

После смыкания интересующего фрагмента ДНК (гена) с генетическим вектором с помощью ДНК-лигазы образованные рекомбинантные молекулы вводят в клетки с целью добиться их репликации (за счет генетического вектора) и увеличения количества копий. Наиболее популярным способом введения в клетки рекомбинантных молекул ДНК, в которых вектором служит плазмида, является трансформация *E. coli*. С этой целью бактериальные клетки предварительно обрабатывают кальцием или рубидием (ионами) для того, чтобы они стали «компетентными» в восприятии рекомбинантной ДНК.

Чтобы повысить частоту проникновения ДНК в клетки, используют метод электропорации, заключающийся в кратком экспонировании клеток в интенсивном электрическом поле. Эта обработка создает полости в мембранах клеток, что способствует лучшему восприятию клетками ДНК. После введения рекомбинантных молекул ДНК в бактерии последние высевают на МПА, обогащенный антибиотиками для селекции желаемых клеток, т. е. клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК. Частота трансформации является невысокой. Обычно один трансформант возникает на 10^6 высевных клеток. Если же вектор является фаговым, то прибегают к трансфекции клеток (бактерий или дрожжей) фагом. Что касается соматических клеток животных, то их трансфекцию осуществляют ДНК в присутствии химических веществ, облегчающих прохождение ДНК через плазматические мембраны. Возможны также прямые микроинъекции ДНК в овоциты лягушек, в культивируемые соматические клетки и в эмбрионы млекопитающих.

Важнейшим моментом, связанным с молекулярным клонированием, является поиск способа, позволяющего установить, действительно ли клонируемый фрагмент вошел в вектор и вместе с вектором, образовав рекомбинантную молекулу ДНК, вошел в клетки. Если речь идет о бактериальных клетках, то один из способов основан на учете инсерционной инактивации плазмидного (векторного) гена резистентности. Например, в плазмидном векторе pBR322, детерминирующем резистентность к ампициллину и тетрациклину, единственный сайт для рестриктазы Pst I находится в локусе, занимаемом геном резистентности к ампициллину. Pst I — плавление на этом сайте генерирует липкие концы, позволяющие лигирование клонируемого фрагмента с векторной ДНК. Однако при этом плазмидный (векторный) ген ампициллинрезистентности инактивируется, тогда как ген тетрациклинрезистентности на векторе остается интактным. Именно, ген тетрациклинрезистентности и используется для селекции клеток, трансформируемых рекомбинантными молекулами ДНК. Чтобы убедиться, что клетки выросших колоний на среде с тетрациклином действительно содержат рекомбинантные молекулы ДНК, их проверяют с помощью так

называемого «спот-теста» на паре чашек с плотной средой, одна из которых содержит ам-пициллин, тогда как другая лишена этого антибиотика. Клонлируемые ДНК содержатся лишь в трансформантах, резистентных к тетрациклину. Что касается трансформантов, резистентных одновременно к ампициллину и тетрациклину (АрТс), то они содержат плазмидные (векторные) молекулы, которые спонтанно приобрели кольцевую форму без включения в них чужеродной (клонлируемой) ДНК. Другой способ обнаружения инсерции чужеродных (клонлируемых) фрагментов в плазмидный вектор основан на использовании вектора, содержащего ген (3-га-лактозидазы. Инсерция чужеродной ДНК в этот ген неизбежно инактивирует синтез р-галактозидазы, что может быть обнаружено посевом трансформированных клеток на среду, которая содержит субстраты р-галактозидазы. Эта среда позволяет селекцию окрашенных колоний клеток.

Как уже отмечено, рестрикционные линейные фрагменты векторной ДНК способны к восстановлению кольцевой структуры без включения в них клонлируемых сегментов. Чтобы уменьшить частоту спонтанного образования таких кольцевых молекул векторной ДНК, рестрикты векторной ДНК обрабатывают фосфатазой. В результате этого образование кольцевых молекул ДНК становится невозможным, поскольку будут отсутствовать концы 5'-PO⁴, необходимые для действия лигазы.

Совокупность клоний-трансформантов, выросших на селективной среде, представляет собой совокупность клеток, содержащих клоны разных фрагментов (генов) клонлируемой геномной или кДНК. Коллекции этих клонов формируют так называемые библиотеки ДНК, широко используемые в генно-инженерных работах.

Заключительной стадией клонирования генов является выделение и исследование клонированной ДНК, включая секвенирование.

Перспективные штаммы бактерий или соматических клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК, которые контролируют синтез интересующих белков, имеющих коммерческую ценность, передают в промышленность.

Пехов А. П. Биология с основами экологии. Серия «Учебники для вузов. Специальная литература» — 2000.