

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

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

НОВАЯ СТАРАЯ ДНК

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

***А.В. Чемерис, С.М. Бикбулатова,
Д.А. Чемерис, В.А. Вахитов***

Издание второе, дополненное и расширенное

Уфа – 2005

УДК 577
ББК 28.07
Ч 42

НОВАЯ СТАРАЯ ДНК. Уникальные черты самой главной молекулы, или почему ученые разных специальностей в последнее время обращают на ДНК все больше внимания / А.В. Чемерис, С.М. Бикбулатова, Д.А. Чемерис, В.А. Вахитов – Уфа: Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 2005. 143 с. Издание второе, дополненное и расширенное

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

Книга 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 Ф.Р. Гималов

кандидат биологических наук Ю.М. Никоноров

Утверждено к печати

Ученым советом Института биохимии и генетики

Уфимского научного центра Российской академии наук

© А.В. Чемерис, С.М. Бикбулатова, Д.А. Чемерис, В.А. Вахитов, 2005

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	14
Метод ПЦР и новая эра в исследовании ДНК	18
Сайт-направленный мутагенез	21
Секвенирование полных геномов организмов	22
Геном человека	26
Биоинформатика	31
ДНК-чипы	35
"Новая" ПЦР	36
ПЦР в реальном времени или новейшая ПЦР	39
Простые и модифицированные олигонуклеотиды	42
ДНК древняя и не только	49
ПЦР - некоторые аспекты теории метода	53
ПЦР и новая судебная медицина и криминалистика	56
Генетические штрих-коды организмов	58
ДНК-идентификация личности	61
Аmplификация целых геномов	69
ЛЦР - лигазная цепная реакция	72
ЛЦР в реальном времени, или новая жизнь старой реакции	75
ПЦР + 1/2 ЛЦР и наоборот	78
SARS	79
ДНК-компьютинг	82
ДНК-шаффлинг	85
ДНК и наноструктуры	88
ГЦР - гибридизационная цепная реакция	93
Атомно-силовая микроскопия ДНК	97
Генотерапия	110
ДНК-вакцины	112
Генетически модифицированные организмы	117
Заказные синтез олигонуклеотидов и секвенирование ДНК	122
Другие исследования молекул ДНК	124
ДНК на "стыках" наук	127
Вместо заключения, или Digitally yours, DNA	129
Благодарности	131
Литература	132

Вместо предисловия

К написанию еще первого издания данной книги авторов подвигло сразу несколько обстоятельств, среди которых, помимо юбилейных дат (упомянутых на титульном листе), 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 Академии наук Республики Башкортостан и в рамках Программы государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации.

Подготовка второго расширенного и дополненного издания была вызвана, во-первых, тем, что на первую книгу мы продолжаем получать запросы. И это несмотря на то, что на веб-сайте нашего Института выложена полная, активно скачиваемая и, видимо, пользующаяся популярностью ее pdf-версия. Во-вторых, за время, прошедшее с момента выхода первого издания, интересы самих авторов (как и сам авторский коллектив) несколько расширились, что и нашло отражение в появлении здесь новых глав, большинство из которых посвящено циклическим реакциям нуклеиновых кислот, в том числе, в режиме реального времени с FRET эффектом, включая изотермические. Наибольшей ревизии подверглась глава, посвященная секвенированию полных геномов организмов, и поскольку новая информация в этой области накапливается почти лавинообразно, мы были вынуждены разделить ее на две, тогда как остальные написанные ранее главы сознательно изменены и дополнены совсем незначительно. Равно как и посвящение самой книги осталось неизменным, хотя упоминаемые юбилеи уже давно прошли, но они как бы и непреходящи.

Поскольку, в процессе подготовки этого материала было проанализировано неподдающееся учету число экспериментальных и обзорных статей, а также значительное количество интернетовских web-страниц, то указать даже малую их толику в виде списка цитируемой литературы поначалу просто не представлялось возможным, и, тем не менее, потом было решено все же привести ключевые. Единственным исключением явилась глава про атомно-силовую микроскопию, цитированные работы (преимущественно последних 2 - 3 лет) по которой заняли добрую половину всего списка. В целом, из экономии места в ходе изложения данного материала приходилось ограничиваться лишь кратким описанием (помимо собственных) 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 сильно увеличили бы его в объеме. Поэтому авторы предлагают всем заинтересованным читателям задавать возникающие у них вопросы по электронной почте через почтовый ящик с простым и кратким адресом - DNA@anrb.ru. В довольно многочисленных сносках представлена имеющая, главным образом, справочный характер некая дополнительная информация, подчас малоизвестная.

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, всю 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 ДНК как "новой старой", на взгляд авторов, 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 дня сегодняшнего можно уверенно сказать, что "ДНК - (основная) молекула жизни!"

И 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 крайне важной 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. ...

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. ...

Двойная спираль

Наверное, наиважнейшим и к тому же сильно ожидаемым открытием 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 [Watson, Crick, 1953; 1953a]. ...

Генетический код

После того, как стала известна структура ДНК, весьма важно было понять, как именно в этой молекуле записывается наследственная информация. ...

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" [Опарин, 1924] рассмотрел процессы, которые могли привести к синтезу неких соединений (которые мы сегодня называем органическими) и переходу к первым жизненным формам. ...

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 на этом пути 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. ...

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. ...

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 (многократного умножения) фрагментов ДНК с помощью так называемой полимеразной цепной реакции, или сокращенно ПЦР [Saiki et al., 1985]. ...

Сайт-направленный мутагенез

Нобелевскую премию 1993 г. по химии вместе с 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. ...

Секвенирование полных геномов организмов

Метод ПЦР и прочие серьезные 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 [Fleischmann et al., 1995]. ...

Геном человека

Впервые о необходимости определения нуклеотидной последовательности всех 24 хромосом (22-х аутосом и 2-х половых X и Y хромосом) человека заговорили в середине 80-х годов прошлого столетия, и в 1988 г. в США был создан Национальный центр по исследованию генома человека, возглавил который Нобелевский лауреат Дж.Уотсон. Немного позднее в 1990 г. в тех же США был разработан проект "Геном человека", практически сразу ставший международным, поскольку многие страны, включая СССР, изъявили желание принять участие в его выполнении. Причем считаем важным отметить, что Советский Союз стал второй страной после США, где в том же 1988 г. по инициативе выдающегося ученого академика А.А.Баева была сформирована Государственная программа "Геном человека". ...

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. ...

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. ...

"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. ...

ПЦР в реальном времени или новейшая ПЦР

Вскользь упомянутая в предыдущей главе ПЦР в реальном времени несомненно заслуживает отдельного описания, поскольку она во многом изменила взгляды как исследователей, использующих метод ПЦР для получения новых знаний о функционировании генов и геномов, так и тех, кто занят исключительно ДНК-диагностикой. Если для первых главным является возможность количественного определения с помощью ПЦР-РВ числа копий той или иной мишени в стартовом материале, то вторые, помимо этого, отдают ей предпочтение еще и ввиду практически полного исключения загрязнения ампликонами рабочих помещений и сведения, таким образом, риска получения ложнопозитивных результатов к абсолютному минимуму, что при массовом характере анализов при использовании обычной ПЦР удастся добиться далеко не всегда. ...

Простые и модифицированные олигонуклеотиды

В данной главе мы хотим задержать внимание читателей на обычных и модифицированных олигонуклеотидах, без которых молекулярная биология уже просто немыслима. Так, помимо использования олигонуклеотидов в качестве праймеров при проведении ПЦР, синтезируемые химическим путем, они находят в молекулярной биологии еще массу применений. ...

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. ...

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 25 нуклеотидных звеньев, впрочем, они могут быть как значительно короче, так и заметно длиннее. ...

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. ...

Генетические штрих-коды организмов

Безусловно, главный интерес в связи с вопросами генетической паспортизации вызывает человек и по этой причине данному вопросу будет отведена отдельная нижеследующая глава. Здесь же мы изложим свои результаты по генетической паспортизации бактерий на основе полиморфизма их ДНК, выявляемого рестрикционными эндонуклеазами и немного порассуждаем о важности этого процесса. ...

ДНК-идентификация личности

В настоящее время человечество стоит перед суровой необходимостью однозначно идентифицировать и паспортизировать любого человека по только ему свойственным биологическим чертам и признакам и постоянно хранить эту информацию в силу сразу множества причин. Это и возросший уровень криминалитета, и имеющий место терроризм с его многочисленными подчас неподдающимися опознанию жертвами. А также природные и техногенные катастрофы, которые иногда невозможно предсказать или избежать. ...

Аmplификация целых геномов

WGA или Whole Genome Amplification - именно так звучит по-английски этот процесс. В русском языке аналогичное сокращение еще просто отсутствует. Может быть, его назвать нам как АЦГ, полагая, что такая аббревиатура приживется? А то, что в ней весьма скоро появится потребность - в этом у нас нет никаких сомнений. ...

ЛЦР - лигазная цепная реакция

Помимо полимеразной цепной реакции, существует еще и лигазная цепная реакция (ЛЦР), которая, в силу многих причин, известна гораздо меньше, но, как ни странно это может показаться, имеющая при этом перед ПЦР в плане диагностики целый ряд преимуществ. ...

ЛЦР в реальном времени, или новая жизнь старой реакции

Несмотря на то, что уже довольно давно используются различные варианты ПЦР-РВ, для ЛЦР-РВ ни одного подобного варианта предложено еще не было. И если набрать в различных базах данных ключевые слова "LCR" и "real-time" вместе с булевским оператором "AND", то поисковая система выдаст совсем немного статей, удовлетворяющих запросу; к тому же при внимательном рассмотрении оказывается, что LCR в них это вовсе и не Ligase Chain Reaction, а - Locus Control Region. Такое "неправильное" отношение к ЛЦР-РВ, на наш взгляд, возникло именно из-за трудностей в детекции продуктов реакции в обычной ЛЦР, а также из-за бурного развития ПЦР-РВ. ...

ПЦР + 1/2 ЛЦР и наоборот

Может быть, кому-то такое название этой главки покажется странным, но назвать ее так нас заставило опять-таки отсутствие широкоупотребимого русского эквивалента обозначения метода LDR (Ligase Directed Reaction). ...

SARS

Ярким примером объединения усилий ученых многих стран (вирусологов, молекулярных биологов и др.), равно как и возможностей современной биологии, явились идентификация возбудителя инфекции и последовавшее за этим секвенирование генома коронавируса. Так, неожиданное появление и быстрое распространение такого опасного заболевания как SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) или ТОРС (Тяжелый Острый Респираторный Синдром - в русскоязычной интерпретации), называемого еще также и атипичной пневмонией, заставило ученых многих стран отложить свои плановые исследования и переключиться на решение серьезных и актуальнейших задач, сначала по идентификации возбудителя, затем по выработке тест-систем для его выявления у заболевших и в более далекой перспективе на создание специфических вакцин.

И хотя вирус этот РНК-содержащий, без ДНК-копий его изучать и диагностировать уже просто невозможно; и нам представляется вполне логичным включить целую главу о нем в книгу о ДНК. ...

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 [Adleman, 1994]. ...

ДНК-шаффлинг

Метод искусственной эволюции белков *in vitro*, 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 [Stemmer, 1994] в том же году, что и ДНК-компьютинг, и имеет с последним немало общего. ...

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. ...

ГЦР - гибридизационная цепная реакция

Расположение этой главы именно здесь вслед за описанием наноструктур вполне оправданно, так как предложившие совсем недавно гибридизационную цепную реакцию (ГЦР) американские ученые [Dirks, Pierce, 2004] в своих исследованиях занимались как раз вопросами самосборки молекул ДНК при формировании различных наноконструкций. Заметив, что в определенных сценариях самосборки отдельные молекулы ДНК являются как бы переключателями процесса, ими были разработаны условия, при которых два шпилечных

фрагмента ДНК, частично или, точнее, особым образом комплементарные друг другу, после добавления олигонуклеотида, выступающего инициатором цепной реакции, начинают гибридизироваться, приводя к структуро-зависимому неферментативному росту молекул ДНК с неизбежными регулярными "никами" на обеих цепях. Можно считать, что движущей силой ГЦР является временно сокрытая энергия, заключенная в этих самых шпильчатых наноструктурах. ...

Атомно-силовая микроскопия ДНК

По глубокому убеждению авторов, атомно-силовой микроскоп (АСМ) будет через несколько лет одним из основных приборов в физико-химической биологии. Собственно, подобные высказывания уже не редкость и нет-нет, да и встречаются в многочисленных обзорных статьях последних лет, посвященных применению АСМ в молекулярной биологии и в смежных с ней дисциплинах. Считается даже, что с помощью, в том числе и АСМ, молекулярная биология превратится со временем в молекулярную нанобиологию. Впрочем, этот процесс уже начался. И как сейчас практически ни одна молекулярно-биологическая лаборатория уже не обходится без ДНК-амплификатора, так не смогут уважающие себя лаборатории такого профиля в будущем (хотя, вероятно, не таком уж и близком) обходиться и без АСМ. Причиной тому служит все та же возможность вести анализ биополимеров, включая ДНК, по существу в режиме реального времени, то есть прямо наблюдая происходящие, например, ферментативные процессы. ...

Генотерапия

Внимательный читатель, скорее всего, заметил, что в ходе написания этого труда авторы волей-неволей концентрировали свое внимание на различных аспектах применения, главным образом, 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 (и не только) построении новых цепей ДНК, а также в клонировании и секвенировании. Другое оригинальное применение олигонуклеотидов связано с их использованием в качестве фармацевтических препаратов. ...

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. ...

Генетически модифицированные организмы

Когда-то давно наука биология была чисто описательной, но с течением времени она, превращаясь уже в целую систему биологических дисциплин, становилась все более экспериментальной, а в настоящее время стала даже созидательной. Можно сказать, что благодаря появлению современной биотехнологии, наступила эпоха превращения биологической науки в непосредственную производительную силу. Причем процесс этот будет, несомненно, нарастать, и многочисленными экспертами из разных стран практически единодушно признается, что наступивший век - это век биотехнологии. Биотехнология уже сегодня зримо присутствует в разнообразных сферах жизни человечества благодаря, в том числе, и созданию генетически модифицированных организмов, или кратко ГМО, называемых еще трансгенными. ...

Заказные синтез олигонуклеотидов и секвенирование ДНК

Сейчас, наверное, невозможно назвать точную дату выполнения химиками-профессионалами первого полученного ими заказа по синтезу конкретных олигонуклеотидов.

...

Другие исследования молекул ДНК

В этом далеко не кратком (или наоборот, очень кратком - как считать!) изложении различных черт и особенностей ДНК не удалось, к сожалению, затронуть еще целый ряд направлений исследований этой архиважной молекулы.

Так, оказались, по существу, оставленными без внимания такие старые подходы, как аналитическое ультрацентрифугирование, оптические и вискозиметрические методы, рентгеноструктурный анализ, сыгравшие в свое время заметную или даже ключевую роль в познании особенностей молекул ДНК. Не удалось разобрать теорию и детально коснуться важных вопросов электрофоретического разделения фрагментов ДНК, в особенности его разнообразных вариантов в пульсирующем электрическом поле, позволяющем фракционировать весьма крупные молекулы ДНК. Причем в лаборатории авторов имеется специальный прибор - так называемый контроллер программируемого обращения электрического поля, применяемый в одном из простых подходов пульс-электрофореза, и, видимо, в последующих переизданиях на этом методе, равно как и на аналитическом, и препаративном ультрацентрифугировании ДНК мы обязательно остановимся. В последующих переизданиях предполагается значительное место выделить для описания электрофоретических, хроматографических и прочих методов детекции целевых продуктов циклических реакций нуклеиновых кислот, как очень важной составляющей современного анализа молекул ДНК и несправедливо оставленных здесь пока почти без внимания. Что касается атомно-силовой микроскопии ДНК, то эта уже и сейчас самая большая глава, несомненно, будет еще более расширена. Может быть, к тому времени, появятся у нас и собственные результаты по анализу природных и синтетических молекул ДНК с помощью АСМ.

Мы лишь упомянули о молекулярном клонировании, совершенно не затронув вопроса - какое оно сейчас. Совсем немного было сказано о рестрикционных эндонуклеазах - этих, с позволения сказать, "скальпелях" в руках молекулярного биолога и, учитывая важность данных ферментов, к их более подробному рассмотрению мы обязательно вернемся, тем более, что нами уже некоторое время назад разработан некий новый принцип их обозначения. Довольно мало говорилось здесь о ДНК-чипах, в том числе, практически ничего не было сказано о способах их изготовления, об особенностях проведения молекулярной гибридизации и детекции ее результатов, что будет непременно исправлено в будущем. Отдельная большая глава будет обязательно посвящена SNP, точнее методам их первоначального выявления и последующей детекции.

Следует сказать, что в последнее время серьезное внимание уделяется подходам, позволяющим работать всего с одной молекулой ДНК, исключаящим, таким образом, вклад возможного полиморфизма нуклеотидных последовательностей, способного исказить некоторые результаты, хотя часто бывает, что именно полиморфизм (как в случае с SNP, например) является как раз предметом исследования. Так, все еще весьма перспективным продолжает выглядеть разрабатываемый, но неупомянутый здесь 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. Все это также осталось за рамками данного труда.

Что касается такого крайне важного вопроса как целено-геномное секвенирование ДНК, то может быть к моменту следующего переиздания оно будет уже каким-то иным, и мы тогда его опишем. При этом можно не сомневаться в том, что работа над созданием новых подходов и принципов такого секвенирования ДНК несомненно будет продолжаться ввиду того, что главенствующий ныне метод электрофоретического разделения продуктов секвенирующих реакций с дидезокситерминаторами практически достиг своего "потолка" и может быть улучшен в нынешнем своем виде в лучшем случае лишь на процентов 15-20, тогда как на самом деле производительность определения нуклеотидных последовательностей ДНК увеличивать надо сразу на несколько порядков. В этом плане более обнадеживающими выглядят теоретически легче масштабируемые неэлектрофоретические методы и, в частности, оригинальный метод пиросеквенирования ДНК, основанный на детекции молекул неорганического пирофосфата, образующихся из дНТФ в ходе реакции полимеризации ДНК ДНК полимеразой. Однако сейчас все же трудно пока сказать каким будет новое секвенирование ДНК полных геномов. Единственное, что можно сказать с уверенностью, то это то, что оно, скорее всего, будет характеризоваться массивным или более того - сверхмощным параллелизмом, где будет осуществляться чтение относительно коротких фрагментов ДНК (в пределах 50 - 200 нуклеотидов), но сразу огромного их числа. И речь здесь не идет о поставленных в ряд десятках или сотнях современных капиллярных ДНК секвенаторов, поскольку на самом деле все должно уместиться в одном приборе. Но нельзя исключать и другую крайность - когда с одной матрицы будет "читаться" до сотни тысяч нуклеотидов. Схем нового секвенирования ДНК на самом деле немало, хотя наиболее оптимальной и высокотехнологичной все же пока еще не видно и мир продолжает только двигаться в этом направлении. В этой связи рады заметить, что нам известны российские исследователи, активно думающие и работающие над новым секвенированием ДНК, что, безусловно, дает некую надежду не остаться в очередной раз в стороне. Такой повышенный интерес к широкомасштабному секвенированию ДНК объясняется очень просто - именно возможность определения нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК и полученные благодаря этим методам знания уже оказали несравнимое влияние на все дальнейшее развитие биологической (и не только) науки и чуть ли не вся нынешняя физико-химическая биология так или иначе опирается на эти сведения, а будущая легкость секвенирования полных геномов любых организмов, несомненно, послужит сверхважному делу понимания их функционирования.

Несмотря на то, что мы полны решимости в будущем заполнить некоторые из перечисленных выше незначительных и даже весьма серьезных "пробелов" в описании черт и особенностей "новой старой ДНК" и методах их изучения, тем не менее, данная глава "Другие исследования молекул ДНК" все равно будет присутствовать, надо думать, и в последующих переизданиях по причине того, что, даже если нам удастся хотя бы коротко изложить чуть ли не все применяемые и применявшиеся методы исследования молекул ДНК, неизбежно к моменту выхода очередного издания появятся новые подходы или получат неожиданно новое мощное развитие уже существующие.

ДНК на "стыках" наук

На заре зарождения научной мысли биология (да и все другие науки) существовали практически независимо друг от друга, но оставаться вечно так не могло. Несмотря на то, что, наверное, главной задачей любой науки является проведение исследований для проникновения вглубь себя самой, подобный процесс неизбежно идет и вширь. Это привело к тому, что на пространстве естественно-научных дисциплин произошло некоторое сближение различных наук и появились точки их соприкосновения. ...

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 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 главы 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". ...

Благодарности

Интерес авторов к ДНК вызван проводимыми и проводившимися ими исследованиями по грантам РФФИ (95-04-12022, 98-04-62048, 98-04-48072, 01-04-49042, 03-04-49619, 04-04-48884 и 04-04-97513), РФФИ-Агидель (02-04-97903, 02-04-97918 и 05-04-97914), 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, 00-15-97810 и НШ-2217.2003.4).

Литература

Лиманский А.П. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // Успехи соврем. биол. 2003. Т.123. С.531-42.

Лысов Ю.П., Флорентьев В.Л., Хорлин А.А., Храпко К.Р., Шик В.В., Мирзабеков А.Д. Определение нуклеотидной последовательности ДНК гибридизацией с олигонуклеотидами. Новый метод // ДАН СССР. 1988. Т.303. С.1508-11.

Опарин А.И. Происхождение жизни. М., «Московский рабочий», 1924. 71 С.

...