# Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

 «Майкопский государственный технологический университет»

Факультет аграрных технологий

кафедра технологии производства сельскохозяйственной

продукции

КУРСОВАЯ РАБОТА

по дисциплине: «Генетика»

**тема: «Методы исследования клеток»**

|  |
| --- |
| **Выполнил(а):**Студент группыАГ-31, ОФОПивнев Данила  |

# Майкоп, 2022

**Вступление**

Клетки очень малы по размеру и сложно устроены: трудно рассмотреть их структуру, трудно определить молекулярный состав и еще труднее установить, как функционируют их отдельные элементы. Для изучения клеток разработано множество экспериментальных методов, возможности которых определяют уровень наших знаний в этой области. Успехи в изучении биологии клетки, включая наиболее удивительные достижения последних лет, как правило, связаны с применением новых методических подходов. Поэтому для понимания клеточной биологии необходимо иметь некоторое представление о соответствующих экспериментальных методах.

Целью нашей работы мы поставим рассмотрение современных методов, используемых для изучения клеток. Мы рассмотрим современные методы, используемые для изучения клеток. Мы начнем знакомиться с теми из них, которые позволяют изучать клетку как единое целое, и затем обратимся к анализу составляющих клетку макромолекул. Отправной точкой станет микроскопия, поскольку клеточная биология началась со световой микроскопии, и этот метод до сих пор остается весьма эффективным инструментом исследования, наряду с более современными устройствами для получения изображения, основанными на электронных пучках или иных формах излучения. От пассивного наблюдения мы постепенно перейдем к методам, предполагающим активное вмешательство: рассмотрим, как клетки различных типов могут быть отделены от ткани и при этом сохранять способность расти, узнаем, как клетки можно разрушить, а клеточные органеллы и составляющие их макромолекулы выделить в чистом виде. И, наконец, мы изложим суть технологии рекомбинантных ДНК, благодаря которой стало возможным выделять, секвенировать и манипулировать генами и, следовательно, изучать механизмы их действия в клетке. Также мы систематизируем их, выделим основные вехи, которые удалось достигнуть благодаря их применению.

**Раздел I. Микроскопические исследования как метод познания клетки**

Диаметр типичной клетки животных составляет 10-20 мкм, что в пять раз меньше мельчайшей видимой частицы. Только с появлением совершенных световых микроскопов в начале XIX века удалось установить тот факт, что все ткани животных и растений состоят из отдельных клеток. Это открытие, обобщенное в форме клеточной теории Шлейденом и Шванном в 1838 году, знаменует собой начало клеточной биологии.

Будучи чрезвычайно малыми по размерам, животные клетки к тому же бесцветны и прозрачны: следовательно, открытие их основных структур стало возможным благодаря разработке набора красителей в конце XIX столетия. Именно красители обеспечили достаточный контраст для наблюдения субклеточных структур. Сходная ситуация наблюдалась в начале 40-х годов нашего столетия, когда изобретение мощного электронного микроскопа потребовало новых методов сохранения и окраски клеток. И только после того, как они были разработаны, начала проявляться вся сложность клеточной структуры. В основе микроскопии как методологии до сих пор лежат способы приготовления образца и возможности самого микроскопа.

**1.1 Световая микроскопия и ее возможности**

***1.1.1 Обычная оптическая микроскопия***

В общем случае излучение данной длины волны может быть использовано для изучения только таких структур, минимальные размеры которых еще сопоставимы с длиной волны самого излучения. Этот принцип ограничивает возможности любого микроскопа. Предел разрешения светового микроскопа задается длиной световой волны, которая для видимого света лежит в пределах от 0,4 мкм (фиолетовый) до 0,7 мкм (темно-красный). Из этого следует, что самыми маленькими объектами, которые еще можно наблюдать в световой микроскоп, являются бактерии и митохондрии (их ширина ~ 0,5 мкм). Более мелкие элементы клетки искажаются эффектами, вызванными волновой природой света.

Для приготовления постоянного препарата, который можно окрасить и наблюдать в микроскоп, клетки обрабатывают фиксирующим агентом с тем, чтобы иммобилизировать, убить и сохранить их. В современных методах, как правило, используется обработка альдегидами, например, формальдегидом или глутаральдегидом, которые формируют ковалентные связи со свободными аминогруппами белков и, таким образом, сшивают соседние молекулы.

После фиксации ткани обычно режут на очень тонкие "ломтики" (срезы)на микротоме. Срезы толщиной от 1 до 10 мкм помещают на поверхность предметного стекла. В качестве заключающих сред используют парафин или специальную смолу. В жидком виде эти среды пропитывают и окружают фиксированную ткань: затем они затвердевают при охлаждении или за счет полимеризации, образуя твердый блок, который удобно резать на микротоме.

Существует серьезная опасность того, что процедуры фиксации или заключения могут повредить структуру клеток или клеточных макромолекул. Вот почему предложен другой метод приготовления срезов - быстрое замораживание. Замороженную ткань режут на криостате в специальном микротоме, установленном в холодной камере.

В содержимом большинства клеток, состоящих, как правило, на 70% из воды, практически отсутствуют компоненты, способные помешать прохождению световых лучей. Поэтому в естественном состоянии большинство клеток даже после фиксации и приготовления срезов практически невидимы в обычном световом микроскопе. Одна из возможностей их увидеть состоит в окраске клеток красителями.

***1.1.2Флуоресцентная микроскопия***

Поскольку большинство макромолекул представлены в клетках относительно незначительным числом копий, одна или две молекулы красителя, связанные с макромолекулой, могут оставаться незамеченными. Альтернативный подход к проблеме чувствительности состоит в использовании флуоресценции.

Флуоресцирующие красители поглощают свет одной длины волны и излучают свет другой длины волны, более длинной. Если такое вещество облучить светом, длина волны которого совпадает с длиной волны света, поглощаемого красителем, и затем для анализа использовать фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей свету, излучаемому красителем, флуоресцирующую молекулу можно выявить по свечению на темном поле. Высокая интенсивность излучаемого света является характерной особенностью таких молекул.

Применение флуоресцирующих красителей для окраски клеток предполагает использование специального флуоресцентного микроскопа. Такой микроскоп похож на обычный световой микроскоп, но здесь свет от осветителя, излучаемый мощным источником, проходит через два набора фильтров - один для задержания света перед образцом и другой для фильтрации света, полученного от образца.

Флуоресцентная микроскопия часто используется для выявления специфических белков или других молекул, которые становятся флуоресцирующими после ковалентного связывания с флуоресцирующими красителями. Например, флуоресцирующие красители могут быть связаны с молекулами антител, что сразу же превращает их в высокоспецифические и удобные красящие реагенты, селективно связывающиеся со специфическими макромолекулами на поверхности живой либо внутри фиксированной клетки. Для этой цели обычно используют два красителя - флуоресцеин,который дает интенсивную желто-зеленую флуоресценцию после возбуждения светло-голубым светом, и родамин,обусловливающий темно-красную флуоресценцию после возбуждения желто-зеленым светом.

***1.1.3 Фазово-контрастная и интерференционная микроскопия***

Возможность потери или нарушения образцов в процессе их приготовления всегда беспокоила микроскопистов. Единственный способ решить эту проблему состоит в изучении живых клеток без фиксации или замораживания. Для этой цели очень полезны микроскопы со специальными оптическими системами.

При прохождении света через живую клетку фаза световой волны меняется согласно коэффициенту рефракции клетки: свет, проходящий через относительно тонкие или относительно толстые участки клетки, такие, как ядро, задерживается, и его фаза соответственно сдвигается по отношению к фазе света, проходящего через относительно тонкие участки цитоплазмы. Как в фазово-контрастном, так и в интерференционном микроскопеиспользуются эффекты интерференции, возникающие при рекомбинации двух наборов волн, которые и создают изображение клеточных структур. Оба типа световой микроскопии широко используются для наблюдения живых клеток.

Простейший способ разглядеть детали клеточной структуры - наблюдать свет, рассеивающийся различными компонентами клетки. В темнопольном микроскопелучи от осветителя направляются сбоку и при этом в линзы микроскопа попадают только рассеянные лучи. Соответственно клетка выглядит как освещенный объект на темном поле. Одним из основных преимуществ фазово-контрастной, интерференционной и темнопольной микроскопии является возможность наблюдать движение клеток в процессе митоза и миграции

Видеокамеры и соответствующие технологии обработки изображения значительно увеличили возможности световой микроскопии. Это позволило наблюдать клетки в течение длительного времени при низкой освещенности, исключая длительное воздействие яркого света (или тепла). Поскольку изображение создается видеокамерой в форме электронных сигналов, его можно соответствующим образом преобразовать в числовые сигналы, направить в компьютер и затем подвергнуть дополнительной обработке для извлечения скрытой информации. Эти и подобные методы обработки изображения позволяют компенсировать оптические недостатки микроскопов и практически достичь предела разрешения.

Высокий контраст, достижим с помощью компьютерной интерференционной микроскопии, позволяет наблюдатьдаже очень мелкие объекты, как, например, отдельные микротрубочкидиаметр которых менее одной десятой длиныволны света (0,025 мкм). Отдельные микротрубочки можно увидеть и с помощью флуоресцентной микроскопии. Однако в обоих случаях неизбежны эффекты дифракции, сильно изменяющие изображение. Диаметр микротрубочек при этом завышается (0,2 мкм), что не позволяет отличать отдельные микротрубочки от пучка из нескольких микротрубочек.

**1.2 Электронная микроскопия**

Взаимосвязь длины волны света и предела разрешения сохраняется для любой формы излучения, как для световых лучей, так и для электронов. Однако в последнем случае предел разрешения существенно ниже. Длина волны электрона уменьшается с увеличением его скорости. В электронном микроскопе с напряжением 100000 В длина волны электрона равна 0.004 нм, а согласно теории, разрешение такого микроскопа составляет 0,002 нм.

Общая схема просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) напоминает схему светового, хотя электронный микроскоп значительно больше и как бы перевернут. Источник излучения - нить катода, испускающая электроны с вершины цилиндрической колонны высотой около двух метров. Поскольку при столкновении с молекулами воздуха электроны рассеиваются, в колонне должен быть создан вакуум. Электроны, излучаемые катодной нитью, ускоряются ближайшим анодом и проникают через крошечное отверстие, формируя электронный луч, проходящий в нижнюю часть колонны. Вдоль колонны на некотором расстоянии расположены кольцевые магниты, фокусирующие электронный луч, подобно стеклянным линзам, фокусирующим луч света в световом микроскопе. Образец через воздушный шлюз помещают в вакуум колонны, на пути электронного пучка. Часть электронов в момент прохождения через образец рассеивается согласно плотности вещества в данном участке, остаток электронов фокусируется и образует изображение на фотопластинке или на фосфоресцирующем экране.

В электронном микроскопе нельзя наблюдать живые объекты. Поэтому ткани фиксируют, сшивая клетки и клеточные структуры глутаральдегидом, а затем обрабатывают осмиевой кислотой. Образцы обезвоживают, фиксируют смолами и нарезают тонким стеклянным или алмазным ножом.

Тонкие срезы практически являются двумерными срезами ткани и не позволяют судить о трехмерной структуре клеточных компонентов. Трехмерное изображение можно получить после реконструкции сотен серийных срезов. В настоящее время разработаны более прямые методы получения трехмерного изображения. Один из них состоит в изучении образца под сканирующим электронным микроскопом. Для получения изображения в просвечивающем электронном микроскопе используют электроны, проходящие через образец, а в сканирующем электронном микроскопе используются электроны, рассеиваемые или излучаемые поверхностью образца. В данном случае образец должен быть зафиксирован, высушен и покрыт тонкой пленкой тяжелого металла. Затем образец сканируется очень узким пучком электронов. Таким образом происходит формирование единого, цельного и значительно увеличенного изображения.

Метод сканирующей электронной микроскопии обеспечивает значительную глубину фокусировки; более того, поскольку масштабы рассеивания электронов определяются углом поверхности по отношению к лучу, на изображении возникают чередующиеся светлые и темные участки, создающие впечатление трехмерности. Но этот метод применим только для изучения поверхности и его разрешение сравнительно невелико (около 10 нм с эффективным увеличением примерно 20 тыс. раз). Данный метод практически неприменим для изучения субклеточных органелл и используется исключительно для изучения целых клеток и тканей.

Просвечивающий электронный микроскоп можно использовать для изучения поверхности образца с очень большим увеличением, наблюдая отдельные макромолекулы. Как и при сканирующей электронной микроскопии, на высушенный образец напыляется тонкая пленка тяжелого металла. Металл напыляется под определенным углом, так что отложения напыленной пленки в некоторых местах толще, чем в других. Этот процесс известен как оттенение - здесь возникает эффект тени, создающий впечатление трехмерности изображения.

Приготовленные таким образом образцы могут быть достаточно малы и тонки, чтобы электронный луч проникал сквозь них; например, таким способом можно анализировать индивидуальные молекулы, вирусы и стенки клеток. Что же касается более толстых образцов, то здесь после оттенения необходимо удалить органический материал клетки, при этом на поверхности образца останется только тонкий металлический отпечаток или реплика поверхности. Эта реплика затем усиливается углеродной пленкой, после чего ее можно поместить на сетку и изучать в обычном электронном микроскопе.

Вклеточной биологии особенно успешно используются два метода, основанные на получении механических реплик. Один из них - метод электронной микроскопии "замораживание-скалывание" - дает возможность изучать внутреннее строение клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота (-196'С). Замороженный блок затем раскалывают лезвием ножа. Скол часто проходит через гидрофобную середину двойного слоя липидов, обнажая внутреннюю поверхность клеточных мембран. Образующуюся поверхность скола оттеняют платиной, органический материал удаляют и изучают полученные реплики в электронном микроскопе.

Метод "замораживания - травления"используется для изучения внешней поверхности клеток и мембран. В данном случае клетки замораживают при очень низкой температуре и замороженный блок раскалывают лезвием ножа. Содержание льда вокруг клеток (и в меньшей степени внутри клеток) понижают возгонкой воды в вакууме при повышении температуры (процесс называют *вакуумной сушкой)*. Участки клетки, подвергнутые такому травлению, затем оттеняют для приготовления платиновой реплики.

Для того чтобы добиться высокого качества изображения, препятствуют образованию больших кристаллов льда. Это возможно при ускоренном замораживанииобразца. Один из методов такого быстрого замораживания состоит в охлаждении до - 269°С жидким гелием. Особенно впечатляющие результаты получают после глубокого травления быстро замороженных клеток. Этот метод позволяет выявлять структуры внутреннего содержимого клеток, демонстрируя их трехмерную организацию с исключительной четкостью.

Поскольку в этом случае в микроскопе под вакуумом наблюдают не образцы, а реплики, полученные после оттенения металлом, методы замораживание-скалывание и замораживание-травление можно использовать для изучения замороженных нефиксированных клеток и исключить риск проявления артефактов, вызванных фиксацией.

Используя для контрастирования оттенение солями тяжелых металлов, можно наблюдать в электронный микроскоп изолированные макромолекулы, например, ДНК или большие белки, а после негативного контрастированияразрешению поддаются даже мельчайшие детали. При приготовлении образцов для негативного контрастирования исследуемые молекулы наносят на тонкую пленку углерода (практически прозрачную для электронов), затем ее смачивают концентрированным раствором солей тяжелых металлов, например, уранилацетата. После высушивания образца тонкая пленка солей тяжелых металлов равномерно покрывает углеродную подложку, за исключением участков, занятых адсорбированными макромолекулами. Вещество макромолекул более проницаемо для электронов по сравнению с прилежащими участками, покрытыми солями тяжелых металлов; за счет этого возникает обращенное или негативное изображение молекулы.

В настоящее время можно наблюдать с высоким разрешением даже внутренние детали трехмерных структур, таких, как вирусы. Для этого используют метод криоэлектронной микроскопии,где очень тонкий (примерно 100 нм), быстро замороженный слой влажного образца помещают на микроскопическую решетку. С помощью специального приспособления гидратированный образец удерживают при - 160сС в вакууме микроскопа. Таким способом можно наблюдать материал практически непосредственно: без фиксации, окраски и сушки.

**1.3 Рентгеноскопия**

Рентгеновские лучи, подобно свету, являются одной из форм электромагнитного излучения, но вследствие того, что длина волны рентгеновских лучей значительно короче, их применение позволяет разрешить значительно более мелкие детали. В отличие от видимого света или потока электронов, рентгеновские лучи нельзя сфокусировать и после их прохождения через образец получить обычное изображение. Однако структуру образца можно выявить, используя метод дифракции рентгеновскихлучей.

Рассеянное излучение можно рассматривать как набор перекрывающихся волн, каждая из которых отражается разными участками объекта. Если волны перекрываются, они подвергаются интерференции и возникает распределение излучения, известное как дифракционная картина. Дифракционная картина может быть зарегистрирована на фотопластинке, помещенной на некотором расстоянии от предмета, или представлена с помощью количества рассеянного излучения, отраженного объектом в разных направлениях. Форма дифракционной картины определяется структурой объекта. С другой стороны, исходя из полного описания дифракционной картины, можно теоретически рассчитать структуру данного объекта

Полная дифракционная картина кристаллической решетки будет состоять из множества ярких пятен различной интенсивности. Относительная интенсивность различных пятен в дифракционной картине зависит от способности различных объектов в решетке рассеивать излучение. В действительности интенсивность данного пятна пропорциональна интенсивности излучения, которое будет отражаться в данном направлении от характерного одиночного объекта.

Таким образом, положениепятен в дифракционной картине зависит от расположения объекта в системе, а их интенсивностьдает информацию о внутренней структуре типичного объекта. Более того, такая информация является точной и достаточной, поскольку она была получена путем объединения вкладов множества равноценных источников. Пользуясь довольно полным описанием дифракционной картины, можно зачастую вычислить структуру отдельных объектов, образующих кристаллическую решетку.

Длина волны рентгеновских лучей около 0.1 нм (что соответствует диаметру атома водорода), и поэтому данный тип излучения идеально подходит для анализа расположения индивидуальных атомов в молекулах. Такую задачу нельзя решить даже на самых современных электронных микроскопах. Существенным преимуществом рентгеновских лучей является высокая (выше, чем у электронов) проникающая способность. Это делает пригодными для анализа более толстые образцы. И, наконец, поскольку в данном случае использование вакуума не предусмотрено, можно изучать толстые водосодержащие образцы. Вследствие этого исключаются артефакты, возникающие в процессе приготовления образца.

Для достижения высокого разрешения необходимо иметь кристаллы с высокой степенью упорядоченности. По мере прохождения через образец рентгеновские лучи рассеиваются электронами атомов, составляющими образец. Поэтому большие атомы с большим количеством электронов рассеивают рентгеновские лучи более эффективно, чем небольшие атомы, так что атомы С, N, О, Р регистрируются гораздо более надежно, чем атомы Н.

Расшифровка рентгенограмм, образованных крупными и неупорядоченными молекулами белков, до 1960 года была невозможна. В последние годы рентгеноструктурный анализ все более автоматизируется. Рассеянные рентгеновские лучи измеряются электронными детекторами, а компьютеры выполняют необходимые вычисления. В настоящее время наиболее длительным этапом в подобном исследовании является этап получения подходящих кристаллов исследуемых макромолекул; зачастую на подбор оптимальных условий кристаллизации уходят годы. Имея хорошие кристаллы, можно рассчитать структуру белка с разрешением 0,3 нм и выявить не только основные закономерности расположения полипептидной цепи, но и некоторые более мелкие детали. Именно таким образом к настоящему времени были установлены структуры более сотни белков и нескольких малых молекул РНК и ДНК.

**Раздел II Методы изучения химической среды живых клеток**

Классические методы микроскопии позволяют судить о клеточной архитектуре, но не дают подробной информации о клеточной химии. Поддержание жизни возможно только при быстрой и точной регуляции концентрации таких важнейших метаболитов, как АТФ, глюкоза и неорганические ионы; содержание этих веществ в различных участках клеток и тканей может существенно варьировать. Более того, поскольку низкомолекулярные вещества, такие, как клеточный АТФ, кальций и водород могут выполнять функцию внутриклеточных "мессенджеров", очень важно уметь прослеживать изменение их концентрации в ответ на внутриклеточные сигналы. Обсудим некоторые методы, которые позволяют определять химические условия в клетках в процессе их жизнедеятельности.

**2.1 Использование ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для определения химических условий в живых клетках**

Ядра многих атомов характеризуются магнитным моментом: следовательно, они обладают внутренним магнетизмом. Магнитные характеристики этих атомов подвержены влиянию со стороны окружающих атомов. Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), являющийся безвредным для живых клеток, позволяет определить химическую природу вещества. Если ядра атомов, обладающие магнитным моментом, поместить в магнитное поле, они принимают одну из возможных ориентации. Каждая из ориентации характеризуется энергией, определяемой силой поля и химическим окружением. При облучении радиоволнами набора атомов в идентичном химическом окружении, энергия этих волн будет в значительной степени абсорбироваться, если волны обладают строго определенной частотой, соответствующей разности энергетических состояний двух возможных ориентации ядер в магнитном поле. Это так называемая *резонансная частота.* Образец ткани содержит атомы в различных молекулах, в различном окружении, поэтому он будет поглощать энергию на различных резонансных частотах. Диаграмма поглощения на резонансных частотах для данного образца составит его *спектр ЯМР.* Такой спектр отражает структуру и относительное содержание каждого типа молекул, содержащих магнитные ядра.

Лишь некоторые атомы имеют изотопы, создающие удовлетворительный сигнал ЯМР. Для изучения макромолекул, содержащихся внутри живой клетки, обычно используют широко распространенные изотопы 1Н, 13Na, 3lP, 39K и редкие изотопы l3C и l5N. Ввиду важной роли соединений фосфора, которую они играют в метаболизме, эффективным оказывается определение ЯМР 31Р. Этот изотоп в норме присутствует в фосфорсодержащих веществах клеток. Сигналы, создаваемые им, можно использовать для слежения за изменением внутриклеточной концентрации в процессе мышечного сокращения таких соединений, как АТР и неорганический фосфат.

Редкие изотопы 13С и I5N в норме не содержатся в клетках в достаточных количествах, однако их можно вводить в специфические макромолекулы, имеющие биологическое значение. С помощью ЯМР удается следить впоследствии за их химической трансформацией. Если, например, выращивать клетки на среде с глюкозой 13С, то, измеряя в течение некоторого времени спектр ЯМР образца, можно определять скорость многих реакций, в которых участвует глюкоза.

Основным ограничением метода ЯМР является его низкая чувствительность. Например, для определения содержания какого-либо соединения с использованием современных модификаций метода 31Р-ЯМР, в грамме живой ткани должно содержаться не менее 0,2 мМ исследуемого соединения. Однако многие метаболиты присутствуют в живых тканях в более низких концентрациях. Более того, поскольку для снятия одного спектра ЯМР требуется, как правило, несколько минут, можно не уловить быстрые изменения цитохимических характеристик. С другой стороны, значительное преимущество ЯМР состоит в его безвредности для живых клеток, и это обстоятельство делает данный метод весьма перспективным для клеточной биологии.

**2.2 Использование внутриклеточных электродов**

Для изучения отдельных клеток необходимо использовать методы более чувствительные, чем ЯМР. Один из них основан на подходе, разработанном электрофизиологами для изучения разности потенциалов и тока на плазматической мембране. С этой целью готовят внутриклеточные *микроэлектроды.* Они состоят из тонких стеклянных трубок, диаметр конца которых измеряется долями микрона; такие трубочки заполняют электропроводным раствором (обычно это раствор соли КС1 в воде). Кончик микроэлектрода вводят в цитоплазму через плазматическую мембрану, которая смыкается вокруг капилляра, плотно прилегая к стеклу, так что клетка остается относительно неповрежденной.

В исследовании клеточного содержимого микроэлектроды используют двояко: с их помощью можно измерять внутриклеточную концентрацию обычных ионов, таких, как ионы Н+ ,Na+, K+, Cl-, Ca2+ и Mg2+. Они могут быть использованы и для инъекции молекул в клетки.

Микроэлектродную технику используют для изучения транспорта ионов через специализированные белковые каналы (именуемые также ионными каналами), содержащиеся в небольших участках плазматической мембраны. В этом случае необходим стеклянный микроэлектрод с несколько более толстым кончиком. Его не вводят в плазматическую мембрану, а плотно и мягко прижимают к ней. Это позволяет регистрировать электрические характеристики небольшого участка мембраны, прилегающего к кончику микроэлектрода, который прикасается к клетке или находится на небольшом расстоянии от нее. Данный метод известен как "пэтч-регистрация" (регистрация в данном участке). Его применение произвело настоящую революцию в исследовании ионных каналов. Это едиственный метод клеточной биологии, который дает возможность изучать функцию одиночной белковой молекулы в реальном времени.

**2.3 Использование светоизлучающих индикаторов**

Электроды, чувствительные к определенным ионам, позволяют измерять их концентрацию только в одной точке на клеточной поверхности. Если же ионы представлены в клетках в низкой концентрации, показания таких электродов зачастую оказываются ошибочными. Поэтому в таких случаях для регистрации используют внутриклеточные индикаторы, излучающие свет. Такими являются люминесцентные и флуоресцентные вещества, например, белок акварин или синтетические. Этим способом измеряют концентрацию ионов кальция и водородных ионов.

Для введения в клетки молекул, не проникающих через мембрану (это могут быть светоизлучающие индикаторы, клеточные белки, связанные с флуоресцентной меткой) используют микроинъекции молекул в клетки с помощью стеклянной микропипетки. Используя соответствующий микроскоп, исследователь получает возможность следить за поведением такого белка в процессе роста и деления клеток.

Микроинъекции - весьма эффективный и достаточно широко используемый метод, однако важно помнить, что в данном случае процедуре микроинъекции подвергается каждая клетка отдельно, поэтому количество клеток ограничено. Для повышения проницаемости клеточных мембран используют мощный электрический разряд или химическое воздействие, например, раствором детергента низкой концентрации. Электрический разряд создает в плазматической мембране большие поры без повреждения внутриклеточных мембран. Эти поры остаются открытыми в течение нескольких минут и даже часов в зависимости от типа клеток и интенсивности электрического воздействия. Через эти поры макромолекулы могут быстро входить в цитозоль или покидать его. При ограниченном воздействии мембрана многих клеток восстанавливается и клетки выживают. Третий метод введения в клетки крупных молекул состоит в слиянии частиц, окруженных мембраной и содержащих необходимые молекулы, с плазматической мембраной клетки.

**Раздел III Методы культивирования клеток и определения их состава**

Структуру органелл и крупные молекулы можно изучать под микроскопом; для локализации специфических молекул в клетке разработаны эффективные методы окрашивания. Однако чтобы разобраться в молекулярных основах клеточной организации, необходим детальный биохимический анализ. К сожалению, биохимические методы предполагают использование значительного количества клеток и в процессе исследования клетки разрушаются. Если в качестве образца для биохимического анализа использовать кусочек ткани, то после разрушения будет получена смесь фрагментов различных клеток. И если ткань образована клетками разного типа, что скорее является правилом, чем исключением, то разобраться в этой смеси будет просто невозможно. Для того, чтобы извлечь максимум информации о всех клетках, составляющих ткани, разработаны методы разделения тканей на клетки и методы выделения отдельных типов клеток. Полученную относительно гомогенную популяцию клеток можно подвергать анализу непосредственно, либо предварительно размножив их путем культивирования.

**3.1 Методы культивирования клеток**

Большинство видов клеток растений и животных в благоприятных условиях способны выжить, размножиться и даже дифференцироваться. Используя методы культуры ткани, можно изучать клетки под микроскопом или анализировать их биохимически. Кроме того, добавляя в культуральный сосуд и удаляя из него специфические молекулы, такие, как гормоны или факторы роста, мы можем судить об их влиянии на клетки. Применение смешанных культур позволяет изучать взаимодействие между различными типами клеток.

В наше время культуры обычно готовят из клеточной суспензии, полученной путем диссоциации ткани. Большинство клеток, образующих ткани многоклеточных организмов, в отличие от бактериальных клеток не способны расти в суспензии. Для роста и деления им необходима твердая поверхность. Вначале, когда метод культивирования только появился, в качестве механической опоры использовали сгусток плазмы, но в настоящее время его обычно заменяют поверхностью пластиковой культуральной чашки. Клетки очень различаются по своим потребностям; некоторые из них способны расти или дифференцироваться только в том случае, если культуральная чашка покрыта компонентами внеклеточного матрикса, например коллагеном.

Разработаны специальные среды определенного химического состава, используемые для культивирования клеток различных типов. Наряду с низкомолекулярными веществами они содержат один или несколько различных белковых факторов роста, необходимых клеткам для выживания и пролиферация в культуре: например, некоторым нервным клеткам, как в культуре, так и в организме животного необходимы следовые количества *фактора, стимулирующего рост нервов.* Были открыты и другие факторы подобного типа, имеющие жизненно важное значение для развития клеток определенных типов и поддержания их нормального существования.

Большинство клеток млекопитающих в культуре погибает после определенного числа делений; клетки кожи человека, например, прежде чем погибнуть, делятся 50-100 раз. Существует предположение, что ограниченный срок жизни клеток в культуре отражает ограниченный срок жизни организма, из которого были получены эти клетки. Иногда в культуре появляются мутантные клетки, которые практически бессмертны. Они могут размножаться бесконечно и образуют клеточную линию. Эти клетки лучше растут на твердой поверхности, и после образования *непрерывного слоя* их рост, как правило, прекращается.

Обычно мутантные клетки, способные к непрерывному делению, все же отличаются от раковых клеток, способных к непрерывному делению. В отличие от других клеточных линий раковые клетки могут расти, не прикрепляясь к какой-либо твердой поверхности, и образуют в культуральных чашках популяцию более плотную, чем популяции обычных клеток. Аналогичное свойство можно вызвать экспериментально и у нормальных клеток путем *трансформации* их опухолеродными вирусами или каким-либо соединением. Полученные таким образом неопластически трансформированные клеточные линии способны вызывать образование опухолей после введения в организм животных. И трансформированные, и нетрансформированные клеточные линии служат источником большого количества клеток одного типа и поэтому представляют большую ценность для исследователя. Такие клеточные линии имеют еще то преимущество, что при - 70°С их можно хранить неопределенно долго и при этом они сохраняют способность производить жизнеспособные клетки после размораживания.

Генетическую однородность клеточных линий можно усилить еще больше путем **клонирования,** т. е. выделив отдельную клетку и позволив ей пролиферировать до образования большой колонии. *Клон - это* популяция клеток, происходящих из одной клетки-предшественника. Клонирование клеток используется в основном для получения клеточных линий, у которых мутация затронула определенные гены. Исследование таких мутантных клеток, дефектных по специфическому белку, позволяет узнать много нового о функции белка в нормальных клетках.

Две клетки, сливаясь, образуют **гетерокарион** - одну комбинированную клетку с двумя ядрами. Обычно, чтобы осуществить слияние клеток, клеточную суспензию обрабатывают инактивированными вирусами, или полиэтиленгликолем. Оба этих агента повреждают плазматическую мембрану клетки, что и приводит к слиянию клеток. Образование гетерокарионов дает возможность смешивать компоненты двух отдельных клеток с целью изучения их взаимодействия. Именно в опытах по гибридизации клеток мыши и клеток человека впервые были получены данные, свидетельствующие о том, что белки поверхности клеток человека и мыши, находившиеся вначале на своих половинках гетерокариона, быстро диффундируют и перемешиваются по всей его поверхности.

По истечении определенного времени гетерокарион делится митотически, образуя в результате *гибридную* клетку. Ядерные оболочки теряют хромосомы человека. В результате образуется множество гибридных линий "мышь-человек", каждая из которых содержит одну или несколько хромосом человека. Это явление оказалось полезным для картирования и локализации генов в геноме человека. Например, инсулин человека синтезируют только те гибридные клетки, которые содержат хромосому 11 человека, следовательно, ген, кодирующий инсулин, находится именно на этой хромосоме.

**3.2 Фракционирование клеточного содержимого**

При осторожном применении методов разрушения некоторые органеллы сохраняются в интактном состоянии (ядра, минтохондрии, апарат Гольджи, лизосомыи пероксисомы). Таким образом, суспензия клеток превращается в растворимый экстракт, содержащий довольно грубую суспензию связанных с мембраною частиц, обладающих характерными размерами, зарядом и плотностью.

После того как в начале 40-х годов начали использовать препаративную центрифугу, разделение различных компонентов гомогената стало вполне реальным. Такая обработка делит клеточные компоненты по их размеру: более крупные частицы при центрифугировании движутся быстрее. Крупные компоненты экстракта, в том числе ядра или неразрушенные клетки, быстро оседают при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки.

Ультрацентрифуга разделяет клеточные компоненты не только по массе, но и по плавучей плотности. В этом случае образец седиментирует в круговом градиенте, образованном высококонцентрированным раствором сахарозы или хлористого цезия. Компоненты клеток опускаются по градиенту до тех пор, пока не достигнут участка, плотность раствора в котором равна собственной плотности компонентов. Дальнейшей седиментации компонентов не происходит и они "застревают" на этом уровне. Таким образом, в центрифужной пробирке возникает набор различных полос, причем полосы прилежащие к дну пробирки, содержат компоненты максимальной плавучей плотности. Данный метод настолько чувствителен, что с его помощью можно отделять немеченые макромолекулы от макромолекул, содержащих тяжелые изотопы (13С или 15N).

Фракционированные клеточные экстракты, называемые также бесклеточными системами, широко используются для изучения внутриклеточных процессов. Только работая с бесклеточными экстрактами можно установить молекулярный механизм биологических процессов, поскольку лишь в этом случае исследуемых механизм может быть изучен в чистом виде без помех, создаваемых происходящими в клетке побочными реакциями. Использование бесклеточных систем принесло первый триумфальный успех при изучении механизмов биосинтеза белка. Отправной точкой в данном случае послужил неочищенный клеточный экстракт, способный транслировать молекулы РНК в белок. После многократного фракционирования этого экстракта были получены рибосомы, РНК и различные ферменты, составляющие в совокупности аппарат биосинтеза белка. После получения отдельных компонентов в чистом виде их можно было добавлять в систему и исключать из нее и таким образом уточнять роль каждого компонента в процессе биосинтеза белка. Эта же "система трансляции in vitro" оказалась полезной для расшифровки генетического кода-с использованием в качестве матричной РНК (мРНК) искусственных полинуклеотидов известного состава.

В настоящее время различные системы трансляции in vitro применяют и для определения механизмов распределения белков по различным внутриклеточным компартментам, а также для идентификации белков, кодируемых очищенными препаратами мРНК (очистка мРНК является важным этапом в процедуре клонирования генов).

Многое из того, что мы знаем о молекулярной биологии клетки, открыто при изучении бесклеточных систем. Именно так удалось выяснить механизмы репликации ДНК, транскрипции ДНК, сплайсинга РНК, мышечного сокращения и транспорта частиц по микротрубочкам. Анализ в бесклеточных системах подразумевает полное разделение всех составляющих ее индивидуальных макромолекулярных компонентов и, в частности всех белков, входящих в систему. Методы разделения белков рассматриваются в последующих разделах.

В настоящее время хроматография является одним из методов, наиболее широко используемых для фракционирования белков. Наибольшее распространение получила распределительная хроматография.

Белки чаще всего разделяют методом хроматографии на колонках (колоночная хроматография). В этом случае смесь молекул в растворе пропускают через колонку, содержащую твердый пористый матрикс. В результате взаимодействия с матриксом различные белки проходят через колонку с различной скоростью. После того как разные белки достигнут в определенной последовательности дна колонки, их собирают отдельными фракциями. В настоящее время разработано и применяется множество матриксов различных типов, используя, которые можно делить белки согласно их заряду (ионообменная хроматография), гидрофобности (гидрофобная хроматография), размеру (хроматография гель-фильтрацией) или способности связываться различными химическими группами (аффинная хроматография).

На каждом, этапе колоночной хроматографии содержание белка в смеси увеличивается не более чем в 20 раз, и поэтому выделить из сложной смеси белков отдельный белок за один цикл практически невозможно. На долю каждого белка, как правило, приходится менее 1/1000 всего белка клетки, и для его очистки требуется последовательное использование нескольких различных типов колонок.

Гораздо более эффективен метод аффинной хроматографии (хроматография по сродству). В основе этого метода лежат биологически важные взаимодействия, происходящие на поверхности белковых молекул. Так, при ковалентном связывании субстрата фермента с матриксом, например, с полисахаридными шариками, фермент специфически удерживается матриксом и может быть элюирован (смыт) практически в чистом виде. Аффинные колонки обладают высокой степенью специфичности; за один цикл хроматографии можно добиться очень высокой степени очистки (1000-10000 раз). Применение колонок высокоэффективной жидкостной хроматографии обеспечивает высокий уровень разрешения и значительную скорость процесса. Вот почему именно этот метод чрезвычайно популярен сейчас для разделения и белков, и малых молекул.

Белки обычно несут суммарный положительный или отрицательный заряд, обусловленный наличием на их поверхности положительно или отрицательно заряженных групп аминокислот. Если белковые молекулы поместить в электрическое поле, они начинают перемещаться со скоростью, которая определяется их суммарным зарядом, а также формой и размерами. Этот феномен лежит в основе электрофореза - метода разделения смесей белков в свободных водных растворах и в твердом пористом матриксе.

В середине 60-х годов был разработан модифицированный метод электрофореза - *электрофорез в полиакриламидном геле* в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ). При использовании данного метода белки мигрируют в инертном матриксе - полиакриламидном геле с высоким содержанием поперечных сшивок. При этом белки находятся в растворе, содержащем мощный, отрицательно заряженный детергент - додецилсульфат натрия или ДСН (SDS).

Связываясь с гидрофобными участками белковой молекулы, этот детергент вызывает развертывание белковых молекул в длинные вытянутые цепи. Развертываясь, отдельные белковые молекулы освобождаются из комплексов с белками или молекулами липидов и солюбилизируются в растворе детергента.

Каждая молекула белка связывает значительное количество негативно заряженных молекул детергента, общий заряд которых превосходит общий заряд белка. По этой причине белок после того, как будет приложено напряжение, начнет двигаться в направлении положительного электрода. Белки одного размера ведут себя сходным образом, поскольку, во-первых, их природная структура полностью нарушена ДСН так, что их форма идентична, во-вторых, они связывают одинаковое количество ДСН и приобретают одинаковый, негативный заряд. Крупные белки, обладающие большим зарядом, подвергаются действию значительных электрических сил, а также более существенному торможению. В обычных растворах эти эффекты взаимно погашаются, но в порах полиакриламидного геля, действующего как молекулярное сито, большие белки тормозятся значительно сильнее, чем малые белки. Вследствие этого сложная смесь белков делится на ряд полос, расположенных в соответствии с их молекулярной массой. Используя красители, можно выявить основные фракции полипептидов.

Метод ДСН-электрофореза белков в полиакриламидном геле значительно мощнее любого другого метода фракционирования белков, известных ранее, хотя бы потому, что может быть использован для выявления любого белка независимо от его растворимости в воде. При использовании этого метода полипептиды разделяются строго по размеру, поэтому с его помощью можно получить информацию о субъединичном составе любого комплекса и о молекулярной массе белков, образующих этот комплекс.

Метод *двумерного гель-электрофореза*, в котором объединены две различные процедуры разделения, позволяет идентифицировать более 1000 белков. Результаты при этом получают в виде "двумерной" белковой карты.

При работе данным методом на первом этапе белки разделяют по их заряду. Для этого образец помещают в небольшой объем раствора, содержащего неионный (незаряженный) детергент - меркаптоэтанол, и в качестве денатурирующего агента - мочевину. Диссоциированные полипептидные цепи разделяют методом изоэлектрического фокусирования, основанном на изменении заряда белковой молекулы при изменении рН окружающей среды. При изоэлектрическом фокусировании белки подвергаются электрофорезу в узкой трубочке, заполненной полиакриламидным гелем, в котором с помощью специальных буферов создается градиент рН. Под действием электрического поля каждый белок перемещается в ту зону градиента, которая соответствует его изоэлектрической точке и остается в ней. Так происходит разделение белков в одном направлении двумерного гель-электрофореза.

На втором этапе трубочка геля, содержащего разделенные белки, снова подвергается электрофорезу, на этот раз в направлении перпендикулярном тому, что на первом этапе. В этом случае электрофорез ведут в присутствии ДСН и белки разделяют по их молекулярной массе, как в одномерном ДСН-ПААГ. Неразделенными в результате остаются только те белки, которые неразличимы как по изоэлектрической точке, так и по молекулярной массе; такое сочетание встречается очень редко. Разрешение этого метода настолько велико, что позволяет разделить два практически идентичных белка, отличающихся одной заряженной аминокислотой.

В основе точной идентификации белковой молекулы лежит определение аминокислотной последовательности. Уже на первом этапе этого процесса, включающего расщепление белка на мелкие фрагменты, можно получить значительную информацию о данном белке. Так, фермент *трипсин* отщепляет остатки лизина и аргинина со стороны карбоксильных групп; химический реактив *бромистый циан* расщепляет пептидные связи, расположенные после остатков метионина. Поскольку такие специфические ферменты и реактивы расщепляют в белковой молекуле ограниченное количество связей, при их воздействии образуется смесь больших пептидов. Разделив эту смесь методом электрофореза или хроматографии, можно получить пептидную карту**,** характеризующую исследуемый белок. Такие пептидные карты называют иногда "фингерпринтами" (отпечатками пальцев) белка.

После разделения пептидов определяют последовательность аминокислот в каждом из выделенных пептидных фрагментов. Сперва пептид обрабатывают каким-либо реактивом, взаимодействующим только со свободной аминогруппой на его N-конце, специфически расщепляют пептидную связь. Высвобождающуюся аминокислоту идентифицируют методом хроматографии. Оставшийся пептид укорачивается на одну аминокислоту. Его также подвергают реакциям, проводимым в той же последовательности. Циклический характер этих реакций дал возможность автоматизировать весь процесс в приборах секвенаторах. На последнем этапе анализа последовательности аминокислот, полученные для пептидных фрагментов, располагают в том же порядке, как они были расположены в интактной цепи. Для этого сравнивают последовательности наборов перекрывающихся фрагментов, полученных при расщеплении одного и того же белка различными протеолитическими ферментами.

В настоящее время достаточно определить в белке 20 аминокислот, чтобы сконструировать ДНК-зонд, используемый для клонирования соответствующего гена. После выделения гена оставшаяся невыясненной часть аминокислотной последовательности белка может быть реконструирована по нуклеотидной последовательности согласно генетическому коду.

Рассмотрим два метода определения молекул внутри клеток: один из них включает использование радиоактивных изотопов, а другой - использование антител. Оба метода весьма эффективны для выявления определенных молекул в сложных смесях. Потенциально эти методы очень чувствительны и при оптимальных условиях дают возможность обнаруживать в образце молекулы, общее количество которых меньше 1000.

Радиоактивные молекулы можно использовать для исследования практически всех внутриклеточных процессов. Для этого обычно в ходе эксперимента в культуральную среду добавляют предшественник в радиоактивной форме: при этом радиоактивные молекулы смешиваются с присутствующими в клетках нерадиоактивными. Клетка использует оба типа молекул, поскольку они отличаются только массой атомного ядра. Изменение локализации радиоактивных молекул в клетке или их химические превращения можно проследить во времени. Именно этот метод дает возможность дискриминировать химически идентичные молекулы, история которых различна - например, те молекулы, которые отличаются временем синтеза. С помощью радиоактивных методов удалось определить, что почти все молекулы живой клетки постоянно разрушаются и замещаются другими молекулами.

Одна из наиболее важных областей применения радиоактивных изотопов в биологии клетки - это определение локализации радиоактивных соединений в срезах клеток или живых тканей методом радиоавтографии. При использовании этого метода живые клетки подвергаются кратковременному мечению с последующей инкубацией в течении различных промежутков времени в нерадиоактивной среде. Затем клетки фиксируют и обрабатывают для проведения световой или электронной микроскопии. Каждый приготовленный препарат покрывают тонким слоем фотоэмульсии и оставляют на несколько дней в темноте - время, в течении, которого происходит распад радиоактивного изотопа. Затем фотоэмульсию проявляют. Месторасположение радиоактивных молекул в каждой клетке можно определить по расположению темных зерен серебра.

Антителами называют белки, продуцируемые позвоночными животными для защиты от инфекции. Каждая форма антител обладает определенными участками связывания, которые предназначены для специфического узнавания молекул, стимулировавших синтез антител. Эти молекулы называют *антигенами.* Высокая специфичность антител в отношении антигена превращает их в мощный инструмент для исследования биологии клетки. После окрашивания антител флуоресцирующими красителями их можно использовать для определения внутриклеточной локализации специфических макромолекул с помощью флуоресцентной микроскопии. Мечение электроноплотными микрочастицами, например микросферами коллоидного золота, позволяет использовать антитела для локализации клеточных антигенов при помощи электронной микроскопии. Антитела могут выступать в роли биохимических звеньев для выявления и определения количества молекул в клеточных экстрактах и идентификации специфических белков после их разделения с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. При связывании антител с инертным матриксом получают аффинные колонки, пригодные для выделения и очистки специфических молекул из грубых клеточных экстрактов.

Обычно антитела извлекают из сыворотки, обогащенной антителами, которую получают путем многократного введения антигена животным (например, кролику или козе). Эта *антисыворотка* содержит гетерогенную смесь антител, каждый тип которых был образован определенными клетками, синтезирующими антитела (В-лимфоцитами).

Проблему гетерогенности антисыворотки удалось преодолеть в 1976 г. после разработки нового метода, который произвел революцию в исследовании внутриклеточных процессов с помощью антител. Этот метод включает клонирование В-лимфоцитов, секретирующих только один определенный тип антител. Время жизни В-лимфоцитов в культуре обычно весьма ограничено. Поэтому от иммунизированных мышей получают В-лимфоциты, секретирующие отдельные виды антител, и осуществляют их слияние с "бессмертными" клетками из опухоли В-лимфоцитарного происхождения. В результате образуется гетерогенная смесь гибридных клеток, из которых отбирают гибриды, способные размножаться в культуре и синтезировать антитела определенного вида. Эти так называемые *гибридомы*клонируют по отдельности и получают клоны, каждый из которых является постоянным источником *моноклональных антител*одного типа.

Основное преимущество метода гибридом определяется возможностью получения моноклональных антител против неочищенных молекул содержащихся в сложной смеси в качестве минорного компонента. Таким образом, в принципе можно получить моноклональные антитела против любого белка, содержащегося в клетке. Каждый тип антител можно затем использовать в качестве специфического зонда как для локализации белков с помощью цитологических методов, так и для очистки белков.

Поскольку плазматическая мембрана клеток непроницаема для крупных молекул, белки, расположенные внутри живых клеток, не могут взаимодействовать с антителами, добавляемыми извне. Если такие белки необходимо связать, в цитоплазму клеток эукариот можно ввести антитела и другие молекулы, инъецируя их тонкой стеклянной пипеткой через плазматическую мембрану. Прокалываемая плазматическая мембрана имеет способность "самозапаиваться" спустя некоторое время после инъекции.

**Раздел IV. Технология рекомбинантных ДНК**

Этот последний раздел посвящен методам изучения структуры и функции клеточных ДНК. Классический подход подразумевает использование генетических методов, позволяющих судить о функции генов, анализируя фенотипы мутантных организмов и их потомства. Этот подход по-прежнему эффективен, но в последнее время он дополнен набором методов, которые в сумме известны как "технология рекомбинантных ДНК". Эти методы существенно расширили возможности генетических исследований, поскольку с их помощью удается проводить как прямой контроль, так и детальный химический анализ генетического материала. Используя методологию рекомбинантных ДНК, удается даже минорные клеточные белки получать в больших количествах и, следовательно, проводить тонкие биохимические исследования структуры и функции белка.

Еще не так давно, всего лишь в начале 70-х годов биохимики считали, что ДНК является наиболее сложным для исследования компонентом клетки. Чрезвычайно длинную, химически монотонную последовательность нуклеотидов в наследственном материале тогда можно было исследовать лишь с помощью косвенных методов - либо определяя структуру белка или РНК, либо с помощью генетического анализа. В настоящее время можно вырезать отдельные участки ДНК, получать их практически в неограниченном количестве и определять последовательность нуклеотидов по нескольку сот нуклеотидов в день.

С помощью этих же методов можно по желанию экспериментатора изменить выделенный ген и ввести его вновь в геном культивируемых клеток или эмбрион животного (что несколько более сложно), где этот измененный ген начинает функционировать.

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на всю клеточную биологию, позволяя исследователям решать задачи, которые раньше казались неразрешимыми, например, определять функции многих вновь открытых белков и их индивидуальных доменов, расшифровывать сложные механизмы регуляции экспрессии генов у эукариот. С помощью методов генной инженерии удалось в большом количестве получить многие белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации и развитии. Применение этих методов должно принести успех в крупномасштабном промышленном производстве белковых гормонов и искусственных вакцин, на получение которых ранее затрачивали очень много сил и средств.

Технология рекомбинантных ДНК включает в себя набор методов - как новых, так и заимствованных из других дисциплин, например из генетики микроорганизмов. Наиболее важные среди них это:1)специфическое расщепление ДНК *рестрщирующими нуклеазами,* что существенно ускоряет выделение и манипуляции с различными генами; 2)быстрое *секвенирование* всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить точные границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;3) *гибридизация нуклеиновых кислот,* позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большой точностью и чувствительностью на основании их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот; 4)*клонирование ДНК:* интересующий исследователя ДНК-фрагмент вводят в самореплицирующийся генетический элемент (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации воспроизводит этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий; 5) *генетическая инженерия,* посредством которой последовательности ДНК изменяют с целью создания модифицированных версий генов, которые затем вновь внедряют в клетки или организмы.

**4.1 Выделение и фракционирование ДНК**

Основная проблема выделения нуклеиновых кислот заключается в получении клеток и отделении нуклеиновых кислот от связанных с ними белков и других клеточных компонентов. Помимо очистки нуклеиновых кислот от нежелательных компонентов, следует обратить внимание на то, что сами нуклеиновые кислоты требуют исключительно осторожного обращения, так как они чрезвычайно чувствительны к действию нуклеаз и гидродинамических сил. Клетки гомогенизируют различными методами, а из гомогената отделяют нуклеиновые кислоты. Из гомогената нуклеиновые кислоты можно выделить двумя методами, заключающиеся в "высаливании" ДНК различными смесями органических растворителей. Нуклеиновые кислоты остаются в водной фазе, в то время как другие денатурированные макромолекулы собираются на границе между фазами. Эти методы не позволяют выделить неповрежденными большие молекулы ДНК. Образовавшуюся гетерогенную смесь нуклеиновых кислот подвергают разделению на фракции методами ультрацентрифугирования, гель-фильтрации на сефадексах, хроматографированием. Полученные фракции ДНК подвергают секвенированию, для чего их подвергают действию эндонуклеаз рестрикции.

**4.2 Расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами**

Для защиты от молекул чужеродных ДНК, способных проникнуть в клетку и вызвать ее трансформацию, многие бактерии вырабатывают ферменты рестрицирующие нуклеазы**,** способные разрушить чужеродную ДНК. Каждый такой фермент опознает в ДНК специфическую последовательность из 4-6 нуклеотидов. Соответствующие последовательности в геноме самих бактерий замаскированы метилированием остатков А и Ц, но любая чужеродная молекула ДНК, попав в клетку, немедленно опознается нуклеазой, и обе цепи ее ДНК разрезаются. В настоящее время известно более 100 таких ферментов, большинство из которых опознает различные последовательности нуклеотидов.

Сравнение размеров фрагментов ДНК, полученных после обработки определенного участка генома набором рестрицирующих нуклеаз, позволяет построить *рестрикционную карту,* на которой указано положение каждого сайта рестрикции относительно других рестрикционных участков. Короткие фрагменты, разделенные электрофорезом или хроматографией, секвенируются, т.е. определяется последовательность нуклеотидов.

**4.3 Секвенирование ДНК**

Для определения нуклеотидной последовательности в ДНК были разработаны два метода:

1. Метод с использованием "минус- и плюс"-систем ("минус-плюс"-метод, метод Сенгера).
2. Метод с использованием диметилсульфата и гидразина (метод Максама-Гилберта).

Метод Сенгера заключается в получении коротких участков цепи ДНК на матрице родительской ДНК, при этом используются различные уникальные по свойствам ферменты. Сопоставление полученных фрагментов позволяет установить исходную последовательность.

Метод Максама-Гилберта построен на расщеплении фрагментов ДНК по определенным основаниям химическими агентами. Чередование этих расщеплений на однородном материале (сначала, допустим, по А, потом по Т, Г, С) позволяет получить наборы коротеньких фрагментов. Сопоставлением устанавливают общую последовательность.

Несмотря на коротенькое изложение сути методов, сами методы являются очень сложной технической процедурой. Но, все-таки, данные методы удалось автоматизировать, что позволяет довольно быстро устанавливать последовательности нуклеотидов в генах, а также привело к расшифровке генетических карт многих организмов, в том числе и человека.

**4.4 Клонирование ДНК**

Многие рестрицирующие нуклеазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов, так что на концах образуются короткие одноцепочечные участки. Эти одноцепочечные концевые участки обладают способностью образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фермента, и потому их называют *липкими концами*. Липкие концы, образованные рестрикционными ферментами, позволяют легко соединить два любых фрагмента ДНК воедино при условии, что эти фрагменты образовались после действия одной и той же рестрицирующей нуклеазы (рестриктазы). Таким образом, фрагмент ДНК любого происхождения можно встроить в очищенную ДНК автореплицирующегося генетического элемента, которым, как правило, является плазмида или бактериальный вирус. Исходный фрагмент может происходить прямо из геномной ДНК, или из кДНК (комплементарной ДНК), т.е. из ДНК, полученной копированием матричной РНК.

**4.5 Гибридизация нуклеиновых кислот**

Если водный раствор ДНК нагреть до 100 °С и сильно защелочить (рН 13), то комплементарные пары оснований, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушатся и ДНК быстро диссоциирует на две

цепи. Этот процесс, называемый *денатурацией* ДНК, ранее считался необратимым. Однако в 1961 году было обнаружено, что если комплементарные цепи ДНК выдержать при температуре 65 °С, они легко спариваются, восстанавливая структуру двойной спирали (процесс, получивший название *ренатурации* или *гибридизации*) Подобные процессы гибридизации могут происходить между двумя любыми одинарными цепями нуклеиновых кислот (ДНК—ДНК, РНК—РНК, ДНК—РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов.

Этот метод весьма эффективен для поиска неидентичных, но родственных генов; например, после клонирования интересующих исследователя генов мыши или курицы, их последовательности могут быть использованы для поиска соответствующих генов в геноме человека.

ДНК-зонды применяют и в реакциях гибридизации с РНК для выявления экспрессии данного гена в клетках. В этом случае ДНК-зонд, содержащий часть последовательности гена, пытаются гибридизовать с РНК, выделенной из анализируемой клетки. Если гибридизация происходит, проводят количественное определение экспрессии. Более усовершенствованные методики предполагают обработку ДНК-зонда специфическими нуклеазами для обнаружения участков, гибридизующихся с клеточной РНК. Таким образом можно определить начальные и концевые участки транскриптов РНК; этот же метод может быть полезен для выяснения точных границ участков, вырезаемых из транскриптов РНК в процессе *сплайсинга РНК.*

**4.6 Методы рекомбинантных ДНК**

Разработка методов рекомбинантных ДНК сделала доступными любые клеточные белки (включая минорные белки) в больших количествах. Для этого клонируют ген нужного белка и затем встраивают его в специальную плазмиду, именуемую *клонирующим вектором.* Этот вектор сконструирован таким образом, что будучи введенным в бактерии, дрожжи или клетки млекопитающих соответствующего типа, он обеспечивает крупномасштабный синтез этого белка. Таким образом, если раньше для детальных структурных или функциональных исследований были доступны лишь немногие белки, в настоящее время практически все белки клетки могут быть предметом подобных исследований.

Получить мутантов, у которых нарушена репликация ДНК или, например, развитие глаза, в принципе довольно просто. Однако, чтобы связать этот дефект с изменением конкретного белка, могут понадобиться годы. Технология рекомбинантных ДНК дала в руки исследователей совершенно иной подход: анализ начинается с белка и завершается созданием мутантной клетки или целого организма. Поскольку такой подход по сравнению с традиционным направлением генетического анализа от гена к белку представляется обратным, его обычно называют *обратной генетикой.*

**Обратная генетика** начинается с выделения из клетки нужного белка. Ген этого белка клонируют и определяют его нуклеотидную последовательность; затем эту последовательность меняют биохимическими методами, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Затем такой ген вводят в клетку, где он может встроиться в хромосому в процессе гомологической рекомбинации и превратиться таким образом в постоянный элемент генома. Если встроенный ген экспрессируется, то несущая его клетка и все ее потомки будут синтезировать измененный белок. В том случае, когда измененный in vitro ген вводят в оплодотворенную яйцеклетку, получается многоклеточный мутантный организм. Некоторые из таких **трансгенных организмов** передадут этот ген своим потомкам в качестве постоянного элемента клеток зародышевой линии. Такая *генетическая трансформация* в настоящее время становится обычной процедурой для плодовых мушек или млекопитающих. В принципе на сегодняшний день совершенно реальна и трансформация человека, но такие эксперименты не выполняют из страха перед возможными генетическими нарушениями, которые нельзя исключить у лиц, ставших объектом таких исследований.

Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на всю клеточную биологию, позволяя исследователям решать задачи, которые раньше казались неразрешимыми, например, определять функции многих вновь открытых белков и их индивидуальных доменов, расшифровывать сложные механизмы регуляции экспрессии генов у эукариот. С помощью методов генной инженерии удалось в большом количестве получить многие белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации и развитии.

**Вывод**

В ходе выполнения данной курсовой работы были рассмотрены разнообразные методы, которые используются для изучения клеток на современном этапе научного развития. Приведенные в формате данной работы методы можно систематизировать на основе их подхода к исследованию. Можно выделить методы статического исследования, такие как:

 а) методы оптической микроскопии;

 б) методы электронной микроскопии;

 в) методы фракционирования клеточного содержимого;

 г) рентгеноструктурный анализ и метод ЯМР.

Также выделим методы исследования функционирования клетки (т.е. непосредственно влияющие на ее функционирование):

 а) методика меченых изотопов и антител;

 б) методы внутриклеточных иньекций;

 в) методы клеточных культур и тканей;

 г) методы гибридизации и клонирования ДНК.

Набор функциональных методов очень богат и не полностью освещен в данной работе, поскольку не возможно описать все их разнооразие в таком формате, например, не учтено много разнообразных генетических методов, которые помогают установить функции многих молекул, а также механизмы наследования.

Из изложенного материала следует, что современная клеточная биология оперирует множеством методов, позволяющих исследовать клетку не только в ее статическом проявлении, но и разобраться в ее функционировании на молекулярном уровне. А некотором роде венцом современных достижений в клеточной биологии являются методы генной инженерии.

**Список использованной литературы**

1. Айала Ф. Кайгер Дж. Современная генетика. В 3-х т. Пер с англ.: - М.:Мир, 1987.
2. Албертс Б. и др. Молекулярная биология клетки. В 5-ти томах. М.: Мир, 1986 - 1987.
3. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология. В 3-х т. М.: Мир, 1982.
4. Ленинджер А. Основы биохимии. В 3-х т. М.: Мир, 1985.
5. Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987.
6. Страйер Л. Биохимия. В 3-х т. М.: Мир, 1985.
7. Третьяк А. П. Молекулярная биология. Чернигов. 1999.