годов так называемые пептидно-нуклеиновые кислоты или сокращенно ПНК не имеют с ДНК ничего общего, кроме разве что самих азотистых оснований. Последние в ПНК присоединятся к выполняющим остов 2-аминоэтилглициновым группам через метилкарбонильные линкеры, причем шаг спирали был сделан равным таковому в настоящей ДНК, что позволяет ПНК вступать с нуклеиновыми кислотами во взаимодействие и образовывать как дуплексные, так и триплексные структуры. Поскольку, строго говоря, ПНК не являются ни белками, ни нуклеиновыми кислотами, то соответственно и протеазы, и нуклеазы не способны деградировать

данные соединения, что и обеспечивает их чрезвычайную устойчивость в клетке и пролонгированное действие их как фармацевтических средств.

ДНК-вакцины

Принято считать, что вакцинация насчитывает уже свыше двух веков, поскольку англичанин Э.Дженнер еще в 1798 г. сообщил о применении вируса коровьей оспы для защиты людей от оспы настоящей. Однако, лишь через столетие, благодаря трудам знаменитого французского ученого Л.Пастера, появились и другие вакцины. Затем на протяжении всего XX века шло активное создание и усовершенствование разнообразных вакцин, спасших жизни огромному числу людей и препятствующих развитию многих опасных заболеваний. С появлением возможности создавать рекомбинантные молекулы ДНК эта технология также была задействована для разработки новых типов вакцин. И к ставшим уже классическими «живым» аттенуированным вакцинам и «убитым» вакцинам прибавились рекомбинантные субъединичные вакцины, под которыми принято понимать белки-антигены, наработанные в специальных бактериальных или дрожжевых штаммах-суперпродуцентах. Собственно говоря, решение данной задачи с помощью молекулярно-биологических подходов в некотором роде заменяет выращивание патогенных микроорганизмов, включая вирусы. Причем, и в том и в другом случае необходим этап выделения нужного белкового продукта с последующей тщательной его очисткой, что составляет подчас непростую задачу. В этой связи неудивительным выглядит продолжающийся поиск путей создания принципиально новых вакцин.

Считается, что история ДНК-вакцин восходит к началу 1990-х годов. Однако, справедливости ради, необходимо отметить, что первые сообщения о том, что введенная чужеродная ДНК вызывает у млекопитающих выработку антител, были сделаны еще в начале 60-х. Тогда, в частности, было показано, что ДНК вируса полиомы, введенная хомячкам, приводит к образованию у них, в том числе, и специфических антител. Еще почти двадцать лет потребовалось для того, чтобы на основе бактериального вектора рBR322 (к слову сказать, составившего целую эпоху в молекулярном клонировании) получить рекомбинантную плазмиду с ДНК вируса полиомы, которой потом была проведена трансформация фибробластов.

Тем не менее, только в 1990 и затем в 1992 годах были опубликованы две работы, в которых при осуществлении попыток лечения с помощью генотерапии мышечной дистрофии, авторы обнаружили, что инъецированная плазмидная ДНК способна не только сохраняться, но и экспрессироваться в животных клетках. Данные наблюдения вызвали повышенный интерес, и уже в 1993 г. было сделано по-настоящему первое сообщение об образовании у мышей специфических антител к вирусу гриппа в ответ на введение им плазмидной ДНК, несущей ген белка этого вируса. Более того, когда после такой «осознанной» вакцинации мышам интраназально была введена летальная доза вируса гриппа А, то смогли выжить 90% особей. Ввиду такого успеха за данной работой последовала просто лавина исследований, направленных на создание ДНК-вакцин. Тем более что для получения ДНК-вакцин оказалось всего лишь достаточным создать неспособную к репликации в животных клетках правильную генно-инженерную конструкцию, в которой ген, кодирующий белок-антиген, должен быть помещен под контроль подходящего промотора, такого, как например, цитомегаловирусный. Затем в бактериальных клетках надо нарастить данную плазмидную ДНК, которую после не очень сложной процедуры очистки от примесей становится уже возможным использовать для введения или интрамусккулярно, или интрадермально в виде так называемой «голой» ДНК. Надо сказать, что эффективность действия одной и той же ДНК-вакцины в немалой степени зависит от способа ее введения в организм. В настоящее время многими исследовательскими группами активно разрабатываются приемы, направленные на снижение вводимого количества ДНК при одновременном увеличении специфического иммунного ответа. Так, недавно показано, что использование сорбции ДНК-вакцин на биodeградируемых катионных наночастицах, образующих эмульсию, с одной стороны резко увеличивает эффективность вакцинации, а с другой – является еще одним свидетельством постепенного перевода различных технологий на нануровень.

Привлекательность ДНК-вакцин заключается в относительной простоте их создания, дешевизне производства и удобстве хранения, что позволило некоторым авторам заговорить о ДНК-вакцинах, как о вакцинах третьего поколения и о произошедшей революции в вакцинации. Однако, их широкое применение сдерживается некоторыми опасениями, вызванными, в первую очередь, теоретической возможностью внедрения такой чужеродной ДНК в геном вакцинированного организма. Тем не менее, до сих пор не

получено сколько-нибудь убедительных доказательств встраивания ДНК таких вакцин в геном млекопитающих, в то время как имеется множество подтверждений о длительном существовании введенных в организм ДНК-вакцин в форме исходной плазмиды. Впрочем, подобные опасения, пожалуй, можно считать излишними, если вспомнить, что при использовании классических вакцин (применяющихся уже две сотни лет) в организм человека тоже попадает, в частности, ДНК патогена, которая теоретически также способна встраиваться в геном. Более того, как считают некоторые исследователи (и мы с ними полностью солидарны) – если бы ДНК-вакцины были разработаны раньше классических, то ситуация могла бы быть в корне обратной, и предложения применять «живые» или «убитые» вакцины, как вакцины нового типа, также вызывали бы аналогичные и наверное справедливые опасения. Другую опасность представляет возможность образования анти-ДНК антител. Причем подозревают, что у индивидов с аутоиммунными заболеваниями введение ДНК-вакцин может теоретически приводить к более сильному неспецифическому иммунному ответу, однако свидетельств такого рода пока не получено.

В то же время и классические вакцины не лишены целого ряда недостатков. Помимо того, что процесс их производства часто довольно трудоемок и они требуют для хранения пониженных температур, имеются и более веские причины постепенного ухода от их использования. Так, вакцины, содержащие ослабленную культуру патогена или «живые» вакцины, сохраняют значительный риск неконтролируемой реверсии штамма, в результате которой вакцинация может, напротив, привести к заболеванию. Для «убитых» же вакцин, получаемых путем химической или физической обработки вирулентного патогена с целью его инактивации, также существует некоторый риск неполноты этой процедуры, что небезопасно для вакцинируемого.

К преимуществам ДНК-вакцин, кроме уже упоминавшейся простоты их получения, производства и хранения, можно отнести и то, что при введении в организм они как бы имитируют нахождение в нем настоящего патогена, поскольку образование белковых продуктов, выступающих антигенами, происходит в этом случае непосредственно в клетках человека или животного и, следовательно, все посттрансляционные модификации белков происходят в полном соответствии тому, как это совершается при настоящей инфекции. Видимо, этим можно объяснить и высокий уровень иммунного ответа на ДНК-вакцины, и их специфичность.

Принимая во внимание перспективность использования ДНК-вакцин и учитывая необходимость создания эффективной защиты населения Республики Башкортостан от такого серьезного заболевания, как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), нами, наряду с другими вариантами, разрабатывается и такой способ вакцинопрофилактики, которая могла бы быть весьма актуальной. Тем более что Башкортостан, как известно, относится к особо неблагополучным регионам в отношении данной зоонозной неконтагиозной вирусной инфекции, этиологическим агентом которой являются хантавирусы, переносимые мышевидными грызунами и, в частности, рыжей полевкой *Clethrionomys glareolus*, являющейся на территории нашей республики «хозяином» вируса серотипа Пуумала.

Хантавирусы входят в одну из самых крупных группировок вирусов животных – семейство *Bunyaviridae*, и обладают типичными для вирусов этого семейства чертами. Их вирионы содержат три отдельных сегмента одноцепочечной так называемой «минус»-РНК в форме кольцевых рибонуклеопротеидных комплексов. В общей сложности геном хантавирусов кодирует 4 типа белков. Самый крупный L-сегмент кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, обеспечивающую транскрипцию и репликацию вирусного генома, М-сегмент несет информацию о двух поверхностных гликопротеинах G1 и G2, а самый маленький S-сегмент кодирует нуклеокапсидный N-белок. На основе плазмидного вектора рсDNA3 нами создана генно-инженерная конструкция с геном нуклеокапсидного белка, «подставленного» под контроль цитомегаловирусного промотора. Данная конструкция в виде «голой» ДНК была внутримышечно введена лабораторным мышам линии BALB/с. Проведенный анализ уровня специфических антител, выявляемых иммуноферментным анализом с помощью набора Хантагност, показал специфическую ответную реакцию, более чем в 3 раза превышающую контроль, которым служили аналогично вводимые мышам как «холостая» плазмидная ДНК, так и ДНК спермы лосося. Исходя из этих данных, можно говорить, что создан прототип ДНК-вакцины против хантавируса серотипа Пуумала. Справедливости ради, следует отметить, что не так давно была опубликована работа шведских авторов, сообщивших о проведении сходных экспериментов (причем также с нуклеокапсидным белком хантавируса и даже с тем же плазмидным вектором) и получении специфичного иммунного ответа, что дополнительно свидетельствует о перспективности такого подхода.

Дальнейшее проведение исследований по данной ДНК-вакцине связано с необходимостью всестороннего испытания полученных генно-

инженерных конструкций с целью выработки у вакцинированных мышей иммунитета, ведущего к образованию у них невосприимчивости к хантавирусам, что, соответственно, должно не позволить таким мышам служить в качестве их переносчиков. Однако, ввиду реальной опасности для персонала, подобные эксперименты возможны только лишь в специально оборудованном виварии, строительство которого в настоящее время ведется в ГУП «Иммунопрепарат».

Хотя это не имеет прямого отношения к теме данной главы, но, поскольку связано с вакцинами вообще и с хантавирусом в частности, то мы посчитали возможным упомянуть, что нами параллельно ведется работа и по созданию так называемых «съедобных вакцин» против ГЛПС на основе трансгенных растений моркови и томатов. В настоящее время в бинарном векторе готовится генно-инженерная конструкция, в которой ген нуклеокапсидного белка хантавируса будет находиться под контролем сильного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, теоретически способного обеспечить наработку белка-антигена в количестве, достаточном для пероральной иммунизации. Причем, также, как и в случае с ДНК-вакцинами, не так давно только уже американскими авторами опубликована статья, описывающая получение с целью создания «съедобной вакцины» трансгенного растения картофеля, содержащего экспрессируемый ген нуклеокапсидного белка хантавируса.

Надо сказать, что быстро растущий интерес к «съедобным вакцинам» объясняется тем, что они удовлетворяют практически всем требованиям, предъявляемым к подобным препаратам, которые должны быть недорогими, легко получаемыми, пригодными для хранения и транспортирования без охлаждения, а также безопасными. «Прием» же таких вакцин может происходить практически незаметно, поскольку он просто совпадает с приемом пищи.

«Съедобные вакцины» можно считать последним на сегодняшний день поколением вакцин. Тем не менее, первые клинические испытания на людях были проведены еще в 1997 г. При этом использовались клубни трансгенного картофеля, экспрессирующие синтетический бактериальный ген В-субъединицы термолабильного энтеротоксина *E.coli*, вызывающего диарею. Так, в результате у группы добровольцев отмечено образование значительного уровня специфических антител. В настоящее время также идут испытания «съедобной вакцины» против гепатита В и, вероятно, в недалеком будущем она будет производиться уже на коммерческой основе. Есть результаты, свидетельствующие о проявлении вакцинных свойств у трансгенного картофеля, несущего ген,

кодирующий гликопротеин внешней оболочки вируса бешенства. Эти последние примеры приведены здесь в качестве некоего доказательства огромных потенциальных возможностей съедобных вакцин, за которыми, возможно, будущее.

Заказной синтез олигонуклеотидов и заказное секвенирование ДНК

Сейчас, наверное, невозможно назвать точную дату выполнения химиками-профессионалами первого полученного ими заказа по синтезу конкретных олигонуклеотидов. Одно можно сказать с уверенностью, что заказной синтез олигонуклеотидов стал носить массовый характер только после появления метода ПЦР, так как до этого праймеры использовались преимущественно лишь при ферментативном секвенировании ДНК, для которого применялся довольно ограниченный набор векторных молекул и существовало соответственно еще меньшее количество различных мест отжига праймеров на этих векторах, поскольку разные типы векторов могут нести одинаковые участки для «посадки» затравочных молекул. Более того, практически все используемые в секвенировании ДНК праймеры можно было легко купить, так как они фигурировали в каталогах большинства фирм-производителей молекулярно-биологических реактивов и препаратов. Надо сказать, что эта ситуация сохранилась и поныне, и наряду с заказным синтезом, например, стандартного секвенирующего праймера экспериментатор имеет возможность приобрести как реактив готовый олигонуклеотид с такой же последовательностью (но уже дороже!).

Что касается праймеров, используемых в ПЦР, то их может быть такое огромное разнообразие, что только заказной синтез и способен предоставить экспериментаторам требующиеся им варианты олигонуклеотидов. И чтобы у читателя не осталось на этот счет никаких сомнений, пожалуй, стоит еще раз напомнить, что теоретически все возможные комбинации перебора нуклеотидов в тех или иных праймерах составляют 4^n (где n – длина конкретного олигонуклеотида). Причем ввиду того, что на самом деле в ПЦР чаще всего используются праймеры длиной от 15 до 22 звеньев, то, следовательно, общее число возможных олигонуклеотидов, которые могут заказать исследователи, составит сумму праймеров разной протяженности. Строго говоря, не все варианты перебора нуклеотидов подходят для праймеров, но здесь нет возможности рассматривать это более детально. Справедливости ради

следует также отметить, что в случае использования ПЦР в качестве диагностического метода, рассчитанного на детекцию, например, наследственных болезней или возбудителей опасных инфекций, для них предусуществуют подобранные исследователями и уже синтезированные конкретные пары праймеров, продающиеся, как правило, в составе специальных наборов.

В настоящее время в мире имеет место значительная конкуренция среди фирм, предоставляющих услуги по заказному синтезу олигонуклеотидов. Борясь за клиентов, они вынуждены снижать цены, улучшать очистку, гарантировать точность синтеза путем секвенирования олигонуклеотидов. Недавно для этой цели ведущие фирмы даже стали применять весьма дорогостоящую технику и секвенировать готовые праймеры с помощью ионизационной масс-спектрометрии. В России также отмечается заметное увеличение числа научно-исследовательских работ и диагностических процедур, проводимых с помощью ПЦР, и, как следствие этого наблюдается стабильный рост потребности в олигонуклеотидах, постепенно рождающий конкуренцию. В то же время, в России исторически сложилось так, что основными ДНК-синтезирующими центрами являются Москва и Новосибирск, тогда как остальная территория страны отнюдь не покрыта сетью фирм, делающих свой бизнес на заказном синтезе олигонуклеотидов. Вот, и в нашей Уфе, к сожалению, нет глубоких традиций олигонуклеотидного синтеза, хотя надо сказать, что имевшийся в Институте биохимии и генетики УНЦ РАН прибор раннего поколения «Виктория 6М», выпускавшийся СКТБ Новосибирска, сыграл определенную роль в становлении в Уфе этого дела. Однако, в настоящее время та модель скорее морально, чем физически устарела, и недавно ей на смену был куплен современный ДНК-синтезатор производства ООО «Биоссет» (Новосибирск), позволяющий надеяться на удовлетворение в будущем местного, начинающего расти спроса.

Заказное секвенирование каких-либо последовательностей ДНК также существует уже на протяжении многих лет и стало для стран Запада довольно обычным явлением. Хотя, надо признать, что его масштаб конечно же не может сравниться с объемом заказного синтеза олигонуклеотидов. Тем не менее, заказное секвенирование ДНК «идет в ногу со временем» и если раньше речь шла о заказном секвенировании каких-либо отдельных генов или прочих фрагментов ДНК, то относительно недавно было объявлено о предоставляемой специально созданным целым консорциумом фирм возможности заказного

секвенирования полных геномов каких-либо свободноживущих организмов.

Другие исследования молекул ДНК

В этом далеко не кратком (или наоборот, очень кратком – как считать!) изложении различных особенностей ДНК не удалось, к сожалению, затронуть еще целый ряд направлений исследований этой архиважной молекулы. Так, остался неупомянутым оригинальный метод пиросеквенирования ДНК, основанный на детекции молекул неорганического пирофосфата, образующихся из дНТФ в ходе реакции полимеризации ДНК ДНК полимеразой. Отдельный пласт исследований, также нерассмотренный здесь, составляют работы, посвященные изучению ДНК с помощью атомно-силового микроскопа. Причем нельзя исключать, что разрешающая способность данного метода в будущем может повыситься настолько, что появится возможность уверенно различать в единичной молекуле типы азотистых оснований, следующих друг за другом, что есть уже ничто иное, как секвенирование ДНК.

Надо сказать, что в последнее время серьезное внимание уделяется подходам, позволяющим работать всего с одной молекулой ДНК, исключая, таким образом, вклад возможного полиморфизма нуклеотидных последовательностей, способного исказить некоторые результаты. В этой связи весьма перспективным выглядит еще только разрабатываемый метод неэлектрофоретического секвенирования единичных молекул ДНК путем последовательного экзонуклеазного отщепления мононуклеотидов от построенной *de novo* цепи ДНК, в которой каждый тип азотистого основания должен будет нести особую флуоресцентную метку. Что касается отделения единичных молекул ДНК от их смеси, то оно осуществляется с помощью различных подходов, в одном из которых применяется такой прибор, как проточный цитофотометр, используемый обычно для подсчета клеток. Более новыми способами является применение так называемых оптических или магнитных пинцетов, позволяющих «захватывать» единичные молекулы ДНК и проводить с ними операции по растягиванию, искривлению фрагментов ДНК, направленные на решение задач по исследованию конформации или иначе механики двойной спирали.

Не представилось возможным в данной статье описать и метод изотермической амплификации молекул ДНК, имеющий с ПЦР мало

общего, но с разработкой которого ученые связывают определенные надежды. Совсем немного внимания было уделено ДНК-чипам, в том числе, способам их изготовления, особенностям проведения молекулярной гибридизации и детекции ее результатов. Довольно мало говорилось о генетически модифицированных организмах, или иначе ГМО и методах их получения, где в одном из способов, в частности, используется «обстрел» кусочков растительных тканей золотыми либо вольфрамовыми микро- или даже наночастицами с нанесенными на них молекулами ДНК. Не удалось детально коснуться важных вопросов электрофоретического разделения ДНК, в особенности его разнообразных вариантов в пульсирующем электрическом поле, позволяющем фракционировать весьма крупные молекулы ДНК. Оказались оставленными без внимания такие старые подходы, как аналитическое ультрацентрифугирование и электронная микроскопия, оптические методы, сыгравшие в свое время заметную или даже ключевую роль в познании особенностей молекул ДНК.

Завершая описание уникальных черт ДНК, остается выразить надежду, что и впредь будут появляться все новые данные об этой самой главной молекуле, продолжающей как хранить генетическую информацию и передавать ее по наследству, так и «скрывать» от ученых еще некоторые свои «тайны», которые, надо думать, рано или поздно станут известны, и еще не одна Нобелевская премия будет присуждена за те или иные открытия в этой области. Причем они могут быть сделаны как с помощью уже имеющихся подходов, так и благодаря новым, еще более мощным методам, которым в арсенале исследователей, работающих с ДНК, почему бы и не появиться.

Вместо заключения, или Digitally yours, DNA

Мы сейчас живем в эпоху цифровых технологий, которая, впрочем, еще только начинается. Но уже есть цифровые фотоаппараты, цифровые видеокамеры и многое, многое другое «цифровое». Видимо, за ними будущее. Известная южнокорейская фирма LG Electronics, рекламируя свою видео-аудио продукцию, рассчитанную на эксплуатацию цифровых технологий, указывает «Digitally yours». Отчасти поэтому, мы решились в качестве такого необычного заголовка завершающей главки выбрать стандартную фразу, которой обычно заканчиваются международные письма. Конечно, там принято

напомнить – «искренне ваш» или что-то в этом роде, а потом подписаться. Здесь же перевод будет звучать немного «суше»: «В цифровой форме ваша, ДНК». Так ли оно на самом деле или нет, наверное, покажет будущее. А пока приведем чем-то схожие и принадлежащие Л.Адлеману слова, используемые теперь иногда даже в качестве эпиграфа к соответствующим текстам – «ДНК по существу – цифровая молекула». И, вероятно, его высказывание вполне справедливо, поскольку ДНК служит таким хранилищем огромного объема информации, причем, копируемой, что даже в определенном смысле роднит ее с известной машиной Тьюринга – провозвестницей современных компьютеров. Подсчитано, что всего 1 г ДНК содержит столько же информации, какую могут вместить в себя около триллиона обычных компакт-дисков. Однако, использование потенциала молекул ДНК для хранения других, несвойственных ей сведений, и тем более для оперативного обращения к ним, аналогично тому, как это делается в нынешней компьютерной технике, выглядит сегодня весьма и весьма проблематичным. В то же время следует отметить имеющие место попытки как-то двигаться в этом направлении. Так, есть предложения по преобразованию двоичной системы записи путем перевода ее на нуклеотидный язык с учетом принципа комплементарности азотистых оснований. Например, 00 – должно соответствовать, скажем, А (аденину), 01 – С (цитозину), 10 – G (гуанину), а 11 – Т (тимидину). При этом происходит даже как бы некоторое «уплотнение» записи и вместо 8 знаков в данном случае оказывается достаточно только 4. Такая кодировка может естественно работать в обе стороны, но насколько необходимо именно так «оцифровывать» молекулы ДНК или наоборот заменять цифры нуклеотидами – покажет время.

Однако существующий полиморфизм молекул ДНК и его отражение в цифровой форме (как размеров рестриктазных фрагментов с точностью до нуклеотида, например) в виде генетических штрих-кодов организмов, на наш взгляд, как нельзя лучше уже сейчас говорит о справедливости и приведенного высказывания Л.Адлемана, и использованной в данном заголовке фразы, которую напоследок хотим немного усложнить и на этом закончить посвященную уникальным чертам и возможностям молекул ДНК брошюру –

*«В цифровой форме неизменно ваша,
ваша старая новая ДНК».*

Благодарности

Интерес авторов к молекулам ДНК вызван проводимыми ими исследованиями по грантам РФФИ (95-04-12022, 98-04-62048, 98-04-48072 и 01-04-49042), РФФИ-Агидель (02-04-97903 и 02-04-97918), INTAS (99-1200 и 01-2170), а также по заданиям АН РБ («Проблемы физико-химической биологии в области медицины, сельского хозяйства и технологии живых систем в РБ» и «Эпидемиология и профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом»).

Учитывая огромные возможности, которые таит в себе ДНК, в Институте биохимии и генетики УНЦ РАН уделяется самое серьезное внимание развитию всесторонних исследований этих молекул, которые проводились и проводятся в рамках Программы государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (гранты 96-15-98061 и 00-15-97810).

А.В. Чемерис, В.А. Вахитов

НОВАЯ СТАРАЯ ДНК

Уникальные черты самой главной молекулы,
или Почему ученые разных специальностей
в последнее время обращают на ДНК
все больше внимания

Компьютерная верстка: Ю. Грицаенко

© РА «Информреклама», Уфа, 2002. Изд. лиц. № 04565 от 20.04.01. Тир. 200. Зак. 724.

Отп. в тип. «Информреклама», 450077, г. Уфа, ул. Ветешникова, 97.

Тел.: (3472) 522-966, 520-194, 525-999, 533-777. E-mail: reklama@ufacom.ru