**Дополнительные материалы №2**

**к ответуЭксперту**

**от 17.11.2016 г. по заявке № 2015104423/28 (006967)**

**« Нано преобразователь биоструктур**

**(клеточно - бактериальный томограф и магнитоструйный**

**нано пинцет» Кущенко В.А.**

**(131 стр.)**

Содерд\жание

**ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, ПРИГОДНЫХ**

**ДЛЯ СОРБЦИИ ДНК……………………………………………1**

# Взаимодействие наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК in vitrо…………………………………………………5

способ гомогенизации раствора магнитных частиц с адсорбированной на них ДНК………35

# ДНК помогла собрать наночастицы в кристаллы…………….41

[Созданы композиционные материалы на основе ДНК](https://lenta.ru/news/2013/10/21/superlattice/)…………………………………………………………………42

**Функцииядра……………………………………………………………………………….43**

**Экспрессия нерибосомных генов…………………………………………………..44**

**Клеточный цикл…………………………………………………………………………..46**

КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА………………………………………………….49

**Клеточная стенка…………………………………………………………….64**

**Ядерные поры…………………………………………………………..…….83**

**поры и каналы биологических мембран………………………………….91**

виды магнитных резонансов……………………………………………………………..99

Антиферромагнетики……………………………………………………..101

**Ядерный гамма-резонанс**  ( эффект Мессбауэра)……………………………………………….103

ямр…………………………………………………………………………………………..…………..105

## Методы клонирования ДНК

*Геномные библиотеки, клонирование ДНК in vivo…………………………………………………………..106*

### *Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – методика………………………………………107*

## Введение гена в клетку…………………………………………………………………………..111

### *Генетическая трансформация клеток бактерий………………………………………..127*

**Петкевич М.В.\*, Рымко А.Н.\*, Квач С.В., Зинченко А.И.**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

*\*Международный государственный экологический университет*

*им. А.Д. Сахарова, Минск*

**ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, ПРИГОДНЫХ**

**ДЛЯ СОРБЦИИ ДНК**

            Применение наноматериалов в медицине и фармакологии является приоритетным направлением, позволяющим решать самые актуальные проблемы в данных областях знаний [1–3].

         Наночастицы обладают высокоразвитой активной поверхностью и, как следствие, высокой сорбционной емкостью. Важно отметить, что иммобилизация на поверхности наночастицы приводит к стабилизации биомолекул и служит защитой от деградации их под воздействием различных факторов. Показано, что ДНК, иммобилизованная на поверхности наночастицы, сохраняет свою стереометрию и устойчива к действию нуклеаз.

            Магнитные наночастицы нашли широкое применение в диагностике *in vitro*. Разработан высокочувствительный метод цитометрического анализа образцов цельной крови, в основе которого лежит маркировка клеток крови ферромагнитными наночастицами. Магнитные наночастицы, сопряженные с антителами, используются для обнаружения опухолевых клеток в периферической крови, что позволяет оценивать эффективность химиотерапии, а также выделять клетки методом магнитной сепарации.

            Очевидны перспективы использования магнитных наночастиц *in vivo* для диагностики и терапии. В настоящее время наночастицы, покрытые кремнием, для MRI-обнаружения опухолей различной локализации являются коммерческими продуктами. Свойство индуктивного нагревания наночастиц позволило разрабатывать идею их использования для гипертермического разрушения опухолевых клеток. Широко разрабатываются подходы к генотерапии онкологических заболеваний. В настоящее время проведены эксперименты по трансфекции генов с использованием суперпарамагнитных частиц на клетках эпителия легкого человека. Доставка специфических ДНК, РНК, олигонуклеотидов в определенные клетки может подавлять экспрессию гена либо инициировать синтез важных белков.

            Таким образом, сегодня открываются перспективы для проведения высокочувствительной диагностики и высокоспецифичной и эффективной терапии различных заболеваний с помощью магнитных наночастиц. Постоянно синтезируется большое число новых наноматериалов и предлагаются новые подходы в области их биомедицинского применения.

В настоящее время существует огромное количество способов синтеза магнитных наночастиц. Одни из них – одностадийные, другие – многостадийные процессы. Все они имеют свои плюсы и минусы, но ни один из них не является универсальным для синтеза всех типов магнитных наночастиц.

            Цель настоящего исследования – получение силанизированных магнитных наночастиц и проверка возможности их использования в качестве сорбента ДНК.

**Материалы и методы исследования**. Для получения магнитных наночастиц к 20 мл 1 М раствора NH4OH добавляли 20 мл раствора, содержащего 0,1 М FeSO4 и 0,1 M FeCl3. Процедуру смешивания проводили в вытяжном шкафу, покапельно, с постоянным перемешиванием реакционной смеси. Полученную суспензию прогревали при 120°С в течении 15 мин. После остывания суспензии полученный магнетит (Fe3O4)дважды промывали 96%  этанолом.

Для силанизации наночастиц к магнетиту при постоянном перемешивании в строгой последовательности добавляли 16,7 мл 96% этанола (до конечной концентрации 80%), 2,7 мл дистиллированной воды, 0,2 мл NH4ОН и 0,4 мл тетраэтоксисилана**.**Полученную суспензию силанизированных наночастиц трижды промывали этанолом, помещали в водную среду и оставляли на «старение» на 3 сут. Для проверки качества силанизации наночастиц к 100 мкл суспензии магнетита добавляли 100 мкл 2 М НСl и после 2 ч проведения реакции замеряли оптическую плотность супернатанта при λ=295 нм.

Просвечивающую электронную микроскопию осуществляли, используя микроскоп JEM-100CX при ускоряющем напряжении 80 кВ. Образцы наносили на сетчатые никелевые мишени с нитроцеллюлозной подложкой и высушивали на воздухе в течение ночи.

Сорбцию ДНК на магнитные наночастицы проводили следующим образом. В пробирку на 1,5 мл вносили 50 мкл раствора геномной ДНК *Escherichia сoli* с концентрацией 5 мкг/мкл, 500 мкл 6 М NaClO4 в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 5,2), 100 мкл изопропанола и 50 мкл 50% суспензии магнетита. После тщательного перемешивания пробирку помещали на магнитный штатив и с помощью пипетки отбирали супернатант. К осадку добавляли 1 мл 80% этанола в 10 мМ трис-НСl (pH 8,0), перемешивали и снова отбирали супернатант. К осадку добавляли 1 мл 5% этанола, отбирали супернатант и приливали 100 мкл 10 мМ трис-НСl (pH 8,8). Полученную смесь помещали на водяную баню (70°С) на 5–10 мин, после чего отбирали супернатант для измерения в нем количества ДНК. Для количественного определения ДНК к 10 мкл супернатанта прибавляли 190 мкл 6-тикратного интеркалирующего красителя Sybre green (Sigma, США) в 10 мМ трис-НСl (pH 8,0), после чего замеряли величину флуоресценции.

Для определения возможности использования ДНК, десорбированной с магнитных наночастиц, в генно-инженерных исследованиях образец такой ДНК вносили в реакционную смесь следующего состава: 67 мМ трис-HCl (pH 8,3), 17 мМ (NH4)2SO4, 2 мМ MgCl2, 0,02% Твин-20, каждый из четырех природных дезоксинуклеозидтрифосфатов в концентрации 0,02 мМ, 10 пмоль праймеров к последовательности гена уридинфосфорилазы *E. coli* и 1 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы. В качестве положительной пробы использовали ДНК *E. сoli*, в качестве отрицательной пробы – воду. Амплификация выполнялась по программе: 2 мин 94ºС, (30 сек 94ºС; 15 сек 55ºС; 2 мин 30 сек 72ºС) – 25 циклов; 2 мин 72ºС. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

**Результаты исследования.**Синтез магнитных наночастиц, осуществленный по представленной выше методике позволил получить 20 мг магнитных наночастиц.

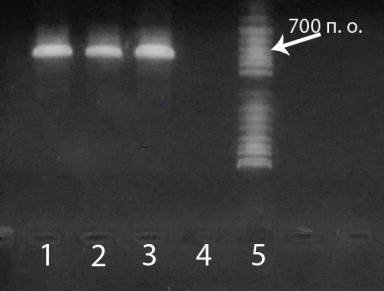
            Одной из особенностей поведения наночастиц в растворе является их склонность к агрегации, поэтому для практического использования растворов магнитных наночастиц необходима их стабилизация. После покрытия наночастиц SiO2 их масса увеличилась до 25 мг. УФ-спектрофотометрические исследования показали, что магнитные наночастицы полностью силанизированы и устойчивы к действию соляной кислоты.

         На полученных микрофотографиях магнитные наночастицы имели вид крупных агрегатов, состоящих из частиц меньшего размера. Маленькие частицы выглядели довольно гомогенными и имели округлую форму. Размер их колебался от 15 до 25 нм с диаметром ядра 15–20 нм и силановым слоем около 5 нм.

         В результате проведенных экспериментов было показано, что полученные нами магнитные наночастицы с сорбированной ДНК способны высвобождать до 65% исходной ДНК. Исходя из результатов измерений, в процессе сорбции с 1 мг полученного сорбента десорбировалось 32,4 мкг ДНК.

         Проведенная полимеразная цепная реакция показала, что десорбированная с магнитных наночастиц ДНК является хорошим объектом для дальнейших генно-инженерных исследований. Анализ ДНК проводили с помощью агарозного гель-электрофореза. На электрофореграмме (рисунок 1) видно, что опытные образцы содержат около 700 п.о. и соответствуют контрольному.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены покрытые оксидом кремния магнитные наночастицы, обладающие хорошей ДНК-сорбционной способностью. Выход сэлюированной ДНК составил 32,4 мкг нуклеиновой кислоты на 1 мг магнитных наночастиц, а эффективность выделения ДНК составляет 65% от исходного количества. Показано, что выделенная с помощью магнетита ДНК пригодна для постановки ПЦР.



**Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации гена уридинфосфорилазы *E. coli***

1–2 – ДНК, элюированная с магнитных наночастиц; 3 – исходная ДНК; 4 - отрицательный контроль; 5 - фрагменты ДНК с известным числом оснований

Разработанный способ получения магнитных наночастиц не требуют использования энергоемкой и сложной вакуумной и высокотемпературной техники, он экологически безопасен и относительно прост, что делает его перспективным для практического использования.

Литература:

Riehemann K., Schneider S.W., Luger T.A., Godin B., Ferrari M., Fuchs H. Nanomedicine – challenge and perspectives**//**Angew. Chem. Int. Ed. Engl.2009. Vol. 48, N 5. P. 872–897.

Sakamoto J.H., van de Ven A.L., Godin B. et. al. Enabling individualized therapy through nanotechnology // Pharmacol. Res. 2010. Vol. 62, N 2. P. 57–89.

SniadeckiN.J. Minireview: a tiny touch: activation of cell signaling pathways with magnetic nanoparticles // Endocrinol. 2010. Vol. 151, N 2. P. 451–457.

# Взаимодействие наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК in vitro

# ВАК РФ 03.01.04, Биохимия

## Авторефератдиссертации по теме "Взаимодействие наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК in vitro"

﻿4856762

ПЕРШИНА АЛЕКСАНДРА ГЕННАДЬЕВНА

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИТА КОБАЛЬТА И МОЛЕКУЛ ДНК IN VITRO

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

п лмт 7fi11

диссертации на соискание ученой степени- О '

кандидата биологических наук

Новосибирск-2011

4856762

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении Высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской

Федерации

Научный руководитель:

д.м.н. Сазонов Алексей Эдуардович

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор Загребельный Станислав Николаевич д.х.н., профессор Зарытова Валентина Филипповна

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича РАМН

Защита состоится « 2011 года в часов минут

на заседании диссертационного совета Д 003.045.0! при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте \v\vw.niboch.nsc.ru Автореферат разослан « 11г.

Ученый секретарь диссертационного совета к.х.н., доцент

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Бионаногибридные конструкции, содержащие [агнитные наночастицы и молекулы нуклеиновых кислот, представляют огромный нтерес для современной биомедицины, в том числе в области создания ысокочувствительных систем количественного определения и идентификации >рагментов ДНК и РНК-молекул. Это связано с появлением у наночастиц 1 шкальных магнитных свойств, обеспечивающих легкость управления и ффективность детектирования конструкций на их основе, сочетающего омехоустойчивость с возможностью обнаружения диагностически-значимых юлекул в режиме реального времени. Нанометровые размеры конструкций озволяют выявлять единичные молекулы, что значительно увеличивает увствительность анализа. Перспективность использования наночастиц на основе юрритов для создания биомедицинских конструкций обусловлена сочетанием ысоких магнитных свойств, с большей устойчивостью к окислению и иологической инертностью по сравнению с наночастицами металлов. Раскрытие акономерностей взаимодействия нуклеиновых кислот и наночастиц является ервоочередной задачей для развития теоретических и методических подходов к озданию бионанокомпозитных конструкций. Это открывает перспективу правления связями компонентов конструкции, определяют область и границы ее иомедицинского использования. Актуальность исследования взаимодействия (ерримагнитных наночастиц и молекул ДНК продиктована и тем, что лежит в снове воздействия наноматериалов на биосистемы, что напрямую связано с

■ \* ■ ' ■ к Г:-

беспечением безопасности и качества жизни человечества в целом. В литературе риводятся данные о высокой адсорбционной активности наночастиц оксидных 1ерримагнетиков относительно молекул ДНК, тем не менее механизмы их заимодействия остаются малоизученными. Заключения о природе формирующихся вязей носят противоречивый характер. Очевидно, что взаимодействие нуклеиновых ислот и магнитных наночастиц может реализовываться за счет нескольких [еханизмов с участием различных групп биомолекулы.

Цель работы изучить взаимодействие суперпарамагнитных наночастиц юррита кобальта, полученных методом механохимического синтеза, и нуклеиновых

кислот, на модели природных и синтетических одноцепочечных и двухцепочечнь молекул ДНК, in vitro.

Задачи исследования:

1. Исследовать закономерности связывания природных и синтетическ1 одноцепочечных и двухцепочечных молекул ДНК и наночастид феррита кобаль-при варьировании рН, ионной силы и химического состава среды;

2. Выявить группы молекул ДНК, участвующие во взаимодействии наночастицами феррита кобальта;

3. Изучить сорбционные свойства и природу активных центров j поверхности частиц нанопорошка феррита кобальта с использованием модельнь молекул;

4. Определить доступность молекулы ДНК, связанной с наночастицаы феррита кобальта, для нуклеазного расщепления;

5. Оценить влияние связывания наночастиц феррита кобальта молекулами ДНК на структуру и функцию биомолекулы;

6. Построить модель взаимодействия компонентов комплекса «ДНК ферримагнитная наночастица».

Научная новизна работы. Впервые показана способность наночасти феррита кобальта, синтезированных методом механохимии, связываться фрагментами природных и синтетических двухцепочечных и одноцепочечных ДН с образованием стабильных комплексов. Определено, что эффективное! связывания и стабильность комплексов при изменении параметров среды (pi ионной силы, химического состава) зависти от нуклеотидного состава биомолекуль Установлено, что связывание молекул ДНК и наночастиц реализуется за счс координации фосфатных групп сахарофосфатного остова и карбонильных груп оснований ДНК атомами переходных металлов на поверхности, и стабилизируете водородными связями. При взаимодействии с одноцепочечными молекулами ДНК связывание с поверхностью наночастицы могут вовлекаться атомы азои гетероциклического кольца. При взаимодействии с природными молекулам двухцепочечных ДНК наночастицы связываются преимущественно с GC-napaMi защищая их от действия рестриктаз. Впервые показано, что в составе комплексов

4

наночастицами феррита кобальта молекулы ДНК не деградированы и могут частично сохранять способность к гибридизации с комплементарными молекулами ДНК. Показана возможность высвобождения молекулы ДНК из комплекса с наночастицами, при этом функция биомолекулы восстанавливается. На основе полученных данных о взаимодействии наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК предложен метод создания и принципиальная схема оригинальной конструкции для выявления диагностически-значимых фрагментов нуклеиновых кислот in vitro, при наложении внешнего магнитного поля.

Теоретическое н практическое значение работы. В работе продемонстрирована принципиальная возможность и перспективность использования суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта, синтезированных методом механохимии, для формирования

магниточувствительных бионанокомпозитных структур. Полученные новые данные о закономерностях взаимодействия наночастиц феррита кобальта и молекул одноцепочечных и двухцепочечных дезоксирибонуклеиновых кислот будут положены в основу реализации подходов к бионаноконструированию при создании новых наноразмерных устройств. Подобные конструкции, созданные на основе суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК, являются перспективными структурами для разработки исследовательских и диагностических инструментов в области молекулярной биологии, медицины и наноэлектроники. Данные, представленные в работе, вносят существенный вклад в понимание механизмов взаимодействия неорганических наночастиц и молекул нуклеиновых кислот, что имеет большое значение для развития представлений о воздействии новых наноразмерных материалов на биологические системы.

Апробация результатов исследования и публикации. По материалам

диссертации опубликовано 8 печатных работ. Материалы, включенные в

диссертацию, докладывались на всероссийских и международных конференциях, в

том числе на 2ой международной конференция «Наноразмерные системы: строение

свойства, технологии» НАНСИС-2007 (Киев, Украина, 2007), 2ой Международной

научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы

биотехнологии» (Казань, Россия, 2008), International Conference on Materials for

5

Advanced Technologies ICMAT 2009 (Сингапур, 2009), Втором Международно конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий в рамках 2\ международного форума по нанотехнологиям «Руснанотех-2009» (Москва, Росси

2009), Third International NanoBio Conference 2010, Zurich (Цюрих, Швейцари

2010).

Структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литератур] описания материалов и методов исследования, изложения результатов и i обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на И страницах, иллюстрирована 40 рисунками и 6 таблицами. Библиография содеряа 271 литературный источник.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наночастицы феррита кобальта, синтезированные методо механохимии, связываются с молекулами природных и синтетически двухцепочечных и одноцепочечных ДНК и формируют стабильные комплекс! Эффективность связывания и стабильность комплексов при изменении химическо1 состава среды зависит от нуклеотидного состава биомолекулы, и может значителы снижаться в присутствии молекул, конкурирующих за центры координационно1 связывания на поверхности.

2. Взаимодействие молекул ДНК и наночастиц феррита кобальт реализуется за счет координации групп оснований и фосфатных групп остова ДН на поверхности наночастицы и стабилизируется водородными связями. Пр связывании с природными молекулами двухцепочечных ДНК наночастицы феррит кобальта взаимодействуют преимущественно с GC-парами. При взаимодействии одноцепочечными молекулами ДНК в связывание с поверхностью наночастиц наряду с карбонильными группами могут вовлекаться атомы азот гетероциклического кольца.

3. Формирование комплекса с наночастицами феррита кобальт приводит к ограничению доступности ДНК для взаимодействия с другим биомолекулами. Однако взаимодействие не приводит к деградаци полинуклеотидной цепи и при десорбции ДНК с поверхности наночастицы е функция может быть восстановлена.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Связывание фрагментов двухцепочечной природной ДНК и наночастиц феррита кобальта

Для исследования взаимодействия наночастиц феррита кобальта с молекулами ДНК получали седиментационно-устойчивую суспензию наночастиц со средним гидродинамическим диаметром 20 нм в трис-буфере (рН 5,0). По данным спектрофотомерии 1 мг наночастиц феррита кобальта связывался с (0,7+0,02) мкмоль (в расчете на н.о.) фрагментов двухцепочечной ДНК, что приводило к формированию бионанокомпозитного комплекса.

Согласно модели Штерна адсорбция групп биомолекул на поверхности частиц может происходить с формированием внешне- (с участием электростатических взаимодействий) или внутрисферных комплексов, за счет прямой координации с отдельными атомами металла. Характер экспериментально полученной изотермы адсорбции фрагментов двухцепочечной геномной ДНК на наночастицах феррита кобачьта (рис. 1) свидетельствует об очень высоком сродстве ДНК к поверхности частиц, что характерно для образования внутрисферных комплексов.

С целью выяснения природы формирующихся связей между наночастицей и молекулой ДНК исследовали образование комплексов при варьировании параметров среды: ионной силы, рН, химического состава (рис. 2).

Рис. 1 - Изотерма адсорбции Рис. 2 - Влияние химического состава фрагментов геномной ДНК на среды на связывание фрагментов наночастицах феррита кобальта, 10 геномной ДНК и наночастиц феррита мМ трис-буфер (рН 5,0) кобальта; ^-статистическая значимость

отличия от связывания в 10 мМ трис-буфере (рН 5,0)

Повышение ионной силы раствора до 1 М не влияло на количеств связываемой с наночастицами ДНК, что позволяет исключить ведущую рол электростатических взаимодействий в связывании. Снижение количеств; связывающихся с наночастицами молекул при повышении рН среды до 7,4 на 9 °/ указывает на определенную роль процессов протонирования фосфатных групп ДН и/или поверхности наночастиц и, соответственно, водородных связей в взаимодействии. Значительное снижение (на 56 %) количества ДНК, связываемой наночастицами, в присутствий фосфат-анионов свидетельствует о высоком сродств фосфатных групп к поверхности наночастиц. Наблюдаемое концентрационнс зависимое снижение связывания ДНК с наночастицами в присутствии имидазол; блокирующего образование координационных связей, позволяет предполагат преимущественно координационное взаимодействие (рис. 3).

0.7 2 0.6 ^ 0.5

л 0.3 с?

I °'2 I од о

Рис. 3 - Влияние имидазола на связывание фрагментов геномной ДНК с наночастицами феррита кобальта (рН 5,0)

100 200 300 400 500 600 [имидазол], мМ

Исследование стабильности полученного комплекса при варьировани параметров среды, а так же воздействии химических веществ, обладающи потенциальной активностью в направлении разрушения связей его компоненте! показало, что инкубация в растворе хлорида натрия с концентрацией от 0,1 до 1 № трис-буфере со значением рН от 5,0 до 9,0 не приводила к разрушению связи ДНК наночастица. Высокий уровень десорбции ДНК с поверхности наночастт наблюдаемый в натрий-фосфатном буфере (рис. 4), обусловлен конкуренцие фосфатных групп за центры связывания на поверхности наночастиц. Учитывая, чт связывание с наночастицами может приводить к возникновению конформационног напряжения молекулы, анионы, образующиеся при диссоциации фосфата натри\* имеющие меньшие размеры и очень высокое сродство к поверхности, способш активно вытеснять функциональные группы ДНК.

0.5 I 0.4

0.3

о г

а §

! 0.1

Рис. 4 - Зависимость десорбции фрагментов геномной ДНК с поверхности наночастиц феррита кобальта от концентрации №2НР04 (рН 7,4)

5 10 15 20 25 [№21!Р04], мМ

Оценка методом гель-электрофореза показала, что при концентрации ЭДТА 50 мМ порядка 50 % ДНК десорбировалось с поверхности наночастиц. Эффективное разрушение связей компонентов бионанокомпозита в результате инкубации в среде с ЭДТА, обладающего высокой склонностью к образованию хелатных комплексов с атомами переходных металлов, свидетельствует в пользу значительной роли координационных взаимодействий между группами ДНК и атомами металла на поверхности наночастиц в связывании.

Данные ИК-спектрометрического исследования комплекса (рис. 5) показали, что при связывании фосфатные группы ДНК координируются на поверхности наночастиц, на что указывает сближение п.п. симметричных и асимметричных колебаний фосфатной группы, относительно п.п. в спектре нативной ДНК (от 1224 к 1218 см'1 и от 1084 к 1086 см4).

ГШ

О.-О

и

1«» 141X1 1200 НХХ1 ™

БЭЛНЭВОГ ЧИСЛО, сы"'

171X1 15 (XI

В0ЛК0В9С числа, см'1

Рис. 5 - Фрагменты ИК-спектров наночастиц феррита кобальта (а), ДНК (Ь, с1), бионанокомпозитного комплекса ДНК-

наночастицы феррита кобальта (с, е) в бидистиллированной (Н20) и

дейтерированной (ОгО) воде

Увеличение интенсивности колебаний при 1665 см"1, свидетельствует о вовлеченности атомов гетероциклических колец оснований во взаимодействие с наночастицами. Дательное исследование изменения положения п.п. колебаний групп оснований в области 1800-1500 см"1 в Э20 (рис. 5, с!, е), показало, что во взаимодействии участвуют карбонильные группы гетероциклов, на что указывает изменение положения п.п. при 1658 (02 цитозина) и 1703 см"1 (Об гуанина). Присутствие в спектре комплекса ДНК-наночастицы п.п. при 1642 см"1, свидетельствует о том, что разрыва АТ-пар не происходит, тогда как в связывание вовлекаются преимущественно СС-пары. Отсутствие изменения положения п.п. при 1528 и 1486 см"1 позволяет исключить участие атомов азота гетероциклов в связывании.

Формирование комплекса ДНК-наночастицы сопровождается исчезновением п.п. координированных на поверхности феррита кобальта карбонатных групп (в области 1500-1300 см"1), что является следствием их вытеснения группами молекулы ДНК.

Отметим, что ДНК, в комплексе с наночастицами, преимущественно сохраняет двуспиральное строение и относится к В-типу, на что указывает положение п.п. фосфата при 1086 см"1 и 1224 см"1, а так же колебаний связей дезоксирибозы в С2'-эндо-анти-конформации (при 1378 и 1422 см"').

Наблюдаемые изменения ИК-спектра ДНК, входящей в состав бионанокомпозита, характерны для нуклеиновых кислот, вступающих в координационное взаимодействие с ионами переходных металлов. По данным литературы Ш-атомы пуринов являются наиболее предпочтительными лигандами для связывания с переходными металлами. Преимущественное участие кислородных атомов в координационном взаимодействии с наночастицами может быть следствием дефектности решетки наночастиц феррита кобальта по кислороду, обусловленной спецификой их синтеза.

2. Связывание синтетических молекул ДНК и наночастиц феррита кобальта

При исследовании взаимодействия наночастиц феррита кобальта с синтетическими олигонуклеотидами различного состава установлено, что эффективность адсорбции молекул на наночастицах, в том числе при изменении рН, ионной силы и химического состава среды, значительно варьирует в зависимости от нуклеотидного состава (рис. 6). Наиболее эффективно в трис-буфере с наночастицами феррита кобальта связывались олиго(<Ю)|8 и олиго^С)!8 - (43,0±0,5) и (39,2±1) нмоль/мг соответственно, тогда как для олиго(с1А)18 наблюдали наиболее низкое связывание (24,3±0,4) нмоль/мг, для олиго(с1Т)18 данный показатель составил 31,0±0,7 нмоль/мг, для гетероолигонуклеотида олиго(с!АбсЮ6с1С4с1Т2) -28,5±0,6 нмоль/мг.

----- Рис. 6 - Связывание наночастиц

феррита кобальта с молекулами 18-мерных синтетических

одноцепочечных олигонуклеотидов при изменении химического состава среды; \* - статистическая значимость отличия от связывания

олигонуклеотида в трис-буфере (рН 5,0), @ - статистическая значимость отличия от связывания олиго(ёА)18, $

О 10 мМ трис (5.0) о 10 мМ трис (7,4) . 0ЛИГ0((1С))8, & - OЛИГO(dG),g, # -

Ш0.4ММаС1. 10 мМ трис (5.0)\_■ 20 мМ N»,№'0., ГО мМ трис (5,0) 4 4 /Д

олиго(сГГ)18, 0 - олиго(йАг^О60С4аА2).

Отметим, что в отличие от фрагментов природной двухчепочечной ДНК повышение ионной силы приводило к снижению количества связываемых с наночастицами молекул для всех исследуемых групп одноцепочечных олигонуклетидов на 6-36%. Повышение рН трис-буфера до 7,4 влияло только на количество связываемых молекул олиго(с1С)|8.

В присутствии фосфата натрия в инкубационной среде наблюдали значительное снижение количества связываемых с наночастицами молекул всех исследуемых групп одноцепочечных олигонуклетидов: на 86-92 % для олиго(с!А)18, олиго(сГГ)18 и олиго(с!Аб(10бс1С,,с1Т2), в то время как для олиго(сЮ)18 и олиго(с1С)]8 эффективность связывания снижалась лишь на 51 и 54 %, соответственно.

11

□ 10 мМ трис (5,0) о 10 кМ трис (7,4) И 0,4 М N80. 10 мМ трис (5,0)\_■ 20 мМ .^а.НЮ,, ГО мМ трис (5.0)

Повышение концентрации имидазола в среде концентрационно-зависим снижало связывание олигонуклеотидов (рис. 7), как и в случае двухцепочечно ДНК, что свидетельствует о координационной природе формирующихся связей.

.о,

^0.4 о

¿0.3

Й0.2 о

¡0.1

50 100 150 200 [имидадол], мМ

Рис. 7 - Влияние имидазола на связывание олиго(с1А7сЮ5сЮ4с1Тз) с наночастицами феррита кобальта (рН 5,0)

Результаты сравнения связывания 18ти и 80ти мерных одноцепочечных ДНК показали, что длина молекулы не влияет на эффективность связывания ДНК с наночастицами (рис. 8).

При исследовании связывания ДНК-дуплексов, полученных в результат гибридизации гомоолигонуклеотидов, установлено, что в расчете на молекулу дл олиго(ёС)18 и олиго(<Ю)18 объединение в пару привело к снижению количеств; связываемых молекул, тогда как при формировании дуплекса олиго(с!А11Т)1. количество связываемых молекул олиго(с!А)|8 возросло, в то время как олиго^Т)^ снизилось (рис. 9). Наблюдаемый эффект свидетельствует о значительной ролг структуры молекулы ДНК при взаимодействии с наночастицами.

Рис. 8 - Связывание наночастиц феррита кобальта с молекулами 18-и 80-мерных одноцепочечных ДНК, трис-буфер (рН 5,0); @ статистическая значимость отличия от связывания поли(ёА80), $ -поли(с1С8о), # - поли(сГГ80)

Рис. 9 - Связывание наночастиц феррита кобальта с молекулами одно-и двухцепоченых ДНК (8 мМ трис, 30 1 шМ ЫаС1, 1шМ На2НР04); \*-статистическая значимость отличия от связывания одноцепочечных

олигонуклеотидов, входящих в дуплекс

Отметим, что вС-содержащая ДНК значительно эффективнее связывалась с наночастицами, чем АТ-содержащая.

Анализ изменения ИК-спектров олигонуклеотидов при связывании с наночастицами подтверждает участие атомов оснований во взаимодействии с поверхностью наряду с атомами фосфатных групп (рис. 10). При взаимодействии олиго(ёА)18 в связывании участвует N7 атом (непрямое) и ЫН2 группа основания, олиго((1С)18 - 02 атом и 1ЧН2 группа, олиго(с1Т)18 - карбоксильные кислороды гетероцикла. При образовании комплекса наночастиц с олиго(£Ю),8 во взаимодействие вовлекается Об и N7 атомы (непрямое), при этом одновременное участие фосфатных групп и гетероциклического кольца нуклеотида в связывании приводит к изменению конформации дезоксирибозы с анти- на син (рис. 10).

он г Л, НО

п

ь Д? V 1!

I, 1 ^ ./1 11 •1 1 "мГ

0Л1ГГ0(<1А)18

|11>

к ?

-1« ,./? к и 1! I! щу

11 Я , К

1)0 ; I ^ ^ „т 1Г« 1.-.\* 1.40 - - Т'л I 1 И'М ■ | <■■'<

олнго(с1С)|а

во к 1\ ■ИЧ ( \ ИЛ 1 £ л 1 4 - и •

олиго(сЮ)1з

0ЛИГ0(с1Т)!5

Рис. 10 - Фрагменты ИК-спектров олигонуклеотидов (а, с) и их комплексов с наночастицами феррита кобальта (Ь, (1) в бидистиллированной (Н20) и дейтерированной (020) воде

Наблюдаемая специфика взаимодействия олигонуклеотидов различного состава позволяет предположить, что присутствие С=0 и NH2 групп в гетероциклическом кольце цитозина и гуанина способствует формированию более выгодных связей с наночастицами. Однако анализ закономерностей взаимодействия гетероолигонуклеотида с наночастицами, как модели, например, олиго^А)^ последовательности с внесенными основаниями гуанина и цитозина, позволяв-предполагать, что важную роль при взаимодействии играет вторичная структур! молекулы и в формирование координационной сферы металла могут вовлекаться атомы соседних оснований олигонуклеотида. Так, расчет площади посадочной площадки ДНК-молекул показал, что площадь, занимаемая молекулами олиго(сЮ)]8 и олиго(с1С)18 на поверхности наночастицы на 22-28 %, а для nonn(dC)80 на 37°/ меньше площади линейной молекулы. Это можно рассматривать как свидетельство определенной «упаковки» молекулы на поверхности.

3. Исследование сорбционных свойств поверхности частиц нанопрошка феррита кобальта с использованием модельных молекул

Природа активных центров, присутствующих на поверхности наночастиц, будет определять группы молекулы ДНК, преимущественно вовлекаемые вс взаимодействие. На рис. 11 представлены результаты сорбционных измерений н< границе раздела газ - твердое тело методом термопрограммируемой хемосорбции. Наблюдаемая десорбция в области температур до 150 °С может быть отнесена к

физически адсорбированным формам молекул NH3 и С02, в то время как более высокие температуры десорбции наблюдаемые для молекул СО и С02 свидетельствуют о хемосорбированном состоянии. Можно заключить, что молекулы аммиака слабо взаимодействуют с поверхностью ферритг кобальта, в то время как оксиды углерода СО и С02 связываются более прочно.

Рис. 11- Десорбция с поверхности нанопорошка феррита кобальта молекул газов - ЫН3 (а), СО (Ь) и С02 (с)

При исследовании методом ИК-спектрометрии сорбции на нанОчастицах феррита кобальта молекул ДЭФ, наблюдали уменьшение разности между частотами валентных асимметричных и симметричных колебаний фосфатной группы ДЭФ, что юзволяет сделать вывод о ее бидентантной координации на поверхности. Аналогичный сдвиг полос поглощения Р02 группы проявляется в спектре ДНК, при :вязывании с наночастицами феррита кобальта (табл. 1).

Образец vasP02, см"1 vsP02, см"1

ДЭФ (вода) 1198 1077

1ЭФ+СоРег04 1155 1089

ДНК (вода) 1224 1084

3HK+CoFe204 1218 1086

Табл. 1 - Смещение положения п.п. фосфатной группы молекул при взаимодействии с наночастицами феррита кобальта

4. Исследование доступности молекул ДНК, связанных с наночастицами, (ля ферментов (нуклеаз)

Способность нуклеаз гидролизовать связи в молекуле ДНК определяется деступностью определенных групп атомов нуклеиновой кислоты для 1заимодействия с молекулой белка. Связывание ДНК с наночастицами может фепятствовать ферментативному расщеплению молекулы.

При электрофоретическом анализе продуктов ферментативной деградации тблюдали неполный гидролиз ДНК плазмиды pBLSK, связанной с наночастицами феррита кобальта, эндонуклеазой DNase I (рис. 12, дор. 2).

Сравнение эффективности гидролиза нуклеазами (DNase 1 и экзонуклеазой III) VT- и GC-содеражащих дуплексов, связанных с наночастицами, показало, что )лиго(с1Ас1Т)80 молекулы подвергались полному гидролизу (рис. 12, дор. 7, 8), тогда сак олиго(сЮс1С)18 практически не повергались ферментативной деградации при тех ке условиях (рис. 12, дор. 12, 13). В резуш.тате гидролиза плазмиды pBLSK эесгриктазами: Msp 1, Vsp 1, Fau I установлено, что доступность GC- и ДТ-сайтов лолекулы ДНК, связанной с наночастицами, различалась. При ферментативном •идролнзе плазмиды, связанной с наночастицами, ферментом Vsp I, имеющим сайт ,'знавания 5'-АТАТААТ-3\ на электрофореграмме выявляли фрагменты. :оответствующие нативной и рестриктированиой плазмидиой ДНК (рис. 13, дор. 3).

1000

3000

500

100

М 3 4 5 б 7 8

9 Ю II Г2 13

1,5% агарозный гель

1,5% агарозный гель

20% ПААГ

Рис. 12 - Электрофореграммы продуктов гидролиза свободных и связанных с наночастицами феррита кобальта молекул ДНК нуклеазами; М - маркер молекулярного веса, К - pBLSK; 1 - pBLSK + DNase I; 2 - pBLSK-CoFe204 + DNase I (элюция 50 мМ ЭДТА); 3 - олиго(с!Ас1Т)80; 4 - nojiH(dAdT)80) гидролизованная DNase I; 5 - поли(с1Ас1Т)8о, гидролизованная экзонуклеазой III; 6 -поли(ёАёТ)80, отделенная от частиц (50 мМ ЭДТА); 7 - no;iH(dAdT)80-CoFe2O4 + DNase I (элюция 50 мМ ЭДТА); 8 - nonH(dAdT)8o-CoFe204 + экзонуклеаза III (элюция 50 мМ ЭДТА); 9 - олиго(сЮс1С)18 + DNase I; 10 - onHro(dGdC)18 + экзонуклеаза III; 11 - ojuiro(dGdC)ls, отделенная от частиц (50 мМ ЭДТА); 12 - I oлигo(dGdC)]8-CoFe204 + DNase I (элюция 50 мМ ЭДТА); 13 - oлигo(dGdC),8-CoFe204 + экзонуклеаза III (элюция 50 мМ ЭДТА).

Тогда как рестриктазы, имеющие GC-сайт узнавания: Msp I (5'-CACGG-3') i Fau I (5'-CCCGC(N)4A-37-3'-GGGCG(N6)A-5') - ДНК, в комплексе с наночастицами не гидролизовали (рис. 13 дор. 6 и 8). Для проверки возможного ингибирования 1 наночастицами феррита кобальта ферментативной активности Msp I и Fau I, | рестрикцию соответствующими ферментами проводили в реакционной смеси содержащей избыток плазмидной ДНК (200 нг) и наночастицы феррита кобальте (240 нг) или комплекс плазмида-наночастицы. Во всех экспериментах плазмидная ДНК успешно гидролизовалась в данных условиях.

Важно отметить, что в результате обработки плазмиды, высвобожденной иг комплекса с наночастицами PBS-буфером, ферментом Msp 1 наблюдали исчерпывающий гидролиз молекулы ДНК с образованием набора фрагменте! ожидаемой длины (рис. 13 дор. 7). Следовательно, связывание с наночастицами не I приводит к необратимым изменениям субстратных, в первую очередь структурных, свойств молекулы плазмиды и не вызывает деградации молекулы ДНК.

Рис. 13 - Электрофореграммы свободной и связанной с наночастицами ДНК плазмиды pBLSK и продуктов ее гидролиза (1,5 % агарозный гель); M - маркер молекулярного веса, К - pBLSK; 3 - pBLSK-CoFe204 H- Vsp I (элюция 50 мМ ЭДТА); 4 - pBLSK + Vsp l; 5 - pBLSK + Msp 1; 6- pBLSK-CoFe204+ Msp I (элюция 50 мМ ЭДТА); 7 - pBLSK, отделенная от частиц PBS-буфером + Msp I; 8 - pBLSK-CoFe204 + Fau [ (элюция 50 мМ ЭДТА); 9 - pBLSK + Fau I

Наблюдаемое различие в эффективности гидролиза по AT- и GC-сайтам указывает на преимущественное связывание наночастиц с GC-парами молекулы ДНК, что приводит к стерическим затруднениям для работы фермента, тогда как АТ-пары ДНК практически не вовлекаются во взаимодействие с наночастицами. Это хорошо согласуется с данными ИК-спектрометрических исследований комплекса молекул ДНК и наночастиц. Наблюдаемое замедление гидролиза плазмиды, входящей в комплекс с наночастицами, ферментом Vsp 1 по АТ-содержащим сайтам обусловлено, вероятно, зависимостью скорости работы фермента от правильности структуры нуклеотидных пар прилегающих к сайту узнавания.

5. Влияние взаимодействия с наночастицами на целостность и функциональные свойства ДНК

Интегральной характеристикой позволяющей оценить эффекты, оказываемые

I

наночастицами на молекулу ДНК в результате их взаимодействия, может служить проверка функциональных свойств ДНК.

При исследовании способности онДНК, закрепленных на поверхности наночастиц к гибридизации с комплементарной ДНК в растворе установлено, что только комплексы содержащие поли(сГГ)80, эффективно связывали и удерживали

иоли(с1Л)8о, в то время как поли((1С)8о и олиго(сЮ)18, закрепленные на наночастица? не удерживали данные молекулы (рис. 14). Отметим, что полученное соотношени поли(0Т)8о - CoFe204 : поли(ёА)80 в пересчете на молекулу полинуклеотида равно 1:4 указывает, что более 75 % оснований «недоступно». Это может быт обусловлено либо их вовлечением во взаимодействие с поверхностью и/ил стерическими ограничениями.

Рис. 14 - Эффективность связывания поли(0А)80 из раствора с поли(ёТ)80, закрепленном на наночастице феррита кобальта

0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 [поли((1А8о)], мкмоль / л

В следующей серии экспериментов влияние связывания с наночастицами н функцию ДНК оценивали по способности плазмиды pBLSK трансформироват прокариотические клетки. Установлено, что ДНК в комплексе с наночастицами н трансформировала клетки Е. coli. Для исключения возможности повреждающи: эффектов на молекулу ДНК, таких как разрывы и деградация, в результат взаимодействия с наночастицами, были проведены эксперименты, в которых качестве вектора трансформации использовали плазмиду, отделенную о наночастиц PBS-буфером после связывания. Отделенная от наночастиц плазмид успешно трансформировала клетки Е. coli. Более того, такой же уровен трансформации достигался при использовании в качестве вектора плазмиды высвобожденной после обработки комплекса рестриктазой Msp I (табл. 2).

Табл. 2 - Эффективность трансформации клеток Е. coli XL 1-blue свободной i

ДНК-вектор Количество колоний

рВЬБК (контроль) 10

рВЬЭК, связанная с наночастицами 0

рВЬ8К, отделенная от наначастиц РВ8-буфером 10 2

рВЬБК, отделенная от наначастиц РВБ-буфером, после инкубации с МБр! 102

18

Снижение количества трансформантов, по сравнению с контролем, связано с тем, что при выдерживании в элюирующем буфере десорбируется не вся ДНК от наночастиц (по данным спектрофотометрических исследований - 58 %).

Неспособность плазмиды связанной с наночастицами трансформировать клетки Е. coli может быть обусловлена следующими альтернативными причинами: либо комплекс не проникал в клетки, либо генетическая информация (устойчивость к антибиотику) не реализовывалась, вследствие недоступности молекулы ДНК для ферментов репликации и транскрипции. Второе предположение хорошо согласуется с данными о значительном снижении доступности ДНК, связанной с наночастицами, для эндонуклеаз. Таким образом, при отделении молекулы ДНК от наночастиц ее функция может быть восстановлена, связывание с наночастицами обратимо и не вызывает деградации молекулы.

6. Модель комплексов ДНК-СоРе204 и схема диагностической конструкции

На основании совокупности полученных данных нами предложена модель комплекса, формирующегося в результате взаимодействия наночастиц феррита кобальта, полученных методом механохимического синтеза, и молекул синтетических и природных ДНК. При взаимодействии атомы переходных металлов, присутствующие на поверхности наночастиц, координируют атомы фосфатных групп и карбонильные кислороды гетероциклических оснований молекулы ДНК с образованием внутрисферных комплексов. Связывание стабилизируется взаимодействиями N-H (МН2) и Р-ОН групп с поверхностью наночастицы. При взаимодействии с одноцепочечными молекулами ДНК в связывание могут вовлекаться так же атомы азота пуринового кольца. Эффективное связывание с поверхностью наночастицы реализуется в области GC-трактов двухцепочечных молекул при одновременном участии атомов оснований и фосфатных групп ДНК во взаимодействии; при связывании с одноцепочечными молекулами в формирование координационной сферы вовлекаются атомы соседних оснований, что обуславливает значительную роль вторичной структуры молекулы.

Результаты проведенных исследований позволили предложить метод создани и принципиальную схему оригинальной магниточувствительной диагностической конструкции (рис. 15), которая может быть использована в система высокоэффективного обнаружения специфических молекул нуклеиновых кислот.

Рис. 15 - Схема метода получения диагностической конструкции на основе наночастиц феррита кобальта;

а- аденин, g - гуанин, с -цитозин, I - тимин, п -любой

дезоксирибонуклеотид

1. Наночастицы феррита кобальта связывают молекулы природных г: синтетических двухцепочечных и одноцепочечных ДНК и формирую магниточувствительные бионанокомпозитные комплексы. Связывание молеку ДНК и наночастиц феррита кобальта реализуется в широком интервале рН (от 5,0 д 9,0) и ионной силы (от 10 мМ до 1 М). Взаимодействие молекулы ДНК с наночастицей и влияние параметров среды на связывание зависит от нуклеотидног состава молекулы; количество связывающихся с наночастицей молеку. уменьшается в ряду олиго(сЮ) > олиго(с!С) > олиго(Т) > олиго(<1А6с1С4сЮбТ2) > олиго((±А).

2. Связывание ДНК и наночастиц феррита кобальта реализуется за сче координации атомами переходных металлов железа и кобальта, присутствующим; на поверхности наночастиц, карбонильных кислородов гетероциклически: оснований и фосфатных групп молекулы ДНК, и стабилизируется водородным)

связями между М-Н (N112) и Р-ОН группами ДНК и поверхностью наночастицы. 1

20

ВЫВОДЫ

двухцепочечных природных молекулах ДНК наночастицы взаимодействуют преимущественно с основаниями GC-nap.

3. На поверхности наночастиц феррита кобальта присутствуют хемосорбционные центры, характеризующиеся температурами десорбции выше 150 °С, для молекул кислотной природы и только физадсорбционные центры, характеризующиеся температурами десорбции ниже 150 °С, для молекул основной природы.

4. Связывание с наночастицами феррита кобальта препятствует взаимодействию рестриктаз с GC-сайтами ДНК, тогда как АТ-сайты могут быть гидролизованы.

5. Молекула ДНК при взаимодействии с наночастицами феррита кобальта сохраняет свою целостность. ДНК плазмиды в комплексе с наночастицами не способна трансформировать клетки прокариот, однако высвобождение из комплекса приводит к восстановлению данной функции.

6. Согласно предложенной модели нанобиокомпозитного комплекса прочное связывание с наночастицей феррита кобальта реализуется в результате одновременного формирования связей типа: Х=0"Ме и Y-H--0-Me (где X = С, Р; Y = О, N; Me = Со, Fe) и достигается в области GC-трактов двухцепочечных молекул при одновременном участии атомов оснований и фосфатных групп ДНК во взаимодействии.

Автор выражает искреннюю благодарность д.м.н., зам.зав. ЦНИЛ СибГМУ Сазонову А.Э., сотрудникам ОСМ ТНЦ СО РАН: к.ф.-м.н., в.н.с. Итину В.И., к.т.н., ученому секретарю Тереховой О.Г., к.х.н., с.н.с. Магаевой A.A., сотрудникам ХФ ТГУ: к.х.н., доценту Изаак Т.Н., к.х.н., зав. лаб. каталитических исследований Князеву A.C., м.н.с. Зарубиной О.Н., студенту Новикову Д.В., а так же м.н.с. ИТ НОЦ ТГУ Полюшко В.А., м.н.с. ТМЦ КП ТГУ Новикову В.А., к.х.н., сотруднику НАД ТПУ Федотовой М.П., к.ф.-м.н., сотруднику НПО «Вирион» Миллеру A.A.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Першина А. Г.. Сазонов А. Э., Мильто И. В. Использование магнитны наночастиц в биомедицине // Бюлл. сиб. мед. -2008. —№ 2. -С. 70-78.

2. Першина А. Г.. Сазонов А. Э., Огородова Л. М. Исследование механизме взаимодействия ДНК и наночастиц феррита кобальта методом ИК-Фурьс спектрометрии // Биоорган, хим. —2009. -Т. 35. -С. 674-680.

3. Магаева А. А., Терехова О. Г., Итин В. И., Радишевская Н. И., Найден Е. П. Егорова Л. А. , Иванчук И. И., Першина А. Г. Механохимический синте наноразмерных порошков на основе диоксида олова // Ж. приклад, хим. —2009. —'Т 82. -С. 220-223.

4. Першина А. Г.. Сазонов А. Э., Огородова Л. М. Исследование устойчивост: ДНК, связанной с ферримагнитными частицами нанопорошка феррита кобальта, нуклеазному расщеплению // Бюлл. эксп. биол. мед. -2010. -Т. 148. -С. 74-77.

5. Першина А. Г.. Ефимова Л. В., Итин В. И., Терехова О. Г., Магаева А. А Серебров В. Ю., Сазонов А. Э. Наноразмерный стабилизатор ферментов на основ частиц феррита кобальта // Нанотехника. -2010. -Т. 2. -С. 81-87.

6. Pershina A. G.. Serebrov V. Yu., Sazonov А. Е. Investigation of Interaction betwee Oligonucleotides and Cobalt Ferrite Nanoparticles // eCells & Materials. -2010. -V. 20. P. 201.

7. Pershina A. G.. Sazonov A. E., Novikov D. V., Knyazev A. S., Izaak T. I., Itin V. I Naiden E. P., Magaeva A. A., Terechova O. G. Study of DNA Interaction with Cobal Ferrite Nanoparticles // J. Nanosci. Nanotech. -2011. -V. 11. -P. 2673-2677.

8. Патент РФ № 2319153 Композиционный наноразмерный материал дл адсорбции и десорбции ДНК/РНК / Итин В. И., Иванчук И. И., Терехова О. Г Магаева А. А., Першина А. Г.. Найден Е. П., Максимов Ю. М. Опубл. 10.03.2008 г.

Подписано в печать 14 сентября 2011 г. Усл. печ. листов 0,75. Печать на ризографе. Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08 Заказ №282 Тираж 150 экземпляров

22

## Содержаниедиссертации, кандидата биологических наук, Першина, Александра Геннадьевна

Оглавление

Список используемых сокращений

Введение

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Бионанотехнология

1.1.1 Бионаноконструирование

1.1.2 ДНК как основа наноструктур

1.2 Ключевые особенности молекулы ДНК, определяющие 18 ее взаимодействие с наночастицами в водной среде

1.2.1 Структурно-конформационные особенности ДНК

1.2.2 Гидратация ДНК

1.2.3 Протонирование ДНК

1.3 Магнитные наночастицы 24 1.3.1 Размерно-зависимые эффекты магнитных наночастиц 25 1.3.2' Влияние структуры и состава наночастиц на магнитные свойства

1.3.3 Особенности поверхностных свойств наночастиц

1.3.4 Модификация поверхности наночастиц

1.3.5 Функции покрытия'наночастиц 30( 1.3.6- Особенности наночастиц ферритов, полученных методом механохимического синтеза

1.4 Механизмы взаимодействие ДНК с магнитными 33 наночастицами

1.4.1 Закономерности участия отдельных атомов ДНК при ее взаимодействии с другими объектами

1.4.2" Взаимодействие ДНК с ионами металлов

1.4.3 Закономерности адсорбции анионов на\* ферросодержащих поверхностях

1.4.4. Взаимодействие ДНК с наночастицами ферритов

1.5 Формирование бионаноструктур ДНК-наночастицы

1.5.1 Стратегии получения бионаноструктур ДНК- 41 наночастицы

1.5.2 Получение гибридных бионаноструктур ДНК- 44 магнитные наночастицы

1.6 Использование магнитных наночастиц и конструкции на 45 их основе

1.6.1 Использование магнитных^ наночастиц для 46 биомедицинских исследований

1.6.2 Целевая доставка нуклеиновых кислот (генотерапия) с 49 использованием магнитных наночастиц

1.6.3 Наночастицы как регуляторы функциональной 51 активности ДНК

1.7 Потенциальные риски от использования наноматериалов

1.7.1 Воздействие наночастиц на биосистемы

1.7.2" Биологические эффекты взаимодействия ДНК и 56 наночастиц in vivo

## ВведениеДиссертация по биологии, на тему "Взаимодействие наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК in vitro"

Актуальность работы

В настоящее время интерес к созданию нанобиогибридных конструкций, содержащих магнитные наночастицы и молекулы нуклеиновых кислот крайне велик. Можно выделить два генеральных направления бионаноконструирования: наноэлектроника (нуклеиновая кислота используется в качестве матрицы для размещения наночастиц) и биоинженерия (создание инструментов медико-биологического назначения).

Существует две основные стратегии наноконструирования' - «снизу вверх» (bottom-up nanofabrication) и «сверху вниз» (top-down nanofabrication) [1]. Ввиду того, что создание наноразмерных систем- путем «top-down», например фотолитография, является высоко затратным, более того миниатюризация имеет естественный барьер, реализация стратегии «bottom -up» в настоящее время высоко востребована. Она базируется\* на использовании малых молекулярных строительных блоков для создания^ надмолекулярных комплексов методом самосборки [2].

Использование молекул нуклеиновых кислот для конструирования? наноразмерных устройств крайне привлекательно. Такие молекулы, помимо того, что являются носителями информации и обладают механизмом специфичного молекулярного узнавания, проявляют высокую физико-химическую стабильность и механическую прочность [3]. Перспективность использования нуклеиновых кислот обусловлена возможностью манипулировать «блоками», созданными на их основе, с высокой точностью. Возможность манипуляции обеспечена способностью нуклеиновых кислот к гибридизации и наличием ферментов, позволяющих разрезать (рестриктазы), сшивать (лигазы) и достраивать (полимеразы) конструкции на основе нуклеиновых кислот [4].

Наибольшую актуальность конструкции, содержащие магнитные наночастицы и специфические фрагменты нуклеиновых кислот, получили в области создания высокочувствительных систем количественного детектирования и идентификации фрагментов ДНК, РНК-молекул , для повышения эффективности биомедицинской диагностики in vitro [5]. Появление у наночастиц уникальных магнитных свойств обеспечивает не только легкость управления, но и эффективность детектирования конструкций на их основе, сочетающего помехоустойчивость с возможностью выявления диагностически-значимых молекул в режиме реального времени [5-7]. Нанометровые размеры конструкций позволяют выявлять единичные молекулы, что значительно увеличивает чувствительность анализа [8]. Конструкции типа «нуклеиновая кислота — магнитная наночастица» разрабатывают для проведения высокоэффективного обнаружения патогенов, создания экспресс-систем генотипирования и секвенирования, выявления мРНК [9].

Молекула ДНК может непосредственно связываться с наночастицей либо для формирования связи используют связующие субстанции, что требует проведения предварительной модификации поверхности наночастицы и/или молекулы нуклеиновой кислоты [10]. Модификация поверхности усложняет и удорожает технологию производства бионаноконструкции, несмотря на то, что далеко не всегда позволяет полностью исключить неспецифические взаимодействия конъюгируемой нуклеиновой кислоты с наночастицей [10, 11]. Не смотря на разнообразие существующих подходов к связыванию нуклеиновых кислот и наночастиц [12], механизмы их взаимодействия остаются малоизученными.

Перспективность использования наночастиц на основе ферритов для создания биомедицинских конструкций обусловлена сочетанием высоких магнитных свойств [13] с большей устойчивостью к окислению и биоинертностью по сравнению с наночастицами металлов [14-16]. В литературе приводятся данные о высокой адсорбционной активности наночастиц оксидных ферримагнетиков относительно молекул ДНК [17]. Однако исследования механизмов взаимодействия наночастиц ферритов с молекулами ДНК представлены весьма скудно. Заключения о природе формирующихся связей носят противоречивый характер [18-22]. Очевидно, что взаимодействие нуклеиновых кислот и магнитных наночастиц может реализовываться за счет нескольких механизмов с участием различных групп биомолекулы [23-26].

Раскрытие закономерностей взаимодействия нуклеиновых кислот и наночастиц является первоочередной задачей для развития теоретических и г методических подходов к созданию бионанокомпозитных конструкций, определяет область и границы биомедицинского использования разрабатываемых нанорзмерных устройств. Новые данные о фундаментальных механизмах взаимодействия откроют перспективу дизайна поверхности наноматериала с целью реализации высокоспецифичного связывания, либо предотвращения его, а так же управления связями компонентов конструкции типа «нуклеиновая кислота - магнитная? наночастица».

Актуальность исследования взаимодействия ферримагнитных' наночастиц и молекул ДНК продиктована\* и тем, что лежит в основе воздействий наноматериалов на биосистемы, что1 напрямую связано с1 обеспечением безопасности и качества жизни человечества в целом.

Цель работы

Изучить взаимодействие суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта, полученных методом механохимического синтеза, и.нуклеиновых кислот, на модели природных и синтетических одноцепочечных и двухцепочечных молекул ДНК, in vitro.

В соответствии с поставленной целью были формулированы следующие задачи:

1. Исследовать закономерности связывания природных и синтетических одноцепочечных и двухцепочечных молекул ДНК и наночастиц феррита кобальта при варьировании рН, ионной силы, и химического состава среды;

2. Выявить группы молекул ДНК, участвующие во взаимодействии с наночастицами феррита кобальта;

3. Изучить сорбционные свойства и природу активных центров на поверхности частиц нанопорошка феррита кобальта с использованием модельных молекул;

4. Определить доступность молекулы ДНК,, связанной- с наночастицами феррита кобальта; для нуклеазного расщепления;

5. Оценить влияние связывания наночастиц феррита кобальта с молекулами ДНК на структуру и функцию биомолекулы;

6. Построить модель.взаимодействия;компонентов комплекса:«ДНК - ферримагнитная наночастица». ' . '

Научная новизна работы I

Впервые показана, способность наночастиц феррита кобальта, синтезированных методом механохимии, связываться с фрагментами природных и синтетических двухцепочечных и одноцепочечных ДНК с образованием стабильных комплексов;. ; •

Определено,, что; эффективность связывания? и стабильность комплексов при: изменении параметров среды (рН, ионной силы;: химического состава); зависти от нуклеотидного состава биомолекулы. Установлено; что связывание молекул ДНК и наночастиц реализуется за счет координации фосфатных групп сахарофосфатного остова; и карбонильных групп оснований ДНК атомами переходных металлов на поверхности, и стабилизируется водородными связями; При взаимодействии с одноцепочечными молекулами ДНК в связывание с поверхностью наночастицы могут вовлекаться^атомы азота гетероциклического^кольца. При взаимодействии с природными^ молекулами двухцепочечных ДНК наночастицы связываются преимущественно с ОС-парами, защищая их от действия рестриктаз.

Впервые показано^ что в составе комплексов с наночастицами феррита кобальта молекулы ДНК не деградированы и могут частично сохранять способность к. гибридизации с комплементарными молекулами ДНК. Показана возможность высвобождения молекулы ДНК из комплекса с наночастицами, при этом функция биомолекулы восстанавливается.

На основе полученных данных о взаимодействии наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК. предложен: новый метод создания- и принципиальная схема оригинальной . конструкции для выявления диагностически-значимых фрагментов: нуклеиновых кислот in vitro, при наложении внешнего магнитного поля.

Теоретическое и практическое значение работы В работе продемонстрирована: принципиальная возможность и перспективность использования суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта, синтезированных " методом механохимии, для формирования магниточувствительных бионанокомпозитных структур;

Полученные / новые - данные о закономерностях взаимодействия-наночастиц: феррита' кобальта и молекул одноцепочечных и двухцепочечиых дезоксирибонуклеиновых кислот будут положены в основу реализации? подходов\* к. бионаноконструированию при создании; новых бионаноконструкциш. . Подобные конструкции,- созданные на основе, суперпарамагнитных наночастиц феррита кобальта и молекул ДНК, являются перспективными структурами для\* разработки исследовательских и диагностических инструментов в области молекулярной биологии, медицины и наноэлектроники:

Данные, представленные в работе, вносят существенный вклад в понимание: механизмов взаимодействия неорганических наночастиц и молекул нуклеиновых кислот, что имеет большое значение для' развития представлений? о воздействии новых наноразмерных материалов: на биологические системы.

Апробация результатов исследования и публикации f

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 5 статей в изданиях,: рекомендованных Высшей аттестационной комиссией

13 ;

Министерства образования и науки Российской Федерации, 2 статьи в зарубежных журналах и 1 патент РФ.

Материалы, включенные . в диссертацию^ докладывались ; на всероссийских и международных конференциях, в том числе; на Международной конференции по физической мезомеханике, компьютерному конструированию и разработке новых материалов (Томск, 2006 г.), на 2ой международной конференция «Наноразмерные системы:. строение свойства, технологии» НАНСИС-2007 (Киев, 2007 г.), на 2ой Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы, биотехнологии» (Казань, 2008 г.), на Интернациональной» конференции материалов и передовых технологий ICMAT 2009 (International Conférence on Materials for Advanced Technologies ICMAT 2009)- (Сингапур, 2009 г.), на Втором Международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий в рамках 2го международного форума по нанотехнологиям Руснанотех-2009 (Москва, Россия, 2009 г.), на Зей международной НаноБио конференции (Third International- NanoBio Conférence 2010,, Zurich) ' (Цюрих, Швейцария, 2010 г.). ■

Структура работы;

Диссертация состоит из введенияобзора: литературы,, описания материалов и- методов исследования, изложения результатов и! их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 166 страницах, содержит 40 рисунков и 6 таблиц. Библиография; включает 271 литературный источник.

## ЗаключениеДиссертация по теме "Биохимия", Першина, Александра Геннадьевна

ВЫВОДЫ

1. Наночастицы феррита кобальта связывают молекулы природных и синтетических двухцепочечных и одноцепочечных ДНК и формируют магниточувствительные бионанокомпозитные комплексы. Связывание молекул ДНК и наночастиц феррита кобальта реализуется в широком интервале рН (от 5,0 до 9,0) и ионной силы (от 10 мМ до 1 М). Взаимодействие молекулы ДНК с наночастицей и влияние параметров среды на связывание зависит от нуклеотидного состава молекулы; количество связывающихся с наночастицей молекул уменьшается в ряду олиго(сЮ) > олиго(ёС) > олиго(Т) > олиго^АбсК^сЮбТз) > олиго(с!А).

2. Связывание ДНК и наночастиц феррита кобальта реализуется за счет координации атомами переходных металлов железа и кобальта, присутствующими на поверхности наночастиц, карбонильных кислородов гетероциклических оснований и фосфатных групп молекулы ДНК, и стабилизируется водородными связями между N-H (NH2) и Р-ОН группами, ДНК и поверхностью наночастицы. В двухцепочечных природных молекулах ДНК наночастицы взаимодействуют преимущественно с основаниями GG-пар.

3. На поверхности наночастиц феррита кобальта присутствуют хемосорбционные центры, характеризующиеся температурами десорбции выше 150 °С, для молекул кислотной природы и только физадсорбционные центры, характеризующиеся температурами десорбции ниже 150' °С, для молекул основной природы.

4. Связывание с наночастицами феррита кобальта препятствует взаимодействию рестриктаз с GC-сайтами ДНК, тогда как АТ-сайты могут быть гидролизованы.

5. Молекула ДНК при взаимодействии с наночастицами феррита кобальта сохраняет свою целостность. ДНК плазмиды в комплексе с наночастицами не способна трансформировать клетки прокариот, однако высвобождение из комплекса приводит к восстановлению данной функции.

6. Согласно предложенной модели нанобиокомпозитного комплекса прочное связывание с наночастицей феррита кобальта реализуется в результате одновременного формирования связей типа: Х=0\*\*Ме и У-Н - ОМе (где X = С, Р; У = О, >1; Ме = Со, Ре) и достигается в области ОС-трактов двухцепочечных молекул при одновременном участии атомов оснований и фосфатных групп ДНК во взаимодействии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами показано, что суперпарамагнитные наночастицы феррита кобальта, полученные методом механохимического синтеза, способны эффективно связывать молекулы одноцепочечных и двуцепочечных природных и синтетических ДНК, формируя бионанокомпозитный комплекс.

Установленные закономерности связывания наночастиц и молекул ДНК при изменении параметров и химического состава среды, а так же зависимость этого процесса от нуклеотидного состава, вносит значительный вклад в понимание механизмов взаимодействия новых наноразмерных материалов и молекул дезоксирибонуклеиновых кислот, играющих ключевую роль в биосистемах.

Связывание с наночастицами феррита кобальта не приводит к деградации молекулы ДНК.

Показанная, зависимость взаимодействия от состава и структуры биомолекулы, определяющая, в том числе, доступность ДНК, в комплексе с наночастицами, для» эндонуклеаз, в сочетании с частичным сохранением способности связанных олигонуклеотидов к гибридизации с комплементарными' молекулами может служить основой для реализации оригинальных подходов к конструированию магниточувствительных бионаноструктур.

Подобные гибридные конструкции, включающие магнитные наночастицы и специфические фрагменты ДНК, являются крайне перспективными для разработки высокоэффективных инструментов современной молекулярной генодиагностики.

Предложенный подход к наноконструированию может представлять определенный интерес и для развития наноэлектронники. г

## БиблиографияДиссертация по биологии, кандидата биологических наук, Першина, Александра Геннадьевна, Томск

1. Garcia Н. DNA-templated nanomaterials Электронный ресурс., 2007. Режим дотупа: http://contentdm.lib.byu.edu/ETD/image/etdl823.pdf.

2. Lee, Y.S. Self-assembly and nanotechnology: a force balance approach / Y.S. Lee. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2008. - 344 p.

3. Abu-Salah K.M., Ansari A.A., Alrokayan S.A. DNA-based applications in nanobiotechnology Электронный ресурс. // J. Biomed. Biotechnol., 2010. -Article ID 715295. Режим доступа: http://downloads.hindawi.com/journals/jbb/2010/715295.pdf.

4. Primrose, S.B. Principles of Gene Manipulation and Genomics (7th Ed.) /

5. B.Primrose, R.M.Twyman. Hoboken, NJ: Blackwell Publishing, 2006. - 626 p.

6. Haun J.B., Yoon T.J., Lee H., Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. NanobiotechnoL, 2010. V. 2 (3). -P. 291-304.

7. Gossuin Y., Gillis P., Hocq A., Vuong Q. L., Roch A. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. NanobiotechnoL, 2009. V. 1(3). - P. 299-310.

8. Hybrid nanocomposites for nanotechnology: electronic, optical, magnetic and biomedical applications / Ed. by Merhari L. New York: Springer, 2009. - 8471. P

9. Osaka Т., Matsunaga Т., Nakanishi Т., Arakaki A., Niwa D., Iida H. Synthesis of magnetic nanoparticles and their application in bioassays // Anal. Bioanal. Chem., 2006. V. 384. - P. 593-600.

10. Sun C., Lee J.S., Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery // Adv. Drug. Deliv. Rev., 2008. V. 60(11). P. 1252-1265.

11. Schmid G. Nanoparticles: from theory to application (2 Ed.) / G. Schmid. -New York, NY: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. 538 p.

12. Lee J.-H., Huh Y.-M., Jun Y., Seo J'.-w., Jang J.-t., Song H.-T., Kim S.J., Cho E.-J., Yoon H.-G., Suh J.-S., Cheon J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitivemolecular imaging // Nat. Med., 2007. V.13. - P. 95-99.

13. Berry C.C.a.C., Adam S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D: Appl. Phys., 2003. V. 36. - P R198-R206.

14. Samanta В., Yan H., Fischer N.O., Shi J., Jerry D. J., Rotello V. M. Proteinpassivated Fe304 nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy //J.Mater. Chem.,2008. V. 19 (11).-P. 1204-1208.

15. Buzea C., Pacheco I., Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity // Biointerphases, 2007. V. 2 (4); - P. MR17-71.

16. Taylor J.I., Hurst C.D., Davies M.J., Sachsinger N., Bruce I.J. Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA // J. Chromatogr. A, 2000. V. 890 (1). - P. 159-66.

17. Dutta P.M., Manivannan A., Seehra M.S., Shah N., Huffman G.P. Magnetic and structural properties of a DNA-maghemite nanocomposite // J. of Applied Physics, 2006. V. 99 (8). - P. 08H105-08H105-3.

18. Kinsella J.M., Ivanisevic A. Enzymatic clipping of DNA wires coated with magnetic nanoparticles // J. Am. Chem-. Soc., 2005. V. 127 (10). - P. 3276-3277.

19. Kinsella J.M., Ivanisevic A. Fabrication of ordered metallic and magnetic heterostructured DNA-Nanoparticle hybrids // Colloids Surf. В Biointerfaces, 2008.-V. 63(2). P. 296-300.

20. Prodelalova J., Rittich В., Spanova A., Petrova K., Benes M.J. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles // J. Chromatogr. A, 2004. V. 1056 (1-2). - P. 43-48.

21. Byrne S .J., Corr S.A., Gun'ko Y.K., Kelly J.M., Brougham D.F., Ghosh S. Magnetic nanoparticle assemblies on denatured' DNA show unusual magnetic relaxivity and potential applications for MRI // Chem. Commun., 2004. P. 25602561.

22. Kinsella J.M., Shalaev M.Y., Ivanisevic A. Ligation of Nanoparticle Coated DNA Cleaved with Restriction Enzymes // Chem. Mater., 2007. V. 19. - P. 35863588.

23. Wu N., Fu L., Su M., Aslam M., Wong K.C.,.Dravid V.6tP. Interaction of Fatty Acid Monolayers with Cobalt Nanoparticles // Nanoletters, 2004. V. 4 (2). P. 383-386.

24. Li Z., Chen H., Bao H., Gao M. One-Pot Reaction to Synthesize Water-Soluble Magnetite // Nanocrystals. Chem. Mater., 2004. V. 16 (8). - P. 13911393.

25. Culita D.C., Marinescu G., Patron L., Stanica N. Synthesis and Characterization of Cobalt Ferrite Nanoparticles Coated with Dehydrocholate Anions // Revue Roumaine de Chimie, 2006. Y. 51 (6). - P. 503-508.

26. Пул Ч. Нанотехнологии / Ч. Пул, Ф. Оуэне. М.: Техносфера, 2005. -336 с.

27. Muraleedharan H. Nanobiotechnology: Biolnspired Devices and Materials of the future // J. Biosci. Res., 2010. V. 1 (2). P. 108-117.

28. Гусев А.И. Нанокристаллические материалы / А.И. Гусев, А.А. Ремпель. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2001. - 224 с.

29. Суздалев И.П., Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов / И.П. Суздалев. М;: КомКнига, 2006. - 592 с.

30. Roduner Е. Nanoscopic materials: size-dependent phenomena / E. Roduner -Cambridge: RSC Pub., 2006. 299 p.142 ,

31. Niemeyer C.M. Nanoparticles, Proteins and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science // Angew. Ghem. Int. Ed., 2001. V. 40 (22). - P. 4128 -4158.

32. Niemeyer C.M. DNA as a Material for Nanotechnology // Angew. Cheni. Int. Ed. Engl., 1997. V. 36 (6). - P. 585-587.

33. Aldaye F.A;., Palmer A.L., Sleiman HlF. Assembling materials with DNA as the guide // Science, 2008.- V. 321(5897). P. 1795-1799.

34. Herdewijn P. Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology) / P. Herdewijn. New Jersey: Humana Press., 2005. - 456 p.

35. Seeman N.C. DNA in a material world//Nature, 2003. V. 421 (6921). - P. 27-31, ■■

36. Seeman N.C. Nucleic acid junctions and lattices //J. of Theoretical Biology, 1982.-V. 99 (2).-P. 237-247. ^

37. Chen J.H., Seeman N.C. Synthesis\* from» DNA of a molecule with- the connectivity of a cube // Nature, 1991. V. 350 (6319). P. 631-633.

38. Qi J., Li X., Yang X., Seeman N.C. Ligation of-Triangles Built from Bulged 3-Arm DNA Branched Junctions // J. Am. Ghem; Soc., 1996. V. 118 (26). P. . 6121-6130.

39. Winfree E., Liu F., Wenzler L.A., Seeman N.C. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals II Nature, 1998: V. 394 (6693): - P. 539-544.

40. Du S.M., Seeman N.C. The construction: of a trefoil knot from a DNA branched junction motif// Biopolymers, 1994. N. 34(1). -P. 31-37.

41. Biancaniello P.L., Kim A.J., Crocker J.C. Colloidal Interactions and Self-Assembly Using DNA Hybridization // Physical Review Letters, 2005. -V. 94. (5)/ -P. 058302-1-4.

42. Garrett R.H. Biochemistry (4th ed.) / R.H. Garrett, C.M. Grisham. -Australia, United Kingdom: Brooks/Cole; Cengage Learning, 2010. 1059 p.

43. Berg M.A., Coleman R.S., Murphy C.J. Nanoscale structure and dynamics of DNA // Phys. Chem. Chem. Phys., 2008. V. 10 (9). P. 1229-1242.

44. Зенгер, В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот // В: Зенгер. М.: Мир, 1987. - 584 с.

45. Voet D. Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level // D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc., 2008. - 344 P

46. Watson J.D., Crick F.H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid //Nature, 1953. V. 171 (4356). P. 737-738.

47. Yakovchuk P., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M.D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix // Nucleic Acids Res., 2006. V. 34 (2). - P: 564-574.

48. Ornstein R.L., Rein R., Breen D.L., MacElroy R.D. An' optimised potential! function\* for calculation of nucleic acid interaction energies. I. Base stacking. // Biopolymers, 1978. V. 17. P. 2341-2360.

49. Shefter E., Trueblood K.N. The Crystal and Molecular Structure of D(+)-Barium Uridine-5'-Phosphate // Acta Crystallogr., 1965. V. 18. - P. 1067-1077.

50. Shakked Z., Guerstein-guzikevich G., Eisenstein M., Frolow F., Rabinovich D. The conformation of the DNA double helix in the crystal is dependent on its environment // Nature, 1989. V. 342 (6248). - P.456-460.

51. Ghosh A., Bansal M. A glossary of DNA structures from A to Z // Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr., 2003. V. 59 (Pt 4). - P. 620-626.

52. Basham В., Schroth G.P., Ho P.S. An A-DNA triplet code: thermodynamic rules for predicting A- and B-DNA // Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1995. V. 92 (14).-P. 6464-6466.

53. Rich A., Nordheim A., Wang A.H. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA // Annu. Rev. Biochem, 1984. V. 53. - P. 791-846.

54. Tajrmir-Riahi H.A., Neault J.F., Naoui M. Does DNA acidvfixation produce left-handed^ structure? //FEBS Letters, 1995. V. 370. - P. 105-108.

55. Pohl F.M'. Polymorphism of a synthetic DNA in solution // Nature, 1976. -V. 260 (5549). P. 365-366.

56. Erfurth S.C., Kiser E.J., Peticolas W.L. Determination of the backbone structure of nucleic acids and nucleic acid oligomers by laser Raman scattering // Proc. Natl: Acad. Sei. USA; 1972. V. 69 (4). - P: 938-941. '

57. Ramaswamy N., Bansal M., Gupta G., Sasisekharan V. Structure of D-DNA: 8-fold or 7-fold helix? // Embo J., 1983. V. 2 (9). - P. 1557-1560.

58. Wing R., Drew H., Takano Т., Broka C.„Tanaka S., Itakura K., Dickerson R.E. Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA // Nature, 1980. V. 287 (5784), - P. 755-758.

59. Heinemann U., Alings C. Crystallographic study of one turn of G/C-rich Bt

60. DNA. //J.Mol. Biol., 1989. V. 210 (2). P. 369-381.

61. Peticolas W.L., Wang Y., Thomas G.A. Some rules for predicting the base-sequence dependence of DNA conformation // Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1988. -V. 85 (8).-P. 2579-2583.

62. Radhakrishnan I., Patel DJ. DNA triplexes: solution structures, hydration sites, energetics, interactions, and function // Biochemistry, 1994. V. 33 (38). P. 11405-11416.

63. Mitchell P:R:, Sigel H; A proton nuclear-magnetic-resonance study of self-stacking in purine and pyrimidine nucleosides and nucleotides // Eur. J. Biochem., 1978. V. 88(1).- P. 149-154.

64. Hatters D.M., Wilson L., Atcliffe B.W., Mulliern T.D., Guzzo-Pernell N.,. Howlett G.J. Sedimentation analysis of novel DNA structures formed by homo-oligonucleotides // Biophys. J., 2001.- V. 81 (1). P. 371-381.

65. Burge S., Parkinson G.N., Hazel P., Todd A.K., Neidle S. Quadruplex DNA: . sequence, topology and structure // Nucleic Acids Res., 2006. V. 34 (19). - P. 5402-5415. ;

66. Sarma M.H., Gupta G., Sarma R.H. 500-MHz 1PI NMR study of poly(dG).poly(dG) in solution using one-dimensional nuclear Overhauser effect // Biochemistry, 1986. V. 25 (12). - P. 3659-3665.

67. Sukhorukov В .1., Montrel M.M. Infrared and X-ray diffraction < study of the effect of protonation of DNA on its B-to-A transition // Biophys. Chem., 1990; V. 35(1).-P. 47-54.

68. Radhakrishnan Г., Patel D.J. Hydration sites in purine.purine.pyrimidine and. pyrimidine.purine.pyrimidine DNA triplexes in aqueous solution // Structure, 1994.-V. 2 (5).-P. 395-405.

69. Schneider В., Patel K., Berman H:M. Hydration of the phosphate group in double-helical DNA // Biophys. J., 1998. V. 75 (5). - P. 2422-2434.

70. Harmouchi M., Albiser G., Premilat S. Changes of hydration during conformational transitions of DNA // Eur. Biophys. J., 1990. V. 19 (2). - P. 8792.

71. Koseoglu Y., Kavas H. Size and surface effects on magnetic properties of Fe304nanoparticles // J. Nanosci. Nanotechnol., 2008. V. 8 (2). - P. 584-590.

72. Stoner Е.С., Wohlfarth Е.Р. A mechanism of magnetic hysteresis in heterogeneous alloys // Philosophical Transactions of the Royal Society A: Physical, Mathematical and Engineering Sciences, 1948. V. 240. - P. 599-642.

73. Jun Y.W., Seo J.W., Cheon J. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences // Acc. Chem. Res., 2008. V. 41 (2). - P. 179-89.

74. Livingston J.D. A review of coercivity mechanisms // J. of Applied Physics, 1981.-V. 52.-P. 2541-2545.

75. Chen Q., Zhang ZJ. Size-dependent superparamagnetic properties of MgFe204 spinel ferrite nanocrystallite // Appl. Phys. Lett., 1998. V. 73. - P. 31563159.

76. Park J.-I., Kang N.-J., Jun Y., Oh S.J., Ri H.C., Cheon J. Superlattice and magnetism directed by the size and shape of nanocrystals // Chem. Phys. Chem., 2002. V. 3. - P. 543-547.

77. Morales M.P., Veintemillas-Verdaguer S., Montero M.I., Serna С.J. Surface and internal spin canting in y-Fe203 nanoparticles // Chem. Mater., 1999. V. 11.-P. 3058- 3064.

78. Lu A.H., Salabas E.L., Schuth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection; functionalization, and application // Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2007. V. 46 (8). - P. 1222-1244.V. 15.- P. 7111-7115. ; • \

79. Yee C., Kataby GUlmán A., Prozorov T., White H;, King A;, Rafailovich M:,SokolovJ.,GedankenA.Self-AssembledMonolayersofAlkanesulfonicandi-phosphonic Acids on Amorphous Iron;Oxidé Nanoparticles // Langmuir, 1999; V. 15.-P. 711:1-7115. '

80. Sahoo Y., Pizem H., Fried I'., Golodnitsky D:, Bürstei&L.,. Sukenik Ch:, N¿ Márkovichs Gí Alkylí Phosphonate/Phosphate Coating on ■ Magnetite Nanoparticles A Comparison with'Fatty Acids,// Langmuir, 200 L V. 17 (25); ~PI 7907-7911.

81. Pardoe Hi Chua-Anusorn W., Pierre T., Dobson J. Structural .and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol // J. of magnetism and magnetic materials, 2001. V. 225 (1-2).-P. 41-46.

82. Zhang Y., Kohler N.3 Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake // Biomaterials, 2002. V. 23 (7).-P. 1553-1561. ;

83. Molday R.S., MacKenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells // J. Immunol. Methods, 1982.-V. 52 (3). P. 353-367.

84. Kim D.K., Mikhaylova M., Wang F.H., Kehr J., Bjelke В., Zhang Y., TsakalakosT., Muhammed M. Starch-Coated Superparamagnetic Nanoparticles as MR Contrast Agents // Ghem. Mater., 2003. V. 15 (23). P. 4343-4351.

85. LaConte L., Nitin N., Bao G. Magnetic nanoparticle ■ probes // Materials today, 2005. V. 8 (5). - P. 32-38.

86. Portet D., Denizot B.', Rump E., Lejeune J.J., Jallet P: Nonpolymeric Coatings of Iron- Oxide Colloids for Biological Use as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents //J. Colloid. Interface Sci., 2001. V. 238'(1). - P. 37-42.

87. Rotello V.M. Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology / V.M: Rotello. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004. - 306 p.

88. Robinson D.B., Persson H.H.J., Zeng H:, Li G., Pourmand N., Sun S., Wang^

89. S.X. DNA-Functionalized MFe204 (M ) Fe, Go, or Mn) Nanoparticles and Their .i

90. Hybridization to DNA-Functionalized Surfaces // Langmuir, 2005. -V. 21'. P. 3096-3103;

91. Tan W., Wang К., He X., Zhao X.J., Drake Т., Wang L., Bagwe R.P. Bionanotechnology based on silica nanoparticles // Med. Res. Rev., 2004. V. 24 (5).-P. 621-638;

92. Патент US5262176 Synthesis of polysaccharide covered superparamagnetic oxide colloids / Palmacci S., Josephson L. Опубл. 16.11.1993.

93. Nyamjav D. Ivanisevic A. Templates for DNA-templated Fe304 nanoparticles // Biomaterials, 2005. V. 26 (15). - P. 2749-2757.

94. Bruce I.J., Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations // Langmuir, 2005. -21 (15).-P. 7029-7035.

95. Koneracka M.K., Kopcansky P., Antalik M., Timko Ml, Ramchand C.N., Lobo D.; Mehta R.V., Upadhyay R.V. Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles // J. of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. V. 201. - P. 427-430.

96. Mikhaylova M., Kim D.K., Bobrysheva N., Osmolowsky M., Semenov V., Tsakalakos Т., Muhammed M. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification // Langmuir, 2004.- V. 20 (6). P. 2472-2477.

97. Dutta P., Seehra M. S. Effect of DNA Coating on Magnetic Relaxation in Fe203 Nanoparticles // IEEE Trasaction on Magnetics, 2007. V. 43 (6). - P. 24682470.

98. Lang С., Dirk S. Biogenic nanoparticles: production, characterization, and application of bacterial magnetosomes // J. Phys.: Condens. Matter., 2006. -V. 18: P. S2815-S2828.

99. Reimers, G.W. Preparing magneticfluids by a peptizing method // G.W. Reimers, S.E. Khalafalla. Washington, D.C.: U.S. Dept. of the Interior, Bureau of Mines, 1972. - 13 p.

100. Ding J., Miao W.F., McCormick P.G., Street R. Mechanochemical Synthesic of ultrafine Fe powder // Appl. Phys. Lett., 1995. V. 67 (25). - P. 3804-3806.

101. Губин С.П., Кокшаров Ю.Л., Хомутов Г.Б. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // Успехи химии, 2005. Т. 74 (6). - G. 539-574.

102. Hadjiliadis N.E. Metal Complex DNA Interactions / N.E. Hadjiliadis, E.C. Sletten. - Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2009s - 544 p.

103. Deweese J.E., Guengerich F.P., Burgin A.B!, Osheroff N. Metal ion interactions in the DNA cleavage/ligation active site of human topoisomerase II alpha//Biochemistry, 2009. V. 48 (38). P. 8940-8947.

104. Weiner P.K., Langridge R., Blaney J.M., Schaefer R.,. Kollman P.A. Electrostatic potential molecular surfaces // Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1982. —V. 79 (12):-P. 3754-3758.

105. Chiu T.K., Dickerson R.E. 1A Crystal Structures of B-DNA Reveal Sequence-specific Binding and Groove-specific Bending of DNA by Magnesium and Calcium // J. Mol. Biol., 2000. V. 301. - P. 915-945.

106. Ouameur A.A., Arakawa H;, Ahmad R., Naoui M;, Tajmir-Riahi H.A. A Comparative study of Fe(ll) and Fe(III) interactions ; with DNA duplex: major and minor grooves bindings // DNA Cell Biol, 2005. V. 24 (6). - P. 394-401.

107. Henle E.S., Han Z., Tang N., Rai P., Luo Y., Linn S. Sequence-specific DNA cleavage by Fe2+-mediated fenton reactions has possible biological implications II J. Biol. Chem., 1999. V. 274. - P. 962-971.

108. Terrona A. X-Ray Structural Studies of Metal-Nucleoside and Metal-Nucleoside Monophosphate Complexes: New Perspectives .// Comments on Inorganic Chemistry, 1993.-V. 14 (2-3). P. 63-88.

109. Hackl E.V., Blagoi Y.P. Effect of ethanol on structural transitions of DNA and polyphosphates under Ca2+ ions action in mixed solutions // Acta Biochim. Pol., 2000. V. 47 (lj. - P. 103-112.

110. Berman H.M. Hydration of DNA // Current Opinion in Structural Biology, 1991. V. 1. - P. 423-427.

111. Arai Y., Sparks D.L. ATR-FTIR Spectroscopic Investigationon Phosphate Adsorption Mechanisms at the Ferrihydrite-Water Interface // J. of Colloid Interface Sci., 2001. V. 241. - P. 317-326.

112. Roonasi P., Holmgren A. AnATR-FTIR study of carbonate sorption onto magnetite // Surf. Interface Anal., 2010. V. 42 - P. 1118-1121.

113. Persson P:, Nilsson N., Sjoberg S. Structure and Bonding of Orthophosphate Ions at the Iron Oxide-Aqueous Interface // J. of Colloid Interface Sci., 1996. V. 177 (l).-P. 263-275.

114. Kurikka S., Ulman A., Yan X., Yang N-L., Estourns C., White H., Rafailovich M. Sonochemical Synthesis of Functionalized Amorphous Iron Oxide Nanoparticles //Langmuir, 2001. V. 17 (16). - P. 5093-5097.

115. Mirkin C.A.; Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff JJ. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials // Nature, 1996.- V. 382. P. 607-609.

116. Alivisatos A.P., Johnsson K.P., Peng X., Wilson T.E., LowetbCJ., Bruchez Jr M.P., Schultz P.G. Organization,of 'nanocrystal molecules' using DNA // Nature, 1996.-V. 382.-P. 609-611.

117. Seela F., Budow S. pH-dependent assembly of DNA-gold nanoparticles based on the i-motif // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2007. V. 26 (6-7). -P. 755-759.

118. Seela F., Jawalekar AM, Chi L., Zhong D., Fuchs H. Gold DNA-conjugates: ion specific self-assembly of gold nanoparticles via the dG-quartet // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2005. V. 24 (5-7). - P. 843-846/

119. You C.-C., Verma A., Rotello V.M. Engineering the nanoparticle-biomacromolecule interface // Soft Matter., 2006. V. 2. P. 190-204.

120. Патент KR20030011721(A) Metallisation of nucleic acids via metal nanoparticles produced ex-situ / Ford W., Harnack O., Wessels Ju., Yasuda A.; Опубл. 02.11.2003.

121. Torimoto Т., Yamashita М., Kuwabata S., Sakata Т., Mori II., Yoneyama Н. Fabrication of CdS Nanoparticle Chains along DNA Double Strands // J. Phys. Chem. B, 1999. V. 103 (42). - P: 8799-8803.

122. Позмогова Г.Е., Чувилин A.H., Смирнов И.П., Зайцева М.А., Татаринова О.Н., Говорун В.М. Получение и свойства ассоциатов наночастиц никеля с ss-ДНК и белками // Российские нанотехнологии, 2008. Т. 3 (5-6). -С. 148-154. ■■ ■■

123. Cassell A.M., Scrivens W.A., Tour J.M. . Assembly of DNA/Fullerene Hybrid Materials // Angew. Chem; Int: Ed:, 1998. V. 37 (11^. - P: Г528т1531. •

124. Sandhu K.K., Mcintosh C.M:, Simard J.M., Smith S.W., Rotello V.M. Gold nanoparticle-mediated transfection of. mammalian cells // Bioconjug. Chem., 2002. -V. 13(1).-P. 3-6. ;

125. Braun E. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire // Nature, 1998. V. 391. - P. 775-778.

126. Kinsella J.M., Ivanisevic A. Magnetotransport of One-Dimensional Chains of CoFe204 Nanoparticles Ordered along DNA // J. Phys. Chem. C, 2008. -V. 112 (9).-P. 3191-3193.

127. Mornet S., Vekris A., Bonnet J., Duguet E., Grasset F., Choy J.-H., Portier J. DNA-magnetite nanocomposite materials // Materials Letters, 2000. V. 42. - P. 183-188.

128. Патент JP2007269770(A) Functional magnetic super-nanoparticle and use thereof / Sedo M., Taira O., Hatanaka Т., Ichiyanagi Y.; Опубл. 18.10:2007. .

129. Rosensweig R.E. Heating magnetic fluid with' alternating magnetic field // J. Magn. Magn. Mater., 2002. V.252. - P. 370-374.

130. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S:K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // J: Phys. D:.Appl. Phys., 2003; V. 36. -P. R167-R181.

131. Cartmell S.H., Dobson J., Verschueren S., Hughes S., Eh Haj A.J. Mechanical conditioning of bone cells in vitro using magnetic microparticle technology // European-Cells and Materials, 2002. V. 4 (2); - P: 130-131.

132. Fukuda N., Ishii J., Tanaka Т., Fukuda H:, Ohnishi N., Kondo A. Rapid and efficient selection of yeast displaying a target protein using thermo-responsive magnetic nanoparticles // Biotechnol!. Prog., 2008. V. 24 (2). - P. 352-357.

133. Chiang C.L., Sung C.S., Wu T.F., Chen C.Y., Hsu C.Y. Application of superparamagnetic nanoparticles in- purification of plasmid DNA from bacterial cells // J. Chromatogr. В Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., 2005. V. 822 (1-2). -P. 54-60.

134. Sebastianelli A., Sen Т., Bruce I.J. Extraction of DNA from soil using nanoparticles by magnetic bioseparation // Lett. Appl. Microbiol., 2008. V. 46 (4).-P 488-491.

135. Kaittanis C., Naser S.A., Perez J.M. One-step, nanoparticle-mediated bacterial detection with magnetic relaxation // Nano Lett., 2007. V. 7 (2). - P. 380-383.

136. Amagliani G., Omiccioli E., Campo A., Bruce I.J., Brandi G., Magnani M. Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for Listeria monocytogenes direct detection in milk samples // J. Appl. Microbiol., 2006. V. 100 (2).-P. 375-383.

137. Zhao M., Josephson L., Tang Y., Weissleder R. Magnetic sensors for protease assays // Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2003. V. 42 (12). - P. 1375-1378.

138. Perez J.M., Josephson L., O'Loughlin Т., Hogemann D., Weissleder R. Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions // Nat Biotechnol, 2002. V. 20 (8). - P. 816-820.

139. Grimm J., Perez J. M., Josephson L., Weissleder R. Novel nanosensors for rapid analysis of telomerase activity // Cancer Res., 2004. V. 64 (2). - P. 639-643.

140. Josephson L., Perez J.M., Weissleder R. Magnetic Nanosensors for the Detection of Oligonucleotide Sequences // Angewandte Chemie International Edition, 2001. V. 40 (17). - P. 3204-3206.

141. Мэнсфилд П. Быстрая магнитно-резонансная томография- // Успехи физических наук, 2005. Т. 175 (10). - С. 1044-1052.

142. Touchefeu Y., Harrington K.J., Galmiche J.P., Vassaux G. Review article: gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology//Aliment. Pharmacol. Ther., 2010. V. 32 (8). - P. 953-968.

143. Xu L., Frederik P., Pirollo K.F., Tang W.H., Rait A., Xiang L.M., Huang W., Cruz I., Yin Y., Chang E.H. Self-assembly of a virus-mimicking nanostructure system for efficient tumor-targeted gene delivery // Hum. Gene Ther., 2002. V. 13(3).-P. 469-481.

144. Pap T., Gay R.E., Muller-Ladner U., Gay S. Ex vivo gene transfer in the years to come // Arthritis. Res., 2002. V. 4 (1). - P. 10-12.

145. Widder K.J., Senyel A.E., Scarpelli G.D. Magnetic microspheres: a model system of site specific drug delivery in vivo // Proc. Soc. Exp. Biol; Med., 1978. -V. 158(2).-P. 141-146.

146. Mykhaylyk O., Zelphati O., Rosenecker J., Plank G. siRNA delivery by magnetofection // Curr. Opin. Mol. Ther., 2008. V. 10 (5). - P: 493-505.

147. Kneuer C., Sameti M., Haltner E.G., Schiestel T., Schirra H., Schmidt H., Lehr C.M. Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA // Int. J. Pharm., 2000. V. 196 (2). - P. 257-261.

148. Krotz F., de Wit C., Sohn H.Y., Zahler S., Gloe T., Pohl U., Plank C. Magnetofection—a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo // Mol. Ther., 2003; V. 7 (5 Pt 1). - P.700-710.

149. Gersting S.W., Schillinger U., Lausier J., Nicklaus P., Rudolph C., Plank C., Reinhardt D., Rosenecker J. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection // J. Gene Med., 2004. V. 6 (8). - P. 913-922.

150. Schillinger U., Brill T., Rudolph C., Huth S., Gersting S., Krotz F., Hirschberger J., Bergemann C., Plank C. Advances in magnetofectionmagnetically guided nucleic acid delivery // J. Magn. Magn. Mater., 2005. V. 293.-P. 501-508.

151. He X.X., Wang K. , Tan W.5 Liu B., Lin X., He C., Li D., Huang S., Li J. Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage // J. Am. Chem. Soc., 2003. V. 125 (24). - P. 7168-7169.

152. Mykhaylyk O.,' Antequera Y.S., Vlaskou D., Plank C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro // Nat. Protoc., 2007. V. 2 (10). - P. 2391-2411.

153. Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery // Gene Ther., 2006. V. 13 (4). - P. 283-287.

154. You C.-C., Chompoosor A., Rotello V.M: The biomacromolecule-nanoparticle interface // NanoToday, 2007. V. 2 (3). - P. 34-43.

155. Mcintosh C.M., Esposito E.A., Boa! A.K., Simard J.Mi, Martin C.T., Rotello V.M. Inhibition? of DNA Transcription^ Using Cationic Mixed Monolayer Protected Gold Clusters // J. Am. Chem. Soc., 20011 V. 123. P. 7626-7629.

156. Han. G., Chari N.S., Verma A., Hong R., Martin C.T., Rotello V.M. Controlled1 Recovery of the Transcription1 of Nanoparticle-Bound DNA by Intracellular Concentrations of Glutathione // Bioconjugate Chem., 2005. V. 16. -P.-1356-1359.

157. Han G., You C.-C., Kim B.-j., Turingam R.S., Forbes N.S., Martin C.T., Rotello V.M. Light-Regulated Release of DNA and Its Delivery to Nuclei by Means of Photolabile Gold Nanoparticles // Angew. Chem. Int. Ed., 2006. V. 45. -P. 3165-3169.

158. Donaldson K., Tran L., Jimenez L.A., Duffin R., Newby D.E., Mills N., MacNee W., Stone V. Combustion-derived nanoparticles: a review of theirtoxicology following inhalation exposure // Part Fibre Toxicol, 2005. V. 2. - P. 10.

159. Warheit D.B., Laurence B.R., Reed K.L., Roach D.H., Reynolds G.A.,. Webb T.R. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats // Toxicol. Sei., 2004. V. 77 (1). - P. 117-125.

160. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation // Toxicol. Sei., 2004. V. 77 (1). - P. 126-134.

161. Karakoti A.Si, HenchvL.L., Seal S. The potential toxicity of nanomateriäls— The role of surfaces // J. of the Minerals, Metals and Materials Society, 2006. V. 58 (7). - P. 77-82.

162. Gurr J.R., Wang A.S., Chen C.H., Jan K.Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation-can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells // Toxicology, 2005. ,- V. 213 (1-2). P. 66-73;

163. HussaimS.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells // Toxicol. In Vitro, 2005. V. 19 (7).-P. 975-983. '

164. Goodman C.M., McCusker C.D., Yilmaz T., Rotello V.M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains // Bioconjug. Chem., 2004. V. 15 (4). - P. 897-900.

165. Schubert D., Dargusch R., Raitano J., Chan S.W. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective // Biochem; Biophys. Res. Commun., 2006. V. 342 (1). - P. 86-91.

166. Zhao'X.,. Striolo'A., Cummings P.T. G60 binds to and deforms nucleotides // Biophys. J., 2005. V. 89 (6). - P. 3856-3862.

167. Dybdahl M., Risom L., Bornholdt J., Autrup H., Loft S., Wallin H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo // Mutat. Res., 2004. V. 562 (1-2). - P. 119-131.

168. Knaapen A.M., Seiler F., Schilderman P.A., Nehls P., Bruch J., Schins R.P., BornrP.J. Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells // Free Radic. Biol. Med., 1999. V. 27 (1-2). - P. 234-240.

169. Baldwin E.L., Byl J.A., Osheroff N. Cobalt enhances DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha in vitro and in cultured cells // Biochemistry, 2004. V. 43 (3). - P. 728-735.

170. Van Leeriputten E., Horisberger. M. Immobilization of Enzymes on Magnetic Particles // Biotechnology and Bioengineering, 1974. V. 16. - P. 385396. . ; . .

171. Везер В. Фосфор и его соединения / В. Везер. М: Изд-во иностранной литературы, 1962. - 690 с. ■

172. Cavaluzzi M.J., Bôrer P.N. Revised UV extinction coefficients for nuclëosidë-5'-monophosphates and unpairediDNA and RNA // Nucleic Acids Res.,, 2004. V. 32 (1). - P. el3.

173. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное' клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. М.: Мир, 1984 - 480 с.

174. Золотарев В.М., Лыгин В.И;, Тарасевич Б.Н. Спектры внутреннего отражения поверхностных соединений и адсорбированных молекул // Успехи химии, 1981.- Т. 50 (1). С. 24-53.

175. Tsuboi М. Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids // Applied Spectroscopy Reviews, 1970. V. 3 (1). - P: 45-90.

176. Rivetti C., Guthold M., Bustamante C. Scanning\* force-microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis // J. Mol. Biol., 1996.- V. 264'(5). P. 919-932.

177. Parikh S.J:, Chorover J. ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide // Langmuir, 2006. V. 22 (20). - P. 84928500.

178. Wijnja H., Schulthess C.P. Carbonate Adsorption Mechanism on Goethite Studied with ATR-FTIR, DRIFT, and Proton Coadsorption Measurements // Soil Science Society of America J., 2001. V. 65. - P. 324-330.

179. Bargar J.R., Kubicki J.D., Reitmeyer R., Davis J.A. ATR-FTIR spectroscopic characterization of coexisting carbonate surface complexes on hematite //Geochimica et Cosmochimica Acta, 2005. V. 69 (6). - P. 1527-1542.

180. Джайлс Ч. Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел / Ч. Джайлс, Б. Инграм, Дж. Клюни и др. М.: Мир, 1987. - 488 с.

181. Stern O.Z. // Electrochemistry, 1924. V. 30. - P. 508.

182. McBride M.B. A Critique of Diffuse Double Layer Models Applied to Colloid and Surface Chemistry // Clays and Clay Minerals, 1997. V. 45 (4). - P. 598-608.

183. Hayes K.F., Papelis C., Leckie J.O. Modeling ionic strength effects on anion adsorption at hydrous oxide/solution interfaces // J. of Colloid and Interface Sci., 1988. V. 125 (2). - P. 717-726

184. Taillandier E., Liquier J. Infrared spectroscopy of DNA // Methods Enzymol., 1992.-V. 211.-P. 307-335.

185. Tajmir-Riahi H.A. Interaction of La (III) and Tb (III) ions with purine nucleotides: evidence for metal chelation (N-7-М-РОЗ)» and the effect of macrochelate formation on the nucleotide sugar conformation // Biopolymers, 1991.-V. 31 (9).-P. 1065-1075.

186. Lindqvist M., Graslund A. An FTIR and CD study of the structural effects of G-tract length and sequence context on DNA conformation in solution // J; Mol. Biol., 2001. V. 314 (3). - P. 423-432.

187. Dev S.B., Walters L. Fourier transform infrared spectroscopy for the characterization of a model peptide-DNA interaction // Biopolymers, 1990. V. 29 (1).-P. 289-299.

188. Malonga H., Neault J.F., Arakawa H., Tajmir-Riahi H.A. DNA Interaction with Human Serum Albumin Studied by Affinity Capillary Electrophoresis and FTIR Spectroscopy // DNA and Cell Biology, 2006. -V. 25 (1). P. 63-68.

189. Neault J.F., Naoui M., Manfait M., Tajmir-Riahi H.A. Aspirin-DNA interaction studied by FTIR and laser Raman difference spectroscopy // FEBS Lett., 1996. V. 382 (1-2). - P. 26-30.

190. Dagneaux G., Liquier J., Taillandier E. Sugar conformations in DNA and RNA-DNA triple helices determined by FTIR spectroscopy: role of backbone composition // Biochemistry, 1995: V. 34 (51). -P! 16618-16623;

191. Fritzsche HI, Akliebat A., Taillandier E., Rippe K., Joyih T.Mi Structure:and drug interactions of parallel-stranded: DNA studied by infrared spectroscopy and fluorescence•// Nucleic Acids Res., 1993. V 21 (22): - P.6 5085-509V. ,

192. Xu Q.S.,Kucera R.B., Roberts RJ"~Guo H.C. An asymmetric complex of restriction endonuclease Mspl on its palindromic DNA recognition site // Structure, 2004. -V. 12 (9). P; 1741-1747.

193. Jang N.H. The Coordination Chemistry of DNA Nucleosides on Gold Nanoparticles as a Probe by SERS // Bull. Korean Chem. Soc., 2002. V. 23 (12). -P. 1790-1800.

**Информация о работе**

* *http://earthpapers.net/images/ico27.png* Першина, Александра Геннадьевна
* *http://earthpapers.net/images/ico31.png* кандидата биологических наук
* *http://earthpapers.net/images/ico28.png* Томск, 2011
* *http://earthpapers.net/images/ico29.png* ВАК 03.01.04

**Диссертация**

[](http://earthpapers.net/preview/362123/d)

Начало формы

Читать

Конец формы

**Автореферат**

Изобретение относится к области молекулярной биологии и химии. Предложен способ гомогенизации раствора магнитных частиц с адсорбированной на них ДНК. Данное изобретение применяется в лабораторной диагностике при подготовке пробы к постановке ПЦР, для экстракции ДНК из биопрепаратов и удаления или нейтрализации посторонних примесей, что позволяет получить ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации. 7 ил., 1 пр.

1. Область техники

Изобретение относится к области молекулярной биологии и химии. Данное изобретение применяется в лабораторной диагностике для подготовки пробы к постановке ПЦР, в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепаратов и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации. Изобретение представляет способ растирания концентрационных неоднородностей, образующихся при смешивании в лизирующем растворе образца крови с магнитными наночастицами оксида железа, покрытыми адсорбентом SiO2.

2. Уровень техники

Использование магнитных частиц ничем принципиальным не отличается от использования других типов сорбентов (латексы, полимерные сорбенты, стекло), но позволяет применять магнитное разделение вместо центрифугирования и фильтрации. В основе магнитных частиц используются получаемые наночастицы оксида железа, обладающие суперпарамагнитными свойствами. Частицы на основе оксида железа с суперпарамагнитными свойствами обладают целым рядом преимуществ, наиболее важные из которых следующие:

- такие частицы имеют практически нулевую степень остаточной намагниченности, то есть после снятия внешнего магнитного поля (переноса из магнитного штатива в обычный) эти частицы не слипаются и могут быть легко ресуспендированы;

- такие частицы химически инертны и могут долго храниться в водных растворах, не ингибируют ферментативные реакции, их можно использовать в экспериментах in vitro и in vivo без риска нежелательных последствий;

- такие частицы открывают широкие возможности для автоматизирования процессов выделения нуклеиновых кислот, белков, клеток.

Из уровня техники известны следующие способы получения нуклеиновых кислот с использованием магнитных частиц:

A. Способ очистки с применением магнитных частиц (патент №WO 00/42432 от 20.07.2000)

Данный способ очистки вещества состоит в том, что материал, содержащий вещество и магнитные частицы, покрытые и обработанные реагентом, который связывает частицы с веществом, размещают в первой среде, создают возможность для протекания связывающей реакции, в которой вещество связывается с частицами, и вводят в среду магнитный зонд, в результате чего частицы прилипают к зонду, и зонд вместе с частицами и веществом, связанным с ними, переносят во вторую среду и, если нужно, выделяют из второй среды и переносят в третью среду, отличающийся тем, что в нескольких средах предпочтительно по меньшей мере в первой среде, а наиболее предпочтительно во всех средах, до того как зонд и частицы перенесут из соответствующей среды, размещают агент, ослабляющий поверхностное натяжение.

Основным недостатком этого способа очистки является необходимость переноса магнитного зонда с прилипшими к нему магнитными частицами между различными средами, что резко увеличивает риск контаменации исследуемого образца.

Б. Магнитные полимерные частицы на основе поливинилового спирта, способ их получения (патент №WO 97/04862 от 13.02.1997)

Изобретение относится к магнитным гранулообразным носителям, которые получают суспендированием содержащей магнитные коллоиды поливинилового спирта - полимерной фазы в органической фазе, которая содержит специальную смесь эмульгаторов. Получают частицы с размером частиц 1-8 мкм, которые могут химически связывать лиганды. Носители можно применять для выделения и обнаружения биомолекул, клеток, антител и нуклеиновых кислот.

B. Способ обнаружения анализируемого вещества при помощи коллоидных магнитных частиц (патент №WO 03/04453 от 30.05.2003)

Данный способ обнаружения и количественного определения характеризуется тем, что в нем используют магнитные коллоидные частицы, функционализированные по поверхности одним специфическим лигандом, подлежащим обнаружению или количественному определению анализируемого вещества. Для магнитного разделения используют сильные магниты на основе редкоземельных элементов. Чтобы полностью собрать магнитные частицы в магнитном штативе, требуется, как правило, от нескольких секунд до нескольких минут. Время разделения зависит от объема и вязкости жидкости, из которой собираются магнитные частицы.

Проблема, которая возникает при использовании магнитных частиц (после адсорбции - «прилипания» ДНК на поверхности магнитных частиц и сбора магнитных частиц магнитным полем на одной из стенок пробирки), - это образование «клубка» магнитных частиц, «опутанных» ДНК, что затрудняет проведение дальнейших этапов промывки и исключает в дальнейшем возможность проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени для анализа ДНК.

Задача

Задачей настоящего изобретения является создание способа гомогенизации-ресуспендирования раствора адсорбированных на магнитных частицах ДНК посредством частичной ее дефрагментации и уменьшения сверхспиральности, эффективной промывки и эллюирования - отделения ДНК от магнитных частиц без переноса магнитного зонда, с риском контаменации, между различными объемами, и обеспечения наиболее благоприятных условий для флюоресцентного анализа выделенной и очищенной ДНК приборами «PCR RealTime» и, таким образом, автоматизирования всего цикла проведения анализа ДНК.

3. Раскрытие изобретения

Поставленная задача создания однородного раствора магнитных наночастиц с адсорбированными на них образцами ДНК, выделенными из клеток крови, решается новым способом частичной дефрагментации молекул ДНК, а именно растиранием любых неоднородностей концентрации магнитных частиц, зажатых сильным неоднородным магнитным полем между внутренней поверхностью пробирки и вращающимся вокруг своей оси магнитным зондом. Вращение магнитного зонда с одновременным его прижимом к внутренней стенке пробирки осуществлялось вращающимися магнитными (1.2-1.3 Тл) шариками штатива.

[Яндекс.Директ](https://direct.yandex.ru/?partner" \t "_blank)

В пробирку, стандартно используемую для выделения ДНК, объемом 1.5 мл вводилось:

1) 5 мкл магнитных частиц в концентрации 5 мг/мл;

2) 50 мкл крови для выделения ДНК;

3) 150 мкл лизирующего раствора;

4) магнитный цилиндрический зонд.

Вращение магнитного зонда вокруг своей оси, коллинеарной оси пробирки и создание микротурбулентных течений способствовало максимально полной адсорбции - «прилипанию» ДНК на поверхности магнитных частиц. После остановки вращательного движения зонда и сбора магнитных наночастиц с ДНК сильным неоднородным магнитным полем шариков штатива на внутренней поверхности пробирки и, частично, на поверхности магнитного зонда магнитные частицы, «опутанные» ДНК, образуют «клубок», представляющий собой очень эластичную пористую среду с высокой прочностью на разрыв, что и было основной преградой на пути использования стандартного метода выделения ДНК с использованием магнитных частиц и магнитного штатива.

Предпринимались различные неудачные попытки для устранения (разбиения) комкования магнитных частиц, такие как многократное пипетирование, разрезание ножами миксера при оборотах более 50 Гц, разбиение более крупными ферромагнитными частицами по принципу работы шаровых мельниц. Таким образом, становилось невозможным проведение дальнейших стандартных стадий пробоподготовки - три промывки и элюирование ДНК от магнитных частиц, и следовательно, невозможность выделения чистых, пригодных для ПЦР анализа образцов ДНК.

Положительный результат - создание гомогенного раствора магнитных частиц с ДНК - был получен лишь с использованием принципа растирания микронеоднородностей, зажатых между двумя поверхностями. Микронеоднородности с магнитными частицами - «комки» втягиваются в область высокого магнитного поля, прижимаясь к стенкам пробирки, как это реализуется в стандартном магнитном штативе со стационарным магнитным полем. В качестве магнитов штатива нами используются магнитные (Nd-Fe-B) шарики диаметром 5 мм (Bостаточное≈1.2-1.3 Тл), расположенные с внешней стороны пробирки, способные свободно вращаться вокруг любой из своих осей. Второй, прижимающей, поверхностью в предлагаемой нами методике является вводимый внутрь пробирки магнитный зонд - цилиндрик диаметром 1.5-2.0 мм и длиной 6-8 мм, намагниченный поперек оси цилиндра (параллельно оси пробирки) и имеющий Bостаточное0.2-0.3 Тл на поверхности. В качестве материала для изготовления магнитного цилиндрика использовался магнитопласт, получаемый методом литья (силикон с добавлением 80% быстрозакаленного магнитного порошка неодимового сплава), с последующим намагничиванием его с помощью индуктора.

Магнитный цилиндрик-зонд, притягиваемый сильным магнитом, зажимал «комки» между собой и внутренней стенкой пробирки. Вращаясь вокруг своей оси и оставаясь всегда прижатым к внутренней стенке пробирки, магнитный зонд эффективно растирает «комки» магнитных частиц «опутанных» ДНК, частично (как показал последующий электрофорез) дефрагментируя саму ДНК.

В пробирке при этом образуется суспензия из магнитных частиц с адсорбированными на них ДНК.

4. Осуществление изобретения

4.1 Описание конструкции модели прибора, с помощью которого проводились испытания.

16 пробирок с одноразовыми магнитными цилиндрическими зондами внутри располагались равномерно по окружности в штативе. Между каждой из 8 пар пробирок в цилиндрические полости (диаметром 5.1 мм) штатива помещались 8 супермагнитных (1.2-1.3 Тл) шариков диаметром 5 мм, имеющих возможность свободно вращаться вокруг любой своей оси. Вид модели без пробирок представлен на фиг.1. Вращение восьми супермагнитных шариков штатива осуществлялось посредством создания вращающегося в горизонтальной плоскости вектора индукции магнитного поля в плоскости окружности их расположения. Создание вращающегося с частотой 10-30 Гц магнитного поля в нашей модели обеспечивалось вращением в радиальной плоскости одного стержневого магнита, расположенного вдоль диаметра окружности пробирок.

На фиг.2, изображен вид модели снизу, где показано расположение стержневого магнита, создающего вращающееся магнитное поле. Приводом служил электромотор, питаемый от батареек (3-6 В), с частотой вращения 30-50 Гц. Лунки штатива для пробирок прокладывались гибким нагревательным элементом (нихром в карбоновой ленте, мощность около 10 Вт), для нагрева до 50-60°С после третьей стадии промывки - сушки (5 минут), а также для нагрева до 60-65°С (10 минут) в эллюирующем растворе для отделения ДНК от сорбента на поверхности магнитных частиц. Гибкая нагревательная карбоновая лента с двумя нихромовыми нитями, также видна на фиг.1 и фиг.2.

Последней стадией пробоподготовки является сбор магнитных частиц на стенке пробирки и магнитном зонде. Выделенная и очищенная ДНК остается в растворе.

Этапы выделения ДНК из биологического образца с использованием изобретения

ДНК выделяют из образцов крови при помощи стандартного набора реагентов. На одну пробирку 1.5 мл используют:

1 этап

- 50 мкл крови + 150 мкл лизирующего раствора + 5 мкл стандартной концентрации магнитных частиц;

- Промывка;

- Удержание магнитных частиц на стенке пробирки;

- Удаление жидкой фазы из пробирки;

2 этап

- 400 мкл стандартного промывочного раствора №1;

- Промывка;

- Удержание магнитных частиц на стенке пробирки;

- Удаление жидкой фазы из пробирки;

3 этап

- 200 мкл стандартного промывочного раствора №2;

- Промывка;

- Удержание магнитных частиц на стенке пробирки;

- Удаление жидкой фазы из пробирки;

4 этап

- 200 мкл стандартного промывочного раствора №3;

- Промывка;

- Удержание магнитных частиц на стенке пробирки;

- Удаление жидкой фазы из пробирки;

- Сушка содержимого пробирки в течение 5 минут при температуре 50-65°С;

5 этап

- 100 мкл стандартного эллюирующего раствора в течение 10 минут при температуре 50-65°С;

- Удержание магнитных частиц на стенке пробирки;

- Сбор выделенных и очищенных ДНК из пробирки для последующего анализа.

Пример конкретного выполнения

Для выделения ДНК из клеток крови в модель прибора устанавливалось 16 пробирок объемом по 1.5 мл. Одна пробирка использовалась для контроля температурного режима на 4 и 5 этапах пробоподготовки. Для этого в шестнадцатую пробирку вводился цифровой датчик температуры. В остальных 15 пробирках размещался магнитный цилиндрический зонд.

1 этап

После введения в пробирку раствора, содержащего 50 мкл крови + 150 мкл лизирующего раствора, в нее добавлялось 5 мкл стандартной концентрации магнитных частиц. Включением на 5-10 секунд вращающегося магнитного поля, за счет вращения магнитного зонда, достигалось равномерное перемешивание магнитных частиц в растворе и создание оптимальных условий для адсорбции ДНК на их поверхности. Как показали опыты, частота вращения магнитного зонда не должна превышать 50 Гц. Противное приводит к вспениванию раствора, а также к разбрызгиванию его по стенкам пробирки.

После остановки вращательного движения супермагнитные шарики штатива собирали магнитные частицы на стенке пробирки на высоте около 100 мкл. Одновременно с этим к стенке пробирки прижимался и магнитный цилиндрический зонд. Часть магнитных частиц оседала также на поверхности магнитного зонда. Дрейф магнитных частиц из раствора и их оседание на стенки пробирки и поверхность зонда длился около 1 минуты. Затем жидкая фаза удалялась из пробирки стандартной пипеткой с одноразовыми носиками.

2 этап

После введения в пробирку 400 мкл промывочного раствора №1 модель прибора включалась приблизительно на 1 минуту. Вращающийся магнитный зонд, будучи прижатым к стенке пробирки супермагнитным шариком штатива, растирал о внутреннюю стенку пробирки любые неоднородности, содержащие магнитные частицы, создавая суспензию магнитных частиц. Микротурбулентное вращательное движение жидкости в пробирке способствовало тщательной промывке ДНК.

После остановки вращательного движения супермагнитные шарики штатива собирали магнитные частицы на стенке пробирки на высоте около 100 мкл. Одновременно с этим к стенке пробирки прижимался и магнитный цилиндрический зонд. Часть магнитных частиц оседала, также на поверхности магнитного зонда. Дрейф магнитных частиц из раствора и их оседание на стенки пробирки и поверхность зонда длится около 1 минуты. Затем жидкая фаза удалялась из пробирки стандартной пипеткой с одноразовыми носиками.

3 этап

После введения в пробирку 200 мкл промывочного раствора №2 этап проводился аналогично.

4 этап

После введения в пробирку 200 мкл промывочного раствора №3 этап проводился аналогично. Однако после удаления жидкой фазы следовало осушить содержимое пробирки в течение 5 минут при температуре 50-65°С. Для того включался гибкий нагревательный элемент, опоясывающий все 16 пробирок в их посадочных местах в штативе. Нагревательный элемент запитывался от стандартного источника питания HY3005С напряжением около 15 В. Контроль температуры осуществлялся по цифровому датчику температуры, расположенному в шестнадцатой пробирке. Процедура сушки должна выполняться тщательно, так как промывочный раствор №3 блокирует реакцию амплификации ДНК.

5 этап

После введения в пробирку 100 мкл эллюирующего раствора, отделяющего ДНК от магнитных частиц, также включался гибкий нагревательный элемент, и в пробирках на 10 минут устанавливалась температура 50-65°С. В течение этого времени вращение магнитного зонда осуществлялось периодически на 10-15 секунд каждую минуту. Это позволяло гомогенизировать раствор, с одной стороны, и не допускало чрезмерной дефрагментации молекул ДНК.

После отключения прибора магнитные частицы в течение минуты собирались на боковых стенках пробирки и одноразовом магнитном зонде под действием неоднородного магнитного поля шариков.

Очищенные ДНК оставались в растворе, готовые для дальнейшего анализа.

Для сравнения количества ДНК, выделенного стандартным способом и с помощью модели прибора, в том числе и в разных пробирках, были проведены реакции амплификации с образцами каждого вида. Амплификацию проводили с помощью детектирующего амплификатора ДТ-96 (Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития №ФСР 2007/01250 от 20 ноября 2007 года). Результаты проведенной амплификации представлены на фиг.6. Характерный номер цикла начала реакции в обоих случаях равен 27.

Степень дефрагментации ДНК, выделенной моделью прибора, можно проанализировать по проведенной электрофорограмме фиг.7.

5. Краткое описание чертежей

Вид модели прибора, с помощью которого проводились испытания, представлен на фиг.1. Видны 8 супермагнитных шариков и гибкий нагревательный элемент. На фиг.2, изображающем вид модели снизу, показано расположение стержневого магнита, создающего вращающееся магнитное поле. Приводом служил электромотор, питаемый от батареек (3-6 В), с частотой вращения 30-50 Гц. Лунки штатива для пробирок прокладывались гибким нагревательным элементом (нихром в карбоновой ленте), для нагрева до 50-60°С после третьей стадии промывки - сушки (5 минут), а также для нагрева до 60-65°С (10 минут) в эллюирующем растворе для отделения ДНК от сорбента на поверхности магнитных частиц. Гибкая нагревательная карбоновая лента с двумя нихромовыми нитями, также видна на фиг.1 и фиг.2.

На фиг.3 представлен общий вид модели во время испытаний.

На фиг.4 представлены магнитные частицы с адсорбированной на них ДНК после 2 промывочного раствора.

Фиг.5 изображает способ растирания неоднородностей, зажатых между вращающимся вокруг своей оси магнитным зондом и стенкой пробирки.

Фиг.6 изображает сравнительные результаты качественного ПЦР анализа для ручного стандартного метода выделения ДНК и метода с использованием модели прибора для пробоподготовки. Совпадение кривых указывает на хорошую работу модели. Фиг.7 показывает сравнительные результаты качественного ПНР анализа ДНК, полученной с применением стандартной пробоподготовки, и анализа ДНК, полученной способом гомогенизации с использованием модели прибора для пробоподготовки. Результаты электрофореза демонстрируют некоторую дефрагментацию ДНК, выделенную моделью прибора (первые 6 колонок) по сравнению со стандартным ручным методом (7 и 8 колонки).

Способ гомогенизации раствора магнитных частиц с адсорбированной на них ДНК, заключающийся в растирании неоднородных по концентрации магнитных частиц, зажатых неоднородным магнитным полем между внутренней поверхностью пробирки и магнитным зондом, вращающимся вокруг своей оси с частотой 20-50 Гц и представляющим собой цилиндр из магнитопласта диаметром 1,5-2,0 мм и длиной 6-8 мм, намагниченный поперек оси цилиндра и имеющий В остаточное 0,2-0,3 Тл на поверхности, при этом вращение магнитного зонда с одновременным его прижимом к внутренней стенке пробирки обеспечивают с помощью магнитных шариков диаметром 5 мм, с величиной В остаточного 1,2-1,3 Тл на поверхности, расположенных с внешней стороны пробирки и способных свободно вращаться вокруг своих осей под действием постоянно вращающегося в радиальной плоскости стержневого магнита.

<http://www.findpatent.ru/patent/245/2451747.html>  
© FindPatent.ru - патентный поиск, 2012-2017

20:02, 28 ноября 2013

# ДНК помогла собрать наночастицы в кристаллы

Ученые Северо-западного университета в США научились использовать ДНК для сборки правильных кристаллов из наночастиц золота и, потенциально, других наночастиц. Исследование [опубликовано](http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/full/nature12739.html)в журнале *Nature*, его краткое содержание [приводит](http://www.northwestern.edu/)сайт университета.

Идея исследователей заключалась в том, чтобы использовать спаривание ДНК для связи наночастиц между собой. В таких кристаллах последние выступали в роли атомов, а нуклеиновая кислота — в роли связей между ними.

Для демонстрации эффективности такого подхода ученые собрали кристаллы из наночастиц золота диаметром от 5 до 20 нанометров с помощью олигонуклеотидов длиной чуть более 20 «букв». Одним концом ДНК была присоединена к наночастице золота, а последние шесть нуклеотидов состояли только из одной цепи, то есть выступали в роли так называемых «липких концов», которые способны связываться со своей комплементарной молекулой. Соединение липких концов нуклеотидов приводило к образованию правильного кристалла из наночастиц.

Как показали эксперименты, ключевым параметром в данном процессе является правильное соотношение между наночастицами и нуклеотидами. Кроме того, для правильности сборки важное значение имеет медленное снижение температуры — не быстрее одной десятой градуса в 10 минут. Всего процесс сборки кристаллов занимал два-три дня.

Ученые не впервые используют ДНК в качестве структурного элемента. Наиболее известна в этом отношении технология ДНК-оригами. Она подразумевает соединение специально синтезированных нуклеотидов в сложные структуры — например в микроскопическую [коробку](http://lenta.ru/news/2011/04/18/nanoflask/), куда помещают лекарство.

0

0

0

[**ОБСУДИТЬ**](https://lenta.ru/comments/news/2013/11/28/nanocry/)

**ССЫЛКИ ПО ТЕМЕ**

[Созданы композиционные материалы на основе ДНК](https://lenta.ru/news/2013/10/21/superlattice/)

**lenta.ru, 21 октября 2013**

[Ученые обнаружили метод скоростного сворачивания ДНК-оригами](https://lenta.ru/news/2012/12/14/speedorigamifolding/)

**lenta.ru, 14 декабря 2012**

[Из ДНК-оригами сделали генный выключатель](https://lenta.ru/news/2012/06/04/rnaorigami/)

**lenta.ru, 04 июня 2012**

[Специалисты по ДНК-оригами создали нанопосуду](https://lenta.ru/news/2011/04/18/nanoflask/)

|  |
| --- |
|  |

**Форма ядра** различных клеток неодинакова: встречаются клетки с округлым, овальным, бобовидным, палочковидным, многолопастным, сегментированным ядром. Чаще всего форма ядра в целом соответствует форме клетки: оно обычно сферическое в клетках округлой или кубической формы, вытянутое или эллипсоидное в призматических клетках, уплощенное в плоских. **Расположение ядра** варьирует в разных клетках, оно может лежать в центре (в клетках округлой, плоской, кубической или вытянутой формы), у ее базального полюса (в клетках призматической формы) или на периферии (жировые клетки). **Величина ядра** в среднем 5-10 мкм, и она относительно постоянна для каждого типа клеток, однако может меняться в определенных пределах, увеличиваясь при увеличении функциональной активности клетки и уменьшаясь при ее угнетении. В разных видах клеток наблюдается неодинаковое **соотношение ядра и цитоплазмы**. Так, например, в клетках ядерного типа - крупное ядро и узкий ободок цитоплазмы (лимфоцит), в клетках цитоплазматического типа объем цитоплазмы превосходит объем ядра (н-р, бокаловидные клетки).

**Компоненты ядра.**Кариолемма - или ядерная оболочка, хроматин, ядрышко и кариоплазма (ядерный матрикс или ядерный сок).

**Функции ядра:**

1. хранение генетической информации (в молекулах ДНК, находящихся в хромосомах)

2. реализация генетической информации, контролирующей осуществление разнообразных процессов в клетке - от синтетических до запрограммированной гибели (апоптоз)

3. воспроизведение и передачу генетической информации (при делении клетки)

**Ядерная оболочка** - на светооптическом уровне практически не определяется, под электронным микроскопом обнаруживается, что она состоит из двух мембран - наружной и внутренней разделенных полостью шириной 15-40 нм (перинуклеарным пространством). Наружная - покрыта рибосомами и тесно связана с гр. ЭПС. Нередко можно видеть, как наружная мембрана продолжается в канальцы гр. ЭПС. Внутренняя мембрана является местом прикрепления хромосом. В нуклеолемме имеются ядерные поры. В их состав входят поровые комплексы, в составе которых имеются: отверстие поры диаметром около 90 нм, гранулы поры и мембрана поры. Отверстие поры образуется в результате слияния наружной и внутренней мембран. Гранулы поры располагаются в 3 ряда, по 8 гранул в каждом ряду. Размеры гранул около 25 нм. От гранул к центру сходятся фибриллы, формирующие диафрагму, в середине которой лежит центральная гранула (по некоторым представлениям - это транспортируемая через пору субъединица рибосомы.

**Функции комплекса ядерной поры:**

беспечение регуляции избирательного транспорта веществ между цитоплазмой и ядром.

2. Активный перенос в ядро некоторых белков, имеющих особую маркировку и распознаваемой рецепторами в комплексе поры.

еренос в цитоплазму субъединиц рибосом.

Чем больше пор в нуклеолемме, тем активнее ядро, если активность снижена, то количество пор уменьшается, если синтетическая активность ядра близка к нулю, то поры в ядре отсутствуют (н-р, в кариолемме ядра сперматозоида).

**Хроматин** занимает основную часть объёма ядра. Он представлен тёмными (электроноплотными) глыбками - т.н. **гетерохроматином** (**функционально неактивные**отделы и целые хромосомы, которые конденсированы, образуя глыбки) и светлыми (электронопрозрачными) областями -**эухроматином**это **функционально активные*,***участвующие в транскрипции части хромосом, которые находятся в деконденсированном (диффузном) состоянии. Причём, глыбки гетерохроматина находятся, главным образом, на периферии ядра   
и прилежат к ядерной оболочке. При изменении состояния клетки или в процессе дифференцировки **возможен переход части гетерохроматина в эухроматин и обратно.**Таким образом, чем больше в ядре доля гетерохроматина, тем ниже функциональная активность ядра, т.е. тем меньше скорость синтеза РНК. Так, в ядре нервной клетки гетерохроматина очень мало - ядро и клетка в целом функционально очень активны. Напротив, в лимфоците наблюдается преобладание гетерохроматина. Это вполне коррелирует с очень малым объёмом цитоплазмы, которая к тому же бедна органеллами. Данная клетка циркулирует в крови, и процессы синтеза РНК и белков идут в ней с небольшой скоростью. Хроматин дает положительную реакцию на ДНК (реакция Фельгена) - ДНК окрашивается в вишневый цвет, а все прочие структуры в зеленый, также по методу Браше хроматин окрашивается метиловым зеленым в соответствующий цвет красителя. Весь **хроматин** в целом - это совокупность 46 хромосом. Каждая из них представляет собой нуклеопротеидный комплекс - двуцепочечную молекулу ДНК, которая определённым образом связана с ядерными белками. Содержание белков в хромосоме по массе в 1,3-1,7 раза больше, чем ДНК. Кроме того, в хромосоме обнаруживается и РНК, являющаяся продуктом транскрипции. Тарнскрипция сопровождается **экспрессией** рибосомных и нерибосомных генов. **Ген** - единица наследственной информации, состоящий из нуклеотидов.

**Экспрессия нерибосомных генов:**

1. Сопровождается синтезом гигантской молекулы гетерогенной и-РНК при участии катализатора ДНК-полимеразы

2. Гигантская и-РНК подвергается сплайсингу, в результате длина гигантской и-РНК укорачивается в 10-30 раз и она превращается в и-РНК.

3. и-РНК взаимодействует с белками и образует РНК-азную гранулу (интерхроматиновая гранула диаметром 30 нм).

4. Перемещаясь на перпиферию ядра интерхроматиновая гранула перезревает в перихроматиновую гранулу диаметром 45 нм.

5. Перихроматиновая гранула покидает ядро в форме информосом.

Одним из компонентов гетерохроматина может быть т.н. **половой хроматин**.

У мужчин в наборе хромосом каждой клетки содержатся, как известно, по одной Х- и Y-половой хромосоме. Обе они находятся в деконденсированном состоянии, т.е. входят во фракцию эухроматина. **У женщин** в клетках содержатся по две Х-хромосомы. Одна из них деконденсирована. Вторая же Х-хромосома всегда находится **в конденсированном состоянии**, образуя в ядре компактное тельце - половой хроматин. Для обнаружения полового хроматина обычно исследуют мазок крови. **В нейтрофильных лейкоцитах** женщин половой хроматин выявляется в виде барабанной палочки, находящейся в одном из сегментов ядра. По этому признаку в судебной медицине отличают кровь женщин от крови мужчин. В деконденсированном состоянии длина одной молекулы ДНК равна в среднем около 5 см, а общая длина молекулы ДНК всех хромосом в ядре более 2м. В этой связи очевидна необходимость компактной упаковки молекул ДНК.

**Выделяют 4 уровня компактизации ДНК:**

1. **Нуклеосомный** (длина уменьшается в 6-7 раз). Нуклеосома - это белковая частица, состоящая из основных белков - гистонов. Основа каждойнуклеосомы- глобула из 8 молекул гистонов (октамер). Двуцепочечная молекула ДНК последовательно "намотана" на огромное количество таких глобул, делая вокруг каждой из них почти по 2 оборота (1,75 раз). В участках между глобулами с ДНК связано ещё по 1 молекуле гистона. В итоге, совокупность нуклеосом выглядит как цепь бусин, а деконденсированный хроматин имеет гранулярную структуру.

2. **Нуклеомерный** (компактизация в 40 раз). Формируется суперспираль. Ее витки образуют нуклеосомы обвитые ДНК. Каждый виток суперспирали образован 6-ю нуклеосомами и называется нуклеомерой, ее диаметр 25-30 нм. Суперспираль - это элементарная нить эухроматина. Гетерохроматин и полностью конденсированные хромосомы тоже имеют нуклеосомную организацию. Однако здесь **добавляются** и **следующие уровни укладки хромосомы**, что приводит к резкому сокращению её длины.

3. **Хромомерный** (компактизация в 680 раз). Негистоновые белки сшивают

суперспираль в боковые петельные домены, с образованием хромомеры.

4. **Хромонемный** - связывают со сближением хромомеров, боковые петли переплетаются и образуют кластеры, которые формируют хромонему. Их диаметр от 300 нм. Кластер рассматривают, как компонент гетерохроматина, видимый в световой микроскоп, как глыбка.

5. **Хроматидный у**ровень компактизации образуется только при делении клетки, в результате образуются митотические хромосомы, видимые в световой микроскоп. Во время деления ДНК редуплицируется, каждая дочерняя хромосома, называемая хроматидой связана в области первичной перетяжки (центромеры), она делит хроматиду на два плеча. Каждая хроматида образуется путем закручивания в спираль хромонемы. Виток спирали имеет диаметр 700 нм и содержит 18-20 хромомер.

Совокупность числа, размеров и особенностей строения хромосом называется **кариотипом**. Оценка кариотипа производится путем изучения хромосом в метафазной пластинке. Для кариотипирования получают культуру клеток, в которую вводят колхицин, блокирующий формирование веретена. Из таких клеток извлекают хромосомы, которые далее окрашивают и идентифицируют. Нормальный кариотип человека представлен 46 хромосомами - 22 пары аутосом и двумя половыми хромосомами. Кариотипорование позволяет диагносцировать ряд заболеваний, связанных с хромосомными аномалиями, в частности синдром Дауна - трисомия 21 хромосомы.

**Ядрышко -** это место образования рибосом в клетке. Оно образовано специализированными участками хромосом, которые называются ядрышковыми организаторами. У человека такие участки имеются в пяти хромосомах - 13, 14, 15, 21 и 22, где находятся многочисленные копии генов, кодирующих рибосомальные РНК. Ядрышко выявляется в интерфазном ядре на светооптическом уровне как мелкая плотная гранула, интенсивно окрашивающаяся основными красителями. При окраске по методу Браше дает + реакцию на РНК - окрашивается пиронином в розовый цвет. Оно располагается в центре ядра или эксцентрично. Размеры и число ядрышек увеличиваются при повышении функциональной активности клетки. Особенно крупные ядрышки характерны для эмбриональных и активно синтезирующих белки клеток, а также клеток быстро растущих злокачественных опухолей. Под электронным микроскопом в ядрышке обнаруживают 3 компонента.

1. центральный фибриллярный светлый компонент - окрашивается бледно, где находится ДНК ядрышкового организатора, содержащей информацию о р-РНК.

2. периферический фибриллярный компонент - в виде тонких нитей и представляет собой транскрипты р-РНК.

3 гранулярный компонент - субъединицы рибосом.

**Кариоплазма** - жидкий компонент ядра, в котором располагаются хроматин и ядрышко. Содержит воду и ряд растворенных и взвешенных в ней веществ: РНК, гликопротеины, ионы, ферменты, метаболиты. Некоторые авторы разделяют понятие кариоплазмы и ядерного матрикса, к последнему помимо кариоплазмы относят также и кариоскелет, состоящий из **ядерной ламины** и фибриллярной сети, пронизывающей ядро. Ламина это пластинка белковой природы, которая связана с внутренней мембраной. К ядерной ламине и внутриядерной фибриллярной сети крепятся хромосомы, а также  
разнообразные белковые комплексы с ферментативной или регуляторной функцией.

**Клеточный цикл -**это время существования клетки от одного деления до другого, или от деления до гибели. Клеточный цикл включает собственно митотическое деление и интерфазу - промежуток между делениями. Интерфаза значительно более длительна, чем митоз (обычно занимает не менее 90% клеточного цикла) и подразделяется на 3 периода: пресинтетический или постмитотический (G1), синтетический (S) и постсинтетический или премитотический (G2).

G1 - наступает сразу после митоза и характеризуется активным ростом клетки и синтезом белка и РНК, благодаря чему клетка достигает нормальных размеров и восстанавливает необходимый набор органелл (продолжительность от неск часов до неск дней)

 течение этого периода клетка осуществляет непосредственную подготовку к делению. Происходит созревание центриолей, запасается энергия, синтезируется РНК и белки (в частности тубулины, необходимые для образования веретена деления). Продолжительность 2-4 часа. Некоторые клетки могут выходить из клеточного цикла, это обозначается буквой G0. Клетка, вошедшая в этот период, утрачивает способность к митозу. В том случае, если клетка временно утрачивает способность к делению, она подвергается начальной дифференцировке. При этом дифференцированная клетка специализируется для выполнения определенной функции, после чего она способна вновь возвратиться в клеточный цикл. Н-р, при повреждении печени гепатоциты, подвергшиеся начальной дифференцировке, возвращаются в клеточный цикл, и за счет их деления происходит быстрое восстановление ткани. Те клетки, которые окончательно утрачивают способность к делению, не могут возвратиться в клеточный цикл и погибают. Н-р, гранулоциты крови, подвергшиеся дифференцировке, функционируют в течение 8 суток, а затем погибают. Также высокоспециализированные клетки - кардиомиоциты или нервные клетки не способны делиться.

**Митоз** - непрямое деление. В процессе, которого происходит равномерное распределение хромосомного материала между дочерними клетками. Выделяют 4 фазы, общая продолжительность которых 2 часа. Профаза - 30-60 мин, метафаза 10-20 мин, анафаза - 2-3 мин, телофаза - 30-40 мин.

**Мейоз** - это такое деление, при котором в дочерних клетках оказывается половинный (гаплоидный) набор хромосом. Такое деление имеет место при образовании половых клеток. Особенности мейоза: состоит из 2-х делений, второе деление без S-периода в интерфазе, 80% времени занимает профаза первого деления. В ней выделяют периоды: 1. **Лептотена - х**ромосомы спирализуются и приобретают вид тонких нитей. 2. **Зиготена - г**омологичные хромосомы конъюгируют друг с другом.**Пахитена -** пары хромосом ещё больше спирализуются и, утолщаясь, укорачиваются. Хромосомы обмениваются гомологичными участками (**кроссинговер**).Вместе с тем активируются синтезы РНК и белка. Благодаря этому, сильно увеличивается объём ядра и клетки. **Диплотена - г**омологичные хромосомы начинают расходиться. Но между ними сохраняются **хиазмы** - перекрёсты в местах происшедшего кроссинговера. Из-за ещё большей спирализации хромосомы утолщаются и подразделяются на хроматиды. Поэтому каждая пара гомологичных хромосом выглядит как тетрада. **Диакинез - х**иазмы исчезают из-за ещё большего расхождения гомологичных хромосом.

**Амитоз -** этот тип деления характеризуется тем, что хромосомный материал ядра материнской клетки может распределяться неравномерно между дочерними клетками. Такой тип деления считается ненормальным.

**Полиплоидия** - это процесс увеличения количества хромосом в ядре клетки. В результате образуются полиплоидные клетки. Это может происходить в результате блокирования одной из фаз митоза, либо нарушения цитотомии во время телофазы. Н-р, гепатоциты, мегакариоциты красного костного мозга, гландулоциты ацинусов слюнных желез.

**Эндорепродукция** - это последовательное многократное удвоение ДНК, в результате увеличивается набор хромосом, при этом хромосомы связаны тонкими нитями, эти структуры называются политенами. Характерными для клеток плаце

**Диаметр молекулы воды**  равен примерно 0 0000000 Зсм. [**[1]**](http://www.ngpedia.ru/pg2162946m4WY0l30001001860)

**Диаметр молекулы воды** , вычисленный с помощью числа Аво-гадро, равен трем ангстремам. Подобная определенность объективно присуща молекуле любого вещества. Значит, структура выступает как пространственное расположение частиц в молекуле. [**[2]**](http://www.ngpedia.ru/pg1092936gcdeobS0002001860)

**Диаметр молекулы воды**  составляет 0 29нм ( 2 9 А), что сопоставимо с размерами пор и дефектов большинства неметаллических материалов. Это обусловливает ее достаточно высокую проникающую способность, особенно в пористые силикатные материалы и композиты. [**[3]**](http://www.ngpedia.ru/pg1977174ExACXNh0003001860)

**Диаметр молекулы воды**  равен всего 2 5 10 - 10 м, и водяной пар проходит сквозь мельчайшие поры. Плотные, непористые материалы не пропускают водяные пары и негигроскопичны. К ним относятся ситаллы, малощелочное стекло, вакуумно-плотная керамика, эпоксидные пластмассы и неполярные полимеры. [**[4]**](http://www.ngpedia.ru/pg0020423iDRgOLo0004001860)

|  |
| --- |
|  |

**Глава 36. Строение клетки**

*Клетка* — элементарная живая система, единица строения, жизнедеятельности, размножения и развития живых организмов. Это самая простая (элементарная) живая система, способная к самообновлению, саморегуляции и самовоспроизведению. В зависимости от количества клеток, образующих организм, различают:

© *одноклеточные организмы*;

© *многоклеточные организмы.*

Клетки живых организмов очень разнообразны: они отличаются друг от друга формой, размерами, особенностями организации и функциями. По форме различают шаровидные, цилиндрические, призматические, кубические, удлиненные, дисковидные, звездчатые и другие клетки. Наиболее часто встречаются клетки шаровидной или овальной формы.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | |  | | --- | | http://ok-t.ru/studopediaru/baza1/1050389867935.files/image562.jpg | |  |  |
|  |  | |  | | --- | | Рис. 279. Схема строения эукариотической клетки (слева животной, справа — растительной):   1 — ядро с хроматином и ядрышком; 2 — цитоплазматическая мембрана; 3 — клеточная стенка; 4 — плазмодесмы; 5 — гранулярная эндоплазматическая сеть; 6 агранулярная эндоплазматическая сеть; 7 — пиноцитозная вакуоль; 8 — комплекс Гольджи; 9 — лизосома; 10 — жировые включения; 11 — центриоль и микротрубочки центросферы; 12 — митохондрии; 13 — полисомы; 14 — вакуоль; 15 — хлоропласты. | |  |
|  |  |  |  |

Разнообразны и размеры клеток. Большинство клеток имеют размеры от 10 до 100 мкм, реже — 1-10 мм (клетки мякоти арбуза) и очень редко от 5 до 10 см (яйца птиц — гусей, пингвинов, страусов).

Толщина плазматической мембраны в среднем 7,5 нм.

Лекция 7. КЛЕТКА 1. КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА,   
КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА, ЯДРО

[(курс лекций "Общая биология", читавшийся О.Э. Костериным на первом курсе психологичесого факультета НГУ в 2006-2011 гг.)](http://pisum.bionet.nsc.ru/kosterin/lectures/index.htm)

Перейдем от структурных формул к рассмотрению структур, которые можно увидеть хотя бы под микроскопом, пусть и электронным. Мы ознакомились с жизнью как со сложнейшим биохимическим предприятием по преобразованию сотен тысяч, если не миллионов, разных сложных органических молекул. Большое количество этих процессов происходит одновременно и совместно в одних и тех же растворах, и они разделены и предопределены исключительно специфичностью осуществляющих их ферментов. Но и из общих соображений ясно и мы уже встречались с тем, что во многих ситуациях разные части этого производства должны быть расположены в специальных цехах, в которых поддерживается специальная химическая среда (та же кислотность) и на поверхности которых определенным образом организованы ферменты.

И первое, в чем нуждается живая система, – это в локализации собственного пространства и отграничении от пространства окружающего. Иначе все вещества, включая ферменты, разойдутся по градиенту своей концентрации в окружающую среду (несомненно, водную, так как все живые процессы идут в водных растворах или гелях) и не смогут встретиться друг с другом. По-видимому, жизнь возникла не в воде как таковой, иначе бесконечное разведение не позволило бы ей сложиться, а в какой-то капельной среде – в грунте, пористых горных породах и т. д., где пространственная ограниченность обеспечивалась извне. О возникновении жизни можно говорить с того момента, когда первые самовоспроизводящиеся системы научились хоть в какой-то мере ограничивать себя самостоятельно. Основные теории, описывающие, как все это происходило, достойны специального рассмотрения, а пока нам нужно принять хозяйство по описи и рассмотреть, что мы имеем сегодня.

А сегодня мы имеем, что все живое организовано на основе элементарной и более или менее самодостаточной структурно-функциональной единицы – клетки. Причем каждый живой организм либо является клеткой, либо состоит из многих клеток и является колонией или государством клеток, как мы с вами (мы являемся государством ни много ни мало из миллиона миллиардов клеток).

Почти каждая клетка проявляет все основные свойства живого организма: она питается, растет, реагирует на внешние сигналы, взаимодействует с другими клетками, часто движется и еще чаще (но не всегда!) размножается.

Размножаются клетки посредством деления (иногда почкования, что, по сути, является неравным делением). Важно, что каждая клетка происходит от клетки же и не может возникнуть иным путем.

Все биохимические процессы, связанные с получением энергии и синтезом биологических органических веществ, происходят внутри клетки. Внутри клетки же хранится и реализуется генетическая информация.

Внутри клетки находятся сотни тысяч различных ферментов и других белков, но ограниченное число их видов может специально выделяться во внешнюю среду. Углеводы находятся или внутри клеток или снаружи. Жиры и липиды, как правило, находятся внутри клеток, но могут и выделяться наружу (допустим, в наших сальных железах). А вот нуклеиновые кислоты в норме всегда находятся только внутри клеток.

Поговорим о самом простом – о размере клеток. Исключения как в большую, так и в меньшую сторону поразительны, но обычные размеры клеток прокариот – 0,5–5 мкм, а эукариот – 10–50 мкм. Мы все хорошо знаем миллиметр – одна тысячная метра. Микрометр – это одна тысячная миллиметра. Таково подавляющее большинство клеток. Потому что именно это – оптимальный размер всего хозяйства, организованного как живая клетка. Исключения представляют собой особые случаи. Давайте же их рассмотрим.

Желток любого яйца – одна клетка – а именно *яйцеклетка*. Соответственно яйцеклетка вымершего (не без помощи человека) мадагаскарского страуса эпиорниса достигала в объеме 6 л. У таких клеток основное клеточное хозяйство размазано в виде пластиночки на одной из сторон, все остальное пространство занято запасным веществом – желтком, представляющим собой определенные запасные белки (преимущественно лецитин), кроме того, в нем довольно много запасенной впрок матричной РНК. Однако все это вместе – одна клетка, окруженная клеточной мембраной.

Вы знаете, что нервные клетки общаются друг с другом при помощи особых отростков, являющихся частью клетки. При этом многие отростки, по которым сигнал собирается (*дендриты*), короткие, а один отросток, по которому передается (*аксон*), длинный. Нервная система моллюсков устроена таким образом, что сигналы от мозга передаются клеткам тела фактически без посредников. Соответственно длина аксонов гигантских кальмаров достигает пары десятков метров.

Кроме яиц вы постоянно сталкиваетесь с клетками, которые можно увидеть невооруженным глазом – в переспевшей мякоти яблока или арбуза. Там клетки немногим меньше миллиметра, но они в основном заполнены  огромными пузырьками с соком.

Клетки, в которых практически нет «ничего лишнего», т. е. которые представляют собой фабрики, но не склады – невелики. Особенно это касается клеток, которые активно делятся, прежде всего, клеток зародышей животных или растущих верхушек растений.

Самые мелкие клетки – 0,1 мкм в поперечнике – наблюдаются у *микоплазм* – своеобразных бактерий, до крайней степени упростившихся за счет своего образа жизни внутриклеточных паразитов.

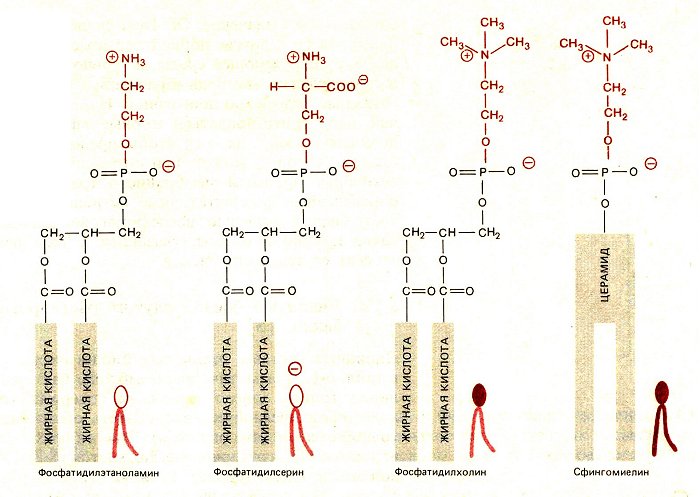
Главные свойства всех клеток одинаковы. Основные различия существуют между двумя типами организмов (мы уже знакомы с ними – это прокариоты и эукариоты), различия же между клетками одноклеточных и многоклеточных эукариот незначительны.

Рассмотрим важнейшие компоненты клетки.

**1. Клеточная мембрана**

Рассмотрим сначала, что есть общего у всех без исключения клеток. Пожалуй, главный атрибут клетки, который делает ее таковой, это *внешняя клеточная мембрана*, или *плазмалемма*. Она отграничивает клетку от внешней среды, часто наряду с клеточной стенкой. Однако клеточная стенка есть только у прокариот, растений и грибов, тогда как у животных ее нет. А мембрана присутствует всегда. Толщина клеточной мембраны – 5–7 нм. Как сказано ранее, микрометр – это одна тысячная миллиметра, а нанометр – одна тысячная микрометра. Вот о таких тонких материях мы с вами сейчас и рассуждаем.

Мембрана – это оболочка с весьма примечательными свойствами. Она не имеет постоянной формы, а ограничиваемое ею пространство – постоянного объема, и, вообще-то говоря, она жидкая, хотя и вязкая. Внутренний объем клетки она ограничивает силами поверхностного натяжения, которые существуют благодаря тому, что «жидкость» мембраны образована другой фазой – гидрофобной, не смешивающейся с водными растворами. Устройство мембраны замечательно. Ее основу составляют уже знакомые нам фосфолипиды – вещества с длинным двойным неполярным и, следовательно, гидрофобным хвостом и полярной головкой (рис. 7.1).



Фосфолипиды выстраиваются в два слоя – хвостами внутрь, головами наружу. Это называется липидный бислой. Их хвосты образуют ту самую несмешивающуюся с водой фазу – гидрофобную пленку, а головы ориентированы к водной среде снаружи и внутри клетки.

В водной среде фосфолипиды всегда располагаются в виде бислоя и образуют пузырьки. Это свойство обеспечивает замкнутость клеточной мембраны: если ее целостность нарушить, то она тут же восстанавливается.

Так же устроены молекулы детергентов – веществ, составляющих основу стирального порошка. Они потому и стирают, что связываются гидрофобной частью молекулы с гидрофобными, нерастворимыми в воде веществами грязи, а за счет гидрофильной части молекулы этот комплекс – грязь+ детергент – растворяются в воде.

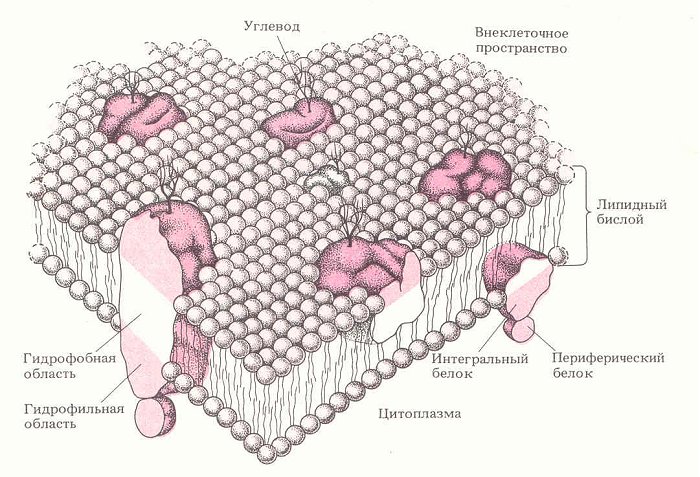
Все видели бензиновую пленку на лужах. Это тоже гидрофобная фаза, которая не смешивается с водой и располагается на поверхности. Но она очень текучая и не имеет упругости, а мембрана – вязкая и достаточно упругая на растяжение. С химической точки зрения клеточная мембрана больше похожа на пленку, образующую пузыри стирального порошка. Но опять-таки она более вязкая и упругая и по этим свойствам больше похожа на воздушный шарик.

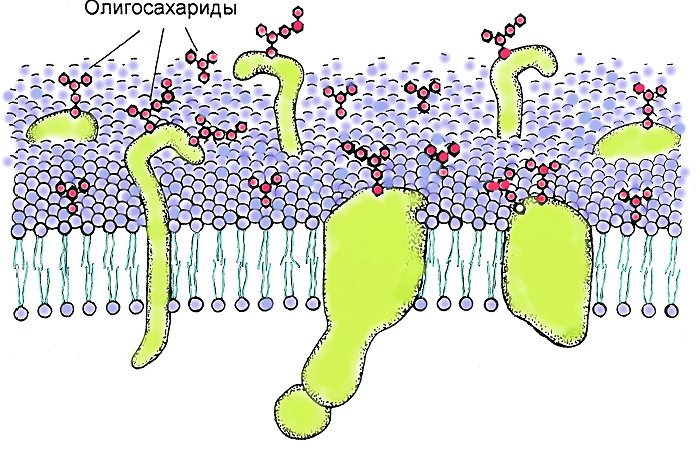
Кстати, в живой клетке непременно присутствует определенное избыточное давление. Это так называемое *осмотическое давление*. Природа его такова. Во внутриклеточной среде в растворе находится довольно много гидрофильных веществ – полярных органических веществ (например, сахара) и ионов (органические кислоты, аминокислоты и соли). Вода имеет сродство к ним за счет своего дипольного момента и водородных связей. Поэтому молекулы воды стремятся занять все свободные места возле молекул этих веществ – это выгодное энергетическое состояние. По этой причине каждая такая молекула гидратируется – окаймляется максимально большим количеством рыхло связанных с ней молекул воды. Как следствие вода притягивается к гидрофильным молекулам в клетке, накапливается внутри нее и создает там избыточное давление. В клетке поддерживается такая концентрация гидрофильных веществ, чтобы некоторое осмотическое давление имело место, но не такое сильное, чтобы оно могло разорвать клетку. Прочность мембраны и осмотическое давление, т. е. концентрация гидрофильных веществ во внутренней среде, подогнаны под оптимальное значение, и оно сказывается на объеме клетки, который может меняться в зависимости от осмотического давления.

Объемы нормальных функциональных клеток в нормальных для них условиях достаточно постоянны. Если поместить их в среду, где концентрация гидрофильных веществ вне клетки будет существенно меньше, чем внутри (такая среда называется *гипотоничной*), то клетка начнет разбухать, пока не лопнет, вследствие того что фосфолипидов мембраны не хватит на всю ее поверхность. Если же концентрация гидрофильных веществ во внешней среде будет много выше, чем в клетке, т. е. среда будет *гипертоничной*, то клетка начнет терять воду и сдуется. Может быть, вам знакомо такое понятие – физраствор. Это раствор поваренной соли, в которой его ровно столько, чтобы живые клетки не набухали и не сдувались, а их внутреннее осмотическое давление всегда слегка превосходило осмотическое давление раствора.

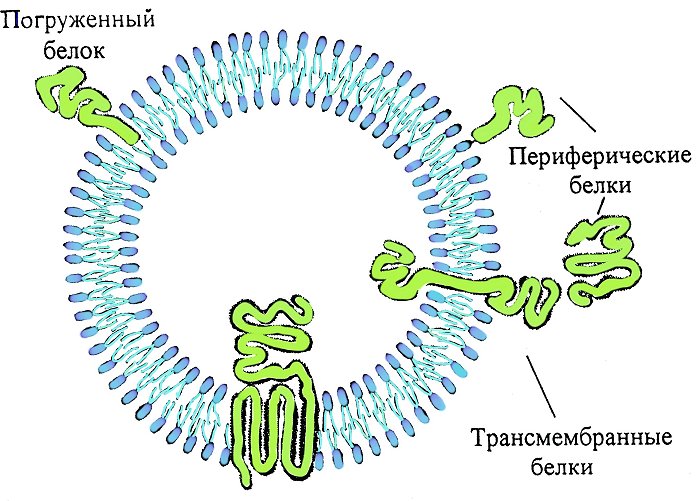
Осмотическое давление создают любые гидрофильные вещества. Это могут быть соли, а могут быть незаряженные вещества, например тот же сахар. И это используется в повседневной практике консервации продуктов  – именно из-за высокого осмотического давления бактерии не живут в варенье. Они там просто обезвоживаются.

Кстати, не вызвало ли вышесказанное такой вопрос: как вода проникает в клетку, если она окружена гидрофобной внутри мембраной? Детали этого процесса до конца не выяснены, но нужно принять во внимание, что двойной слой фосфолипидов – это не все, что есть в мембране, и гидрофобная пленка – не сплошная. Здесь не раз было сказано, что некие белки фиксированы на мембране. Так вот, мембрана вся насыщена белками и белковыми комплексами. В клеточной мембране белки могут уступать по массе фосфолипидам, а могут и превосходить. Как вы помните, у белков весьма велик диапазон варьирования гидрофильность / гидрофобность за счет варьирования аминокислотного состава гидрофильности. Белки, локализованные на мембране, заякориваются в гидрофобном слое фосфолипидных хвостов, а их гидрофильные, как правило, реакционноспособные части торчат внутрь и наружу клетки. При этом белок, погруженный в мембрану, за счет гидрофобного взаимодействия с фосфолипидами имеет совсем другую конформацию, чем тот же белок в водной среде. Вообще, расположение белков на мембране дало повод назвать описывающую ее модель плодоовощной - они там сидят, как огородные растения, имеющие корнеплоды, с глобулярной гидрофобной частью, погруженной в <почву> мембраны, и с гидрофильными частями в виде ботвы (рис. 7.3).





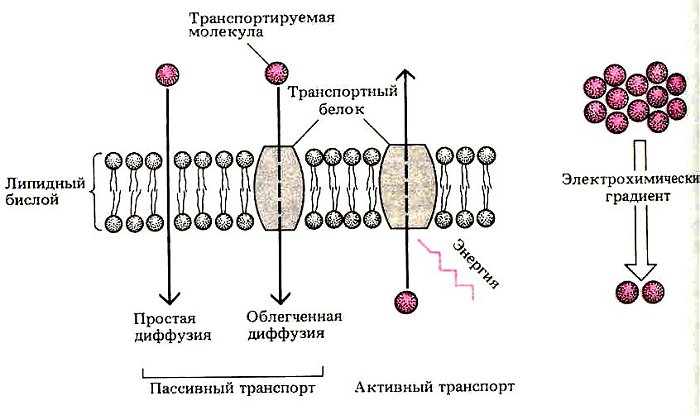
Участки некоторых белков пронизывают мембрану насквозь. Это так называемые *трансмембранные белки*.



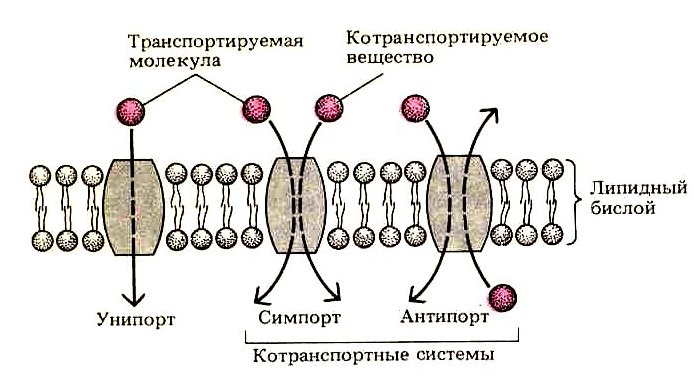
Иногда это целые белковые комплексы – поры. Вода и растворенные в ней простые вещества могут проникать через мембрану сквозь систему гидрофильных белков и пор – путем диффузии. Направление диффузии таково, что вещества идут из области с большей их концентрацией в область с меньшей. Это называется – по градиенту концентрации, или по химическому градиенту. Если вещества заряжены, то имеет значение и электрическое поле. Разные стороны клеточной мембраны могут иметь разный заряд, и это влияет на диффузию заряженных веществ – они идут по электрохимическому градиенту.

Некоторые липиды могут проникать в клетку путем диффузии непосредственно сквозь фосфолипидный слой. Все упомянутые способы перемещения веществ через мембрану объединяются термином *пассивный транспорт*.

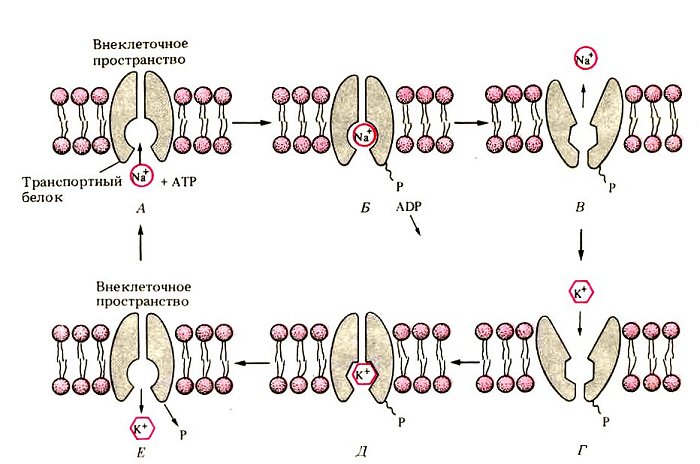
Но большая часть сложных веществ, включая, между прочим, и жирные кислоты с углеводородными цепочками свыше 10 атомов углерода, обмениваются через клеточную мембрану посредством специальных транспортных белков. Часть таких переносов проходит самопроизвольно, а часть требует затраты энергии, т. е. гидролиза молекулы АТФ. Первый случай называется *облегченным транспортом* через мембрану, а второй – *активным транспортом*. Если скорость диффузии зависит только от разности концентрации самого вещества, то скорость облегченного и активного транспорта – также и от концентрации транспортного белка в мембране, а скорость активного транспорта – еще и от концентрации АТФ. Разные типы трансмембранного транспорта представлены на схеме:



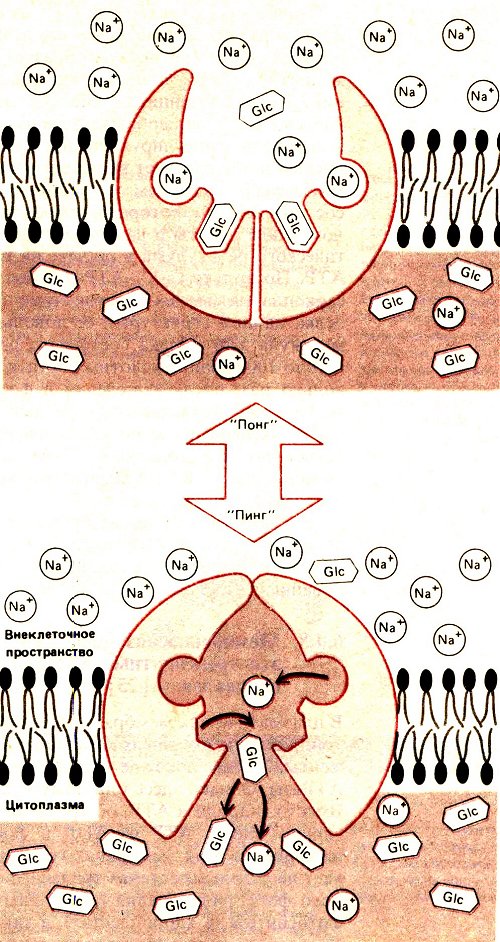
Кроме того, бывают случаи так называемого *котранспорта* – когда транспорт одного вещества через мембрану непременно связан с транспортом другого вещества, в том же самом или в противоположном направлении. Во втором случае транспортный белок фактически обменивает одно вещество на другое по разные стороны мембраны.



Однако активным транспортом переносятся не только <тяжелые грузы> - крупные и сложные органические молекулы. До 30 % всей энергии клетки затрачивается на поддержание разности концентраций внутри и снаружи неорганических ионов. Наиболее известный случай, и при этом пример котранспорта - это так называемый натрий-калиевый насос. Концентрация калия в наших клетках составляет около 100-150 ммоль, а в крови и плазме - в 30 раз меньше, всего около 5 ммоль. Концентрация натрия, наоборот, составляет 10-20 ммоль внутри и в 15 раз больше - около 145 мм - вовне. Как достаточно простые молекулы, ионы калия и натрия проникают за счет диффузии по градиенту своей концентрации наружу и внутрь соответственно. Причем ионы калия делают это в десятки раз быстрее: атом калия больше по диаметру, но за счет этого его ион меньше притягивает воду, поэтому он менее гидратирован, т. е. окружен меньшим количеством прилипших к нему молекул воды) - как следствие, эффективный диаметр иона калия в воде меньше, чем иона натрия. Натрий-калиевый насос катализирует гидролиз АТФ, при этом он фосфорилируется сам и одновременно открывается вовне клеточной мембраны, выталкивает связанный с ним ион натрия. Там он может связаться с ионом калия, что катализирует дефосфорилирование насоса и открывание его внутрь клеточной мембраны, с высвобождением иона калия внутрь. Таким образом, натрий-калиевый насос обменивает ионы натрия на ионы калия, делая это против градиента концентрации, тем самым поддерживая это далекое от равновесия со средой состояние клетки.



Оно не является самоцелью – разница в концентрациях этих ионов используется в самых различных процессах. Вот, к примеру, как организован транспорт глюкозы в клетку. Имеется белок – насос, перекачивающий глюкозу. Это некий трансмембранный белок,  имеющий центр, связывающий молекулу глюкозы. Кроме того, белок имеет два состояния: «пинг» – когда он открыт внутрь клетки, и «понг» – когда он открыт наружу. Причем белок переключается между этими состояниями случайным образом и безо всякой затраты энергии. Однако центр связывания устроен таким образом, что сила связывания молекулы глюкозы напрямую зависит от присутствия ионов натрия в среде. Соответственно молекула глюкозы прочно связывается с белком при большой концентрации ионов натрия, и непрочно – при маленькой. В состоянии «понг» белок открыт наружу клетки, где концентрация натрия гораздо выше, чем внутри. Поэтому в этом состоянии он преимущественно связывается с глюкозой. Если после этого он перейдет в состоянии «пинг» и откроется внутрь клетки, где натрия мало, молекула глюкозы тут же отсоединится от него.



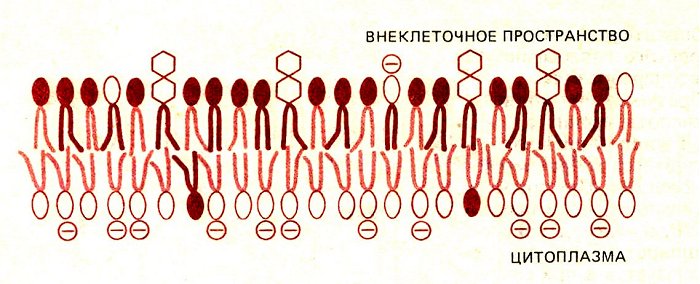
Таким образом, данный трансмембранный белок осуществляет транспорт глюкозы с той стороны мембраны, где концентрация ионов натрия велика, на ту сторону, где она низка, хотя у самого его нет никакого предпочтительного направления именно переноса глюкозы. И более того, работа этого насоса идет без всякой затраты энергии. Однако сам транспорт глюкозы идет с затратой энергии, а именно энергия тратится на создание самой разницы в концентрациях ионов натрия посредством натрий-калиевого насоса. Такое явление называется*вторичный активный транспорт*.

Разница в концентрации ионов натрия и калия используется также при передаче возбуждения по нервным клеткам. А разница в концентрации ионов кальция важна для мышечного сокращения.

Мы уже сталкивались с одним, пожалуй, наиболее важным специализированным трансмембранным транспортным комплексом – АТФ-синтетазой. Она не просто осуществляет пассивный транспорт протонов по градиенту концентрации, но и умудряется за счет этого синтезировать АТФ.

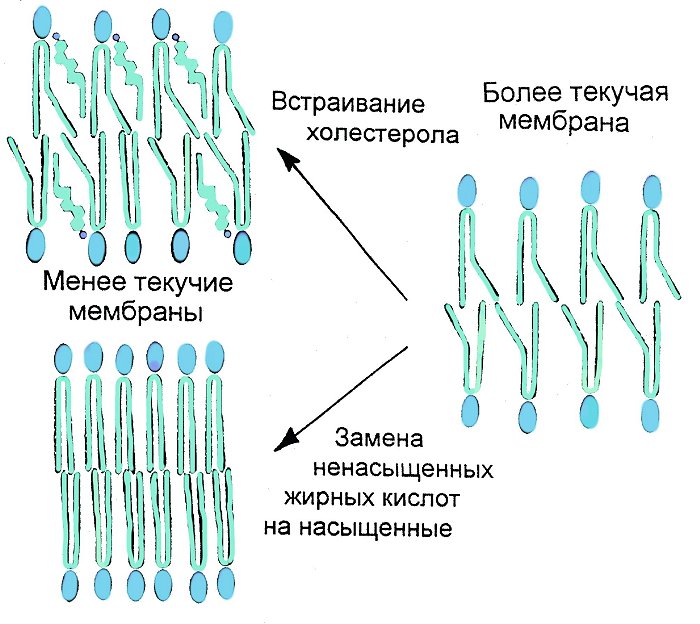
Кроме транспортной функции, мембранные белки могут осуществлять передачу сигнала извне клетки внутрь нее. Этим занимаются *рецепторы* – гормонов, медиаторов или физических воздействий. Рецепторы гормонов и медиаторов взаимодействуют со своими субстратами, в результате чего меняют конформацию, связываются с другими белками и вместе с ними погружаются внутрь клетки, передавая сигнал в ядро.

Необходимо отметить, что молекулы фосфолипидов и белков могут беспрепятственно перемещаться вдоль мембраны – это называется текучесть мембраны. Но они почти не перемещаются поперек, т. е. не переходят из внутреннего слоя во внешний и наоборот. И фосфолипидный состав слоев часто довольно существенно отличается. В частности, на внутреннем слое мембраны обычно преобладают фосфолипиды с отрицательно заряженными головками.



Аналогично, а частично и в силу этого мембранные белки не меняют свою ориентацию – внутрь или наружу – относительно клеточной мембраны.

Далее, текучесть мембраны зависит от температуры – как вы догадываетесь, связь этих параметров прямая. Фосфолипиды с предельными жирными кислотами дают более вязкую мембрану, чем с непредельными. Так что у клетки есть возможность влиять на текучесть своих мембран (а значит, и на крепость своей внешней границы) путем синтеза тех или иных фосфолипидов.



Многие белки мембраны несут на своих частях, обращенных вовне, нерегулярные олигосахариды строго определенной структуры – такие белки называют *гликопротеидами*. Это своего рода опознавательные знаки клетки. Через них осуществляется ее специфическое узнавание другими клетками или специальными белками. Иногда специфические олигосахариды присоединены к липидам – это *гликолипиды*. Например, группа крови определяется присутствием либо отсутствием одного из двух или обоих олигосахаридов определенной структуры на внешней стороне мембраны эритроцитов.

**2. Клеточная стенка**

Как вы понимаете, плазмалемма – очень непростая оболочка. Она может менять форму и площадь поверхности. Благодаря разнообразным белкам она может пропускать или не пропускать самые разные наборы вещества. Но это полужидкая и неизбежно очень нежная оболочка, которая вряд ли может предотвращать клетку от серьезных механических повреждений. Поэтому у многих организмов клетка окружена еще и *клеточной стенкой*. Это жесткое мало- или совсем нерастяжимое образование, внешнее по отношению к клетке. Как правило, она в той или иной степени сохраняет форму, упруга и прочна, в ряде случаев – очень прочна и обладает изрядной толщиной. Она состоит из веществ, вырабатываемых внутри клетки, выделяемых ею наружу и там затвердевающих. Чаще всего основу клеточной стенки составляют полисахариды. Но иногда большая часть стенки представлена другими твердыми органическими веществами.

Именно клеточные стенки наблюдали создатели первых микроскопов, и именно им, клеточным стенкам древесины, мы обязаны самим словом «клетка», так как сначала ученые увидели только стенки и лишь много позже получили представление о содержимом.

Можно было бы сказать, что клеточная стенка – явление универсальное, если бы не одно важнейшее исключение. Клеточной стенки нет у животных. Ни у одного животного и ни у одной клетки! И у нас с вами, естественно, тоже. Индивидуальные клетки животных могут нести на внешней поверхности определенные структурные белки, которые никогда не образуют плотной стенки. У многоклеточных животных могут быть сколь угодно прочные и толстые внешние покровы всего организма и отдельных органов, но их нет у индивидуальных клеток. Нет клеточной стенки и у одноклеточных животных – простейших. Именно поэтому возможны такие существа, как амебы, которые меняют форму своего тела, перетекая в выпячивания своего тела произвольной формы. Многие простейшие окружены известковой (в том числе и некоторые амебы) или кремниевой раковиной, часто очень сложного строения, но никогда плотной органической оболочкой.

Кроме животных на свете, как вы знаете, существуют растения, грибы и бактерии. Хороший вопрос: где граница между животными и растениями? Вы, наверное, слышали, что есть такая эвглена зеленая – то ли животное, то ли растение, которая плавает при помощи жгутика, зеленая и фотосинтезирующая на свету и бесцветная (только что не пушистая) и питающаяся бактериями и тому подобным в темноте. Ее часто выдают за «промежуточное звено между растениями и животными». У нее клеточной стенки нет. Похоже, на самом деле эвглена – это животный жгутиконосец, который носит в себе бывшую водоросль в виде хлоропласта с тройной мембраной. Обычно хлоропласты имеют двойную мембрану, еще одна мембрана, возможно, указывает на происхождение того, что под ней, от другого одноклеточного организма – водоросли, имевшей единственный хлоропласт. (А откуда взялись нормальные хлоропласты – мы еще рассмотрим.)

Другие одноклеточные зеленые жгутиконосцы (а их не так и много) клеточную стенку имеют и в этом смысле являются растениями. Наверняка они не очень-то и родственны «животным» жгутиконосцам, потому что плавание при помощи жгутика – вещь достаточно универсальная, и свободноживущие фотосинтезирующие жгутиконосцы могли возникнуть даже за счет упрощения каких-то многоклеточных форм, к примеру из их половых клеток, которые «начали самостоятельную жизнь».

Итак, животные отличаются от всех прочих живых существ тем, что утратили клеточную стенку. Это сделало их уязвимыми, но дало гибкость и подвижность, что немаловажно для их по сути хищнического существования – за счет поедания других организмов.

Клеточная стенка бактерий и растений состоит в основном из полисахаридов. У растений основу клеточной стенки составляет целлюлоза, гемицеллюлоза и*пектин*. Последнее – аморфное, не очень плотное вещество. Клеточная стенка растений обычно организована как железобетонная конструкция: волокна целлюлозы выполняют роль стальной арматуры, а пектин – цемента. Все знают, что такое волокна целлюлозы и где мы с ними сталкиваемся? Вата, хлопчатобумажные и льняные ткани, бумага (в последнем случае мы фактически имеем дело с их обрывками).

В клетках древесины к полисахаридам добавляется лигнин – сложный полимер органических спиртов, который составляет значительную часть их чрезвычайно толстой клеточной стенки.

**У бактерий осно**вным компонентом клеточной стенки является гликопептид *муреин* – полимер, в состав которого входят сахара, несущие аминогруппы, и короткие пептиды по 4–5 аминокислотных остатков. Может быть, будет полезно знать, что по типу клеточной стенки бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные (это различия в окраске при технологии окрашивания по Граму). У грамположительных бактерий стенки толще, но внутренняя структура не выявляется: кроме муреина там есть другие полисахариды. У грамотрицательных стенки тоньше, но в них выявляются слои: внутренний состоит из муреина, затем идет слой неплотно упакованных молекул белка, а потом – из липополисахаридов. Снаружи многие бактерии окружены слизистой капсулой.

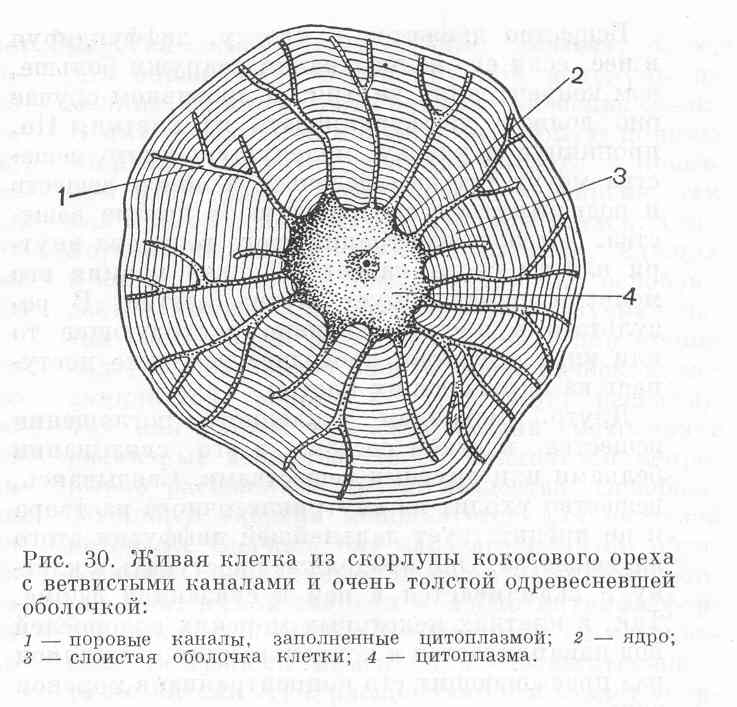
В клетках бактерий поддерживается очень высокое осмотическое давление, которому толстая клеточная стенка призвана противостоять. Именно клеточная стенка придает бактериям характерную форму, по которой прежде всего и идет их классификация: форму шариков имеют кокки, форму палочек – бациллы, форму запятых – вибрионы, форму плавных спиралей – спириллы, тонких частых спиралей – спирохеты, форму с многими нитчатыми отростками – актиномицеты.

Клеточная стенка грибов состоит в основном из хитина – это, как вы помните, также азотсодержащий полисахарид, очень прочный и инертный.

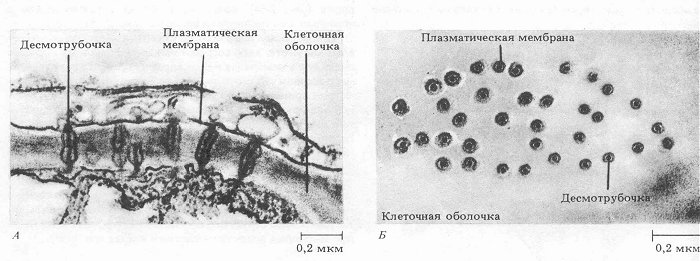
Поразительна клеточная стенка археобактерий, состоящая в основном из полимера на основе изопрена – непредельного пятиуглеродного углеводорода, являющегося основной для каучука, т. е. резины! (Еще конденсация изопрена используется при синтезе терпенов и стероидных гормонов.) Получается, что химически их клеточная стенка родственна пластмассам и полиэтиленам. Вспомним, что галобактерии из археобактерий не умеют усваивать сахара, а утилизируют только аминокислоты. Судя по всему, эта форма жизни не умеет как следует обращаться с углеводами.

Клеточная стенка одноклеточных диатомовых водорослей состоит из неорганического вещества – кремнезема, поэтому ее, возможно, следовало бы считать не клеточной стенкой, а раковиной. Но так как диатомовые водоросли, как фотосинтезирующие эукариоты с хлоропластами, все же приходится относить к растениям, то и их покровы принято считать клеточной стенкой.

Для жизни клетка должна химически взаимодействовать с окружающей средой, а клеточная стенка как раз призвана это взаимодействие прервать, так как в отличие от плазмалеммы она непроницаема для большинства веществ. Поэтому в определенных, удобных для данной клетки местах в клеточных стенках имеются поры. На следующей схеме показана крайняя степень развития клеточной стенки - в клетке скорлупы кокосового ореха - где видны, соответственно, наиболее впечатляющие поры.



Сквозь поры проходят цитоплазматические мостики, соединяющие растительные клетки друг с другом - *плазмодесмы*. Вот как выглядят плазмодесмы, связывающие две клетки листа кукурузы:



А вот во что они превращаются в толстых оболочках клеток питательной ткани семени хурмы:



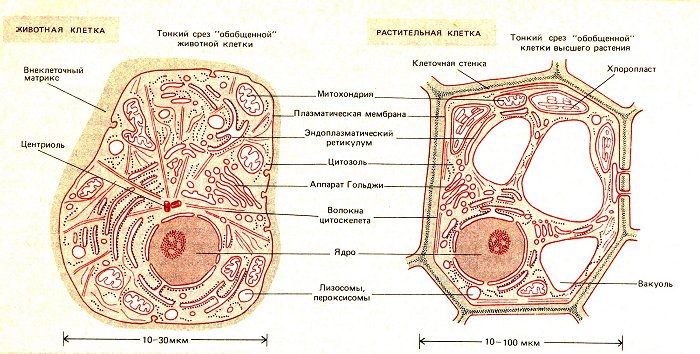
Некоторые (допустим, мужские половые) клетки растений не имеют клеточной стенки. Другие (почти все) их клетки можно лишить клеточной стенки искусственно (такая клетка называется «протопласт»), и это вполне совместимо с жизнью. Такая клетка строит себе новую клеточную стенку. А ее «голое» состояние бывает необходимо в технологиях, связанных с культурой клеток.

Собственно, на этом клеточные структуры, общие прокариотам и эукариотам заканчиваются, и дальше мы будем в основном иметь дело со структурами эукариотических клеток.  Ну и начнем с главного, что делает их эукариотами (в переводе с греческого – «истинноядерными»), – с ядра.

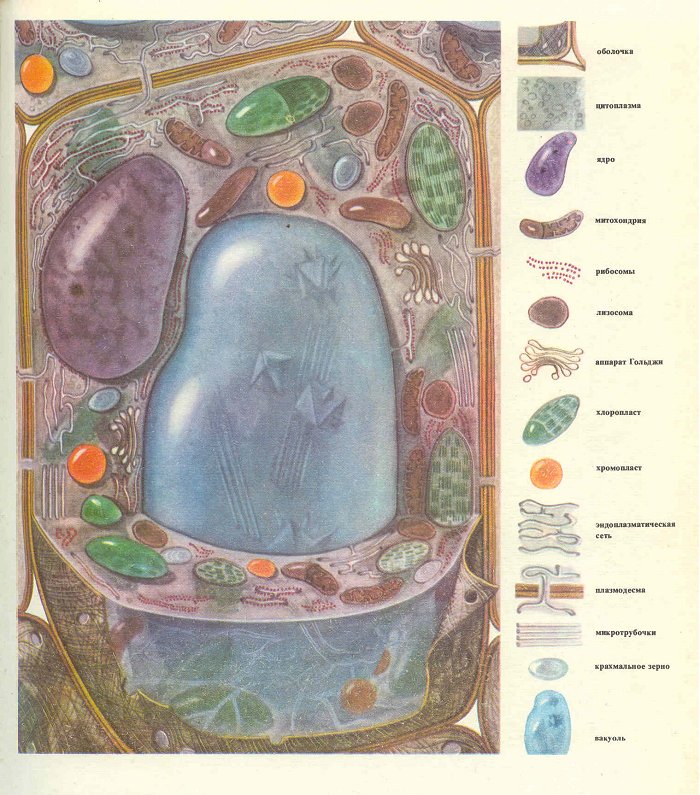
**3. Ядро**

Внутреннее содержимое клетки выглядит бесструктурным, и чтобы визуализовать различные структуры перед тем, как рассматривать под микроскопом клетки, их обычно окрашивают теми или иными красителями. Применение большинства их них (даже неспецифических) к клеткам эукариот выявляет прежде всего ядро как крупную структуру, находящуюся чаще всего близко к середине клетки и более или менее сферической формы (но здесь бывают поразительные исключения). Преобладание сферической формы понятно – если мы внутри жидкости изолируем каплю другой жидкости жидкой же мембраной, то она примет сферическую форму. Это своего рода форма по умолчанию, которая может видоизменяться в случае особой внутриклеточной структуры.

Вот здесь показана схема эукариотической (животной и растительной) клетки, с типичным ядром



И вот здесь еще - растительной. Здесь вы видете ядро, смещенное к одной из стенок и немного вытянутое:



Эукариотические клетки без ядра представляют собой такое же исключение, как всадник без головы. Это значит, что дни такой клетки сочтены и она скоро выполнит свою функцию и погибнет. Самый яркий и едва ли не единственный пример – красные кровяные клетки (эритроциты) млекопитающих. Что характерно, у наших ближайших родственников – рептилий и птиц – ядра в эритроцитах есть. Такая обязательность ядра связана с тем, что ядро действительно является головой клетки – местом, где хранится и обрабатывается информация. Хранится там информация генетическая, а обрабатывается внешняя, пришедшая в виде тех или иных химических сигналов.

Что находится в ядре? Понятно, что там должна находиться ДНК, но есть еще и хороший ответ на все случаи жизни – белки. Белков там хватает самых разных – вспомним хотя бы ДНК- и РНК-полимеразы, белки – генные активаторы и репрессоры. Однако больше всего там структурных белков, которые связываются с ДНК и обеспечивают ее правильную упаковку. Комплекс ДНК и белков в ядре принято называть *хроматином*. (Название «хроматин» вводилось для обозначения вещества хромосом, а слово «хромосома» переводится как «цветное тело» – такое название они получили за счет интенсивного прокрашивания цитологическими красителями).

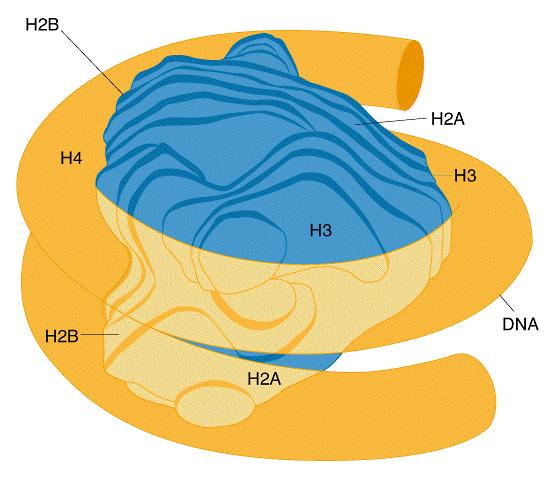
Кстати, такой вопрос: какое вещество в клетке имеет наибольшую молярную концентрацию? Вода конечно же! Немногим меньшую, чем в чистой воде. Молярная концентрация имеется не только у растворенных в воде веществ, но и у самой воды. Молярная концентрация воды в воде составляет- 18,5 моль / л. А какое вещество имеет наименьшую молярную концентрацию? ДНК! Сколько молекул ДНК содержится в ядре клеток человека? 46 или 92! Ровно столько, сколько у человека хромосом, или вдвое больше (угадайте почему). Каждая хромосома - это одна молекула ДНК. И в этих-то 46 молекулах, в каждой клетке, дважды записана информация о всех белках (а их сотни тысяч) и РНК (короткие некодирующие РНК пока никто не сосчитал) всего человеческого организма.

Суммарная длина молекул ДНК человека достигает в длину около 2 м. О хромосомах мы поговорим несколько позже, а сейчас просто осознаем тот факт, что 2 м ДНК нам нужно упаковать в ядро диаметром 5–10 мкм (т. е. в 500 тыс. раз меньше). Причем упаковать так, чтобы она имела возможность осмысленно работать – синтезировать нужные белки в нужном месте, в нужное время и в нужном количестве! И заметим, что гены почти равномерно раскиданы по всей ДНК, в том числе и нужные в любой конкретный момент. Это достигается несколькими уровнями упаковки нити ДНК, для которой у меня нет подходящей аналогии из нашей обыденной жизни. Магнитная лента не подойдет, так как, чтобы прочитать с нее какое-то место, до него нужно последовательно домотать. Натянутая, но более верная аналогия будет тут с книгой. Суммарная площадь книжных страниц в сотни раз больше площади поверхности закрытой книги. При этом книгу можно раскрыть в любом нужном месте и прочитать все, что нужно. А сделав закладки, – даже в нескольких местах сразу. Но это один уровень упаковки. Вообразим теперь книгу, все страницы в которой представляют собой раскладные вклейки. Мы получим два уровня компактной упаковки информации. Что-то такое имеет место и с ДНК, только информация там записана не на плоскости, а на линии, и уровней упаковки больше.

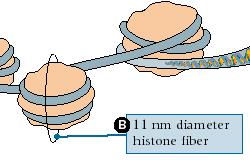
Более того, нужно вспомнить, что ДНК - какая-никакая, а все же кислота. Если мы вознамеримся плотно упаковать полианион, нам придется действовать против электростатического отталкивания и мы вряд ли преуспеем. Следовательно, чтобы упаковать ДНК, необходимо также нейтрализовать ее отрицательный заряд каким-то положительным зарядом.

Такая многоуровневая упаковка ДНК достигается за счет белков. Два самых нижних уровня упаковки обеспечиваются белками, имеющими в хроматине наибольшее количественное содержание и называемыми *гистоны.* Молекулы гистонов в целом положительно заряжены, за счет этого они и связываются с отрицательно заряженной ДНК. Cуществует пять типов гистонов – четыре аргинин-богатых и один лизин-богатый. Молекулы первых четырех (они обозначаются Н2a, H2b, H3 и H4) формируют единый белковый комплекс диаметром около 10 нм – коровую частицу, на которую наматывается (2,5 оборота) кусок ДНК. Коровая частица с намотанной на нее ДНК называется *нуклеосомой*. Нуклеосомы располагаются на частично свернутой ими молекуле ДНК как бусинки.





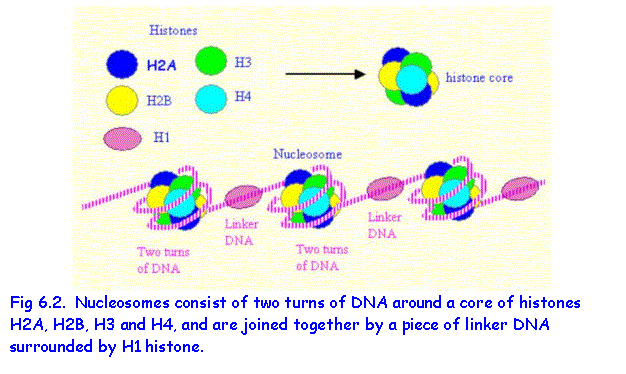
Нуклеосомы располагаются на частично свернутой ДНК как бусинки.



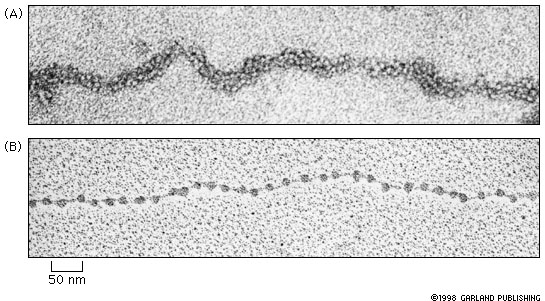
Кстати, конкретное расположение нуклеосом на ДНК связано с тем, должна или не должна на этом участке идти транскрипция. Когда хроматин становится *транскрипционно-активным*, расположение нуклеосом на нити ДНК меняется. Более того, существует явление, образно называемое гистоновым кодом. Коровые гистоны подвержены различным вторичным модификациям - к ним присоединяются метильные группы, остатки фосфорной кислоты, ацетильные группы, небольшой белок убиквитин. Это присоединение возможно лишь в строго определенных позициях гистонов (как правило, указанных группы присоединяются к положительно заряженным остаткам лизина или аргинина). Состав модифицированных гистонов в хроматине определяет его транскрипционную активность - по сути она сводится к плотности упаковки и доступности для РНК-полимераз. Так, модификации с присоединенными остатками кислот уменьшают общий заряд молекулы и как правило способствует разрыхлению хроматина. За счет так называемого кооперативного эффекта - а данном случае речь идет о том, что посадка молекул определенного типа на ДНК облегчает посадку таких же молекул во время ее репликации - определенное состояние отдельных участков хроматина может наследоваться в ряду клеточных поколений. Этим во многом объясняется тот факт, что клетки определенного типа как правило дают при делении клетки того же типа, то есть в дочерней клетке работают обычно те же гены, что работали в материнской, притом что каждая клетка имеет всю ДНК, характерную для данного вида.

С участком ДНК между нуклеосомами связывается пятый, лизин-богатый гистон Н1. В результате нить бусинок сворачивается в фибриллу  диаметром 30 нм.

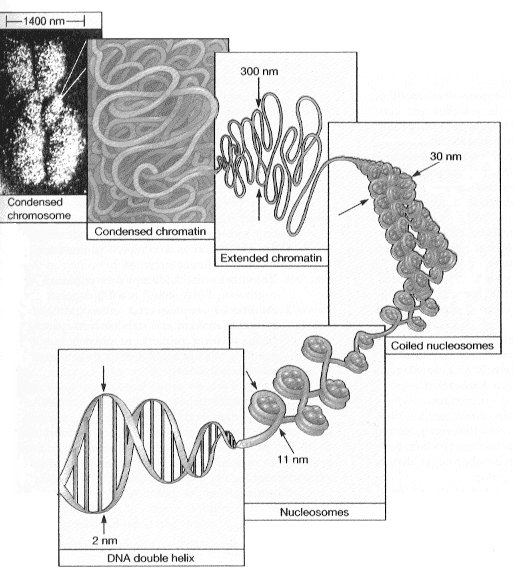




Цепочку нуклеосом и фибриллу диаметром 30 нм можно увидеть даже под электронным микроскопом:

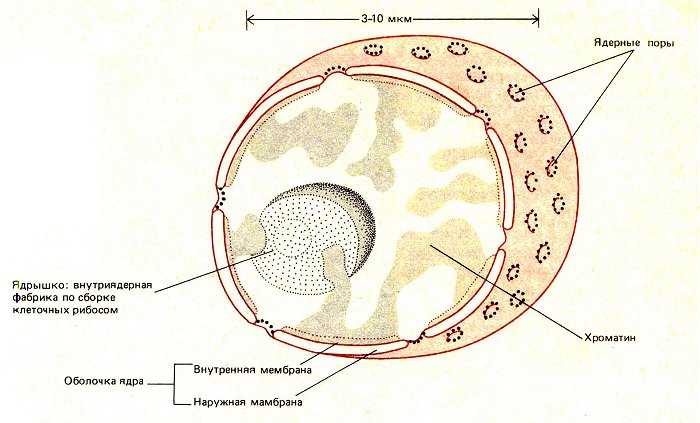


В свою очередь, фибрилла диаметром 30 нм еще несколько раз сворачивается в упаковку более высокого порядка при помощи других, *негистоновых белков хроматина*, которые пока хуже изучены и не так широко известны. На следующем сделана попытка показать уровни упаковки ДНК в хроматин.



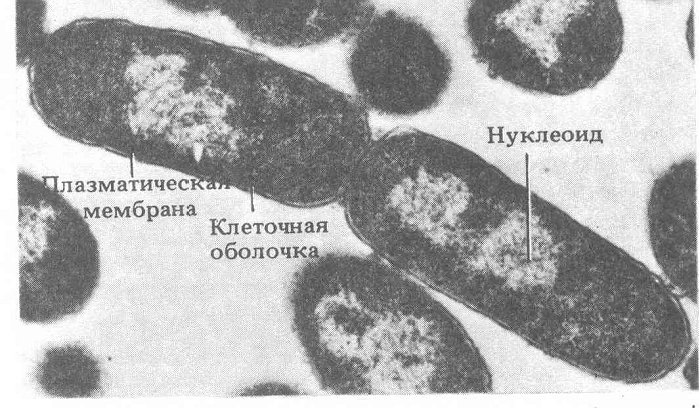
Ядро окружено не одной мембраной, а двумя. Сложные белковые механизмы – *ядерные поры* – пронизывают обе ядерные мембраны, которые в области пор замыкаются друг на друга. Становится ясно, что обе ядерные мембраны, по сути, представляют одну и ту же мембрану. Вероятно, она происходит от замкнувшегося на себя впячивания внешней клеточной мембраны вокруг области, занятой ДНК. На такие мысли наталкивает строение этой области у бактерий.

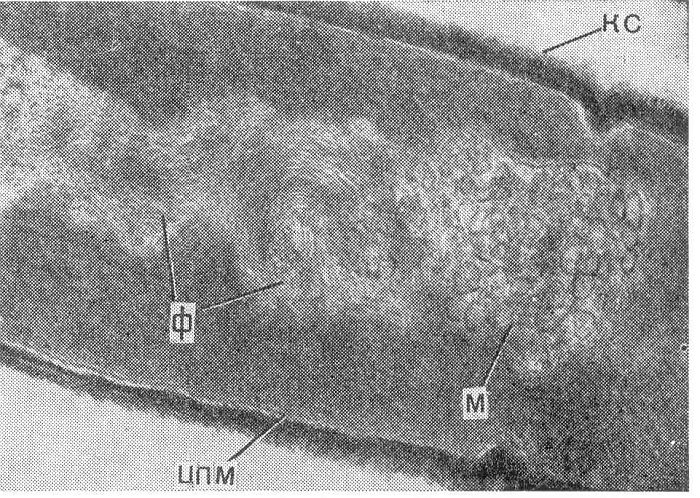
Вот здесь показана схема ядра:



Действительно, интересно посмотреть, чем обходятся вместо ядра прокариоты. У них тоже есть ДНК и с ней тоже связаны белки, но это не гистоны, да и количество их в расчете на ДНК существенно меньше, чем у эукариот. Молекула ДНК прокариот многократно короче (так как, в отличие от эукариот, в ней нет ничего лишнего) и не требует такой сильной упаковки. (Тем не менее, ДНК покоящихся бактерий часто упакована, опять-таки при помощи белков, практически до кристаллического состояния.) У большинства бактерий большинство генов заключается в одной молекуле ДНК, которая замкнута в кольцо. Она по аналогии с эукариотами обычно тоже называется хромосомой, хотя ее нельзя увидеть под световым микроскопом так, как бывает видно эукариотические хромосомы. Кроме того, в бактериальной клетке обычно имеется произвольное количество небольших кольцевых ДНК, называемые*плазмиды*. Бактерии легко обмениваются плазмидами, которые часто кодируют отдельные ситуационно-полезные признаки, например устойчивость к какому-то антибиотику. Несколько лет назад в журнале *Nature* был опубликован полный геном спирохеты, которая вызывает бореллиоз, или болезнь Лайма. (Эта болезнь, передающаяся клещами и распространенная у нас не менее энцефалита, но не такая знаменитая.) У этой спирохеты ДНК представлена фрагментами самого разного размера, частично кольцевыми, частично линейными, причем размерной границы между «хромосомами» и плазмидами не существует.

ДНК в клетке бактерий не распределена по всему объему, а собрана в довольно большой центральной области клетки. Под микроскопом эта область выглядит как имеющая другую плотность. Она получила название *нуклеоид*, т. е. <подобный ядру>.





Рядом с нуклеотидом есть так называемая *мезосома –*образование из множества плотно упакованных мембран, которые считаются впячиванием внешней мембраны.

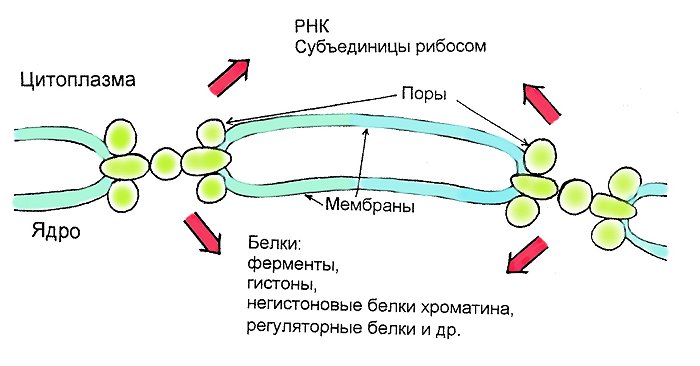
Известно, что бактериальная «хромосома» прикреплена к внешней клеточной мембране и рост последней обеспечивает расхождение двух «хромосом» после их репликации, так что при образовании перетяжки и делении бактерии на две в каждую попадает одна копия. Считается, что мезосома имеет ко всему этому непосредствнное отношение – именно здесь хромосома присоединяется к мембране и именно мезосома участвует в ее росте. Мезосомы играют роль в репликации хромосомы и ее последующем расхождении по дочерним клеткам, участвуют в процессе инициации и формирования поперечной перегородки при делении. Не исключено, что после удвоения ДНК участок клеточной мембраны, который должен вырасти между ними, формируется  именно в мезосоме. Имеются данные, что мезосомы же играют роль в клеточном дыхании (мы помним, что для этого нужны мембранные компартменты).

У эукариот хромосомы тоже присоединяются концами к определенным местам ядерной оболочки. Получается, что мезосома прокариот в каких-то функциях сходна с ядерной оболочкой эукариот. Только представляет собой мембрану, не одевающую нуклеоид, а сложенную рядом, как надетая и снятая одежда.

Вернемся к эукариотам, а именно к ядерным порам. Они нам были нужны как места, где мембрана замыкается на себя, теперь взглянем на них как на сложные шлюзы для транспорта веществ в ядро и обратно. Все, что находится внутри наружной клеточной плазматической мембраны, но не является ядром, называется *цитоплазмой*. Одно из главных функциональных отличий ядра и цитоплазмы состоит в том, что синтез РНК идет только в ядре, а синтез белков – в цитоплазме (хотя в последнее время появились данные, что до 15% синтеза белка идет в ядре). А как вы, надеюсь, помните, для синтеза РНК нужны определенные ферменты, которые тоже белки. Кроме того, в ядре нужны такие белки, как гистоны, и другие белки, упаковывающие ДНК в хроматин, ферменты, участвующие в репликации ДНК, а также множество специфичных генных регуляторов – активаторов и репрессоров – также белковой природы. Это означает, что ядерные поры должны пропускать наружу мРНК в комплексе со специальными белками, а внутрь – белки, необходимые в ядре.

Еще важная статья ядерного экспорта – субъединицы рибосом. Они, как вы помните, состоят из рРНК и нескольких десятков белков. Это продукты из разных стран происхождения. Цех по сборке почему-то находится именно в ядре и называется *ядрышко*. Субъединицы рибосом транспортируются обратно в цитоплазму.

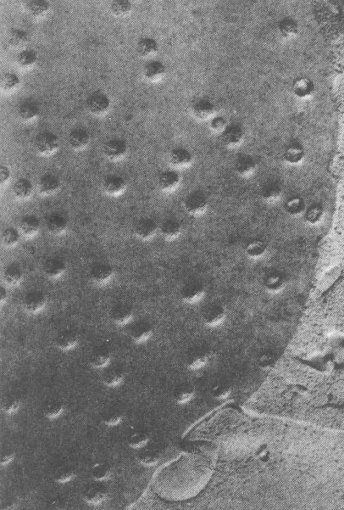
Вот схема транспорта через ядерную оболочку:



Таким образом, ядерные поры аналогичны не дыркам в заборе, через которые что-то может быть утащено, нет, это сложно устроенные таможни, где компетентные белковые структуры обслуживают строго регламентированный трансграничный транспорт. Для того чтобы быть импортированным в ядро, белок должен нести особую акцизную марку – пептид ядерного транспорта. Это короткий пептид, состоящий из нескольких аминокислотных остатков. Он навешивается на готовые белки, которые должны быть перенесены в ядро после их синтеза, причем неважно, на какое именно место его навесили. Когда такой белок случайно оказывается рядом с ядерной порой, она опознает его по пептиду ядерного транспорта и затаскивает внутрь.

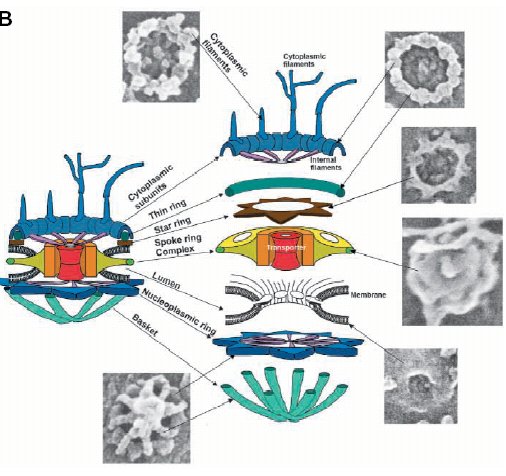
При транспорте мРНК через ядерную пору связанные с ней ядерные белки заменяются на цитоплазматические, т. е. мРНК следует как транзитный багаж, передаваясь из рук в руки разными компаниями грузчиков. (Можно также представить это как переодевание РНК в национальную одежду при пересечении границы.)

Ядерные поры на поверхности ядра под сканирующим электронным микроскопом выглядят так:

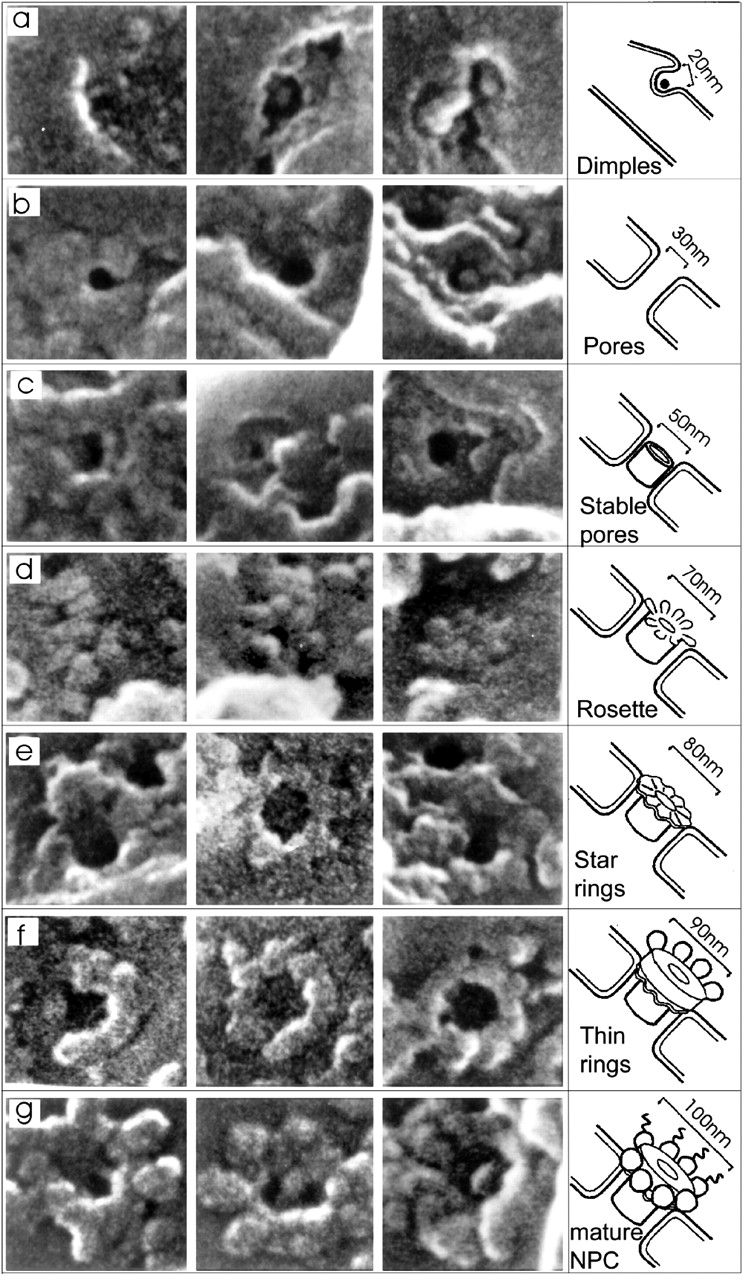


Ядерные поры достаточно велики, и отдельные их белковые элементы могут быть видны в электронном микроскопе. В Институте цитологии и генетики новосибирского Академгородка этими исследованиями с успехом и во взаимодействии с англичанами занимается группа под руководством Е. В. Киселевой. На следующем рисунке приведена схема ядерной поры, взятая из работы этой группы.

схема строения ядерной поры, с электронной микрофотографией всех ее элементов:



и электронные микрофотографии ядерной поры в процессе сборки при восстановлении ядерной мембраны после деления клетки:



**Величина клеток микобактерий**  меняется в зависимости от вида культуры и состава среды. В молодом возрасте чаще всего клетки имеют длину 2 5 - 7 0 мкм. Нередко встречаются организмы, величина которых не превышает 2 - 3 и даже 1 - 2 мкм; немало форм и с более длинными клетками, 10 - 15 мкм. Поперечник клеток у разных видов микобактерий также различен; чаще всего он равен 0 6 - 0 7 мкм. Однако нередко встречаются культуры с толщиной клеток 0 2 - 0 3 и 0 8 - 1 0 мкм. Толщина клеток микобактерий - величина более постоянная, чем длина. [**[4]**](http://www.ngpedia.ru/pg19086927mT3gkX0004357295)

Помимо физиологических особенностей тех или иных культур микроорганизмов эффективность их применения в производстве определяют**величина клеток**  и их способность выделяться из среды при сепарировании и флотировании. [**[5]**](http://www.ngpedia.ru/pg5167041vL2G5aS0005357295)

Это было интересное упражнение, потому что акция пересекала линию смены масштаба пару раз, демонстрируя развороты на три клетки в тех местах, где**величины клеток**  были равны и 1 / 2 пункта, и 1 пункту. [**[6]**](http://www.ngpedia.ru/pg61184264UmpNmn0006357295)

Этот график является очень долгосрочной картиной поведения Доу-Джонса. **Величина клетки**  равна 20 пунктам и требуется 60 клеток, чтобы развернуться на трех клетках. [**[7]**](http://www.ngpedia.ru/pg0673406E1xdZyp0007357295)

Индуцированная колхицином форма S. Однако в дальнейшем полиплоидная природа этой формы по показателям**величины клеток**  и ядер и содержанию ДНК в клетке не была подтверждена. [**[8]**](http://www.ngpedia.ru/pg3370789OcJeSOz0008357295)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| [[9](http://www.ngpedia.ru/searchdata/?squery=%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B0%20%D1%81%20%D0%B3%D0%B8%D1%84%D0%B0%D0%BC%D0%B8%20(%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0%D0%BC%D0%B8,%20%D0%B1%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%BA%D0%B0%D1%8F%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BC%D0%BE%D1%80%D1%84%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D0%B8%20%D0%BA%20%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B7%D0%BC%D0%B0%D0%BC%20%D0%B8%D0%B7%20%D1%80%D0%BE%D0%B4%D0%B0%20Ancalomicrobium.%20%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%8F.%20...&search_area=0)](http://www.ngpedia.ru/searchdata/?squery=%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B0%20%D1%81%20%D0%B3%D0%B8%D1%84%D0%B0%D0%BC%D0%B8%20(%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0%D0%BC%D0%B8,%20%D0%B1%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%BA%D0%B0%D1%8F%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BC%D0%BE%D1%80%D1%84%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D0%B8%20%D0%BA%20%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B7%D0%BC%D0%B0%D0%BC%20%D0%B8%D0%B7%20%D1%80%D0%BE%D0%B4%D0%B0%20Ancalomicrobium.%20%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%8F.%20...&search_area=0) |  | [Клетка с гифами ( простеками, близкая по морфологии к организмам из рода Ancalomicrobium. Электронная микрофотография. Увел, х 20 000.| Клетка Hyphomicrobium с двумя стебельками. Электронная микрофотография. Увел. X 20 000.| Последовательность роста гиф и почек Hyphomicrobium. ( Цифры означают поэтапность перехода к росту разных участков гиф и почек. Схема.](http://www.ngpedia.ru/searchdata/?squery=%D0%9A%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B0%20%D1%81%20%D0%B3%D0%B8%D1%84%D0%B0%D0%BC%D0%B8%20(%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0%D0%BC%D0%B8,%20%D0%B1%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%BA%D0%B0%D1%8F%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BC%D0%BE%D1%80%D1%84%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D0%B8%20%D0%BA%20%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B7%D0%BC%D0%B0%D0%BC%20%D0%B8%D0%B7%20%D1%80%D0%BE%D0%B4%D0%B0%20Ancalomicrobium.%20%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%8F.%20...&search_area=0) [**[9]**](http://www.ngpedia.ru/pg127vCet5n929C352C7h90009357295) |

Строение клеток

Клетки всех организмов имеют единый план строения, в котором четко проявляется общность всех процессов жизнедеятельности. Каждая клетка включает в свой состав две неразрывно связанные части: цитоплазму и ядро. Как цитоплазма, так и ядро характеризуются сложностью и строгой упорядоченностью строения и, в свою очередь, в состав их входит множество разнообразных структурных единиц, выполняющих совершенно определенные функции.   
Оболочка. Она осуществляет непосредственное взаимодействие с внешней средой и взаимодействие с соседними клетками (в многоклеточных организмах).   
Оболочка - таможня клетки. Она зорко следит за тем, чтобы в клетку не проникли ненужные в данный момент вещества; наоборот, вещества, в которых клетка нуждается, могут рассчитывать на ее максимальное содействие.  
Оболочка ядра двойная; состоит из внутренней и наружной ядерных мембран. Между этими мембранами располагается перинуклеарное пространство. Наружная ядерная мембрана обычно связана с каналами эндоплазматической сети.  
Оболочка ядра содержит многочисленные поры. Они образуются смыканием наружной и внутренней мембран и имеют различный диаметр. В некоторых ядрах, например ядрах яйцеклеток, пор очень много и они с правильными интервалами расположены на поверхности ядра. Количество пор в ядерной оболочке варьирует в различных типах клеток. Поры расположены на равном расстоянии друг от друга. Так как диаметр поры может изменяться, и в ряде случаев ее стенки обладают довольно сложной структурой, создается впечатление, что поры сокращаются, или замыкаются, или, наоборот, расширяются. Благодаря порам кариоплазма входит в непосредственный контакт с цитоплазмой. Через поры легко проходят довольно крупные молекулы нуклеозидов, нуклеотидов, аминокислот и белков, и таким образом осуществляется активный обмен между цитоплазмой и ядром

|  |
| --- |
| [http://counter.rambler.ru/top100.cnt?1436262](http://top100.rambler.ru/top100/) |
| **[Новости](http://dendrology.ru/news/)**  **[Подписка](http://dendrology.ru/about/delivery.shtml)**  **[Библиотека](http://dendrology.ru/books/index.shtml)**  **[Новые книги](http://dendrology.ru/books.shtml)**  **[Энциклопедия](http://dendrology.ru/forest/index.shtml)**  **[Карта сайта](http://dendrology.ru/sitemap/index.shtml)**  **[Ссылки](http://dendrology.ru/catalog/index.shtml)**  **[О проекте](http://dendrology.ru/about/index.shtml)**  Начало формы    Конец формы  Google  Пользовательского поиска | КЛЕТКА Расстановка ударений: КЛЕ`ТКА  КЛЕТКА, элементарная живая система, основная единица строения и жизнедеятельности всех организмов. К. могут существовать как самостоят. организмы (напр., одноклеточные водоросли) или же формировать многоклеточные организмы, в к-рых они выполняют разл. функции. Величина К. семенных растений колеблется в ср. от 0,01 до 0,1 мм. Однако, напр., размеры паренхимных К. запасающих тканей клубней или сочных плодов может достигать 1 мм, а про-зенхимных К. лубяных волокон крапивы — 80 мм. Между К. растений и животных, наряду с принципиальным сходством в строении и функциях отдельных частей, существуют и различия. Осн. компоненты растит. К.: протопласт и оболочка (отсутствует у животных К.).  Протопласт живой К. составляют ядро и цитоплазма. В растительной К. обычно содержится одно ядро, в нек-рых специализированных К. встречается по 2—3 и даже 4—5 ядер. В ядре различают ядерную оболочку, в к-рой заключена кариолимфа, содержащая хроматин и ядрышко или ядрышки. Ядрышки состоят из РНК (см. Нуклеиновые кислоты), а также белков (гистонов). Осн. функция ядрышка — синтез рибосомальной РНК. Во время деления К. хроматин образует плотные упорядоченные структуры — хромосомы, хранящие и переносящие генетич. информацию в процессе деления.  *Схема строения растительной клетки: 1 - цитоплазма, 2 - ядро с хроматином, 3 - митохондрии, 4 - хлоропласты, 5 - хромопласты, 6 - крахмальные зёрна, 7 - аппарат Гольджи, 8 - эндоплазматическая сеть, 9 - вакуоли с включениями, 10 - клеточная стенка, 11 - срединная пластинка. Схема строения растительной клетки: 1 - цитоплазма, 2 - ядро с хроматином, 3 - митохондрии, 4 - хлоропласты, 5 - хромопласты, 6 - крахмальные зёрна, 7 - аппарат Гольджи, 8 - эндоплазматическая сеть, 9 - вакуоли с включениями, 10 - клеточная стенка, 11 - срединная пластинка.*  Цитоплазма К. представляет собой сложно организованную систему, осн. элементами к-рой являются клеточные органоиды (органеллы), распределённые в полужидкой средегиалоплазме (матриксе). Взаимодействие органоидов, их функциональное состояние определяют направленность процессов обмена в К. и её специфич. роль в тканях организма. В К. растений огромную роль играют пластиды — хлоропласты, лейкопласты и хромопласты. Хлоропласты встречаются в К. тканей листа, генеративных органов, в паренхимных К. и т. д., но гл. обр. они сосредоточены в мезофилле (хлорофиллоносной ткани листа). В хлоропластах протекает процесс фотосинтеза, обусловливающий автотрофность зелёных растений. Лейкопласты — бесцветные пластиды, в к-рых осуществляются вторичный синтез запасных в-в (гл. обр. крахмала, а также белков и липидов), их превращение в растворимые формы и т. д. Хромопласты обычно формируются из хлоропластов и встречаются чаще всего в К. цветков, созревающих и зрелых плодов, осенних листьях. В хромопластах содержатся пигменты (каротиноиды), обусловливающие яркую окраску соответствующих органов. В цитоплазме находятся также митохондрии, обеспечивающие клеточное дыхание, в результате к-рого образуются богатые энергией соединения, необходимые для поддержания процессов жизнедеятельности К. Биосинтез белков протекает на р ибосом а х.  Передвижение веществ из окружающей среды в цитоплазму и между внутриклеточными структурами обеспечивается системой плоских цистерн, канальцев и пузырьков, ограниченных мембранами, — эндоплазматич. ретикулумом. Этот органоид выполняет и образоват. функцию — даёт начало вакуолям, лизосомам, сферосомам. Почти все растит. К. содержат т. н. аппарат Гольджи (пластинчатый комплекс), к-рый состоит из системы диктиосом, пузырьков и вакуолей и участвует в синтезе, накоплении и выделении (секреции) полисахаридов, в т. ч. полисахаридов матрикса клеточной оболочки и слизей. В цитоплазме образуются полости — вакуоли, часто заполненные разл. включениями и отграниченные от гиалоплазмы одинарной мембраной — тонопластом. В зрелых растит. К. вакуоль часто имеет большие размеры и занимает осн. объём К., а цитоплазма образует лишь очень узкий пристенный слой. В вакуолярном (клеточном) соке содержатся ферменты, углеводы и др. растворимые в-ва, могут откладываться таннины, белки, комплексные липопротеид-ные соединения, кристаллы минер. в-в.  Клеточная стенка, или клеточная оболочка, наиболее мощно развитая у древесных растений, выполняет механич. (опорную) функцию, через неё происходит транспорт воды и др. компонентов обмена веществ, в ней локализуются ферменты. Стенка К. зрелой древесины состоит из неск. слоев: срединной пластинки, первичной и вторичной оболочек. В состав её входят (в основном) лигнин, пектины, гемицеллюлозы, целлюлоза, а также минер. соединения. Срединная пластинка — разделяющий слой, общий для двух соседних К. Первичная оболочка — наружный слой клеточной стенки, непосредственно прилегающий к срединной пластинке, к-рая в дальнейшем превращается в межклеточное в-во. Осн. строит. материал вторичной оболочки — микрофибриллы, состоящие из неск. мицелл. Пучки микрофибрилл неплотно примыкают один к другому, образовавшиеся при этом промежутки заполнены пектиновыми в-вами. Микрофибриллы (в кол-ве до 400) соединяются в фибриллы в виде пластинок или волокон в неск. мкм при диам. 0,5 нм. Отложение вторичной оболочки обеспечивает рост клеточной стенки в толщину за счёт протопласта. У высокоактивных К., напр. ассимиляционной или образоват. ткани, вторичная оболочка не образуется. В нек-рых случаях образуется и третичная стенка — выстилающий слой, контактирующий с цитоплазматич. мембраной — плазмалеммой. Взаимосвязи между клетками осуществляются через особые образования: поры, плазмодесменные канальцы и перфорации. Формирование пор связано с неравномерностью отложения вещества первичной оболочки на срединную пластинку, в результате чего образуются углубления — первичные поровые поля. На этих участках не откладывается вещество вторичной оболочки и развиваются поры. Наиболее просты они преим. в паренхимных К. Более сложные, т. н. окаймлённые поры, характерны для К. древесины — трахеид и сосудов. В каждой трахеиде, напр. сосны, до 300 пор. Плазмодесмы представляют собой тонкие плазматич. тельца, проходящие сквозь клеточную оболочку и соединяющие между собой соседние К. (в стенке молодых К. их может быть до 1000). Перфорации — крупные отверстия в стенке К., формируются под влиянием ферментов, растворяющих первичную оболочку и срединную пластинку. Они служат гл. обр. для передвижения веществ по растению (проводящие элементы). Клеточная стенка с возрастом пропитывается лигнином и наступает её одревеснение, что повышает её твёрдость, плотность и снижает пластичность и способность к росту. Обильное наслаивание в стенке К. суберина вызывает её опробковение, к-рое свойственно преим. К. вторичной покровной ткани — пробки. В растит. клетках, как в протопласте, так и в клеточном соке, часто встречаются различные оформленные частицы — включения (кристаллы, крахмальные зёрна, капли масла и др.). Наука о К. наз. цитологией.  (Атлас ультраструктуры растительных клеток, под ред. Г. М. Козубова и М. Ф. Даниловой, Петрозаводск, 1972; Руководство по цитологии, т. 1—2, М.—Л., 1965—66; Фрей-Висслинг А., Мюлеталер К., Ультраструктура растительной клетки, пер. с англ., М., 1968; Ботаника. Анатомия и морфология растений, М., 1978.)    Источники:   1. Лесная энциклопедия: В 2-х т./Гл.ред. Воробьев Г.И.; Ред.кол.: Анучин Н.А., Атрохин В.Г., Виноградов В.Н. и др. - М.: Сов. энциклопедия, 1985.-563 с., ил. |

# Поры и каналы биологических мембран

Живая клетка - это элементарная ячейка биологической организации, обеспечивающая все функции организма. Среди многообразных явлений, протекающих в клетке, важное место занимают активный и пассивный транспорт веществ. В настоящее время стало очевидно, что эти явления, так или иначе, определяются барьерными свойствами клеточных мембран. Клетка - открытая система, которая непрерывно обменивается с окружающей средой веществом и энергией. Во многих случаях биологического транспорта основного переноса веществ является их диффузия через клеточную или многоклеточную мембрану. Способы диффузионного переноса многообразны: диффузия жирорастворимых веществ через липидную часть мембраны, перенос гидрофильных веществ через поры, образуемые мембранными липидами и белками, облегченная диффузия с участием специальных молекул-переносчиков, избирательный транспорт ионов через ионные каналы.

**Общая характеристика транспорта веществ через мембрану**

*Пассивный транспорт.*Под пассивным транспортом веществ через биологические мембраны подразумевается движение молекулы вещества в комплексе с переносчиком. Такой путь проникновения веществ через мембрану не требует затраты энергии, что и дало возможность назвать его пассивным. Для пассивного транспорта характерен эффект насыщения - по мере увеличения концентрации вещества скорость его трансмембранного движения достигает некоторого предела. Так как эффект насыщения очень четко наблюдается также в ферментативных реакциях, в связи с движением в мембране гипотетических переносчиков.

В настоящее время имеется большое количество различных моделей пассивного транспорта. Все они могут быть разделены на две большие группы: модели переносчиков и модели пор. Основное отличие между этими группами моделей заключается в том, что в моделях переносчиков каждый специфический связывающий центр в течение транспортного цикла бывает попеременно доступен омывающим растворам мембраны. В моделях пор каждый специфический центр фиксирован в мембране и доступен или обоим омывающим растворам (одноцентровые поры), или только одному из них, либо вообще недоступен растворам.

Транспорт в порах осуществляется в результате последовательного связывания вещества специфическими центрами. Транспорт же по типу переносчиков осуществляется в результате попеременного экспонирования центров связывания последнего к омывающим мембрану растворам.

*Активный транспорт.*В последнее время достигнуты большие успехи в изучении активного транспорта, представляющего наибольший интерес из всех видов трансмембранного движения веществ. Особенностью активного транспорта является перенос молекул вещества через мембрану против градиента концентрации, т.е. при неравенстве концентраций (Се>Сi или Сi>Се) существует равенство потоков Iе= Ii. Процессы активного транспорта весьма сложны и протекают с участием нескольких мембранных компонентов. К активному транспорту веществ через мембраны относятся явления эндо - и экзоцитоза.

Эндоцитоз - это явление, благодаря которому внеклеточные вещества попадают внутрь клетки, заключенные в пузырьки из плазматической мембраны, что часто называют – гетерофагосомами. В этом процессе принимают участие плазматическая мембрана, микрофиламенты и контрактильные нити клетки.

Экзоцитоз - это процесс обратный эндоцитозу. Так удаляются в окружающее клетку пространство остаточные тельца.

**Каналы**

Под каналами чаще всего понимают ионные каналы, которые, как теперь известно, широко распространены во многих типах клеток. Регулируемые ионные каналы, участвующие в передаче сигнала, в ответ на определенный внешний стимул быстро изменяют мембранную проницаемость для определенного иона. При этом происходит изменение трансмембранного потенциала. К работе такого вида каналов предъявляются некоторые требования. Во-первых, внешний сигнал должен вызывать быстрое переключение между открытым и закрытым состояниями канала. Необходимо чтобы быстро устанавливалось равновесие. Когда канал открыт, через бислой может проходить до 106-108 ионов в секунду. Каналы обладают селективностью, т.е. способность канала пропускать некоторые ионы лучше, чем другие; ее можно качественно охарактеризовать как отношение проницаемостей или проводимостей для сравниваемых ионов. Например, у входа в канал имеются отрицательные заряды, то скорость транспорта анионов может уменьшаться, т.е. канал окажется катионселективным. Размеры переносимых веществ также влияют на скорость транспорта. Существует большое количество видов каналов. Две большие группы составляют потенциалзависимые ионные каналы и каналы, регулируемые нейромедиаторами.

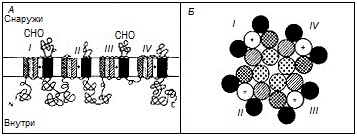
*Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR-канал).*nAChR-канал является примером канала, работа которого регулируется нейромедиаторами. Эти каналы находятся главным образом в концевых пластинках постсинаптических мембран нервно-мышечных соединений. При возбуждении нейрона из него высвобождается нейромедиатор ацетилхолин. При взаимодействии с ацетилхолином канал открывается, опосредуя селективное перемещение катионов. nAChR-канал регулируется с помощью химического механизма, которым является ацетилхолин.

Выделенный и очищенный nAChR-канал состоит из пяти полипептидных субъединиц четырех разных типов со стехиометрией α2βδγ. Две копии α-субъединиц, присутствующие в комплексе, выполняют разные функции. Все субъединицы фосфорилированы и гликозилированы, а к двум α и β, ковалентно присоединен липид. Была построена модель канала, приведенная на рис.2.

Модель канала
никотинового ацетилхолинового рецептор  
Рис.1. Модель канала никотинового ацетилхолинового рецептора

Канал имеет центральное отверстие диаметром 30Ǻ с внеклеточного конца и более узкое с цитоплазматической стороны. Пять субъединиц расположены в следующей последовательности: β-α-δ-γ-α, так что α-субъединицы не соседствуют друг с другом. Места связывания располагаются на α-субъединицах. Канал имеет длину около 140Ǻ, причем участок длиной 70Ǻ расположен над поверхностью бислоя с наружной стороны, образуя большие ворота канала. В открытой конформации канал проницаем для катионов и небольших неэлектролитов, но не анионов. Селективность канала по отношению к одно- и двухвалентным катионам невелика. Хотя размеры nAChR-канала относительно велики, он все же слишком мал, чтобы через него могли полностью проходить гидратированные ионы.

*Натриевый канал.*Является потенциалзависимым ионным каналом, который обеспечивает быстрое увеличение натриевой проводимости, ответственное за фазу деполяризации при развитии потенциала действия в нервных и мышечных клетках. Каналы, выделенные из тканей млекопитающих, имеют молекулярную массу ~335000. Na+-каналы взаимодействуют с различными токсинами, в частности с тетродотоксином, сакситоксином и α-токсином скорпиона, которые очень прочно связываются с канальными белками и могут использоваться при количественных биохимических измерениях.

  
Рис.2. Некоторые модели натриевого канала

*А - модель укладки полипептидной цепи; показаны четыре гомологичных домена, каждый из которых имеет шесть трансмембранных спиралей. Знаком + отмечен амфифильный сегмент;  Б - гипотетическая организация шести спиралей каждого домена, образующих центр. канал*

Было показано, что белок натриевого канала содержит 1820 аминокислотных остатков, организованных в четыре повторяющиеся единицы (рис.2.). Каждый гомологичный участок содержит 4, 6 или 8 трансмембранных α-спиралей. Некоторые из этих трансмембранных спиралей амфифильны. Специфические группы организованы в канале таким образом, что образуется «селективный фильтр».

*Кальциевый канал.*Ca2+-селективные каналы так же относятся к потенциалзависимым ионным каналам. Широко распространены в возбудимых клетках - нервных и мышечных, а также в большинстве других типов клеток. Некоторые Ca2+-каналы отвечают на изменение напряжения на мембране. Обычно концентрация ионов Ca2+в цитоплазме не превышает 10М, что в 10000 раз ниже, чем концентрация ионов Ca2+вне клетки. Открывание Ca2+--канала может приводить к значительным изменения концентрации этого иона в цитоплазме, что в свою очередь индуцирует разнообразные биохимические события. Каналы состоят как минимум из двух субъединиц с молекулярной массой 140000 и 30000. Большая субъединица была клонирована и секвенирована, и оказалось структурно близка к потенциалзависимому натриевому каналу.

**Щелевые контакты**

Щелевые контакты - это кластеры мембранных каналов, которые соединяют содержимое соседних клеток в тканях. Через такие каналы проходят небольшие молекулы - метаболиты и неорганические ионы. Диаметр каналов в клетках млекопитающих составляет от 12 до 20Ǻ. Эти каналы соединяют две плазматические мембраны. Исходя из данных об аминокислотной последовательности, можно предположить, что в каждой субъединице имеется четыре трансмембранные α-спирали. Эти каналы находятся обычно в открытом состоянии, но закрываются, когда понижается скорость метаболизма. Каждый канал состоит из 12 субъединиц, по шесть от каждой клетки. Канал представляет собой гексамерную структуру. Два гексамерных комплекса соседних мембран соединены конец к концу и образуют протяженный канал, объединяющий обе мембраны. Структура канала щелевого контакта зависит от наличия ионов Ca2+. В присутствии Ca2+субъединицы расположены параллельно центральной оси канала, а в отсутствии этих ионов несколько наклонены (открытое состояние). Точный механизм открывания и закрывания далеко не ясен.

**Поры**

В последнее время достигнуты большие успехи в определении строения пор на молекулярном уровне. Особенно ценным в исследованиях оказался метод реконструкции изображения; с его помощью удалось не только визуализировать отверстия в мембране, создаваемые большими порами, но и выявить симметричную организацию субъединиц вокруг центрального отверстия. Важным исключением из α-спирального семейства являются порины, поскольку они формируют поры из β-слоев, а не с помощью α-спиралей. Поры могут образовываться с помощью эндо- и экзогенных веществ.

*Ядерные поровые комплексы.* Ядерная оболочка клеток млекопитающих содержит 3-4 тысячи пор (примерно 10 пор на 1 квадратный мкм). Через ядерные поры происходит обмен веществами между ядром и цитоплазмой. Действительно, РНК, синтезируемые в ядре, а также рибосомные субъединицы и белки, содержащие сигналы ядерного экспорта, транспортируются через ядерные поры в цитоплазму, а гистоны, компоненты репликативной системы, многие другие белки импортируются через ядерные поры из цитоплазмы в ядро. Поры окружены большими кольцевыми структурами, называемыми поровыми комплексами (их внутренний диаметр составляет приблизительно 80 нм, а мол. масса -50-100 млн. Каждый комплекс образован набором больших белковых гранул, сгруппированных в октагональную структуру. Поровой комплекс пронизывает двойную мембрану, связывая по окружности поры липидный бислой внутренней и внешней мембран в единое целое. "Дыра" в центре каждого комплекса (ядерная пора) представляет собой водный канал, сквозь который водорастворимые молекулы курсируют между ядром и цитоплазмой. Ядерный поровой комплекс содержит заполненный водой цилиндрический канал диаметром около 9 нм. Большие ядерные белки взаимодействуют с белками-рецепторами, расположенными на границе ядерных пор, и эти рецепторы активно переносят белки в ядро, увеличивая канал поры.

Количество ядерных пор зависит от типа клетки, стадии клеточного цикла и конкретной гормональной ситуации. Для ядерной поры характерна симметрия восьмого порядка, поэтому многие белки ядерной поры представлены в ее составе в количестве, кратном восьми. В электронный микроскоп видны выпуклые кольца. Кольцо, находящееся с ядерной стороны, несет структуру, называемую корзиной (basket). Это образование состоит из обращенных в нуклеоплазму фибрилл и прикрепленного к ним терминального кольца. К просвету канала обращены восемь симметричных образований (spoke complex). В центре комплекса виден вход в канал ядерной поры. Иногда в канале оказывается видна электронноплотная гранула. Некоторые исследователи полагают, что это какой-то транспортирующийся комплекс в момент пересечения ядерной мембраны. Другие считают, что эта структура является функциональной деталью ядерной поры. На основании этого последнего предположения была даже выдвинута не подтвердившаяся впоследствии гипотеза, согласно которой ядерная пора содержит не один, а восемь проницаемых каналов. Молекулы массой менее 5 кДа, проходят через ядерную пору свободно, и равновесие между ядерной и цитоплазматической концентрацией устанавливается за секунды. Для белков массой 17 кДа этот процесс занимает 2 минуты, белков массой 44 кДа (приблизительно 6 нм) - 30 минут. Белки массой более 60 кДа, по-видимому, вообще не могут пассивно проходить через ядерные поры. Проницаемый для гидрофильных макромолекул канал, через который происходит как активный, так и пассивный транспорт, в ядерной поре один, и он, по всей видимости, расположен в центре комплекса. Существуют специальные механизмы транспорта макромолекул внутрь ядра и из ядра в цитоплазму, однако до сих пор о них мало что известно.

*Порины.*Порины образуют поры, которые функционируют как молекулярные сита, опосредуя диффузию небольших гидрофильных молекул через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Молекулярная масса поринов варьирует от 28000 до 48000. В мембране обычно присутствуют в виде триммеров. Для поринов характерно высокое (до 60%) содержание β-слоев. Наиболее полно к настоящему времени охарактеризованы порины из Escherichia coli: ОmpF (порин матрикса), ОmpС, РhoE, LamB (мальтопорин). Эти белки имеют молекулярную массу ~35000. Их основной особенностью является то, что они образуют наполненный водой трансмембранный канал, причем этот канал образован в основном β-структурами. На рис.4. представлена одна из возможных моделей образования поринового канала из амфифильных β-цепей.

Модель
поринового тримера (вид сверху)  
Рис.3.Модель поринового тримера (вид сверху)

Образуемые порином каналы различаются как по размерам (диаметр от 6 до 23Ǻ), так и по селективности. Селективность связана с наличием внутри или около входа заряженных аминокислотных остатков. В одних случаях порины образуют один большой канал, в других – три независимых (рис.3.). Три из четырех поринов Escherichia coli имеют много общих структурных особенностей, а их аминокислотные последовательности в значительной степени гомологичны. Эти порины образуют поры диаметром 10-12 Ǻ (ОmpF, ОmpС, РhoE). Порины представляют большой интерес, поскольку они показывают, что трансмембранные каналы могут образовывать не только из α-спиралей, но и из β-слоев.

**Мембранные поры, создаваемые экзогенными агентами**

*Токсины и цитолитические белки.* В природе существуют различные водорастворимые токсины, взаимодействующие со специфическими клетками-мишенями. Одни токсины способствуют высвобождению в цитоплазму фермента, оказывающего летальное воздействие, другие просто образуют в мембране неселективные поры, давая возможность метаболитам, ионам, а иногда и макромолекулам выйти из клетки.

Основные свойства некоторых из токсинов, образующих поры в биомембранах. Колицины - одиночные полипептиды (60000 Да), и некоторые образуют неселективные поры. Наиболее полно к настоящему времени охарактеризованы колицины Е1 и А. Под действием напряжения происходит переход образуемой колицином Е1 поры из открытого состояния в закрытое, что сопровождается переносом через мембрану значительного количества белка. Пору образует только одна молекула колицина.

Дифтерийный токсин – одиночный полипептид, при связывании с поверхностными рецепторами определенных клеток образует в мембране канал и высвобождает в цитоплазму фермент, оказывающий летальное действие. Один фрагмент токсина формирует поры, размер которых достаточно велик, чтобы через них мог пройти сегмент токсина.  Комплекс комплемента и порообразующих белков из цитотоксичных Т-клеток (перфорин) – эти родственные белки сыворотки агрегируют, образуя поры (внутренний диаметр от 100 до 160Ǻ) в мембране клеток-мишеней.

*Пермеабилизация при помощи детергентов.*Сапонин и дигитонин взаимодействуют с холестеролом внутри мембран и образуют агрегаты в виде пор. Образуют большие поры, через которые внутрь клеток могут проникать как набольшие молекулы, так и мактомолекулы.

*Пермеабилизация при помощи осмотического шока.*Под действием осмотического шока в мембранах образуются отверстия. Так, в мембране эритроцита появляется одно большое отверстие диаметром ~1 мкм, размер которого затем уменьшается до 14-280 Ǻ.

**Молекулы, используемые в качестве моделей пор и каналов**

Особенно интересны в этом отношении нистатин и амфотерицин В – структурные формулы этих сходных полиенов приведены на рис.4. Диаметр поры составляет около 8Ǻ. От 8 до 10 молекул полиена образуют цилиндрическую структуру, в которой гидроксилированные сегменты каждой молекулы обращены внутрь, образуя заполненную водой пору.

Структурные
формулы нистатина и амфотерицина В и канал, образуемый в мембране этими
полиеновыми антибиотиками  
Рис.4.Структурные формулы нистатина и амфотерицина В и канал, образуемый в мембране этими полиеновыми антибиотиками

Эта порообразующая молекула является амфифильной, поскольку обладает полярными и наполярными участками. Полярная часть образована гидроксильными и карбонильными группами. Порообразующий комплекс, по-видимому, стабилен внутри слоя.

Грамицидин А-канал образован двумя молекулами грамицидина А, расположенными голова к голове в β (L, D)-спиральной конфигурации. В результате чередования образуется спираль, в которой все боковые цепи располагаются снаружи, а карбонильные группы остова - внутри канала

Свойства:

а) гидрофобен, нет ни одной полярной аминокислоты;

б) высокая проводимость;

в) канал является катионселективным;

г) проницаемость для одновалентных катионов изменяется: Cs+>Rb+>K+>Na+>Li+;

д) молекулы могут проходить через канал только поодиночке, поскольку его диаметр составляет всего 4Ǻ;

е) вода проходит через канал со скоростью около 108молекул в 1 с при низкой ионной силе;

ж) при достаточно высокой концентрации в мембране (>5мол.%),  агрегирует с образованием тубулярных структур.

Аламетицин - представитель природных пептидов, который образует потенциалзависимые каналы. Молекула состоит из 20 аминокислот. Каждый канал образован 6-11 молекулами. Длина составляет 32 Ǻ. Каждый канал образован олигомерным кластером молекул, соединенных водородными связями с образованием стабильной структуры. Представляет хорошую модель, позволяющую объяснить процесс образования поры при ассоциации α-спиралей.

Принимая во внимание сложную структурную организацию пор и каналов, следует сделать заключение, что поступление веществ в клетку приводит к тому, что происходит запас энергии и поддержание гомеостаза клетки. Транспортные функции белков весьма разнообразны. Жизнедеятельность клетки невозможна без создания и поддержания градиентов концентрации веществ, как электролитов, так и неэлектролитов. Этот градиент поддерживается благодаря действию пассивного и активного транспортов. Главная роль в этом принадлежит: порам, каналам биологических мембран.

﻿

#### Меню

* [Космос](http://biofile.ru/kosmos/)
* [География](http://biofile.ru/geo/)
* [Человек](http://biofile.ru/chel/)
* [История](http://biofile.ru/his/)
* [Биология](http://biofile.ru/bio/)
* [Психология](http://biofile.ru/psy/)

#### Реклама

Copyright © BioFile 2007-2016

Copyright © BioFile 2007-2016

## Дополнительная информация о запросе

Исправлена опечатка «[размерыпор мембраны клетки](https://yandex.ru/search/?csg=2777%2C11891%2C23%2C13%2C0%2C1%2C0&text=%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%B5%D1%80%D1%8B%D0%BF%D0%BE%D1%80+%D0%BC%D0%B5%D0%BC%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%8B+%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%82%D0%BA%D0%B8&lr=193&clid=1955454&win=167&p=1&noreask=1)»

## [Электрогенные ионные насосы — allRefs.net](http://allrefs.net/c24/3s1b5/p16/)

[**allrefs.net**](http://allrefs.net/)›[Физика](http://allrefs.net/c24/)›[3s1b5/p16](http://allrefs.net/c24/3s1b5/p16/)

Во время набухания **клетки** **мембрана** растягивается, что обусловливает рост **мембранного** натяжения. При определенном пороговом уровне натяжения появляются гидрофильные липидные **поры**. **Размеры** **пор** достаточны для выхода...

## [Поры и каналы биологических мембран](http://knowledge.allbest.ru/biology/3c0b65625a2ad68b5d53b88521306c37_0.html)

[**knowledge.allbest.ru**](http://knowledge.allbest.ru/)›[Биология и естествознание](http://knowledge.allbest.ru/biology/)›[…\_0.html](http://knowledge.allbest.ru/biology/3c0b65625a2ad68b5d53b88521306c37_0.html)

3.1 ядерные **поровые** комплексы. Ядерная оболочка **клеток** млекопитающих содержит 3-4 тысячи **пор** **...**Так, в **мембране** эритроцита появляется одно большое отверстие диаметром ~1 мкм, **размер** которого затем уменьшается до 14-280 ?.

## [Строение и основные свойства клеточных мембран...](http://yandex.ru/clck/jsredir?from=yandex.ru%3Bsearch%2F%3Bweb%3B%3B&text=&etext=1358.yKzqfOMdQcyILFXQQvzTBWfhljB_YP6rsYRQCsFLQneCDnDkiyHDhXA9Cy0WFG7l1nCezOFJOwVAW6dNc53MfsxGNvAeYt7qZ5tskEvyVgE.be7263437bb6899e4e30c75876002765ccd1bce9&uuid=&state=PEtFfuTeVD5kpHnK9lio9RkXO-oKT4gI9-AVfjFsc0JktxaUVjxeBQ&data=UlNrNmk5WktYejR0eWJFYk1LdmtxaHVpeU5ydHNTOXpsSWpvZExNcXBpdnhLZGRwLVNkZXh5eFAxWFpMeVlhNW5WVjFwZXNCZzhSV0JSejMyVW9veEdtTXdJa1l0dFlJcWZPcTNqNE9BTkVvZVlXQlV0OGpLVndHOHJGR0ZETHFYYlRMYWdyV0t6bw&b64e=2&sign=ad86c9053b68cb6f1f9b28431c470033&keyno=0&cst=AiuY0DBWFJ5Hyx_fyvalFFM6B1zj5uwQVV-M_nxK7tvSJjml33k67TGWXrmZ4WFkx2HoP9pIAo7ZeyGWLTsiWR96_CMd6dXc4nlMkVHZU2iyjJvsRWWUHa7ontZvaAWSiiaec1SuiAFEv2PuyMF-92dj80gV2tvpdEvkcT8e7B6XfqMCUfyq4smRqzVoLvBFWxuMF4IXUSddViZ5sltcF6c4LC09V17rsZOPAuLFRLDzrWyPJp7JHyhGqMaKTMrveQS218nuf4zYNQxdndJA1RWRxwSgXenTR95FK_fqCMWOjgZL4yPQWCHT73-NqByrw1tZ9zTXuCoiFDQIUx0u9_5HK3srVyXLFtX3oY0rHodbZkF7oed046ZBY93qKpuFAb-cqZGTAxOkK4Sv-MwsivDb2NzQbh7XC1Pqt_btlnJtke1Ptc-r0QG3qkq63KCZFlKtMHARsAvxR1tDp_m6Bi-qIfLZ7t7S0BNAefPUWhJHf5IDIupq9L6WHpxTNx9LRf6hMKa7QwD_WD1o7mia70bFzANT9mfMNR_N7S1tRBCzpqj-TiUH7-aUXxpe_zuTzu_b4NKdBhxH7BoB2iUfKkZ07VzzLjR0cDHlhwIxoiGLBPs3J6IB_0hesb-Fzs0KsjFqQgvDUp43Gzu1rVEZslDuXhs46KgpcwNs_vC2cjTy0OuYd0vPwdMck7N24jmYVJHjIBSzNwINiKKhVMZ17J2m2vMhzahEWHTzg4UZUdPakpj6ZeZjQQ&ref=orjY4mGPRjk5boDnW0uvlrrd71vZw9kpUomQzV4uP5amFFs3L1hxJeAfk-Am5549a6v113YU-ZShVT6XarijzIjjqyxxCDcLOgXvxIRGv6nqjfih7PSQUUCvxyR4WvbcMh77eKW02Y4qPKa9wkjGRA0hdpB1sS_-ehB0eC_rV2rgjsAXuID6SoRq2mQWxhibvaglkUj1aKi_NnrPWZQL6g0LKWbZ1TD2Z7r6P2i3v5W_bvv1FpnX6CQQQJVRz-H36vUc3Ec1Ywps2HBqi_1WEj_OV7mkBtmc0_81z3KSSB045SbxcLD8uUuMoeFnyghUFHM0X0EM0FtQalUngZz3EWQ4GzQnNA2M4WG4lv_hB3x5UmLbMWvKLp8q1jD1yXuHCyW__da_9vTGF1rpJbi5Q8t3WszV7hY4mt1U1-vA-8Q1N0yGiChHnIVdTLT0s0nuS4QZoWkoDJnZi2skjs9Myv9bPN4nINxDD-ZUy8AW4_gd7ogZj2vn4LeliLEh8tBdtsaVLeZKe5pDzvv8N-ZpMjddtWrZyauPZbnEGs6LNBc&l10n=ru&cts=1489310764082&mc=5.412028180702322)

[**studentmedic.ru**](http://studentmedic.ru/)›[Рефераты](http://studentmedic.ru/referats.php)›[?view=1702](http://yandex.ru/clck/jsredir?from=yandex.ru%3Bsearch%2F%3Bweb%3B%3B&text=&etext=1358.yKzqfOMdQcyILFXQQvzTBWfhljB_YP6rsYRQCsFLQneCDnDkiyHDhXA9Cy0WFG7l1nCezOFJOwVAW6dNc53MfsxGNvAeYt7qZ5tskEvyVgE.be7263437bb6899e4e30c75876002765ccd1bce9&uuid=&state=PEtFfuTeVD4jaxywoSUvtJXex15Wcbo_6yYT3tY6I8A2Qa05Pns-to-r6JtXFNP2&data=UlNrNmk5WktYejR0eWJFYk1LdmtxaHVpeU5ydHNTOXpsSWpvZExNcXBpdnhLZGRwLVNkZXh5eFAxWFpMeVlhNW5WVjFwZXNCZzhSV0JSejMyVW9veEdtTXdJa1l0dFlJcWZPcTNqNE9BTkVvZVlXQlV0OGpLVndHOHJGR0ZETHFYYlRMYWdyV0t6bw&b64e=2&sign=52a6e3ddffc5aad0f0cce03b9ead59d5&keyno=0&cst=AiuY0DBWFJ5Hyx_fyvalFFM6B1zj5uwQVV-M_nxK7tvSJjml33k67TGWXrmZ4WFkx2HoP9pIAo7ZeyGWLTsiWR96_CMd6dXc4nlMkVHZU2iyjJvsRWWUHa7ontZvaAWSiiaec1SuiAFEv2PuyMF-92dj80gV2tvpdEvkcT8e7B6XfqMCUfyq4smRqzVoLvBFWxuMF4IXUSddViZ5sltcF6c4LC09V17rsZOPAuLFRLDzrWyPJp7JHyhGqMaKTMrveQS218nuf4zYNQxdndJA1RWRxwSgXenTR95FK_fqCMWOjgZL4yPQWCHT73-NqByrw1tZ9zTXuCoiFDQIUx0u9_5HK3srVyXLFtX3oY0rHodbZkF7oed046ZBY93qKpuFAb-cqZGTAxOkK4Sv-MwsivDb2NzQbh7XC1Pqt_btlnJtke1Ptc-r0QG3qkq63KCZFlKtMHARsAvxR1tDp_m6Bi-qIfLZ7t7S0BNAefPUWhJHf5IDIupq9L6WHpxTNx9LRf6hMKa7QwD_WD1o7mia70bFzANT9mfMNR_N7S1tRBCzpqj-TiUH7-aUXxpe_zuTzu_b4NKdBhxH7BoB2iUfKkZ07VzzLjR0cDHlhwIxoiGLBPs3J6IB_0hesb-Fzs0KsjFqQgvDUp43Gzu1rVEZslDuXhs46KgpcwNs_vC2cjTy0OuYd0vPwdMck7N24jmYVJHjIBSzNwINiKKhVMZ17J2m2vMhzahEWHTzg4UZUdPakpj6ZeZjQQ&ref=orjY4mGPRjk5boDnW0uvlrrd71vZw9kpUomQzV4uP5amFFs3L1hxJeAfk-Am5549a6v113YU-ZShVT6XarijzIjjqyxxCDcLOgXvxIRGv6nqjfih7PSQUUCvxyR4WvbcMh77eKW02Y4qPKa9wkjGRA0hdpB1sS_-ehB0eC_rV2rgjsAXuID6SoRq2mQWxhibvaglkUj1aKi_NnrPWZQL6g0LKWbZ1TD2Z7r6P2i3v5W_bvv1FpnX6CQQQJVRz-H36vUc3Ec1Ywps2HBqi_1WEj_OV7mkBtmc0_81z3KSSB045SbxcLD8uUuMoeFnyghUFHM0X0EM0FtQalUngZz3EWQ4GzQnNA2M4WG4lv_hB3x5UmLbMWvKLp8q1jD1yXuHCyW__da_9vTGF1rpJbi5Q8t3WszV7hY4mt1U1-vA-8Q1N0yGiChHnIVdTLT0s0nuS4QZoWkoDJnZi2skjs9Myv9bPN4nINxDD-ZUy8AW4_gd7ogZj2vn4LeliLEh8tBdtsaVLeZKe5pDzvv8N-ZpMjddtWrZyauPZbnEGs6LNBc&l10n=ru&cts=1489310266942&mc=5.25295142936873)

2.Регуляторная функция **клеточной** **мембраны** заключается в тонкой регуляции внутриклеточного содержимого и **...**имеются круглые или овальные отверстия (**поры**) **размером** 50—100 нм, которые занимают до 30 % поверхности **клетки**.

**Наружная клеточная мембрана.**С помощью светового микроскопа можно видеть только довольно толстую оболочку растительных клеток, клеток простейших, но не удается обнаружить оболочку у большинства клеток многоклеточных животных.

Электронно-микроскопические исследования позволили установить, что любая клетка растений и животных, бактерий и простейших имеет очень тонкий внешний покров, который называется наружной мембраной клетки («мембрана» – кожица, пленка, лат.). Те же оболочки, которые обычно видны в световой микроскоп, и в первую очередь толстые оболочки растительных клеток, состоящие у большинства растений из клетчатки, представляют собой лишь дополнительные образования на поверхности этой наружной мембраны.

Толщина наружной мембраны около 75 А, и, конечно, такая тонкая пленка не может быть видна под световым микроскопом. Но, несмотря на столь незначительную толщину, в состав наружной мембраны входят три слоя. На электронно-микроскопической фотографии показаны мембраны двух соседних клеток, и в каждой из мембран видны три слоя: два темных, один из которых расположен на наружной поверхности, граничащей с внешней средой, второй же обращен непосредственно к цитоплазме клетки, а третий, светлый слой расположен в середине, между двумя темными. Оба темных слоя мембраны состоят из молекул белков, а средний, светлый слой – из молекул жиров.

Наружная мембрана клетки пронизана многочисленными мельчайшими отверстиями – порами, через которые внутрь клетки из внешней среды могут проникать только ионы, вода и мелкие молекулы многих других веществ, находящихся во внешней среде, окружающей клетку. Через поры могут также выходить из клетки во внешнюю среду разнообразные вещества.

Но через мельчайшие поры наружной мембраны в клетку из окружающей среды не могут проникать довольно крупные частицы твердых веществ, например частички пищи, имеющие размеры в несколько микрон, а также крупные молекулы органических веществ, например белков. Проникновение относительно крупных твердых частиц в клетку осуществляется путем фагоцитоза («фагос» – пожирать, «цитос» – клетка, греч.). Здесь видно, что частичка пищи или какого-либо другого вещества сначала очень близко подходит к наружной клеточной мембране. Затем в месте контакта с такой частицей мембрана образует впячивание, направленное внутрь клетки. Это впячивание постепенно углубляется, и частичка, попавшая в него, погружается внутрь клетки, в ее цитоплазму.

У одноклеточных животных, или простейших (например, инфузорий, амеб), фагоцитоз выполняет функцию питания, и все твердые пищевые частички попадают внутрь их клетки именно таким путем. У многоклеточных животных и человека функцию фагоцитоза осуществляют только специализированные клетки, например белые кровяные тельца, которые поглощают бактерий, попавших в организм, пыль и другие твердые частички. Этим клеткам, способным к фагоцитозу, принадлежит функция защиты организма от разнообразных посторонних, попавших в него частиц, например от патогенных бактерий. В процессах фагоцитоза наружная клеточная мембрана принимает активное участие; способность к фагоцитозу – одна из важных ее функций.

Через наружную мембрану в клетку попадают и капли жидкости, содержащие в растворенном виде разнообразные вещества. Процесс поглощения жидкости в виде мелких капель напоминает питье и потому был назван пиноцитозом («пино» – пью, «цитос» – клетка, греч.).

На схема пиноцитоза, процесс поглощения жидкости клеткой сходен с процессом фагоцитоза: вначале капля жидкости сближается с наружной клеточной мембраной, которая в этом месте образует многочисленные мелкие складочки. Затем образуется впячивание с попавшей в него каплей жидкости, которое постепенно углубляется и, наконец, полностью отделяется от поверхности, и кап-16 ля жидкости оказывается в цитоплазме клетки. Пиноцитоз – еще одна важная функция наружной клеточной мембраны, присущая клеткам всех животных и растений.

Итак, через наружную клеточную мембрану постоянно осуществляется обмен веществ между клеткой и окружающей средой: благодаря наличию пор мембрана регулирует проникновение ионов и мелких молекул в клетку и из клетки, через нее в клетку поступают и более крупные, твердые и растворенные в воде вещества. Но, кроме этих важных функций, наружная мембрана выполняет и много других не менее важных биологических функций. Она отграничивает цитоплазму и все органоиды клетки от внешней среды, причем легко и быстро восстанавливает свою целостность после небольших повреждений. Соединение клеток в разнообразные ткани многоклеточных организмов также осуществляется за счет наружной мембраны, которая образует многочисленные складки и выросты, увеличивающие прочность клеточных соединений. Они хорошо видны на микрофотографии.

Большинство клеток многоклеточных животных, например эпителиальные клетки крови, печени, почек и др., имеют только одну наружную мембрану, которая и представляет их единственный внешний покров. У других же клеток, например у отростков нервных клеток, у многих простейших, внешний покров состоит из нескольких прилегающих друг к другу мембран, образующих прочную клеточную оболочку, которая обычно бывает, видна с помощью светового микроскопа. Отличительную черту клеток растений, как уже упоминалось выше, представляет толстая клеточная оболочка, состоящая из клетчатки, особого органического вещества пектина или из других веществ. Эта оболочка располагается над наружной цитоплазматической мембраной, образуется за счет активной деятельности мембраны и представляет собой прочный внешний покров растительных клеток.

Магнитные резонансы подразделяются обычно на пять видов: 1)циклотронный резонанс (ЦР); 2) электронный парамагнитный резонанс (ЭПР); 3) ядерный магнитный резонанс (ЯМР); 4) электронный ферромагнитный резонанс; 5) электронный антиферромагнитный резонанс.

**Циклотронный резонанс**. При ЦР наблюдается избирательное поглощение энергии электромагнитного поля в полупроводниках и металлах, находящихся в постоянном магнитном поле, обусловленное квантовыми переходами электронов между энергетическими уровнями Ландау. На такие эквидистантные уровни расщепляется квазинепрерывный энергетический спектр электронов проводимости во внешнем магнитном поле.

**Электронный парамагнитный резонанс**. Явление ЭПР заключается в резонансном поглощении энергии электромагнитного поля в парамагнитных образцах, помещенных в постоянное магнитное поле http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image524.gif , нормальное к магнитному вектору http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image537.gif электромагнитного поля. Физическая сущность явления заключается в следующем.

**Ядерный магнитный резонанс**. Тяжелые элементарные частицы - протоны и нейтроны (нуклоны), а, следовательно, построенные из них атомные ядра обладают собственными магнитными моментами, которые служат источником ядерного магнетизма. Роль элементарного магнитного момента по аналогии с электроном здесь играет ядерный магнетон Бора

http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image575.gif (5.58)

Атомное ядро обладает магнитным моментом

http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image577.gif , (5.59)

где http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image579.gif – http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image329.gif -фактор ядра, http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image144.gif – спиновое число ядра, которое принимает полуцелые и целые значения:

http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image144.gif = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, ... . (5.60)

Проекция ядерного магнитного момента на ось *z*

**Ферро- и антиферромагнитный резонанс**. Физическая сущность ферромагнитного резонанса заключается в том, что под действием внешнего магнитного поля http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image363.gif , намагничивающего ферромагнетик до насыщения, полный магнитный момент образца начинает прецессировать вокруг этого поля с ларморовой частотой http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image606.gif , зависящей от поля. Если на такой образец наложить высокочастотное электромагнитное поле, перпендикулярное http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image608.gif , и изменять его частоту http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image610.gif , то при http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image612.gif наступает резонансное поглощение энергии поля. Поглощение при этом на несколько порядков выше, чем при парамагнитном резонансе, потому что магнитная восприимчивость, а, следовательно, и магнитный момент насыщения в них много выше, чем у парамагнетиков.

Особенности резонансных явлений в ферро**-** и антиферромагнетиках определяются в первую очередь тем, что в таких веществах имеют дело не с изолированными атомами или сравнительно слабо взаимодействующими ионами обычных парамагнитных тел, а со сложной системой сильно взаимодействующих электронов. Обменное (электростатическое) взаимодействие создает большую результирующую намагниченность, а с ней и большое внутреннее магнитное поле, что существенно изменяет условия резонанса (5.55).

От ЭПР ферромагнитный резонанс отличается тем, что поглощение энергии в этом случае на много порядков сильнее и условие резонанса (связь между резонансной частотой переменного поля и величиной постоянного магнитного поля) существенно зависит от формы образцов.

На явлении ферромагнитного резонанса основаны многие СВЧ-устройства: резонансные вентили и фильтры, парамагнитные усилители, ограничители мощности и линии задержки.

**Антиферромагнитный резонанс (**электронный магнитный резонанс в антиферромагнетиках) – явление относительно большого избирательного отклика магнитной системы антиферромагнетика на воздействие электромагнитного поля с частотой (10-1000 ГГц), близкой к собственным частотам прецессии векторов намагниченности магнитных подрешеток системы. Это явление сопровождается сильным поглощением энергии электромагнитного поля.

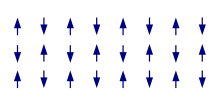
С квантовой точки зрения а**нтиферромагнитный резонанс**можно рассматривать как резонансное превращение фотонов электромагнитного поля в магноны с волновым вектором http://ok-t.ru/studopediaru/baza6/3717969594115.files/image614.gif .

Для наблюдения а**нтиферромагнитного резонанса** используются радиоспектрометры, аналогичные применяемым для изучения ЭПР, но позволяющие проводить измерения на высоких (до 1000 ГГц) частотах и в сильных (до 1 МГс) магнитных полях. Наиболее перспективны спектрометры, в которых сканируется не магнитное поле, а частота. Получили распространение оптические методы детектирования а**нтиферромагнитного резонанса**.

# Антиферромагнетики это:

Толкование[Перевод](http://translate.academic.ru/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%84%D0%B5%D1%80%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D0%B3%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B8/ru/)

Антиферромагнетики

[](http://dic.academic.ru/pictures/wiki/files/65/Antiferromagnetic_ordering.svg)

Антиферромагнетик — магнитные моменты веществанаправлены противоположно иравны по силе.

**Антиферромагнетик** — вещество, в котором установился [антиферромагнитный](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/785652) порядок [магнитныхмоментов](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/313527) [атомов](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/376) или [ионов](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/18769).

|  |
| --- |
| Содержание  * [1 Свойства антиферромагнетиков](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#.D0.A1.D0.B2.D0.BE.D0.B9.D1.81.D1.82.D0.B2.D0.B0_.D0.B0.D0.BD.D1.82.D0.B8.D1.84.D0.B5.D1.80.D1.80.D0.BE.D0.BC.D0.B0.D0.B3.D0.BD.D0.B5.D1.82.D0.B8.D0.BA.D0.BE.D0.B2) * [2 Антиферромагнетики среди элементов](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#.D0.90.D0.BD.D1.82.D0.B8.D1.84.D0.B5.D1.80.D1.80.D0.BE.D0.BC.D0.B0.D0.B3.D0.BD.D0.B5.D1.82.D0.B8.D0.BA.D0.B8_.D1.81.D1.80.D0.B5.D0.B4.D0.B8_.D1.8D.D0.BB.D0.B5.D0.BC.D0.B5.D0.BD.D1.82.D0.BE.D0.B2) * [3 Антиферромагнетики среди химических соединений](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#.D0.90.D0.BD.D1.82.D0.B8.D1.84.D0.B5.D1.80.D1.80.D0.BE.D0.BC.D0.B0.D0.B3.D0.BD.D0.B5.D1.82.D0.B8.D0.BA.D0.B8_.D1.81.D1.80.D0.B5.D0.B4.D0.B8_.D1.85.D0.B8.D0.BC.D0.B8.D1.87.D0.B5.D1.81.D0.BA.D0.B8.D1.85_.D1.81.D0.BE.D0.B5.D0.B4.D0.B8.D0.BD.D0.B5.D0.BD.D0.B8) * [4 Применение](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#.D0.9F.D1.80.D0.B8.D0.BC.D0.B5.D0.BD.D0.B5.D0.BD.D0.B8.D0.B5) * [5 Примечания](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#.D0.9F.D1.80.D0.B8.D0.BC.D0.B5.D1.87.D0.B0.D0.BD.D0.B8.D1.8F) * [6 Литература](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#.D0.9B.D0.B8.D1.82.D0.B5.D1.80.D0.B0.D1.82.D1.83.D1.80.D0.B0) * [7 См. также](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#.D0.A1.D0.BC._.D1.82.D0.B0.D0.BA.D0.B6.D0.B5) |

## Свойства антиферромагнетиков

Обычно [вещество](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/168) становится *антиферромагнетиком* ниже определённой температуры , такназываемой [точки Нееля](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/375141) и остаётся антиферромагнетиком вплоть до .

## Антиферромагнетики среди элементов

Среди элементов *антиферромагнетиками* являются твёрдый кислород (a-модификация при ), хром (), а также ряд [редкоземельных металлов](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1118886). В последних обычнонаблюдаются сложные *антиферромагнитные* структуры в температурной области между  и (). При более низких температурах они становятся [ферромагнетиками](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/136479). Данные онаиболее известных *антиферромагнетиках* — редкоземельных элементах — приведены в таблице ниже.

Данные о наиболее известных антиферромагнетиках.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Элемент** | ***T*1, K** | ***T*N, K** |
| [Dy](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/8750) | 85 | 179 |
| [Ho](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/8751) | 20 | 133 |
| [Er](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/8752) | 20 | 85 |
| [Tm](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/8753) | 22 | 60 |
| [Tb](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/8749) | 219 | 230 |

## Антиферромагнетики среди химических соединений

Число известных [химических соединений](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1179793), которые становятся *антиферромагнетиками* при определённых[температурах](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/1958), приближается к тысяче. Ряд наиболее простых *антиферромагнетиков* и их температуры  приведены в таблице ниже. Большая часть *антиферромагнетиков* обладает значениями , лежащими существенно ниже комнатной температуры. Для всех гидратированных солей  непревышает , например  у .

Ряд наиболее простых антиферромагнетиков.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | | **Соединение** | ***T*N, K** | | MnSO4 | 12 | | FeSO4 | 21 | | CoSO4 | 12 | | NiSO4 | 37 | | MnCO3 | 32,5 | | FeCO3 | 35 | | CoCO3 | 38 | | NiCO3 | 25 | | |  |  | | --- | --- | | **Соединение** | ***T*N, K** | | MnO | 120 | | FeO | 190 | | CoO | 290 | | NiO | 650 | | MnF2 | 72 | | FeF2 | 250 | | CoF2 | 37,7 | | NiF2 | 73,2 | |

## Применение

* С использованием атомов антиферромагнетика при низких температурах возможно создание ячеек [памяти](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/2182), содержащих всего 12 атомов (для сравнения, в современных [жестких дисках](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/15666) для хранения 1 [бита](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/4904)информации необходимо около 1 млн. атомов) [[1]](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#cite_note-1)[[2]](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#cite_note-2).

## Примечания

1. [**↑**](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#cite_ref-1) [Ученые IBM создали элемент магнитной памяти из 12 атомов](http://www.ixbt.com/news/hard/index.shtml?15/42/70)
2. [**↑**](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/141636#cite_ref-2) [IBM News room - 2012-01-12 IBM Research Determines Atomic Limits of Magnetic Memory - United States](http://www-03.ibm.com/press/us/en/pressrelease/36473.wss)

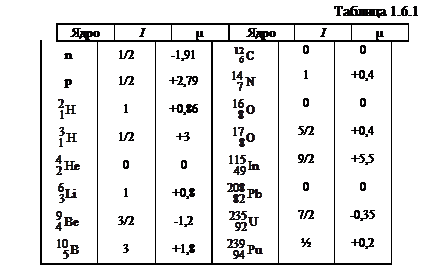
## Литература

* [К. М. Хёрд — Многообразие видов магнитного упорядочения в твёрдых телах](http://ufn.ru/ufn84/ufn84_2/Russian/r842e.pdf)
* [Тябликов С. В.](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/692564) Методы квантовой теории магнетизма. 2-е изд. — М., 1975.

## См. также

* [Парамагнетики](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/438453)
* [Диамагнетики](http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/442009)
* **Ядерный гамма-резонанс**  ( ЯГР) - излучение или поглощение гамма-квантов твердым телом без рождения в нем фононов - не относится к числу магнитных резонансов. [**[1]**](http://www.ngpedia.ru/pg3971807DgCcJrp0001638238)
* **Ядерный гамма-резонанс**  ( эффект Мессбауэра) позволяет получать ценную информацию о строении электронных оболочек атомов, содержащих мессбауэровские ядра. Существенным недостатком метода является ограниченность числа элементов, практически доступных для исследования. В настоящей работе сделана попытка преодолеть это ограничение, используя результаты мессбауэровских измерений на ядрах Sn119 и Sb121 атомов олова и сурьмы, входящих в состав соединений, а также на ядрах Fe57 примесных атомов железа в качестве критерия применимости различных подходов при теоретическом расчете эффективных зарядов атомов в соединениях рассматриваемого типа. [**[2]**](http://www.ngpedia.ru/pg1283877HS1fVIP0002638238)
* Спектроскопия**ядерного гамма-резонанса**  ( мессбауэровская спектроскопия) позволяет обнаружить слабые возмущения энергетических уровней ядер железа окружающими электронами. Этот эффект представляет собой явление испускания или поглощения мягкого v-излучения без отдачи ядер. Интересующий нас ядерный переход с энергией 14 36 кэВ - происходит между состояниями / 3 / 2 и / 1 / 2 мессбауэровского изотопа 57Fe, где / - ядерное спиновое квантовое число. Для белка с молекулярным весом 50 000, который связывает 1 атом железа на молекулу, и в отсутствие изотопного обогащения это соответствует весу образца 2 5 г. Рассматриваемые здесь многоядерные белки содержат гораздо больше железа и вполне подходят для исследования методом ядерной гамма-резонансной спектроскопии. Широко исследуются четыре возможных типа взаимодействия между ядром 57Fe и его электронным окружением: изомерный сдвиг, квадрупольное расщепление, ядерные магнитные сверхтонкие взаимодействия, ядерные зеемановские взаимодействия. [**[3]**](http://www.ngpedia.ru/pg18905507GgwZZS0003638238)
* Суть**ядерного гамма-резонанса** , или так называемого эффекта Мессбауэра, состоит в том, что у кванты испущенные при переходе возбужденного ядра в основное состояние, могут равновесно поглощаться невозбужденными ядрами с переходом последних в возбужденное состояние. Аналогичное явление хорошо известно в обычной оптике; существенно лишь то, что при сравнительно большом импульсе у-квантов следовало бы ожидать сильной отдачи как у испускающего; так и у поглощающего ядра и тем самым невозможности резонансного поглощения из-за эффекта Допплера. Мессбауэр показал, что по крайней мере в значительной доле случаев отдачу принимает на себя кристалл ( или тяжелая молекула) как жесткое целое, и явлением отдачи при этом, естественно, можно пренебречь. [**[4]**](http://www.ngpedia.ru/pg1543499Z5SCvwX0004638238)
* Явление**ядерного гамма-резонанса**  на атомных ядрах заключается в резком возрастании вероятности поглощения или рассеяния у-кван-тов с энергией, соответствующей возбуждению ядерных переходов. [**[5]**](http://www.ngpedia.ru/pg2302518glouIF00005638238)
* Исследование с помощью**ядерного гамма-резонанса**  показало, что изучаемые частицы железа не окислены. [**[6]**](http://www.ngpedia.ru/pg2504717CxKegNj0006638238)
* Методом рентгеноструктурного анализа и**ядерного гамма-резонанса**  было установлено, что данное изменение кристаллической структуры не связано с изменением концентрации углерода в твердом растворе, а обусловлено обратимыми переходами атомов внедрения ( углерода) из октаэдрических междоузлий к радиационным дефектам. Для таких переходов не требуется диффузии углерода на значительные расстояния - она совершается в пределах элементарной ячейки. Повышенная концентрация точечных дефектов, созданных облучением в кристаллической решетке мартенсита, стимулирует переходы атомов внедрения с одних позиций на другие, энергетически более выгодные при данных температурах. [**[7]**](http://www.ngpedia.ru/pg09120610wigwED0007638238)
* Нами были проведены наблюдения**ядерного гамма-резонанса**  в образцах различных массивных многокомпонентных оловосодержащих стекол и стекловолокнах того же химического состава. Составы стекол приведены в таблице. [**[8]**](http://www.ngpedia.ru/pg2029532zykteMb0008638238)
* Нами было проведено изучение**ядерного гамма-резонанса** в комплексных соединениях железа с анионами 4- бутироил - и 4-бензоил - 1 2 3-три-азола. Спектры получены на спектрометре ЯГР механического типа, источник Со57 в хроме. **[[9]](http://www.ngpedia.ru/pg5595495m6rlbfj0009638238" \t "_blank)**
* Обработка экспериментальных данных по**ядерному гамма-резонансу**  возможна только в том случае, если проведена калибровка ЯГР спектрометра по скоростям и определены положения линий поглощения каких-либо веществ, выбранных в виде стандарта. Обычно в качестве стандарта используют вещества, которые могут быть достаточно легко изготовлены и воспроизведены в идентичных условиях. Они должны быть стабильны, должны иметь достаточно большую величину вероятности поглощения - у-квантов без потери энергии на отдачу, их мессбауэровские спектры должны представлять собой узкую линию, характеризующуюся малым температурным сдвигом. **[[10]](http://www.ngpedia.ru/pg3376728iPARYDl0010638238" \t "_blank)**
* Хотя квадруполыюе расщепление усложняет вид спектров**ядерного гамма-резонанса**  ( ЯГР) ( рис. 111 6), но оно помогает вывести ряд важных заключений о структуре и симметрии исследуемых соединений. Это соединение ( служившее поглотителем) было синтезировано с применением изотопа 1291 - долгоживущего продукта реакции деления. Сложный вид спектра обусловлен как квадрупольным расщеплением, так и тем, что иод находится в этом соединении в двух различных позициях. **[[11]](http://www.ngpedia.ru/pg2400566hauN7hH0011638238" \t "_blank)**
* Нами было предпринято систематическое исследование методом**ядерного гамма-резонанса**  ( ЯГР) соединений олова с элементами пятой и шестой групп, а также халькогенидных полупроводниковых стекол в системе мышьяк - селен - олово с целью получения информации о химической связи и внутренних кристаллических полях в этих соединениях. **[[12]](http://www.ngpedia.ru/pg5949853cnnPbbb0012638238" \t "_blank)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| [[13](http://www.ngpedia.ru/searchdata/?squery=%D0%A1%D1%85%D0%B5%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9%20%D1%81%D0%BF%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%20%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%20%D1%83-%D0%B8%D0%B7%D0%BB%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F.&search_area=0)](http://www.ngpedia.ru/searchdata/?squery=%D0%A1%D1%85%D0%B5%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9%20%D1%81%D0%BF%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%20%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%20%D1%83-%D0%B8%D0%B7%D0%BB%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F.&search_area=0) |  | [Схематический спектр кристаллического источника у-излучения.](http://www.ngpedia.ru/searchdata/?squery=%D0%A1%D1%85%D0%B5%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9%20%D1%81%D0%BF%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%20%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%20%D1%83-%D0%B8%D0%B7%D0%BB%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8F.&search_area=0) [**[13]**](http://www.ngpedia.ru/pg0239TGq8s1N5r3q0P9Y00013638238) |

* Изучение узких линий проводят с помощью метода**ядерного гамма-резонанса** , который принято называть мессбауэровской спектроскопией. На рис. 8.14 показана типичная схема экспериментальной установки. **[[14]](http://www.ngpedia.ru/pg4359832pI23DmN0014638238" \t "_blank)**
* Метод мессбауэровской спектроскопии, называемой иногда спектроскопией**ядерного гамма-резонанса**  ( ЯГР), основан на изучении поглощения у-излучения какого-то ядра-источника ядром того же изотопа, находящимся в исследуемом образце. Условия резонанса соблюдаются только тогда, когда устранен также эффект отдачи ядер при испускании и поглощении у-квантов, а также скомпенсирован каким-то образом эффект Допплера. Метод получил свое развитие именно с того момента, когда это было понято, а еще раньше экспериментально был найден простой и едва ли не единственно возможный путь ликвидации потерь на отдачу. **[[15]](http://www.ngpedia.ru/pg2459387Zaw24aY0015638238" \t "_blank)**
* ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС
* (ЯМР), явление резонансного поглощения радиочастотной электромагн. энергии в-вом с ненулевыми магн. моментами ядер, находящимся во внеш. постоянном мага. поле. Ненулевым ядерным магн. моментом обладают ядра 1 Н, 2 Н, 13 С, 14N, 15N, 19F, 29Si, 31P и др. ЯМР обычно наблюдается в однородном постоянном магн. поле В 0, на к-рое накладывается слабое радиочастотное поле В 1 перпендикулярное полю В 0*.*Для в-в, у к-рых ядерный спин I= 1/2 (1H, 13C, 15N, 19F, 29Si, 31P и др.), в поле В 0возможны две ориентации магн. дипольного момента я...
* [**Ядерный Магнитный Резонанс**`Большой энциклопедический словарь`](http://enc-dic.com/enc_big/JAdernyj-Magnitnyj-Rezonans-71467.html)
* Необходимая энергия сообщается слабым высокочастотным полем http://ok-t.ru/studopediaru/baza3/660667025747.files/image289.png, направление которого перпендикулярно векторуhttp://ok-t.ru/studopediaru/baza3/660667025747.files/image290.png. Когда http://ok-t.ru/studopediaru/baza3/660667025747.files/image292.png, то под действием резонансного воздействия высокочастотного поля дискретным образом изменяется положение вектора http://ok-t.ru/studopediaru/baza3/660667025747.files/image261.png(резонансное «опрокидывание» магнитного момента из положения 1 в положение 2 на рис. 1.6.3), которое может быть замечено по максимуму поглощения энергии в этот момент. Используя полученное таким образом значение http://ok-t.ru/studopediaru/baza3/660667025747.files/image294.png, из (1.6.29) определяется гиромагнитный множитель γ.
* Резонансные методы измерения магнитных моментов отличаются высокой точностью (до 6 знаков). Метод магнитного резонанса имеет несколько модификаций, в зависимости от способа обнаружения переориентации магнитных моментов в резонансном поле. Этот метод был успешно использован для измерения магнитного момента нейтрона с той только разницей, что вместо образцов, содержащих ядра, использовались нейтронные пучки.
* В таблице 1.6.1 приведены спины *I* и приближенныезначения магнитных моментов http://ok-t.ru/studopediaru/baza3/660667025747.files/image296.pngдля нуклонов и некоторых легких, средних и тяжелых ядер. Знак минус у магнитного момента указывает на то, что он направлен противоположно спину. Ядра, имеющие нулевой спин, обладают нулевым магнитным моментом в полном соответствии с (1.6.10). Отличие магнитных моментов нуклонов от целочисленных значений (в единицах, равных ядерному магнетону), а также наличие магнитного момента у нейтрона, имеющего нулевой электрический заряд, еще не объяснено полностью. Однако эти факты с определенностью указывают на то, что нуклоны имеют внутреннюю структуру (см. §1.9 п.8).

# Раздел "Генная инженерия"

## Методы клонирования ДНК

### *Геномные библиотеки, клонирование ДНК in vivo*

После того, как ДНК сшита в пробирке, ее необходимо размножить.

Существует два подхода к клонированию ДНК. Первый подход предполагает использование бактериальных или дрожжевых клеток для размножения введенной в них чужеродной ДНК. Второй способ представляет собой амплификацию ДНК in vitro.

***Клонирование ДНК in vivo***

Используя микроорганизмы, можно создавать два типа библиотек ДНК: геномную и клоновую (кДНК).

**Геномная библиотека.** Если геном какого-либо организма разрезать, вставить в плазмидные или вирусные вектора и ввести в клетку, то в таком виде его можно сохранить. При разрезании плазмидной или фаговой ДНК вероятность выпадения целых и неизмененных кусков генома довольно высока.

Такой способ получения геномной библиотеки получил название «*метод дробовика*», так как геном в данном случае представлен отдельными фрагментами.

Принципы создания плазмидных и вирусных векторов общие, поэтому рассмотрим их на примере плазмидных. Следует отметить, что из вирусных ДНК лучше использовать ДНК фагов, так как они имеют большую емкость и позволяют вставлять более крупные куски генома.  
Очищенные кольцевые молекулы ДНК обрабатывают рестриктазой, получая линейную ДНК. Клеточную ДНК обрабатывают той же рестриктазой, добавляют к плазмидной, добавляют лигазы. Таким образом получают рекомбинантную плазмидную ДНК, которую вводят в бактериальные или дрожжевые клетки. Плазмида реплицируется с образованием многих копий. Многие плазмиды несут ген устойчивости к антибиотикам, и если в рекомбинантной плазмиде есть такой ген, то клетки легко выявлять, выращивая на среде с антибиотиком.  
Каждая такая колония представляет собой клон или потомство одной клетки. Плазмиды одной колонии содержат клон геномной ДНК, а совокупность плазмид можно назвать библиотекой геномной ДНК. Недостаток такого метода в том, что фрагменты ДНК образуются в огромном количестве. Разрезание геномной ДНК определяется случаем, поэтому лишь часть фрагментов содержат полноценные гены. Некоторые фрагменты могут содержать только часть гена или же интронные последовательности.

**Библиотека кДНК.** Создание кДНК начинается с синтеза на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы комплементарной нити ДНК. Затем создают щелочные условия, разрушают цепь РНК на нуклеотиды, после чего с помощью ДНК-полимеразы синтезируют комплементарную цепь ДНК. При этом образуется фрагмент ДНК с тупыми концами. Такую ДНК встраивают в плазмиды и вводят в клетки бактерий. При амплификации плазмиды образуется клон комплементарной копии ДНК (кДНК).

Преимущества клоновой ДНК перед клонами геномной ДНК в том, что кодирующая белок нуклеотидная последовательность гена ничем не прерывается.  
Гены эукариот содержат интроны, которые должны удаляться из транскриптной РНК перед превращением ее в матричную, после чего следует сплайсинг (сращивание). Бактериальные клетки не могут осуществлять такую модификацию РНК, образовавшуюся путем транскрипции гена эукариотической клетки. Поэтому если преследуют получение белка путем экспрессии клонированного гена, то лучше использовать банк кДНК, полученной на основе матричной РНК.

Читать дальше ► [*полимеразная цепная реакция (ПЦР)- описание метода*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_2.htm)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | | Раздел "Генная инженерия"Методы клонирования ДНК*Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - методика* В 1985 году К. Мюллис с сотрудниками разработали метод клонирования последовательностей ДНК in vitro, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР). К анализируемому образцу ДНК добавляют в избытке 2 синтетических олигонуклеотида - праймера размером около 20 нуклеотидов. Каждый из них комплементарен одному из 3’-концов фрагмента ДНК. ДНК нагревают для разделения цепей двойной спирали, а при охлаждении происходит гибридизация праймеров с комплементарными участками фрагментов ДНК. В результате в растворе будут находиться однонитевые ДНК с короткими двухцепочечными участками - затравками (праймерами). При добавлении нуклеотидов и ДНК-полимеразы синтезируются комплементарные цепи и образуются идентичные фрагменты ДНК (первый цикл, рис. 43). Реакция останавливается и ДНК снова денатурируется прогреванием.  http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1_1.gif  Рис. 43. Первый цикл полимеразной цепной реакции В процессе охлаждения праймеры, находящиеся в избытке, вновь эффективно гибридизуются, но уже не только с цепями исходной ДНК, но и с вновь синтезированными. Внесение в систему ДНК-полимеразы инициирует второй цикл полимеразной реакции. Многократное повторение описанной процедуры позволяет провести 30 и более циклов ферментативного удлинения праймеров. При этом число сегментов ДНК, ограниченных с обоих концов используемыми праймерами, с каждым циклом ПЦР увеличивается экспоненциально (приближается к зависимости 2n, где n — число циклов). Выход всех других продуктов реакции увеличивается по линейной зависимости (рис. 44). Таким образом, в процессе рассматриваемой реакции эффективно амплифицируется только та последовательность ДНК, которая ограничена праймерами. Первоначально для ПЦР использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I E. coli. Однако недостатком данного подхода являлось то, что после каждого цикла реакции необходимо было вносить в реакционную смесь новую порцию фермента. Кроме того, в оптимальных температурных условиях такой полимеразной реакции (37 °С) появлялись вторичные участки связывания праймеров и наблюдалась амплификация незапланированных сегментов генома, т. е. специфичность амплификации не была полной. Существенное улучшение метода полимеразной цепной реакции было достигнуто после замены фрагмента Кленова на ДНК-полимеразу термофильной бактерии Thermus aquaticus (Taq-полимераза). Температурный оптимум реакции, направляемой Taq-полимеразой, находится в районе 70 °С. Другим важным свойством является то, что данная полимераза не инактивируется после длительной инкубации при 95 °С. Используя Taq-полимеразу, удалось решить сразу две проблемы. Во-первых, термостабильная полимераза не инактивируется на этапе денатурации ДНК, и поэтому нет необходимости после каждого цикла реакции добавлять новую порцию фермента. Такое упрощение процедуры позволило автоматизировать проведение ПЦР, так как теперь требовалось лишь перенесение образца с определенным интервалом времени в разные температурные условия: 90—95 °С (температура денатурации) и 60—70 °С (температура ренатурации ДНК и ферментативной реакции). Во-вторых, высокий температурный оптимум реакции, катализируемой Taq-полимеразой, позволяет подбирать жесткие температурные условия отжига, обеспечивающие гибридизацию праймеров только в заданном районе изучаемого генома, что существенно повышает специфичность и чувствительность метода.  http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1_2.jpg  Рис. 44. Схема полимеразной цепной реакции  Используя метод ПЦР, можно in vitro селективно обогащать препарат ДНК фрагментом с определенной последовательностью в миллион и более раз. Это позволяет надежно выявлять однокопийные гены и их варианты в таких больших и сложных геномах, каким является геном человека. Чувствительность метода такова, что амплифицировать в ПЦР и выявить целевую последовательность можно даже в том случае, если она встречается однажды в образце из 100 000 клеток. Получаемый сегмент ДНК надежно выявляется в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул ДНК и окраски их этидиум бромидом. Если к праймеру пришить фермент, то ферментная метка будет накапливаться при амплифицировании. Продукт амплификации проверяется по принципу ИФА, то есть добавляется субстрат и отмечается изменение окраски. В качестве метки можно использовать [*стрептавидин*](http://www.biotechnolog.ru/acell/acell4_3.htm). Его можно пришивать как к праймеру, так и к нуклеотидам. В последнем случае нуклеотиды, меченные стрептавидином, добавляются к обычным, идущим на синтез комплементарной цепи ДНК. Этим достигается еще большее усиление сигнала. Размноженный in vitro фрагмент получают в количествах, достаточных для его прямого секвенирования. Поскольку при этом не требуется промежуточный этап клонирования фрагмента ДНК в молекулярных векторах, ПЦР иногда называют бесклеточным молекулярным клонированием (cell-free molecular cloning). Автоматизированная процедура Taq-полимеразной цепной реакции, состоящая из 30 и более циклов, занимает 3—4 часа, что существенно быстрее и проще процедуры клонирования определенного фрагмента ДНК в составе векторных молекул.  Читать дальше ► [*применение ПРЦ в медицине, диагностике*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_3.htm) | Другие главы раздела:  [*Введение в генетическую инженерию*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge1_1.htm)[*Ферменты, используемые в генетической инженерии*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_1.htm)[*Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm)[*Построение рестрикционных карт*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)[*Конструирование рекомбинантных ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge5_1.htm)[*Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6_1.htm)[*Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7_1.htm)[*Введение гена в клетку*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_1.htm)[*Генетические манипуляции с бактериальными клетками*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge10_1.htm)[*Введение генов в клетки млекопитающих*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm)[*Генная инженерия растений*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge12_1.htm)[*Литература к разделу*](http://www.biotechnolog.ru/ge/biblio_ge.htm)  Реклама | |

*[http://counter.yadro.ru/hit?t44.1;rhttp%3A//www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1.htm;s1280*1024*24;uhttp%3A//www.biotechnolog.ru/ge/ge8_2.htm;0.33825163438862593](http://www.liveinternet.ru/click)* *[написать письмо автору](mailto:mail@biotechnolog.ru)* © 1995-2013 Наталья Кузьмина

# Раздел "Генная инженерия"

## Методы клонирования ДНК

### *Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР)*

Используя метод ПЦР, можно in vitro селективно обогащать препарат ДНК фрагментом с определенной последовательностью в миллион и более раз. Это позволяет надежно выявлять однокопийные гены и их варианты в таких больших и сложных геномах, каким является геном человека.

Чувствительность метода такова, что амплифицировать в ПЦР и выявить целевую последовательность можно даже в том случае, если она встречается однажды в образце из 105 клеток. Получаемый сегмент ДНК надежно выявляется в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул ДНК и окраски их этидиум бромидом. Если к праймеру пришить фермент, то ферментная метка будет накапливаться при амплифицировании. Продукт амплификации проверяется по принципу ИФА, то есть добавляется субстрат и отмечается изменение окраски. В качестве метки можно использовать стрептавидин (см. главу 3). Его можно пришивать как к праймеру, так и к нуклеотидам. В последнем случае нуклеотиды, меченные стрептавидином, добавляются к обычным, идущим на синтез комплементарной цепи ДНК. Этим достигается еще большее усиление сигнала.

Размноженный in vitro фрагмент получают в количествах, достаточных для его прямого секвенирования. Поскольку при этом не требуется промежуточный этап клонирования фрагмента ДНК в молекулярных векторах, ПЦР иногда называют бесклеточным молекулярным клонированием (cell-free molecular cloning). Автоматизированная процедура Taq-полимеразной цепной реакции, состоящая из 30 и более циклов, занимает 3—4 часа, что существенно быстрее и проще процедуры клонирования определенного фрагмента ДНК в составе векторных молекул.

Полимеразную цепную реакцию используют для анализа индивидуальных вариаций последовательности нуклеотидов определенных локусов, для повышения эффективности клонирования целевых последовательностей изучаемых геномов и их прямого секвенирования, для детекции в организме патогенных микроорганизмов и т. п.

Используя 32Р-меченные синтетические олигонуклеотиды, можно выявлять единичные замены нуклеотидов в выбранных локусах геномной ДНК человека (или других организмов). Для этого в обычном варианте метода исследуемую ДНК гидролизуют рестриктазами, фракционируют электрофорезом, переносят разделенные фрагменты по Саузерну на нитроцеллюлозный фильтр, который гибридизуют с данным меченым олигонуклеотидом в условиях, при которых даже точечная замена нуклеотидов в анализируемой последовательности приводит к разрушению комплекса ДНК-олигонуклеотид.

 Использование полимеразной цепной реакции для амплификации анализируемого локуса позволяет существенно упростить рассмотренный подход и повысить его чувствительность и специфичность. При этом для анализа аллельных вариантов генов достаточно всего 1 нг геномной ДНК человека, а гибридизацию можно проводить с негидролизованной рестриктазами ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре в виде небольшого пятна. Такой вариант метода позволил разработать новые диагностические тесты на генетические и инфекционные заболевания. В частности, этот подход используют для ранней диагностики наличия в организме вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), что не удается осуществить другими методами. При этом не требуется работать с радиоактивными изотопами, так как амплифицированный сегмент вирусной ДНК выявляется напрямую после электрофоретического разделения ДНК и окраски их бромистым этидием.

Метод ПЦР позволил проанализировать наличие последовательностей вирусов папилломы человека в срезах биопсий новообразований шейки матки человека, залитых парафином за 40 лет до данного исследования. Более того, с помощью ПЦР удалось амплифицировать и клонировать фрагменты митохондриальной ДНК из ископаемых останков мозга человека возраста 7 тысяч лет!

На лизатах индивидуальных сперматозоидов человека продемонстрирована возможность одновременно анализировать два локуса, расположенных на разных негомологичных хромосомах. Такой подход обеспечивает уникальную возможность тонкого генетического анализа и изучения хромосомной рекомбинации, ДНК-полиморфизма и др. Метод анализа индивидуальных сперматозоидов сразу нашел практическое применение в судебной медицине, так как HLA-типирование гаплоидных клеток позволяет определять отцовство или выявлять преступника (комплекс HLA представляет собой набор генов главного комплекса гистосовместимости человека; локусы комплекса HLA — наиболее полиморфные из всех известных у высших позвоночных: в пределах вида в каждом локусе существует необычайно большое число разных аллелей — альтернативных форм одного и того же гена).

Используя ПЦР, можно выявлять правильность интеграции чужеродных генетических структур в заранее определенный район генома изучаемых клеток. Суммарная клеточная ДНК отжигается с двумя олигонуклеотидными затравками, одна из которых комплементарна участку хозяйской ДНК вблизи точки встраивания, а другая — последовательности интегрированного фрагмента в антипараллельной цепи ДНК. Полимеразная цепная реакция в случае неизмененной структуры хромосомной ДНК в предполагаемом месте встройки приводит к образованию фрагментов одноцепочечной ДНК неопределенного размера, а в случае запланированной встройки — двухцепочечных фрагментов ДНК известного размера, определяемого расстоянием между местами отжига двух праймеров. Причем степень амплификации анализируемого района генома в первом случае будет находиться в линейной зависимости от количества циклов, а во втором — в экспоненциальной. Экспоненциальное накопление в процессе ПЦР амплифицируемого фрагмента заранее известного размера позволяет визуально наблюдать его после электрофоретического фракционирования препарата ДНК и делать однозначное заключение о встройке чужеродной последовательности в заданный район хромосомной ДНК.

Читать дальше ► [*введение гена в клетку, генетические вектора*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_1.htm)

# Раздел "Генная инженерия"

## Введение гена в клетку

### *Селективные и репортерные гены*

Ввести рекомбинантный ген в клетку можно 2 способами: используя вектора или путем прямого введения.

***Требования к векторной ДНК, ее состав***

Вектор - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-рецепиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.

Таким образом, вектор должен быть небольшим, способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться), многократно копироваться (ампфлицироваться), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности), должен иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции их; должен быть способен передаваться в клетку соответствующего организма.

Регуляторные последовательности, отвечающие за стабильную экспрессию гена, будут рассмотрены позднее.

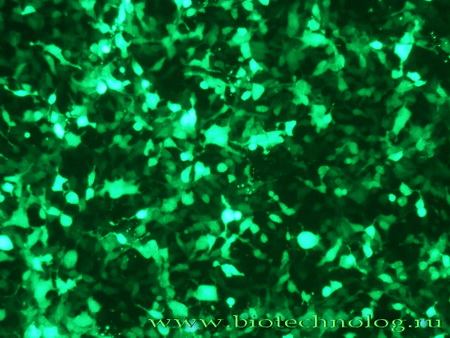
Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. *Селективные гены*, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

2. *Репортерные гены*, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

Чаще всего в качестве репортерных используются гены β-глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). К настоящему времени из этого арсенала наиболее часто используют гены GUS и GFP и, в меньшей степени, LUC и CAT. Используемый в настоящее время как репортерный ген GUS является модифицированным геном из *Escherichia coli*, кодирующим β-глюкуронидазу с молекулярной массой 68 кД. GUS активен в широком диапазоне условий среды с оптимумом при рН 5-8 и 37°С. Он может гидролизовать обширный спектр природных и синтетических глюкуронидов, что позволяет подбирать соответствующие субстраты для спектрофотометрического или флюориметрического определения активности фермента, а также для гистохимического окрашивания тканей in situ (например, в синий цвет). Фермент достаточно стабилен: он устойчив к нагреванию (время полужизни при 55°С составляет около 2 ч) и к действию детергентов. В процессе замораживания-оттаивания потери активности GUS не происходит. В составе химерных белков, созданных генно-инженерными методами, GUS обычно сохраняет свою функциональную активность. В живых клетках белок GUS также весьма стабилен и активен от нескольких часов до нескольких суток.

**GFP** (green fluorescent protein - зеленый флюоресцентный белок, или белок зеленой флюоресценции) был обнаружен Shimomura с соавт. в 1962 г. у люминесцирующей медузы Aequorea victoria. Ген GFP был клонирован в 1992 г. Prasher и соавт., и уже через несколько лет началось активное использование этого гена как репортерного в работах с самыми разными про- и эукариотическими организмами. В настоящее время ген GFP применяется в сотнях работ во всем мире, и число их стремительно нарастает. Столь быстрый рост вызван особыми свойствами белка GFP, а именно его способностью флюоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении длинноволновым УФ. Эта флюоресценция обусловлена непосредственно белком, для ее проявления не требуется субстратов или кофакторов. Благодаря этому свойству ген GFP является очень перспективным репортерным геном, позволяющим проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами.

Многочисленные производные GFP получили общее название AFP (autofluorescent proteins - автофлюоресцентные белки). Из морской анемоны Discosoma sp. недавно выделен еще один белок DsRed, флуоресцирующий в красном свете. Еще несколько аналогичных флюоресцирующих белков было выделено в самое последнее время учеными Российской академии наук из различных коралловых полипов порядка Anthozoa. Он может быть денатурирован очень высокой температурой, крайними значениями рН или сильными восстановителями типа Na2SO4. При возвращении к физиологическим условиям GFP в значительной степени восстанавливает способность к флюоресценции. В составе химерных белков, созданных генноинженерными методами, GFP обычно сохраняет свою функциональную активность. В живых клетках белок GFP также очень стабилен.

CAT – гены отвечают за синтез хлорамфениколацетилтрансферазы (выделены из Escherihia coli). Этот фермент катализирует реакцию переноса ацетильной группы от ацетил-КоА к хлорамфениколу. Определяется гистохимически, по изменению окраски ткани при добавлении соответствующего субстрата.

LUC – ген кодирует фермент люциферазу (клонирована из бактерий и светлячка). Она вызывает свечение трансформированных клеток. Бактериальный фермент состоит из двух субъединиц. Для определения активности ферментов необходимо специальное оборудование - флуориметр и цифровая видеокамера с амплификатором светового сигнала. Фермент теряет активность при действии детергентов и повышенной температуры. Замена селективных генов на репортерные при отборе трансгенных растений часто весьма желательна, так как возможность потенциального риска для окружающей среды и здоровья человека при использовании репортерных генов практически исключена. Однако область применения репортерных генов шире, чем просто контроль трансгеноза. Другое, и, очевидно, более важное назначение репортерных генов состоит в том, чтобы выявлять (по возможности количественно) временные и пространственные особенности экспрессии данного конкретного гена, будь то собственного или чужеродного. Присоединение репортерного гена к одной лишь промоторной области позволяет исследовать в "чистом виде" ее роль в регуляции экспрессии изучаемого гена на уровне транскрипции.

Замена белок-кодирующей области гена на репортерную при сохранении участка, кодирующего 5'-концевую не транслируемую последовательность мРНК, позволяет оценить роль этой последовательности в процессах транспорта мРНК из ядра в цитоплазму и ини

# Раздел "Генная инженерия"

## Введение гена в клетку

### *Регуляция экспрессии прокариотических генов*

Одно из самых важных свойств гена - способность к экспрессии. За это свойство отвечают различные генетические элементы, которые мы должны встроить в векторную молекулу, несущую ген.

Многие бактериальные гены устроены таким образом, что они способны функционировать с существенно разной эффективностью. У E. coli, например, относительное содержание различных белков варьирует в очень широких пределах (от менее чем 0.1% до 2%) в зависимости от их функций; при этом каждый белок в хромосоме E. coli кодируется единственным геном. Такие вариации обусловлены действием системы контроля генной экспрессии, которая осуществляется главным образом на уровне транскрипции ДНК. Таким образом, чаще всего уровень активности гена связан с количеством синтезируемой на нем мРНК, то есть с активностью фермента РНК-полимеразы.

Последовательности ДНК, расположенные перед началом структурного гена и определяющие степень активности РНК-полимеразы, называются *регуляторными последовательностями.* Одна из таких последовательностей представляет собой участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза. Этот участок называется *промотором*.

Последовательность оснований промотора определяет частоту инициации синтеза иРНК, причем замена одного основания в этой последовательности может привести к уменьшению частоты инициации в 1000 раз.

Промотор может быть сильным и слабым. Сильный промотор инициирует синтез иРНК часто, слабый - гораздо реже. С другой стороны, промотор может быть регулируемым и нерегулируемым. Например, промотор β-лактамазы нерегулируемый, но сильный. Использование таких промоторов не всегда удобно. Дело в том, что большое количество белка может блокировать рост бактерий. Кроме того, интенсивная транскрипция рекомбинантной ДНК может помешать репликации плазмиды, и она будет утрачена. Поэтому удобнее использовать регулируемые сильные промоторы (индуцибельные), включение которых, а значит и синтез чужеродного белка можно осуществить, когда получена большая бактериальная масса.

Некоторые плазмидные векторы содержат промотор, работа которого регулируется температурочувствительным белковым продуктом гена-репрессора. Белок-репрессор активен при определенных температурах и блокирует действие промотора. Повысив температуру до 42 оС, можно "включить" промотор и быстро получить большое количество требуемого белка.

В качестве индуцибельных промоторов используют также *Trp*-промотор триптофанового оперона, который регулируется триптофановым голоданием, *lac*-промотор лактазного оперона, который индуцируется субстратом (лактозой) и другие.

Интенсивность транскрипции определенных структурных генов может зависеть от эффективности ее*терминации*, в частности, от того, как часто РНК-полимераза прекращает синтез РНК, не дойдя до этих генов. Сравнительно недавно обнаружено, что во многих оперонах Е.coli, контролирующих биосинтез аминокислот, между промотором и первым структурным геном имеется терминирующая последовательность. В определенных условиях происходит образование терминирующего сигнала, ослабляющего интенсивность транскрипции.

Это явление получило название *аттенуации*, а участок ДНК - *аттенуатор* (ослабитель). Как и репрессия, аттенуация зависит от присутствия в среде соответствующих аминокислот. Например, избыток триптофана в клетках триптофанзависимых мутантов, дефектных по репрессору, только 1 из 10 молекул РНК-полимеразы, начавших транскрипцию, преодолевает аттенуатор и считывает структуру генов. Удаление триптофана втрое повышает эффективность транскрипции генов. В отличие от репрессии, антенуация зависит не от самой аминокислоты, а от триптофанил - тРНК (аминокилоты, присоединенной к соответствующей тРНК).

На эффективность продуктивности рекомбинантной ДНК в существенной степени влияет количество копий этой ДНК в расчете на клетку. Суммарная активность экспрессируемого гена растет с ростом копийности плазмиды. Таким образом, используя многокопийные плазмиды, можно достичь сверхсинтеза нужных белковых продуктов. Обычно используемые плазмидные векторы (pBR 322 и др.) поддерживаются в клетке в количестве 20-50 копий. Сейчас исследователи имеют в своем распоряжении температурно-чувствительные мутантные плазмиды, способные накопить до одной-двух тысяч копий на клетку, не нарушая ее жизненно-важных функций. Таким образом можно достичь сверхпродукции плазмидных генов бактериальными штаммами-сверхпродуцентами.

Регуляция экспрессии у E. coli происходит также и на уровне *трансляции*. Последовательность оснований длиной 6-8 нуклеотидов, расположенная непосредственно перед инициирующим кодоном АУГ, определяет эффективность трансляции. Эта последовательность представляет собой участок связывания мРНК с рибосомой. Как правило, он отстоит на 8 нуклеотидов от инициирующего кодона, и его сдвиг в ту или иную сторону может резко снижать эффективность трансляции соответствующей мРНК. Описанный участок называется последовательностью Шайна-Дальгарно, по имени исследователей, впервые его идентифицировавших.

В состав вектора кроме всего прочего должен входить *маркерный ген*, позволяющий селектировать измененные клетки. Часто в качестве селективных используют широко распространенные в природе гены ферментов, модифицирующих антибиотики и инактивирующие их действие.

Читать дальше ► [*регуляция эукариотических генов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_2_1.htm)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | | Раздел "Генная инженерия"Введение гена в клетку*Регуляция экспрессии генов  эукариот* **Особенности организации генома эукариот**  У эукариотических организмов механизм регуляции транскрипции гораздо более сложен. В результате клонирования и секвенирования генов эукариот обнаружены специфические последовательности, принимающие участие в транскрипции и трансляции.  Для эукариотической клетки характерно:  1. Наличие интронов и экзонов в молекуле ДНК.  2. Созревание и-РНК - вырезание интронов и сшивка экзонов.  3. Наличие регуляторных элементов, регулирующих транскрипцию, таких как: а) *промоторы* - 3 вида, на каждый из которых садится специфическая полимераза. РНК-полимераза I реплицирует рибосомные гены, РНК-полимераза II - структурные гены белков, РНК-полимераза III - гены, кодирующие небольшие РНК. Промоторы РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы II находятся перед участком инициации транскрипции, промотор РНК-полимеразы III - в рамках структурного гена; б) *модуляторы* - последовательности ДНК, усиливающие уровень транскрипции; в) *(энхансеры) усилители* - последовательности, усиливающие уровень транскрипции и действующие независимо от своего положения относительно кодирующей части гена и состояния начальной точки синтеза РНК; г) *терминаторы* - специфические последовательности, прекращающие и трансляцию, и транскрипцию.  Эти последовательности по своей первичной структуре и расположению относительно инициирующего кодона отличаются от прокариотических, и бактериальная РНК-полимераза их не "узнает". Таким образом, для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот нужно, чтобы гены находились под контролем прокариотических регуляторных элементов. Это обстоятельство необходимо учитывать при конструировании векторов для экспрессии.  Структурные гены, обеспечивающие жизнедеятельность эукариотической клетки, обычно транскрибируется в большинстве активно функционирующих клеток. В то же время,  специфические гены, уникальные тех или иных тканей или органов, транскрибируются и транслируются только в определенных клетках. Например, гены, кодирующие α- и β-субъединицы гемоглобина взрослого человека, экспрессируются исключительно в клетках - предшественниках эритроцитов. Число разных мРНК, специфичных для разных клеток, варьирует от единиц до десятков.  Способность клеток включать (активировать) или выключать (ингибировать) структурные гены крайне важна для поддержания клеточной специфичности и экономного расходования энергетических ресурсов. Отсюда и многообразие факторов транскрипции, имеющих белковую природу. Многие из них связываются непосредственно с нуклеотидной последовательностью длиной менее 10 п.н., называемой по-разному: боксом, модулем, элементом инициации, регуляторным элементом. В отличие от прокариот у эукариот опероны в большинстве своем отсутствуют, т. е. каждый эукариотический структурный ген имеет свой собственный набор регуляторных элементов. Существенную роль в регуляции транскрипции у эукариот, помимо опосредованной взаимодействием между ДНК и белками, играют также белок-белковые взаимодействия. Несмотря на индивидуальность набора регуляторных элементов у структурных генов эукариот, каждый из них имеет промоторный участок (ТАТА-бокс, или бокс Хогнесса) из восьми нуклеотидов, включающий последовательность TATA; последовательность ССААТ (САТ-бокс); участок из повторяющихся динуклеотидов GC (GC-бокс). Эти элементы находятся на расстоянии 25, 75 и 90 п.н. от сайта инициации соответственно: http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_2_1.jpg  Регуляторные элементы структурных генов эукариот. Отрицательное значение показывает, что эти элементы находятся в молекуле ДНК слева от сайта инициации транскрипции, обозначенного +1. Стрелка — направление транскрипции (по Глик Б. , Пастернак, Дж., 2002)  Транскрипция структурного гена эукариот начинается со связывания с ТАТА-боксом фактора транскрипции, который представляет собой комплекс по крайней мере из 14 белков. Затем с ним и участками ДНК, примыкающими к ТАТА-боксу, связываются другие факторы транскрипции, и, наконец, со всем этим транскрипционным комплексом связывается РНК-полимераза II. Затем при участии дополнительных факторов происходит инициация транскрипции в точке +1 . Если последовательность TATA отсутствует или существенно изменена, то транскрипция структурного гена становится невозможной.  Пример регуляции транскрипции путем взаимодействия специфических белковых факторов с ТАТА-боксом на этих рисунках ниже. синтез белка до индукции  На первой фотографии показано слабое свечение свечение маркера, показывающего, что синтез идет, но не интенсивно, так как TATA-бокс не активирован.   http://www.biotechnolog.ru/ge/after-induction.jpg  На второй фотографии клетка светится интенсивно, она буквально нафарширована специфичным белком, синтез которого был запущен активацией TATА-бокса. Продукция белка была настолько высокой, что плашки с клетками даже в видимом свете были пурпурного цвета.  Идентифицированы также факторы транскрипции, специфичные для регуляторных элементов ССААТ и GC, но пока неясно, как ДНК-белковые взаимодействия могут влиять в этом случае на эффективность транскрипции, если элементы расположены на расстоянии более 75 п.н. от сайта инициации. Кроме того, на расстоянии сотен и даже тысяч пар оснований от сайта инициации находится энхансерная последовательность, которая многократно повышает скорость транскрипции структурных генов. Специфическое сворачивание ДНК при формировании нативной структуры сближает удаленные регуляторные элементы и соответствующие структурные гены. Кроме того, факторы транскрипции, которые связываются с определенными энхансерами и регуляторными элементами, могут образовывать цепочку, соединяющую удаленные друг от друга сайты.  Некоторые репрессированные (неэкспрессирующиеся) гены активируются каскадом событий, который запускается каким-либо специфическим внеклеточным сигналом, например повышением температуры или синтезом гормона. Гормон, поступив в кровоток, связывается с рецепторами специфических клеток, облегчающими его проникновение в клетку. Оказавшись в клетке, гормон вступает во взаимодействие с одним из клеточных белков и изменяет его конформацию. В таком измененном состоянии белок проникает в ядро и связывается со специфическим регуляторным элементом, который инициирует транскрипцию соответствующего гена. Существуют также белки, которые, взаимодействуя с регуляторными элементами, блокируют транскрипцию.  Регуляция транскрипции у эукариот очень сложна. Структурный ген может иметь множество регуляторных элементов, которые активируются специфическими сигналами в клетках разного типа в разное время клеточного цикла. В то же время, некоторые структурные гены находятся под контролем уникального фактора транскрипции. Специфические белки могут взаимодействовать с определенными регуляторными элементами и блокировать транскрипцию или связываться со всем транскрипционным комплексом еще до инициации транскрипции или во время элонгации    Читать дальше ► [*генетические вектора для генной модификации растений*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_3.htm) | Другие главы раздела:  [*Введение в генетическую инженерию*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge1_1.htm)[*Ферменты, используемые в генетической инженерии*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_1.htm)[*Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm)[*Построение рестрикционных карт*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)[*Конструирование рекомбинантных ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge5_1.htm)[*Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6_1.htm)[*Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7_1.htm)[*Методы клонирования ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1.htm)[*Генетические манипуляции с бактериальными клетками*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge10_1.htm)[*Введение генов в клетки млекопитающих*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm)[*Генная инженерия растений*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge12_1.htm)[*Литература к разделу*](http://www.biotechnolog.ru/ge/biblio_ge.htm)  Реклама | | | |
| Раздел "Генная инженерия"Введение гена в клетку*Типы векторов для введения гена в клетку* Существует несколько типов векторов:  **Бактериальные плазмиды**  Основная масса клеточной ДНК бактерий содержится в хромосоме (в хромосоме E. coli, например, 4 млн. пар нуклеотидов). Однако кроме хромосом бактерии содержат большое количество очень маленьких кольцевых молекул ДНК плазмид длиной несколько тысяч пар оснований (молекулярная масса от 1,5 до 300 мегадальтон, 1 МД = 1500 п.о). Такие мини-хромосомы называют плазмидами.  Как правило, плазмиды имеют в своем составе гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов (R-плазмиды), а также гены, контролирующие катаболизм некоторых органических соединений (плазмиды биодеградации, или D-плазмиды). Поскольку эти гены находятся в плазмидах, они представлены гораздо большим числом копий. Высокая копийность плазмид обеспечивает клетке синтез большого количества ферментов, химически нейтрализующих антибиотики или ксенобиотики, что и обеспечивает устойчивость к последним. Плазмиды, по-видимому, вездесущи, так как их выделяют из разных штаммов и видов бактерий, но не являются обязательными компонентами генома, а в некоторых природных штаммах плазмиды не обнаружены вообще.  Поскольку плазмидная ДНК значительно меньше хромосомной, ее довольно легко выделить в чистом виде. В присутствии ионов кальция плазмиды легко поглощаются бактериями-рецепиентами, даже если те их никогда не содержали, и в клетках бактериального потомства можно обнаружить много копий поглощенной плазмиды. Однако бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды одного типа. Это явление несовместимости плазмид. Существуют группы несовместимости – Inc-группы (от английского incompatibility – несовместимость). В такой группе может быть несколько плазмид, совместимых между собой, но не совместимых с другими плазмидами. У этих плазмид сходны многие признаки и часто значительна гомология ДНК.  Число копий плазмиды в клетке может существенно варьировать. Это зависит от генетических особенностей как клетки, так и плазмиды. Плазмиды, находящиеся "под ослабленным контролем", могут размножаться до тех пор, пока их количество не достигнет 10-200 копий на клетку. Если же плазмида находится "под строгим контролем", она реплицируется с той же скоростью, что и главная хромосома. Такие плазмиды содержатся в клетке в одной или в нескольких копиях. Естественно, что для клонирования рекомбинантных ДНК стараются использовать плазмиды первого типа. Но это не обязательно, так как плазмиды в присутствии хлорамфеникола могут умножаться независимо от деления хромосомы, и количество копий плазмиды может многократно увеличиваться.  Одна их наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования pBR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из E. coli. Эта плазмида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции. Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то последний инактивируется. Следовательно, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику. Но при этом сохраняется устойчивость к другому антибиотику. Таким образом вектор дает возможность детектировать только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную плазмиду.  **Вирусы**  Есть вирусы, которые не ведут к гибели клетки, но встраиваются в геном клетки-хозяина и размножаются вместе с ней, либо вызывают ее неконтролируемый рост, т.е. превращают в раковую. К таким относятся ДНК-вирусы SV-40 и вирус полиомы. Внедрение некоторых опухолевых РНК-вирусов ведет к отпочковыванию вирусных частиц от клетки без ее лизиса. К таким вирусам относятся, например, ретровирусы (вирус саркомы Рауса и СПИДа). Для бактериальных клеток в качестве вектора часто используют бактериофаги.  Вирусы являются одними из главных кандидатов на роль векторов для введения чужеродной ДНК. При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. ДНК можно встраивать так, чтобы она находилась под контролем сильных вирусных промоторов, что обеспечит высокий уровень экспрессии гена, и его продукты будут более доступны для исследования.  В последние годы сконструированы многочисленные "челночные" векторы и их рекомбинантные производные, способные к репликации в животной и бактериальной клетке и эффективно экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. Наиболее распространенные векторы состоят из плазмиды рВR322 и интактного раннего района транскрипции ДНК SV40, а нужный ген встраивается под контроль промотора поздних генов или дополнительного раннего промотора. Например, в ДНК SV40 был встроен ген β-глобина кролика, который экспрессировался в линии клеток обезьяны, зараженных рекомбинантным вирусом: в клетках синтезировались и мРНК гена глобина, и сам белок.  Вирус должен быть жизнеспособным после рекомбинирования его ДНК. Легче всего вирусы вводятся в бактерии. Недостатком вирусов как векторов является их небольшая емкость. Кроме того, вирусы заражают небольшой круг хозяев.  Существуют гибридные вектора, содержащие ДНК фага и плазмиды. К ним относятся, например,**космиды и фазмиды.**  *Космиды* – плазмидные вектора, в которые встроен участок генома фага λ, обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Фаговые частицы обеспечивают хорошее проникновение гибридной ДНК в клетку (путем инъекции), после чего происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.  *Фазмиды* также являются гибридами между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды.  **Вироиды**  Из всех известных в настоящее время инфекционных агентов имеют ранг наиболее странных. Известно, что самые мелкие вирусы, способные к независимой репликации, имеют размеры генома, соответствующие молекулярной массе 1 М, то есть около 1500 тыс. пар оснований. Это считали минимальным количеством генетической информации, необходимой для кодирования вирусоспецифических продуктов и подавления метаболизма хозяйской клетки.  Однако в 1971 году были открыты инфекционные агенты, представляют собой очень короткую цепь 1 нитевой ковалентно связанной кольцевой РНК, состоящую из 270-300 нуклеотидов (на три порядка меньше самых минимальных вирусов), не заключенную в белковую оболочку. Это необычные патогены - самые простые и самые маленькие из всех известных.  Каким образом вироиды продуцируют симптомы болезни в инфицированных растениях, не известно до сих пор. Установлено, что они реплицируются ферментами клетки-хозяина, не транслируются в видоспецифичные полипептиды, интегрируются в геном клетки-хозяина.  Вироиды заражают персиситентно (не происходит выздоровления). Вызывают системную инфекцию, т.е. мигрируют из сайта внедрения в другие части растений, переносятся механически или через клеточный сок, через семена, пыльцу. Вироиды также связаны с ядерными фракциями растений и могут размножаться в ядрах.  При работе с вироидами получают 1-нитевую ДНК- копию РНК и достраивают комплементарную нить для получения 2-нитевой ДНК вироида. Такая 2-цепочечная ДНК вcтраивается в плазмиду и передается в клетки E. coli для клонирования. Считывание гена начинается с промотора, который узнается РНК-полимеразой, отвечающей за транскрипцию ДНК в матрицу РНК. Обычно это фрагмент ДНК из 41-44 пар оснований. Ген считывается слева направо, от 5’ к 3’ концу гена и заканчивается в терминальной области гена. За промотором начинается стартовый сайт транскрипции, за которым следует смысловая часть гена. Промоторная область гена содержит определенные короткие сочетания нуклеотидов, характерные для бактериальных генов, или для генов высших организмов. Такие сочетания служат сигналами для РНК-полимеразы, которая присоединяется к промоторной части гена и начинает его считывать.  Однонитевые и двунитевые ДНК способны инициировать репликацию вироида в механически инокулированных растениях табака. Энзиматически in vitro синтезированы также РНК вироидов, высокоинфекционные для растений. Векторные системы могут быть разработаны на основе самих РНК, на основе вироидоспецифичных ДНК, а также в комбинации вироидоспецифичных ДНК с *Ti*-плазмидами. Вироиды инфицируют своих хозяев в течение всего их жизненного цикла, поэтому в случае использования вироидных векторных систем можно ожидать постоянной экспрессии чужеродного гена в растении.  **Плазмиды агробактерий**  В качестве векторов могут использоваться опухолеобразующие плазмиды бактерий. Виды Agrobacterium эволюционно родственны клубеньковым бактериям, относящимся к роду Rhizobium, и имеют много общих с ними черт. Однако характер взаимодействия агробактерий с растением имеет своеобразные особенности.  Взаимодействие видов Agrobacterium с растениями представляет особый интерес, так как при этом виде паразитизма один из партнеров специфически видоизменяет свойства хозяина, встраивая свои гены в его геном. Кроме того, это служит уникальным примером миграции ДНК прокариот в эукариотическую клетку. ДНК митохондрий и хлоропластов Хлоропласты и митохондрии содержат полноценную генетическую систему, то есть все компоненты, необходимые для экспрессии генетической информации: ДНК, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и белоксинтезирующий аппарат (рибосомы, т-РНК, аминоацил-тРНК-синтетазы).  **Хлоропластная и митохондриальная ДНК** также привлекают внимание ученых в качестве возможных векторов для переноса генов в клетку. Структурная организация этих клеточных субгеномов существенно различается.  *Хлоропласты* и другие пластиды обладают одинаковой генетической информацией, так называемым пластомом. У высших растений он представляет собой замкнутую молекулу ДНК длиной 150 т. н. п., достаточную для кодирования примерно 100 белков. Для синтеза пластид необходимо значительно больше белков. Остальные белки кодируются ядром, синтезируются в цитоплазме и поступают в хлоропласты. Некоторые важнейшие белки хлоропластов состоят из нескольких субъединиц, часть из них синтезируется на рибосомах цитоплазмы и транспортируется в хлоропласт, где они объединяются с другими полипептидами, закодированными в самом хлоропласте и там же синтезируемыми. Таким образом, для биосинтеза функционально активного хлоропласта требуется согласованная экспрессия генома и пластома.  Различные типы пластид содержат неодинаковые количества идентичных копий пластома: от 10 – 20 копий в пластидах корней и зрелых хлоропластах до сотен копий в молодых хлоропластах картофеля. Такой уровень амплификации позволяет надеяться на надежную экспрессию чужеродной ДНК при использовании их в качестве векторов в генноинженерных экспериментах. Кроме того, гены рибосомальной РНК пластид и большой субъединицы РБФК кодируются геномом хлоропластов. Возможно, введение сильных промоторов в эти гены и дополнительная их модификация существенно повлияют на фотосинтетическую активность растительной ткани.  Гены растений также способны к экспрессии в клетках Е. coli. Это гены большой субъединцы РБФК. Преимущество хлоропластных генов заключается в том, что их экспрессия к клетках кишечной палочки может быть достигнута путем простого объединения транскрибируемых последовательностей, т.к. в ДНК хлоропластов и бактерий до начала стартовых кодонов трансляции расположена одинаковая нуклеотидная последовательность. Это дает возможность синтезировать растительные экономически важные полипептиды с помощью клеток прокариот.  В отличие от хлоропластной, *ДНК митохондрий* характеризуются исключительным разнообразием и их величина колеблется от 200 до 2400 т. н. п.. Однако никакой корреляции между размером митохондриального генома и числом белковых продуктов, синтезируемых изолированными митохондриями, не наблюдается. Это явление, а также большие размеры митохондриальной ДНК, по-видимому, можно объяснить присутствием ДНК, бесполезной для функционирования митохондрий.  В составе митохондриальной ДНК имеются структурные гены, кодирующие полипептиды, гены рибосомных и транспортных РНК. Однако большая часть белков митохондрий, как и хлоропластов, кодируется ядерными генами. Но если геном хлоропластов представлен гомогенной популяцией крупных кольцевых молекул, то в митохондриях содержится несколько классов кольцевых молекул, не все функции которых еще ясны.  Митохондриальный геном животных организмов намного меньше, 15 – 19 т. н. п., и более консервативен по структуре. Гены митохондрий кодируют 2 группы признаков – работу дыхательных систем и устойчивость к антибиотикам и другим ядам. В митохондриальном геноме растений есть также гены, отвечающие за признак мужской стерильности цитоплазмы.  **Транспозоны**  Транспозоны - сегменты ДНК, которые контролируют собственную транспозицию (перемещение) из одного сайта ДНК в другой путем вырезания из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды. Впервые были открыты в 40-х годах американской ученой Барбарой Мак-Клинток у кукурузы. Эти гены, индентифицированные по их способности подавлять экспрессию других генов кукурузы, находящихся рядом с ними, не имели фиксированного положения в хромосоме. Они как бы передвигались по всему геному растения. Регуляторные элементы могли встраиваться и выщепляться, причем после их выщепления зачастую начинали функционировать ранее молчащие гены.  Оказалось, что гены, ассоциированные с регуляторными элементами, становились нестабильными и часто мутировали из-за нестабильности самих этих элементов. В течение многих лет кукуруза оставалась единственной системой, в которой обнаруживались такие подвижные генетические элементы. Сейчас - и у бактерий, дрозофил и других организмов.  Механизм перемещения фрагментов ДНК по геному до конца не выяснен. ДНК переносится ферментом транспозазой. Фермент кодируется последовательность длиной около 20 нуклеотидов в середине транспозона. Он специфически взаимодействует с концевыми инвертированными повторами мобильного элемента и может вырезать его из хромосомы. Вырезание может происходить точно – с восстановлением исходной структуры участка ДНК, и неточно, то есть с делециями и вставками от одного до нескольких нуклеотидов. Это приводит к появлению стабильных мутаций и является одним из механизмов создания новых последовательностей ДНК.  Как правило, мобильные генетические элементы многократно повторены в геноме и образуют гетерогенные семейства, члены которых диспергированы по хромосомам. Большая часть членов каждого семейства являются дефектными копиями и не кодируют какой-либо функции, хотя сохраняют способность к перемещению. Поведение транспозонов можно расценить как паразитическое. Длина их от 2 до 10 тысяч нуклеотидных пар. У высших эукариот на долю транспозонов приходится примерно 10% ДНК клетки. Большинство их перемещается изредка, но, так как их в клетке довольно много, транспозиция оказывает значительное влияние на разнообразие видов.  Биологический смысл перемещения отдельных сегментов ДНК:  - прерывание соответствующего гена, что ведет к эволюции;  - регуляция деятельности генов, так как транспозоны могут нести сигналы для начала считывания генов. В новых областях усиливают или запрещают работу гена.  Транспозоны также участвуют в *горизонтальном переносе генов*.  У бактерий были обнаружены 2 класса подвижных генов, различающихся по длине и сложности организации.  1. Инсерционные последовательности, или 1S элементы, имеющие длину около тысячи пар нуклеотидов и содержащие только ген, отвечающий за их перемещение.  2. Транспозоны, длиной от 3 до 20 т. н. п., состоящие из ряда дополнительных генов, отвечающих за устойчивость бактерий к различным токсическим веществам.  Поскольку подвижные гены могут перемещаться в пределах генома с одного места на другое, то они могут быть весьма эффективными векторами для передачи рекомбинантной ДНК. Генетическая трансформация с помощью векторов на основе транспозонов была впервые осуществлена на дрозофиле. С помощью транспозируемого элемента Р дрозофиле был передан ген, обуславливающий коричневую окраску глаз. Перенос генов при помощи транспозонов имеет большие преимущества, так как он происходит с высокой частотой и не влечет значительных перестроек интегрируемой ДНК. Кроме того, этим методом можно переносить достаточно большие фрагменты ДНК.  Читать дальше ► [*биобаллистика и другие методы прямого введения генов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_4.htm) | | |
| |  |  | | --- | --- | | Раздел "Генная инженерия"Введение гена в клетку*Способы прямого введения генов в клетку* Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:  *Трансфекция*  *Микроинъекция*  *Электропорация*  *Метод «мини-клеток»*  *Упаковка в липосомы*  *Электронная пушка*  При **трансфекции** ДНК адсорбируется на кристаллах фосфата кальция (Грэхем Ван дер Эб, 1973). Образуются частицы кальциевого преципитата. Они поглощаются клеткой путем фагоцитоза.  Для повышения эффективности трансформации к специфической ДНК, содержащей ген, по которому будет производится селекция, добавляется неспецифическая ДНК-носитель. Обычно для этой цели берут ДНК из тимуса теленка или спермы лосося. Часть ДНК связывается с мембраной и не попадает в клетки. ДНК акцептируют от 15 до 90% клеток. Через несколько суток после введения небольшая доля клеток способны экспрессировать чужеродные гены, но затем уровень экспрессии падает и более или менее стабильную трансформацию претерпевает 10-3 - 10-5 клеток.  Для трансфекции используется и ДЭАЭ-декстран, полимер, адсорбирующий ДНК. Эффект вхождения в клетки и время экспрессии высоки, но частота стабильной трансформации ниже, чем при использовании преципитата кальция. Частоту трансфекции увеличивает глицериновый шок (4 минуты в 15% растворе глицерина в НEPES-буфере).  В клетки можно вводить любой ген, если заранее лигировать его с клонированным селективным маркером. Однако дальнейшие исследования показали, что лигирование вне клетки не обязательно. Клетки, поглощающие селективный ген, вместе с ним поглощают и другую ДНК, имеющуюся в кальциевом преципитате. Таким образом, пользуясь методом *котрансформации*, практически любой клонированный сегмент ДНК можно ввести в культивируемые клетки эукариот, если включить эту ДНК вместе с селективным маркером в состав смеси для образования кальциевого преципитата.  Для трансфекции можно использовать хромосомы или фрагменты хромосом. Клетки-доноры блокируются на стадии митоза. Митотические хромосомы высвобождаются под воздействием осмотического шока и гомогенизации. Их очищают путем дифференциального центрифугирования. Хромосомы осаждают на поверхности клеток хлористым кальцием, а через несколько часов обрабатывают реагентом, способным перфорировать мембраны (например, глицерином).  Для обработки клеток-рецепиентов используются грубо очищенные препараты хромосом, так как хромосомы при этом разрушаются меньше всего. Количество хромосом для обработки 1 клетки ограничено. Лучше использовать не более 20 хромосом на 1 клетку-рецепиент, так как при высоких концентрациях хромосом в суспензии они агглютинируют. Рецепиентная клетка содержит фрагменты донорных хромосом, которые могут встраиваться в геном, могут реплицироваться самостоятельно. Во введенных фрагментах часто наблюдаются делеции.  Не все клетки способны к трансформации геномной ДНК с высокой частотой. Человеческие фибробласты эффективно включают плазмидную ДНК и почти не включают геномную.  **Микроинъекция ДНК**в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора (рис. 45). Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы (ТК) и плазмиду рВR322, были инъецированы в ТК--клетки и было показано, что ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался. Метод введения ДНК с помощью микроинъекций был разработан в начале 70-х годов Андерсоном и Диакумакосом. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500-1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.  http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_1.gif  Рис. 45. Введение ДНК путем микроинъекции  **Электропорация** основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки (рис. 46). Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200 - 350 В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается.  Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток.  Электропорация — физический, а не биохимический метод, и это, по-видимому, обусловливает его широкое применение. Многочисленные исследования продемонстрировали, что электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений. Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислойную липидную мембрану, по-видимому, зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому мелкие бактериальные клетки эффективно поглощают ДНК при значительно большей напряженности (10 кВ/см и более), чем крупные животные и растительные клетки, эффективно поглощающие ДНК при напряженности поля 1—2 кВ/см.  Электропорация — наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки. Однако до недавнего времени этот метод использовался в ограниченном числе лабораторий в связи с отсутствием серийных приборов — электропораторов. Появление и совершенствование таких приборов в ближайшие годы приведет к широкому применению данного подхода в генетической инженерии самых разных типов клеток.  введение ДНК в клетку путем электропорации  Рис. 46. Метод электропорации  **«Мини-клетки»**получают путем блокирования донорных клеток митозе колцемидом. При продолжительной обработке клеток колцемидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану.  Полученные мини-клетки очень чувствительны к разного рода воздействиям, поэтому для слияния подбирают специальные мягкие условия. Метод трудный, капризный, эффективность низкая – 10-6 – 10-7.  **Упаковка в липосомы** используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз.  Липосомы - сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.  **Метод биологической баллистики (биолистики)** является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных.  Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолистической пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолистической пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.  Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.  С помощью биолистической пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолистическая трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбриогенную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигаплоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаплоидных растений получены стабильные трансформанты.  Читать дальше ► [*трансформация бактерий*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge10_1.htm) | Другие главы раздела:  [*Введение в генетическую инженерию*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge1_1.htm)[*Ферменты, используемые в генетической инженерии*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_1.htm)[*Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm)[*Построение рестрикционных карт*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)[*Конструирование рекомбинантных ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge5_1.htm)[*Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6_1.htm)[*Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7_1.htm)[*Методы клонирования ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1.htm)[*Генетические манипуляции с бактериальными клетками*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge10_1.htm)[*Введение генов в клетки млекопитающих*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm)[*Генная инженерия растений*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge12_1.htm)[*Литература к разделу*](http://www.biotechnolog.ru/ge/biblio_ge.htm)  Реклама | |

*[http://counter.yadro.ru/hit?t44.1;rhttp%3A//www.biotechnolog.ru/ge/ge9_3.htm;s1280*1024*24;uhttp%3A//www.biotechnolog.ru/ge/ge9_4.htm;0.47321701480998657](http://www.liveinternet.ru/click)* *[написать письмо автору](mailto:mail@biotechnolog.ru)* © 1995-2013 Наталья Кузьмина

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | | Раздел "Генная инженерия"Генная инженерия растений*Генетическая трансформация клеток бактерий* В настоящее время бактерия E. coli является самой изученной клеткой из всех существующих. У большинства наиболее полно изученных фагов клеткой - хозяином является также E. coli.  Протопласт E. coli одет в муреиновый мешок, прилегающий к внешней мембране. E. coli относится к микроорганизмам, не обладающим физиологической компетентностью к поглощению экзогенной ДНК. Поэтому необходимо создать условия, позволяющие преодолеть барьер клеточной стенки. Сначала получают сферопласты путем обработки клеток лизоцимом в изотоническом растворе.  Липополисахаридный слой внешней мембраны грамотрицательной бактерии стабилизирован двухвалентными катионами, поэтому для разрыхления внешней мембраны E. coli используется комплексообразователь этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), которая связывает двухвалентные катионы. При обработке EDTA часть липополисахаридов высвобождается из внешней мембраны клетки, и лизоцим может достигнуть муреинового мешка и гидролизовать его. Это ведет к повышению проницаемости клеточной оболочки. Усовершенствование методов получения сферопластов E. coli и их трансфекции позволили достичь достаточно высокой эффективности трансформации молекулами ДНК различных фагов.  Обнаружено, что на инфекционность существенное влияние оказывает форма молекул фаговых ДНК, которую они принимают in vivo. Фаги с кольцевой или линейной, но быстро замыкающейся ДНК (лямбоидные фаги) характеризуются наибольшей эффективностью трансфекции.  Успешное проведение экспериментов на кишечной палочке стало стимулом для проведения аналогичных исследований с другими прокариотическими организмами. Наибольших успехов удалось достичь с клетками Bacillus subtilis. B. subtilis - непатогенный почвенным микроорганизм, растущий в строго аэробных условиях. Бациллы не образуют токсинов и непатогенны ни для животных, ни для человека, тогда как клеточная стенка E. coli содержит эндотоксин, который довольно трудно отделить от продуктов генной инженерии. Кроме того, клеточная стенка бацилл имеет простую структуру и бактерии могут секретировать многие белки в культуральную жидкость. 20 различных видов бацил секретируют в культуральную жидкость более 40 ферментов с внеклеточной локализацией. E. coli секретирует в среду относительно мало белков, а выделение и очистка их затруднены. В бациллах также обнаружены плазмиды и фаги, которые к настоящему моменту уже хорошо изучены.  Чужеродные гены клонируют в так называемых *челночных векторах*. Эти вектора с одинаковым успехом реплицируются в клетках нескольких хозяев, в данном случае, в клетках E. coli и B.subtilis. Векторы были получены комбинацией *in vitro* фрагментов этих плазмид.  Гены E. coli со своими регуляторными районами не функционируют в B.subtilis, поэтому были использованы собственные гомологичные районы B.subtilis.  Для конструирования рекомбинантной ДНК, содержащей в своем составе ген, который должен экспрессироваться, придерживаются следующей стратегии. Синтезируют кДНК или из клонотеки выделяют клетки, несущие фрагмент генома с нужным геном, и клонируют их в соответствующем векторе. Фрагменты геномной ДНК подвергают модификации - удаляют из них некодирующие области и участки соседних генов. Часто для проведения этой операции необходимо секвенирование данного фрагмента ДНК. Затем конструируются промежуточные рекомбинантные ДНК, в которых ген помещается под контроль бактериальных регуляторных элементов (промотор, оператор, точка связывания с рибосомами). Эти регуляторные элементы выделяют из гибридных плазмид, сконструированных специально как источники регуляторных элементов. Полученная конструкция встраивается в подходящий вектор, например, pBR 322, и ген экспрессируется в бактериальной клетке.  Однако удобнее встраивать ген в специальный вектор для экспрессии, который уже содержит регуляторные элементы, обеспечивающие активную экспрессию после введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку. К таким эффективным регуляторным участкам относится, например, сильный промотор гена бэта-лактамазы (ген устойчивости к пенициллину, входящий в состав плазмиды pBR 322). Ряд генов, в том числе и ген инсулина, встраивали в сайт рестрикции Pst I, который расположен в структурной части гена. Промотор этого гена обеспечивает эффективную транскрипцию, которая продолжается до тех пор, пока РНК-полимераза не дойдет до сигнала терминации встроенного гена.  В качестве примера маркирования вектора могут служит первые эксперименты с E. coli, а точнее с одной из ее плазмид рBR322, проведенные Гилбертом для получения инсулина. Плазмида pBR322 содержит 2 гена, которые определяют устойчивость к ампициллину и тетрациклину. Рестриктаза PstI расщепляет плазмиду в средней части гена, кодирующего фермент устойчивости к апициллину. После расщепления плазмиды на ее концы с помощью концевой трансферазы надстраивали последовательность из четырех нуклеотидов с остатками гуанина. Затем, как обычно, с помощью лигаз "вшивали" ген проинсулина, получая рекомбинантную ДНК. Встроенный в плазмиду фрагмент ДНК нарушал синтез фермента, разрушающего ампициллин, но ген, обеспечивающий устойчивость к тетрациклину, оставался активным. Трансформированные таким образом клетки E. coli синтезировали гибридный белок, содержащий последовательности пенициллазы и проинсулина, поэтому биологически активный инсулин получали путем отщепления пенициллазы и средний сегмент проинсулина.  С другой стороны, если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то последний инактивируется. Следовательно, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику.  Читать дальше ► [*перенос генов в клетки животных и человека*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm) | Другие главы раздела:  [*Введение в генетическую инженерию*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge1_1.htm)[*Ферменты, используемые в генетической инженерии*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_1.htm)[*Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm)[*Построение рестрикционных карт*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)[*Конструирование рекомбинантных ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge5_1.htm)[*Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6_1.htm)[*Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7_1.htm)[*Методы клонирования ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1.htm)[*Введение гена в клетку*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_1.htm)[*Введение генов в клетки млекопитающих*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm)[*Генная инженерия растений*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge12_1.htm)[*Литература к разделу*](http://www.biotechnolog.ru/ge/biblio_ge.htm)  Реклама | | | |
| |  |  | | --- | --- | | Раздел "Генная инженерия"Введение генов в клетки млекопитающих*Генетическая транформация соматических клеток млекопитающих* Культуры трансформированных клеток млекопитающих используют для получения различных веществ. Хотя культуры клеток животных, особенно при массовом выращивании, гораздо менее экономичны, чем бактериальные дрожжевые культуры, они обладают существенным преимуществом - способностью осуществлять мелкие, но весьма важные модификации белков - продуктов гена млекопитающих. Например, для эффективного функционирования ряда белков необходимо присоединение к ним цепочек из молекул углеводов или липидов. Образование и присоединение таких цепочек - обычный процесс для клеток млекопитающих, тогда как бактериальная клетка не способна производить подобные модификации.  Помимо создания клеток-продуцентов, трансформация соматических клеток млекопитающих позволяет изучать тонкие механизмы регуляции экспрессии генов и целенаправленно модифицировать генетический аппарат клетки животных, а при необходимости и человека, что имеет огромное значение для медицинской генетики.  Культуры клеток млекопитающих могут оказаться эффективным источником выделения некоторых вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека. Получение таких вакцинных культур клеток осуществимо при помощи техники рекомбинантных ДНК и эффективных векторов экспрессии для клеток млекопитающих и человека. При использовании **ДНК-вакцин** в организм вводится не антиген, а ген, кодирующий синтез этого антигена. Ген встраивается в плазмиду, а плазмида вводится организм путем обыкновенной инъекции.  ДНК-вакцины имеют хорошие перспективы в животноводстве. Фибер – белок вирусной оболочки. Эпитоп фибера кодирует синтез протективных антител. Одно из заболеваний птиц – синдром снижения яйценоскости (ССЯ) вызывается вирусом. После анализа ДНК этого вируса был выделен ген, кодирующий фибер, проклонирован и встроен в плазмиду. Рекомбинантная вакцина при введении ее в организм принесет ДНК фибера в клетку, выработка вирусного белка спровоцирует синтез специфических антител, т. е. вызовет иммунный ответ.  Достоинством таких вакцин является очень маленький объем – для иммунизации одной мыши достаточно 10-50 мкг плазмиды, одной коровы – 200-300 мкг. Плазмида сохраняется в организме до 1 года. В стадии клинических испытаний в настоящее время находятся ДНК-вакцины против микоплазм, возбудителя туберкулеза, сальмонеллеза, лейшманиоза.  Развитие злокачественной опухоли в организме обычно подавляет иммунитет. Проблема в том, чтобы подхлестнуть иммунную систему в целом и направить ее действие против раковых клеток. Исследователи из Медицинской школы в Энн-Арборе (Мичиган) придумали метод борьбы с раком. В опухолевые клетки толстой кишки подопытных мышей ввели гены, кодирующие белки другой линии мышей. Это можно осуществить с помощью липосом или вируса. После появления на внешней стороне клеточной мембраны этих белков иммунная система атаковала такие клетки. 20% больных мышей выздоровели, у 70% опухоль уменьшилась, в контрольной группе все умерли. Лимфоциты боролись не только с «меченными» клетками опухоли, но и клетками метастаз, следовательно, иммунная система «проснулась». В настоящее время ведутся эксперименты на людях с раком кожи.  Читать дальше ► [*генотерапия*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_3.htm) | Другие главы раздела:  [*Введение в генетическую инженерию*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge1_1.htm)[*Ферменты, используемые в генетической инженерии*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_1.htm)[*Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm)[*Построение рестрикционных карт*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)[*Конструирование рекомбинантных ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge5_1.htm)[*Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6_1.htm)[*Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7_1.htm)[*Введение нового гена в клетку*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_1.htm)[*Методы клонирования ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1.htm)[*Генетические манипуляции с бактериальными клетками*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge10_1.htm)[*Генная инженерия растений*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge12_1.htm)[*Литература к разделу*](http://www.biotechnolog.ru/ge/biblio_ge.htm)  Реклама | |

*[http://counter.yadro.ru/hit?t44.1;rhttp%3A//www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm;s1280*1024*24;uhttp%3A//www.biotechnolog.ru/ge/ge11_2.htm;0.4625304032404727](http://www.liveinternet.ru/click)* *[написать письмо автору](mailto:mail@biotechnolog.ru)* © 1995-2013 Наталья Кузьмина

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | | Раздел "Генная инженерия"Генная инженерия растений*Генетическая трансформация клеток бактерий* В настоящее время бактерия E. coli является самой изученной клеткой из всех существующих. У большинства наиболее полно изученных фагов клеткой - хозяином является также E. coli.  Протопласт E. coli одет в муреиновый мешок, прилегающий к внешней мембране. E. coli относится к микроорганизмам, не обладающим физиологической компетентностью к поглощению экзогенной ДНК. Поэтому необходимо создать условия, позволяющие преодолеть барьер клеточной стенки. Сначала получают сферопласты путем обработки клеток лизоцимом в изотоническом растворе.  Липополисахаридный слой внешней мембраны грамотрицательной бактерии стабилизирован двухвалентными катионами, поэтому для разрыхления внешней мембраны E. coli используется комплексообразователь этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), которая связывает двухвалентные катионы. При обработке EDTA часть липополисахаридов высвобождается из внешней мембраны клетки, и лизоцим может достигнуть муреинового мешка и гидролизовать его. Это ведет к повышению проницаемости клеточной оболочки. Усовершенствование методов получения сферопластов E. coli и их трансфекции позволили достичь достаточно высокой эффективности трансформации молекулами ДНК различных фагов.  Обнаружено, что на инфекционность существенное влияние оказывает форма молекул фаговых ДНК, которую они принимают in vivo. Фаги с кольцевой или линейной, но быстро замыкающейся ДНК (лямбоидные фаги) характеризуются наибольшей эффективностью трансфекции.  Успешное проведение экспериментов на кишечной палочке стало стимулом для проведения аналогичных исследований с другими прокариотическими организмами. Наибольших успехов удалось достичь с клетками Bacillus subtilis. B. subtilis - непатогенный почвенным микроорганизм, растущий в строго аэробных условиях. Бациллы не образуют токсинов и непатогенны ни для животных, ни для человека, тогда как клеточная стенка E. coli содержит эндотоксин, который довольно трудно отделить от продуктов генной инженерии. Кроме того, клеточная стенка бацилл имеет простую структуру и бактерии могут секретировать многие белки в культуральную жидкость. 20 различных видов бацил секретируют в культуральную жидкость более 40 ферментов с внеклеточной локализацией. E. coli секретирует в среду относительно мало белков, а выделение и очистка их затруднены. В бациллах также обнаружены плазмиды и фаги, которые к настоящему моменту уже хорошо изучены.  Чужеродные гены клонируют в так называемых *челночных векторах*. Эти вектора с одинаковым успехом реплицируются в клетках нескольких хозяев, в данном случае, в клетках E. coli и B.subtilis. Векторы были получены комбинацией *in vitro* фрагментов этих плазмид.  Гены E. coli со своими регуляторными районами не функционируют в B.subtilis, поэтому были использованы собственные гомологичные районы B.subtilis.  Для конструирования рекомбинантной ДНК, содержащей в своем составе ген, который должен экспрессироваться, придерживаются следующей стратегии. Синтезируют кДНК или из клонотеки выделяют клетки, несущие фрагмент генома с нужным геном, и клонируют их в соответствующем векторе. Фрагменты геномной ДНК подвергают модификации - удаляют из них некодирующие области и участки соседних генов. Часто для проведения этой операции необходимо секвенирование данного фрагмента ДНК. Затем конструируются промежуточные рекомбинантные ДНК, в которых ген помещается под контроль бактериальных регуляторных элементов (промотор, оператор, точка связывания с рибосомами). Эти регуляторные элементы выделяют из гибридных плазмид, сконструированных специально как источники регуляторных элементов. Полученная конструкция встраивается в подходящий вектор, например, pBR 322, и ген экспрессируется в бактериальной клетке.  Однако удобнее встраивать ген в специальный вектор для экспрессии, который уже содержит регуляторные элементы, обеспечивающие активную экспрессию после введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку. К таким эффективным регуляторным участкам относится, например, сильный промотор гена бэта-лактамазы (ген устойчивости к пенициллину, входящий в состав плазмиды pBR 322). Ряд генов, в том числе и ген инсулина, встраивали в сайт рестрикции Pst I, который расположен в структурной части гена. Промотор этого гена обеспечивает эффективную транскрипцию, которая продолжается до тех пор, пока РНК-полимераза не дойдет до сигнала терминации встроенного гена.  В качестве примера маркирования вектора могут служит первые эксперименты с E. coli, а точнее с одной из ее плазмид рBR322, проведенные Гилбертом для получения инсулина. Плазмида pBR322 содержит 2 гена, которые определяют устойчивость к ампициллину и тетрациклину. Рестриктаза PstI расщепляет плазмиду в средней части гена, кодирующего фермент устойчивости к апициллину. После расщепления плазмиды на ее концы с помощью концевой трансферазы надстраивали последовательность из четырех нуклеотидов с остатками гуанина. Затем, как обычно, с помощью лигаз "вшивали" ген проинсулина, получая рекомбинантную ДНК. Встроенный в плазмиду фрагмент ДНК нарушал синтез фермента, разрушающего ампициллин, но ген, обеспечивающий устойчивость к тетрациклину, оставался активным. Трансформированные таким образом клетки E. coli синтезировали гибридный белок, содержащий последовательности пенициллазы и проинсулина, поэтому биологически активный инсулин получали путем отщепления пенициллазы и средний сегмент проинсулина.  С другой стороны, если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то последний инактивируется. Следовательно, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику.  Читать дальше ► [*перенос генов в клетки животных и человека*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm) | Другие главы раздела:  [*Введение в генетическую инженерию*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge1_1.htm)[*Ферменты, используемые в генетической инженерии*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge2_1.htm)[*Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm)[*Построение рестрикционных карт*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm)[*Конструирование рекомбинантных ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge5_1.htm)[*Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge6_1.htm)[*Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge7_1.htm)[*Методы клонирования ДНК*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge8_1.htm)[*Введение гена в клетку*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9_1.htm)[*Введение генов в клетки млекопитающих*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge11_1.htm)[*Генная инженерия растений*](http://www.biotechnolog.ru/ge/ge12_1.htm)[*Литература к разделу*](http://www.biotechnolog.ru/ge/biblio_ge.htm)  Реклама | |