

Приложение на рекомбинантни ДНК технологии в медицината

Цели

Цели на преподавателя: да се направи въведение в рекомбинантните ДНК-технологии и се дадат примери за тяхното приложение за диагностиката, профилактиката и лечението.

След работа с този раздел студентите ще могат да постигнат следните учебни цели:

А. Знания

1. Да дадат определение и примери за генетична рекомбинация ;
2. Да опишат действието и ролята на рестриктазите за рекомбинацията на ДНК;
3. Да дадат определение и примери за проба и матрица;
4. Да посочат други начини за получаване на ДНК фрагменти освен чрез рестриктази;
5. Да изброят методи за идентифициране на ДНК-секвенции;
6. Да обяснят приложимостта и значението на техниките Southern blot, Northern blot и Western blot;
7. Да дадат примери за техники, чрез които ДНК се амплифицира;
8. Да дадат определение на понятието полиморфизми в по-общ смисъл и конкретно полиморфизми в дължината на рестрикционните фрагменти.

Б. Разбирания

1. Да обяснят принципа на метода на Southern;
2. Да обяснят принципа на метода на дидезоксинуклеотидния метод на Sanger;
3. Да обяснят принципа и етапите на клониране;
4. Да обяснят принципа и етапите на полимеразната верижна реакция (PCR);
5. Да обяснят методите за установяване на мутации чрез алел-специфични проби;
6. Да обяснят методите за установяване на мутации чрез PCR;
7. Да обяснят метода за установяване на тандемни повтори и неговото значение.

В. Умения

1. Да приложат познанията си върху електрофореза и да обяснят ролята на този метод в рекомбинантните ДНК технологии;
2. Да илюстрират с пример значението на скриниращите изследвания за установяване на генни дефекти в плода или преди забременяване;
3. Да сравнят класическите и съвременните ваксини, получени чрез рекомбинантни ДНК технологии;

4. Да илюстрират с примери значението на възможността човешки терапевтични белтъци да се произвеждат чрез рекомбинантни ДНК технологии;
5. Да илюстрират с примери значението на рекомбинантните ДНК технологии за съдебната медицина;
6. Да илюстрират с примери значението на възможността за генна терапия;
7. Да илюстрират с примери значението на получените трансгенни животни;
8. Да преценят значението на отскоро въведените ДНК-чипове в диагностиката.

16.1. Резюме

Наследствените разлики и придобитите промени в секвенциите на ДНК са в основата на много заболявания. Методите за определянето на тези различия се означават в съвкупност като рекомбинантни ДНК технологии, също и като техники на молекулната биология. Те са много по-чувствителни от други методи, например ензимни определения. Те позволяват по-ранно установяване на болестта и повече възможности за лечение. Установяването, че даден индивид е носител на наследствено заболяване, позволява навременна консултация във връзка с планове за брак и планиране на деца.

Чрез тези методи може да се установяват и да се идентифицират родствени отношения (например бащинство), а също и да се идентифицират криминални престъпници. Рекомбинантните ДНК технологии се използват за профилактика. Чрез тях се произвеждат ваксини, например срещу вируса на хепатит В. За лечение на сериозни заболявания като захарен диабет, хемофилия, миокарден инфаркт чрез тези методи се произвежда съответно инсулин, фактор VIII (необходим за кръвосъсирването), алтеплаза или ТРА (tissue plasminogen activator). Засега генната терапия е в експериментална фаза на развитие. Работи се в клетъчни култури или в животни. Ограниченията са главно от етични съображения. Няма единно схващане докъде имат право учените да се намесват в тайните на живота.

Всяко изследване за установяване на нормални или патологични вариации в гените започва с изолиране на ДНК, последвано от нейното амплифициране, за да се получат достатъчни количества за секвениране, изучаване и манипулиране. За това са необходими ензими (рестриктази, лигази и други). Използват се процедури като клониране, полимеразна верижна реакция (PCR), гел електрофореза, блотинг върху нитроцелулозен филтър, подготвяне на белязани проби, които хибридизират с изследваната ДНК секвенция, и др.

Генната терапия включва изолиране на нормални гени и включването им в патологични клетки, така че нормалният ген да се експресира, при което патологичната клетка се възвръща към нормално състояние.

16.2. Рекомбинация на ДНК - въведение

Най-кратко **генетичната рекомбинация** (или рекомбинация на ДНК) може да се определи като обмен на гени между хромозомите. Обменът на генетичен материал между ДНК молекулите се извършва често и е причина за генетични промени, които може да са полезни или вредни за засегнатия индивид, а също и за неговото потомство. ДНК-участъците, които се обменят, могат да бъдат хомоложни (с много близки секвенции) или твърде различни. Големината им може да варира от няколко нуклеотида до десетки хиляди нуклеотиди и може да включва части от ген или много различни гени. Повечето от ензимите, които участват в рекомбинацията са същите или подобни на тези, които участват в репликацията и поправянето на ДНК. Тук спадат

ендо- и екзонуклеази, ензими, разтварящи двойната спирала, топоизомеразии, ДНК полимеразии и лигази.

Пример за генетична рекомбинация, протичаща в естествени условия, е кросинг-оувърът (crossing-over) между хомоложни хромозоми по време на мейозата. При неравномерен кросинг-оувър в потомството се предават хромозомни мутации. Друг пример са транспозоните (скачащи гени). Те са подвижни генетични елементи, които се преместват от едно място в генома на друго или произвеждат копия, които могат да се включат в нови места - резултатът е получаване на рекомбинантна ДНК. Генното пренареждане при диференциация на стволни клетки в зрели лимфоцити, които могат да произвеждат само един тип антитяло, е разгледано в

т. 15.4.1.5.

В основата на рекомбинантните ДНК технологии е **хибридизацията**, дефинирана в т. 3.5.3 като специфична реасоциация на комплементарни вериги от различен произход (напр. от различни ДНК-молекули или от ДНК и от РНК, или от различни РНК-молекули). Като експериментална техника хибридизацията е процес, при който част от ДНК или РНК с известна нуклеотидна последователност и различен размер (от 15 бр до няколко стотин килобази), наречена **проба**, се използва за идентификация на друга част от ДНК с комплементарна секвенция. Изследваната верига се означава като матрица. Пробата се свързва с матрицата, ако двете вериги са комплементарни и могат да се образуват достатъчен брой водородни връзки.

При молекулната хибридизация задължително е както пробата, така и матрицата да бъдат едноверижни. Разделянето на веригите на ДНК се постига чрез топлинна денатурация (топене) или третиране с основа. Трябва да се има предвид, че РНК се разрушава в алкална среда. Двойнаверижна ДНК с по-високо съдържание на двойката бази Г-Ц (с 3 водородни връзки между базите) изисква по-висока температура на денатурация в сравнение с ДНК, съдържаща повече от двойката бази А-Т (с 2 водородни връзки). По-висока температура е необходима и когато ДНК веригите са по-дълги и съдържат повече водородни връзки. Денатурацията се улеснява при снижаване на солевата концентрация или в присъствие на урея, която разрушава водородните връзки.

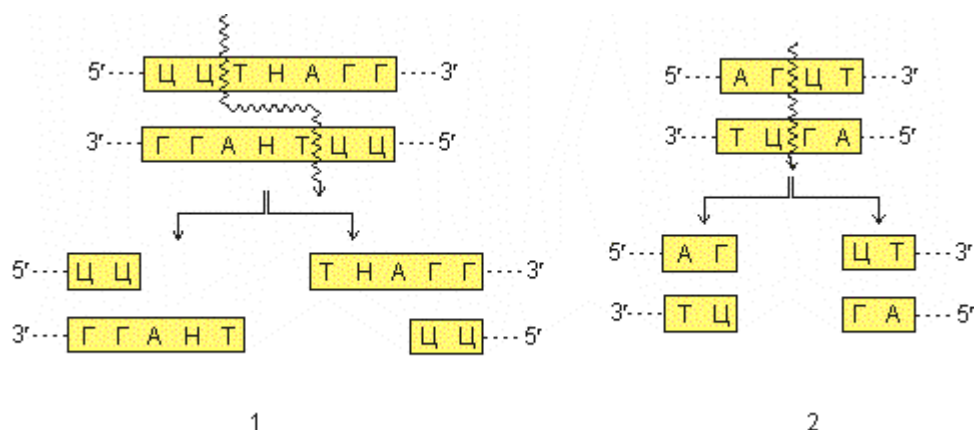
Смесването на едноверижните проба и матрица позволява да се образуват така наречените "проба-матрица" хетеродуплекси. Те именно имат значение за рекомбинантните ДНК технологии.

Пробите трябва да са белязани, за да може да се идентифицира хетеродуплексът проба-матрица. Пробите се бележат или изотопно (напр. ^{32}P , ^{35}S или ^3H) или неизотопно (с флуоресцентни или други малки лиганди).

16.3. Роля на рестриктази, обратна транскриптаза и химически методи

Откриването на **рестриктазите** (рестрикционни ендонуклеази) е от решаващо значение за секвениране на геномната ДНК и за получаване на рекомбинантни ДНК.

Рестриктазите са високо специфични ендонуклеази, които разпознават къси участъци в ДНК, обикновено с дължина 4 - 6 двойки бази. Те срязват двете ДНК вериги винаги и само в рамките на специфичната за тях последователност. Повечето от ДНК-секвенциите, разпознавани от рестриктазите, са палиндроми (виж т. 3.5.6). При срязването с различни рестриктази може да се получат едноверижни стърчащи (наричани още и лепливи) и двойнаверижни нестърчащи (тъпи) краища (фиг. 16-1). В табл. 16-1 са дадени примери за специфичността на няколко често използвани рестриктази. Броят на пречистените рестриктази надвишава стотици и списъкът с новооткрити ензими нараства.



Фиг. 16-1. Действие на рестрикционните ензими върху палиндромни (напълно симетрични обърнати повтори). 1 - под действие на рестриктазата *MspI* се получават стърчащи краища; 2 - под действие на рестриктазата *AluI* се получават тъпи краища. Базите в нуклеотидите са представени със съкращения на кирилица. Н означава кой да е нуклеотид.

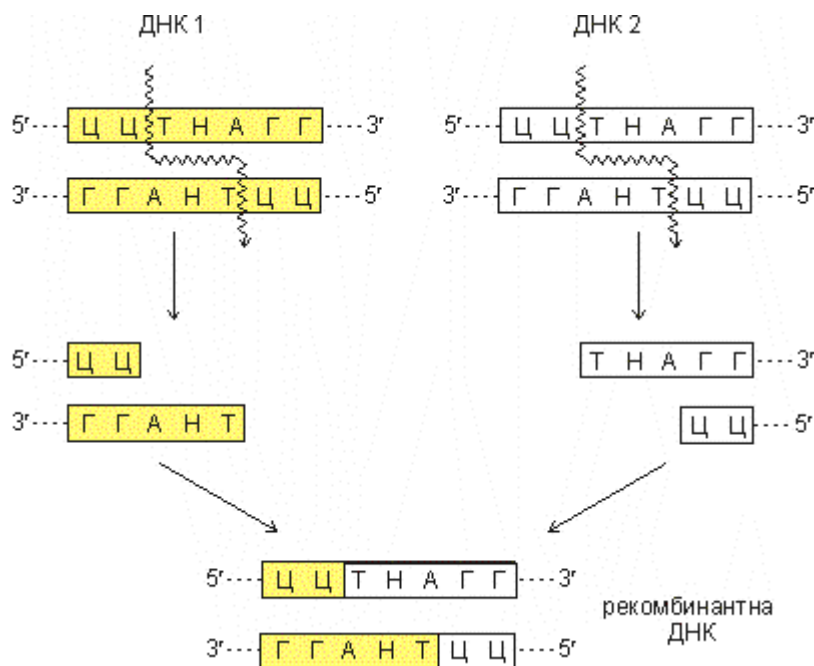
В бактериите тези ензими осъществяват защита срещу инфектиране с фаги. Срязването улеснява по-нататъшното разграждане на вирусната ДНК от неспецифични бактериални екзонуклеази. Бактериалната ДНК е защитена от срязване чрез специфично метилиране като метилазите разпознават същото място, както и рестриктазите.

Названията на тези ензими са трибуквени и са свързани с бактериите, от които са изолирани. Първата главна буква съвпада с родовото име, а втората и третата малки букви са първите две букви на вида - например *AluI* идва от *Arthrobacter luteus*. Римските цифри са в зависимост от реда на откриването. Често след първите три букви и преди римската цифра има друга буква, показваща щам - например *EcoRI*, *EcoRII* са първите две изолирани рестриктази от *Escherichia coli*.

Табл. 16-1. Специфичност на действие на различни рестрикционни ензими

Рестриктаза	Място на срязване	Източник
<i>AluI</i>	5' - А-Г Ц-Т - 3' 3' - Т-Ц Г-А - 5'	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>BamHI</i>	5' - Г-Г-А-Т-Ц-Ц- 3' 3' - Ц-Ц-Т-А-Г-Г- 5'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>EcoRI</i>	5' - Г-А-А-Т-Т-Ц- 3' 3' - Ц-Т-Т-А-А-Г- 5'	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>HaeIII</i>	5' - Г-Г Ц-Ц- 3' 3' - Ц-Ц Г-Г- 5'	<i>Haemophilus aegyptus</i>
<i>HindIII</i>	5' - А-А-Г-Ц-Т-Т- 3' 3' - Т-Т-Ц-Г-А-А- 5'	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d
<i>MspI</i>	5' - Ц-Ц-Г-Г- 3' 3' - Г-Г-Ц-Ц- 5'	<i>Moraxella species</i>
<i>MstII</i>	5' - Ц-Ц-Т-Н-А-Г-Г- 3' 3' - Г-Г-А-Н-Т-Ц-Ц- 5'	<i>Microleus strain</i>

Получените ДНК-фрагменти се наричат рестрикционни фрагменти. Те могат да се свързват едни с други, ако имат стърчащи комплементарни краища. Така фрагменти от различни ДНК могат да се свържат един с друг, ако тези ДНК са разрязани от един и същи рестрикционен ензим. След комплементарното свързване на краищата чрез водородни връзки, краищата се съединяват ковалентно под действие на ДНК лигаза (виж фиг. 16-2).



Фиг. 16-2. Получаване на рекомбинантна ДНК с рестриктазата *MstII* и ДНК-лигаза.

Обратната транскриптаза може да бъде използвана за синтеза на ДНК върху матрица иРНК. Получената ДНК е копие на тази иРНК и се означава като копи-ДНК (кДНК или на английски cDNA). За разлика от получените с рестриктази ДНК-фрагменти, получената кДНК не съдържа интрони.

Чрез автоматизирани химични процедури могат да се получат олигонуклеотиди (едноверижни ДНК фрагменти) с дължина до 100 нуклеотиди, но с определена секвенция на базите, комплементарна на генини сегменти. Тези олигонуклеотиди са полезни за идентифициране, изолиране и амплифициране на гените.

16.4. Идентифициране на ДНК-секвенции

16.4.1. Електрофореза

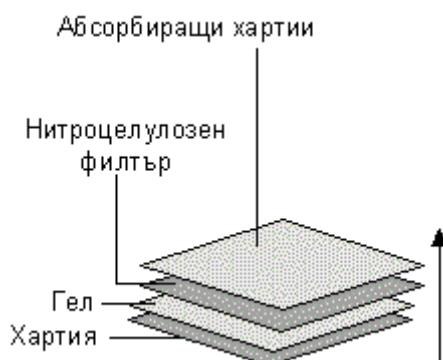
Гел-електрофорезата е метод, при който отрицателно заредените молекули на ДНК се движат към положителния полюс и се разделят въз основа на различните си размери (дължина на веригата). По-късите молекули се движат по-бързо през порите на гела отколкото по-дългите. Чрез агарозни гелове става по-грубо разделяне на фрагменти, които се различават значително по дължина. Чрез полиакриламидни гелове методът е много по-чувствителен - установяват се разлики в дължината дори с един нуклеотид. Това позволява определяне секвенцията на базите в ДНК.

ДНК-ивиците в гела се визуализират с помощта на багрила - например етидиев бромид позволява визуализация на всички ивици под ултравиолетова светлина. Специфични секвенции се установяват чрез белязани проби.

16.4.2. Метод на Southern (Southern blot technique)

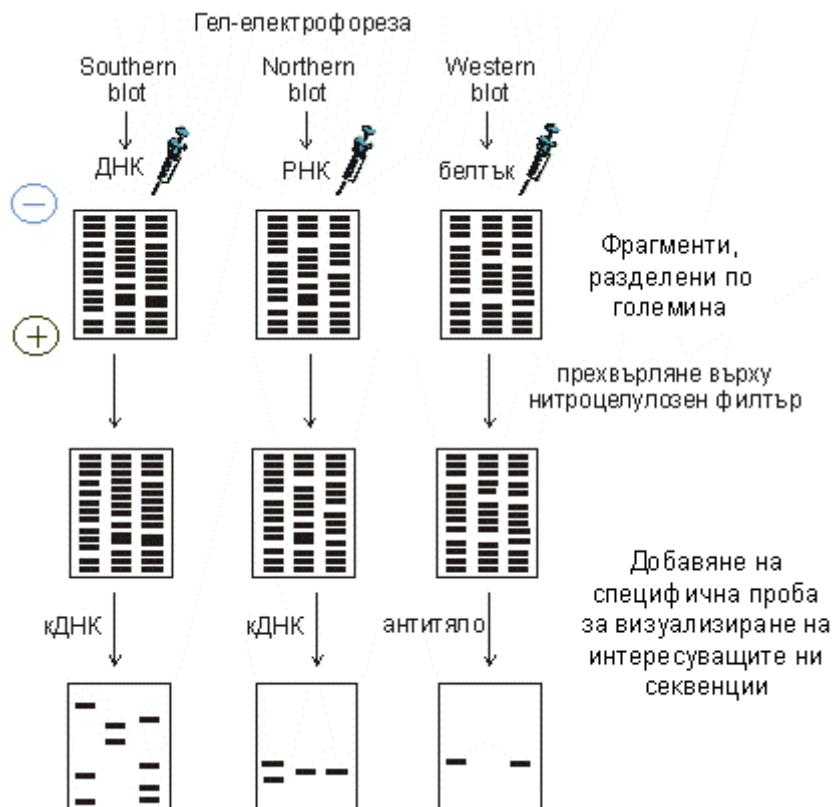
През 70-те години на 20 век Е. Southern въвежда техника, която и днес е полезна и актуална. Чрез този метод могат да се идентифицират специфични ДНК-секвенции от различни източници, независимо от сложността на генома (виж по-долу фиг. 16-3-1). Освен това чрез него може да се определя броят на специфични ДНК-секвенции в целия геном, да се потвърждава получаването на ДНК чрез клониране, и да се демонстрират полиморфизми в ДНК, свързани с патологични състояния (виж следващи точки).

При този метод сместа от рестрикционни ДНК-фрагменти се разделя чрез електрофореза в агарозен гел. Гелът с ивиците ДНК се потапя в алкален разтвор, който денатурира ДНК, т.е. веригите на двойната спирала се разделят. След това гелът се поставя върху абсорбираща хартия, върху гела се притиска нитроцелулозен филтър, а върху филтъра се слагат няколко слоя абсорбираща хартия. Хартията под гела се поддържа влажна с концентриран солеви разтвор, който се придвижва нагоре по капиларен път през гела, нитроцелулозата и горната абсорбираща хартия. Така ДНК се елуира от гела чрез възходящото движение на концентрирания солеви разтвор и се пренася върху нитроцелулозния филтър, където ДНК остава свързана.



Фиг. 16-3-1. Елуиране на ДНК чрез възходящо движение на концентриран солеви разтвор и пренасяне върху нитроцелулозен филтър.

Позицията на ДНК, свързана към нитроцелулозния филтър, е абсолютно същата, както и в агарозния гел. В тази еднорична мембранно-свързана форма ДНК може да бъде анализирана с белязани проби. (В някои учебници нитроцелулозният филтър се нарича нитроцелулозна хартия; една опростена, но полезна представа е следната: ивиците ДНК се пренасят от гела върху нитроцелулозната хартия, подобно както мастилени букви се отпечатват върху попивателна хартия (едно от значенията на думата "blot" е "попивам").



Фиг. 16-3-2. Техники за идентифициране на специфични фрагменти от ДНК (Southern blot), РНК (Northern blot) и белтъци (Western blot). След хибридизация със специфична проба ДНК и РНК се визуализират чрез автордиография, а белтъците, свързани със специфични антитела, обикновено се визуализират чрез флуоресценция.

По същия начин се пренасят колонии от бактерии, растящи в агарозна плака. Нитроцелулозният филтър с колонии от бактерии се третира с алкален разтвор. Едноверижната ДНК се хибридизира с проба и участъците на нитроцелулозния блот, които съдържат комплементарна на пробата ДНК, се идентифицират.

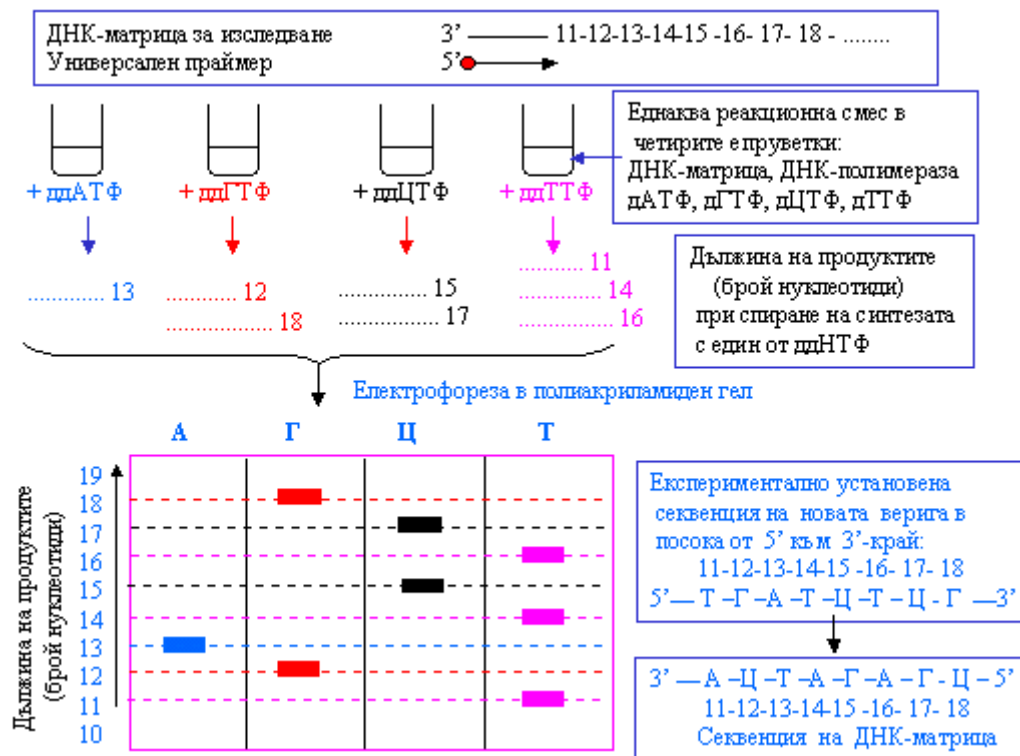
Методът "Southern blot" за идентифициране на ДНК секвенции в гелове посредством прехвърляне върху нитроцелулозен филтър е наречен на фамилията на Southern. Но тъй като то означава "южен", по-късно други две подобни техники са наречени с аналогични географски имена, без да са свързани с имената на откривателите. При Northern (северен) blot смес от РНК фрагменти, разделени чрез електрофореза, се прехвърлят върху нитроцелулозен филтър и се хибридизират с ДНК проба (фиг. 16-3-2). При този метод не се добавя алкален разтвор, тъй като основата улеснява хидролизата на РНК. При Western (западен) blot смес от белтъци се разделят чрез електрофореза и отделни белтъци се идентифицират чрез специфични антитела (фиг. 16-3-2).

16.5. Дидезоксинуклеотиден метод на Sanger за секвениране на ДНК

Най-често употребяваният метод за секвениране на ДНК е въведен от F. Sanger. При него се използват четири дидезоксинуклеотиди (ддНТФ, т.е. ддАТФ, ддГТФ, ддЦТФ и ддТТФ), които нямат хидроксилна група на 2'- и 3'-място. Поради това всеки от тях

прекръпява синтезата на нова полинуклеотидна верига върху ДНК-матрица. Процедурата включва провеждане на ДНК-полимеразна реакция в 4 различни епруветки. Всяка епруветка съдържа разтвор с четирите нормални дезоксинуклеотиди (дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ), ДНК полимеразата, праймер (зародиш) и ДНК-матрична верига. Към всяка от епруветките се добавя само един от четирите ддНТФ. Под действие на ДНК полимеразата се синтезира верига, комплементарна и антипаралелна на матрицата. Дидезоксинуклеотидът във всяка епруветка се конкурира със съответния нормален дНТФ и се включва в нарастващата верига случайно. Последствието е прекръпяване на синтезата. Това прекръпяване е случайно, но базата, при която свършва синтезата, е комплементарна на добавения специфичен ддНТФ. Например, ако в нарастваща полепептидна верига трябва да се добави Т на 11, 14 и 16 място, включването на ддТТФ в конкуренция с дТТФ ще прекрати синтезата в някои вериги на 11, 14 и 16 място.

В резултат на случайното прекръпяване на синтезата се синтезират различно дълги фрагменти (фиг 16-4). Най-късите са до 5'-края на нарастващата верига, тъй като веригата нараства в 5', 3'-направление. Тези фрагменти се разделят чрез гелелектрофореза и секвенцията на ДНК може да се определи експериментално - по позициите на ивиците в гела (фиг. 16-4). За целта или праймерът или дНТФ трябва да са радиоактивно белязани, за да се визуализират ивиците в гела чрез автордиография. Секвенцията на интересуващата ни матрица е комплементарна на експериментално установената нарастваща верига.



Фиг. 16-4. Илюстрация на метода на Sanger за секвениране на ДНК. Неизвестните първоначално нуклеотиди в изследваната матрична ДНК са означени с числата от 11 до 18.

16.6. Амплифициране на ДНК

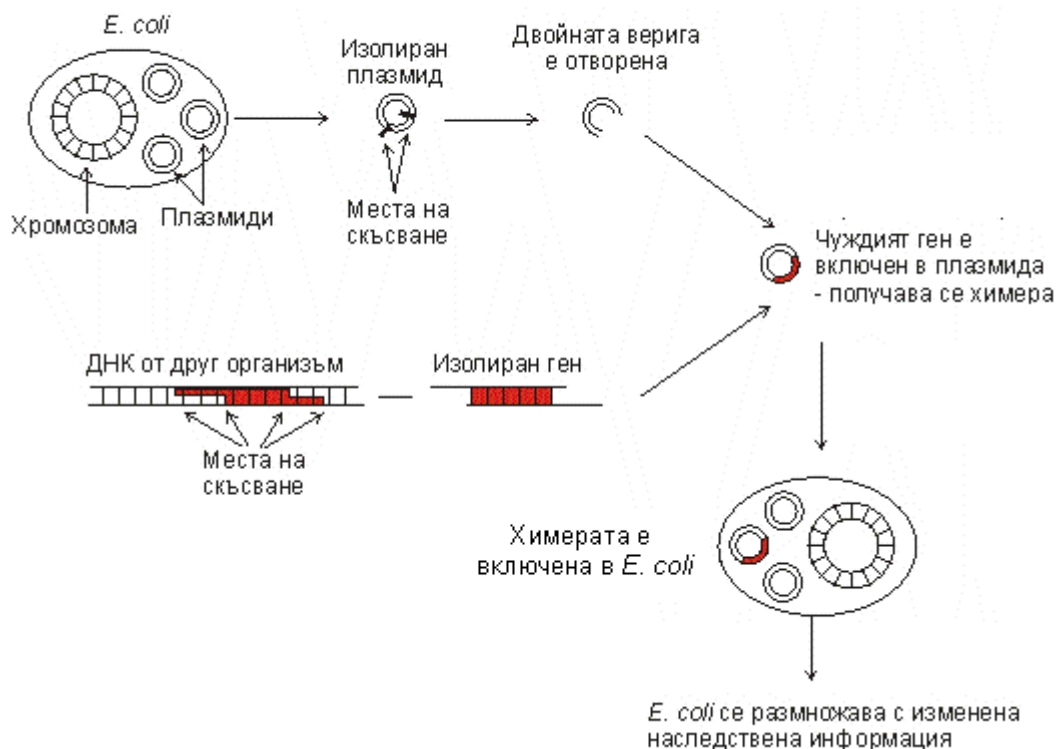
16.6.1. Клониране

За изучаване на гените или части от тях, а също и за клинични изследвания са нужни определени количества ДНК. От жив индивид трудно може да се отдели толкова тъкан, че да се изолира достатъчно ДНК за изследвания. Необходимата ДНК се получава чрез амплифициране (увеличаване на количеството).

Първият въведен метод за увеличаване количеството на ДНК е **клонирание** (фиг. 16-5-1 и фиг 16-5-2). Фрагмент от ДНК от един организъм ("чужда ДНК") се срязва със специфична рестриктаза. Със същата рестриктаза се срязва и ДНК-преносител от *E. coli*, наречена клониращ вектор. Стърчащите (лепливи) краища на чуждата ДНК и на вектора са комплементарни и могат да бъдат съединени с помощта на лигаза. Това позволява чуждата ДНК да се включи във вектора, т.е. да се получи рекомбинантна ДНК. Така измененият вектор се въвежда отново в клетката-реципиент. Най-често използваните вектори са бактериални плазмиди, бактериофаги и космиди.

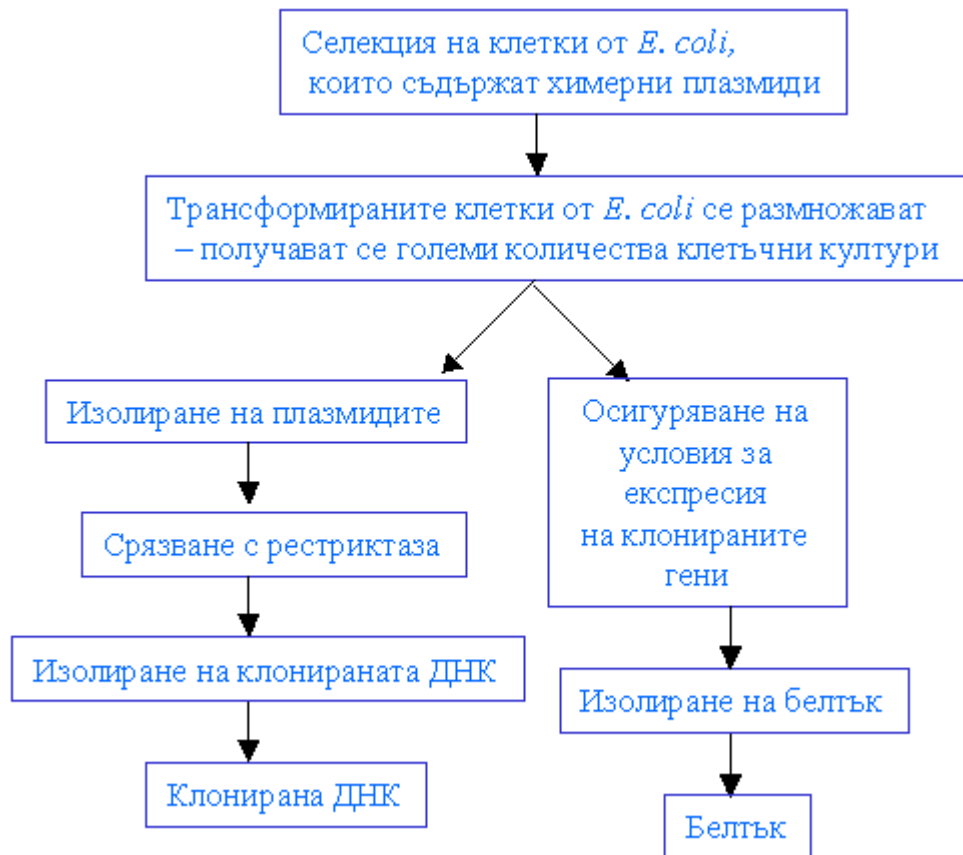
Много бактерии съдържат една циклична хромозома с около 4×10^6 bp (двойки бази). Освен тази хромозома има и много по-малки циклични ДНК молекули, които именно са бактериалните плазмиди. Те обикновено съдържат няколко хиляди bp. Гените в плазмидите имат различни функции, вкл. и осигуряване на резистентност към антибиотици. Репликацията на плазмидите се извършва независимо от тази на главната бактериална хромозома.

Плазмиди с включен в тях генетичен материал се наричат химери (в митологията химера е животно с белези на лъв, коза и змия). Възприето е бактериалните клетки-реципиенти, които съдържат рекомбинантна ДНК, да се наричат **трансформирани**. Ако клетките-реципиенти са еукариотни, те се наричат **трансфектирани**. При делението на клетките-реципиенти, наред с репликацията на собствената ДНК, се реплицира и ДНК на вектора, включително и чуждата ДНК.



Фиг. 16-5-1. Опростена схема за клониране на ДНК в бактерии - получаване на рекомбинантна ДНК.

След това се извършва селекция и клетките, които съдържат химерни плазмиди, се размножават. Това позволява изолиране на големи количества клонирана ДНК. При осигуряване на условия за експресия на гените, може да се изолира и белтък, кодиран от клонирания ген (фиг. 16-5-2).



Фиг. 16-5-2. Опростена схема за клониране на ДНК в бактерии - изолиране на клонирана ДНК и белтък.

Първият използван вектор за клониране е плазмидът pSC101 от *E. coli*. Той съдържа само едно единствено място, разпознавано от рестриктазата *EcoRI*. Този плазмид съдържа и ген, отговорен за резистентност към антибиотици. Това е полезен маркер при селекцията на трансформираните клетки. Плазмидът съдържа и участък, наречен "начало на репликацията" и свързани с него регулаторни секвенции, които общо се наричат репликон. Векторът има следните недостатъци:

- 1) Единственото рестрикционно място ограничава приложението му - само ДНК фрагменти, съдържащи същото рестрикционно място могат да бъдат клонирани;
- 2) Има само един маркер за резистентност към антибиотици;

3) Реплицира се с ниска скорост.

Фагите имат линейни ДНК молекули с няколко рестрикционни места, в които може да се включи чужда ДНК. Докато в плазмидите може да се включи ДНК с дължина около 6-10 kb, то във фагите могат да се включат ДНК фрагменти с дължина 10-20 kb.

Космидите обединяват предимствата на плазмидите и на фагите. Те са плаزمиди, които съдържат ДНК-секвенции, наречени "cos"- места, необходими за пакетиране на ДНК от λ -фаг. Чрез космидите се клонират по-големи ДНК-фрагменти (35-40 kb).

За преодоляване посочените недостатъци при плазмидите, понастоящем чрез рекомбинантните ДНК технологии са конструирани голям брой вектори с по-универсално приложение. Желаните качества за плазмиден вектор са както следва: да са по-нискомолекулни (3-5 kb), за да могат да поемат по-големи фрагменти; да имат няколко рестрикционни места; да имат повече гени - маркери, улесняващи селекцията на трансформираните бактерии. Първият конструиран плазмид, отговарящ на тези изисквания е pBR322. Чрез него са получени цяло поколение по-нови вектори, които се използват днес. Повечето от тях съдържат включена ДНК последователност, наречена полилинкер или банка с рестрикционни места или т. нар. поликлонизиращо място, което съдържа уникален за даден плазмид набор от различни специфични места за рестриктази.

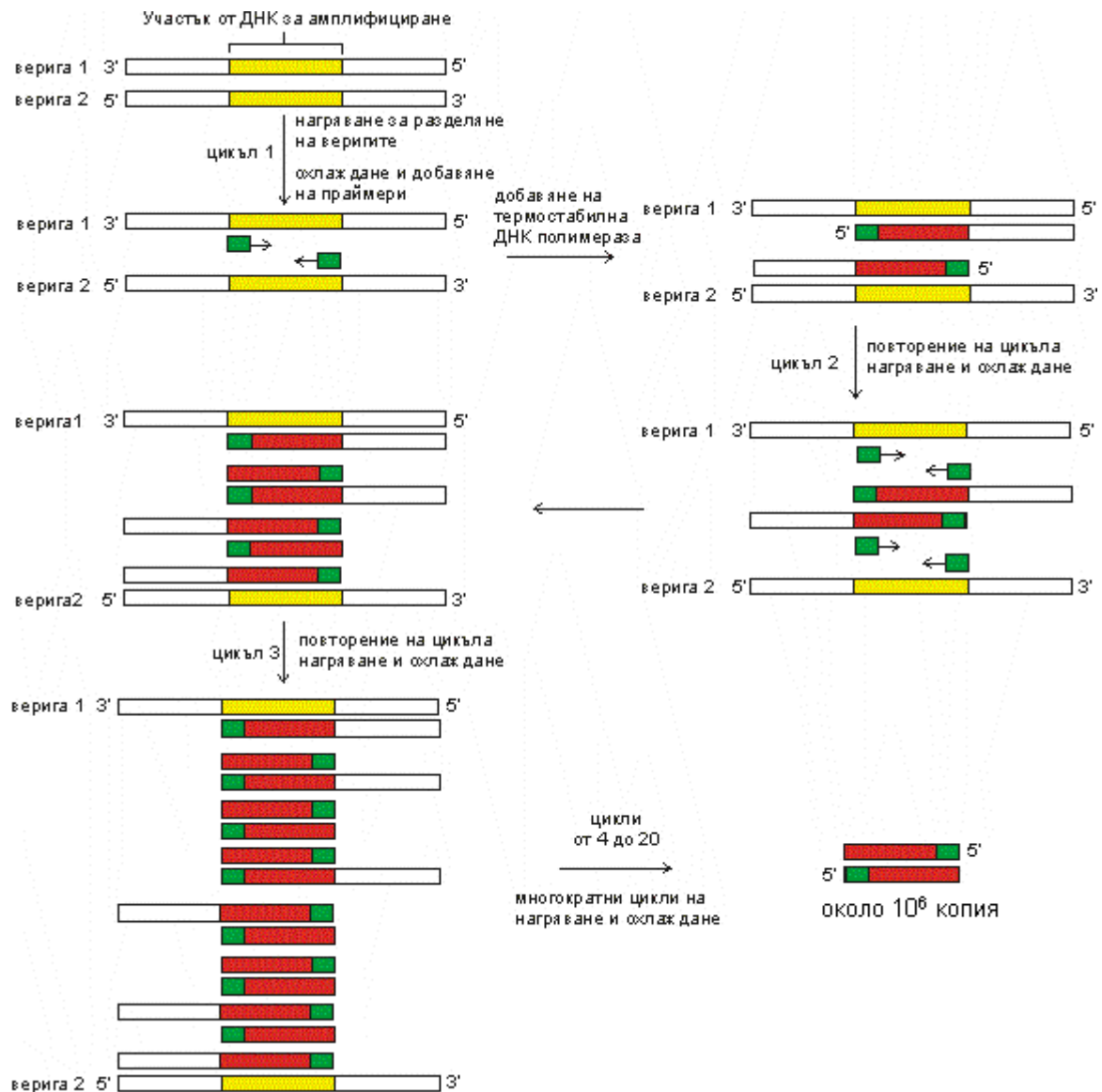
В последно време са създадени и бактериални изкуствени хромозоми - ВАС (bacterial artificial chromosomes), както и дрождени изкуствени хромозоми - YAC (yeast artificial chromosomes), в които могат да се включат много по-големи фрагменти от ДНК (около и над няколко стотин kb). Поради това тези изкуствени хромозоми заместват в голяма степен плазмидите, фагите и космидите.

16.6.2. Полимеразна верижна реакция (PCR)

Полимеразната верижна реакция се означава съкратено PCR - от английското название polymerase chain reaction. Това е метод, при който *in vitro* могат да се получат много големи количества ДНК. Той е особено подходящ за амплифициране на ДНК за клинични изследвания или съдебно-медицински тестове, тъй като като изходен материал може да бъде дори само един косъм от човешка коса, една капка кръв или сперма. Чрез PCR може да се откриват инфекциозни агенти, особено латентни вируси, да се откриват алелни полиморфизми (виж т. 16.7.1), да се установи точно типът на тъкани за трансплантация, да се изучава еволюцията, използвайки ДНК от археологични проби и др.

В много случаи този метод премахва необходимостта от ползване на биологични репликиращи се системи за амплифициране на ДНК. Чрез него за много по-кратко време и по-лесно се получава амплифицирана ДНК.

Първо се изолира ДНК, съдържаща сегмента, който ще се амплифицира. Необходими са големи количества праймери, четирите дНТФ, и термостабилна ДНК полимераза. Всички тези компоненти се смесват в разтвор, който се нагрява, за да се разделят веригите (фиг. 16-6). Праймерите са два синтетични олигонуклеотиди (представени на фигурата в зелен цвят). Всеки олигонуклеотид е комплементарен на къс участък в едната верига на ДНК. След като разтворът се охлади, олигонуклеотидите се свързват към ДНК комплементарно и служат като праймери за синтеза на ДНК от четирите дНТФ под действие на термостабилната ДНК полимераза. Процесът на нагряване, охлаждане и синтеза на ДНК се повтаря много пъти докато се получат голям брой копия на ДНК. При автоматизирането на процеса, времето за един цикъл е няколко минути. За 20 цикъла количеството на изходната ДНК може да се увеличи 10^6 пъти, а за 30 цикъла 10^9 пъти.



Фиг. 16-6. Амплифициране на ДНК чрез полимеразна верижна реакция. Веригите на изходната ДНК, означени като верига 1 и верига 2, се разделят чрез нагряване. Сегментът, който трябва да се амплифицира е оцветен в жълто. Към него в двата му края се присъединяват специфично и комплементарно праймерите, представени в зелено. След многократно нагряване и охлаждане наред с изходните вериги се получават и много копия на сегмента - те са оцветени в червено. ДНК полимеразата удължава веригите в двете направления и синтезира две вериги, комплементарни на изходните. Цикълът се повтаря много пъти и резултатът е многократно увеличено количество ДНК с определена дължина и секвенция.

16.7. Приложение в диагностиката, профилактиката и лечението

16.7.1. ДНК-полиморфизми

Полиморфизмите са вариации в ДНК-секвенциите. Броят им в човешкия геном е огромен - една вариация на всеки 500 нуклеотида, или 10^7 пъти за целия геном. Част от тях са точкови мутации, делеции, инсерции. В здрави хора тези промени са в

некодиращи участъци на ДНК, или в участъци, където не предизвикват промяна във функциите на кодиращия белтък, т. е. говори се за **нормални вариации в гените**.

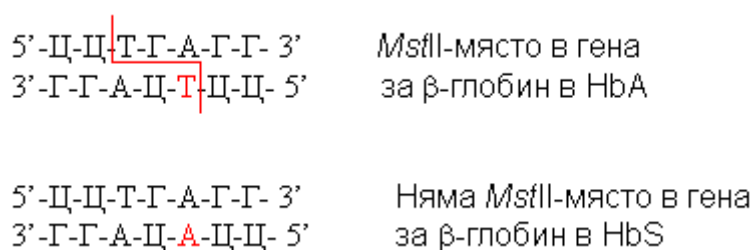
Наследствените полиморфизми обаче могат да бъдат свързани със заболявания и могат да бъдат използвани за откриване на специфичния засегнат ген, а също намират голямо приложение и в съдебната медицина.

Класически пример за точкова мутация е сърповидноклетъчната анемия (виж **т. 2.5.7**), която се причинява от мутация на една единствена база (от общо 3×10^9 в генома) - вместо Т има А, което от своя страна води до промяна в иРНК (вместо А има У) в шестия кодон и като краен резултат в HbS на 6-то място вместо глутамат има валин. В **т. 14.9.2** са дадени други примери за точкови мутации, а в **т. 14.9.3**

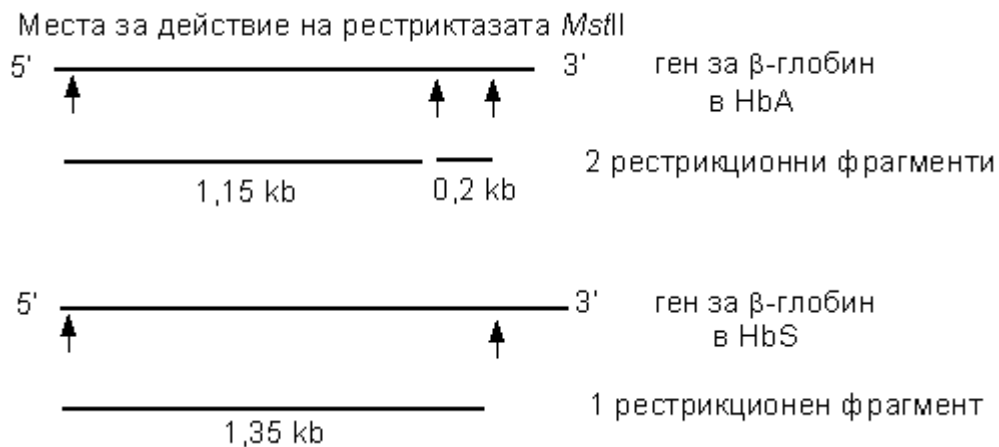
примери за превръщане на смислен кодон в безсмислен и за изместване рамката на четене поради делеции или инсерции. Като се има предвид сложността и многоетапността на синтеза на ДНК, РНК и белтъци, нарушения във всеки от етапите на тези процеси може да доведе до заболяване.

Ако точкова мутация засегне специфичното място за разпознаване от определена рестриктаза, ензимът няма да може да среже ДНК в това променено място. Следователно рестрикционният фрагмент ще бъде по-дълъг за индивид с мутация, отколкото за здрав човек. Възможно е и обратното - в резултат на мутация да се създаде ново рестрикционно място, липсващо в нормалния ген. В този случай дължината на рестрикционния фрагмент ще бъде по-малка, отколкото за здрав човек. Тези вариации са известни като **полиморфизми в дължината на рестрикционните фрагменти**. Английското съкращение **RFLPs** идва от restriction fragment length polymorphisms. Методът, използващ RFLPs за установяване на уникални за даден индивид профили на ДНК фрагменти, се нарича **фингерпринтинг** - от английската дума fingerprinting (виж също **дума-връзка**).

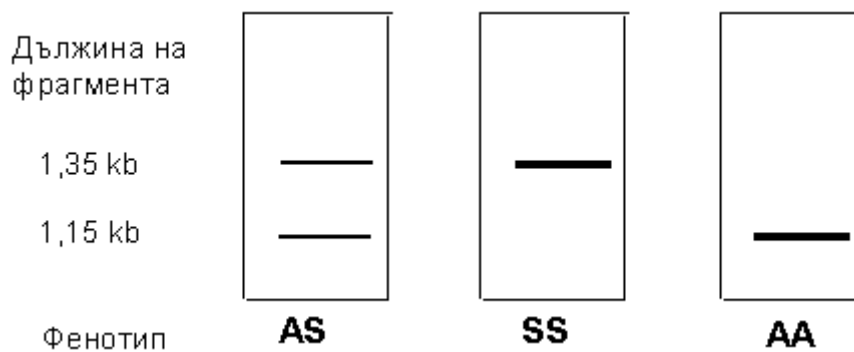
Мутацията, която причинява сърповидноклетъчната анемия, премахва рестрикционното място за ензима *MstII* в α -глобиновия ген (фиг. 16-7-1). В резултат в индивиди със сърповидноклетъчната анемия се получава един по-дълъг рестрикционен фрагмент (1,35 kb), докато в здрав човек се получават два фрагмента (1,15 kb и 0,2 kb) - виж фиг. 16-7-2.



Фиг. 16-7-1. Действие на рестриктазата *MstII* в специфично място в α -глобиновия ген за HbA и невъзможност за действие на ензима в α -глобиновия ген за HbS.



Фиг. 16-7-2. Брой на местата, специфични за *Mst*II в β-глобиновите гени за HbA и HbS. Стрелките сочат местата на срязване. В HbA има 3 места и при срязването се получават 2 фрагмента с дължина 1,15 kb и 0,2 kb. В HbS поради мутация едното място е загубено, има само 2 места и при срязването се получава 1 фрагмент с дължина 1,35 kb.



Фиг. 16-7-3. Установяване разликите в размерите на фрагментите чрез метода Southern blot. ДНК фрагментите са хибридизирани с радиоактивна проба: β-глобинова κДНК (сDNA). Малкият фрагмент (0,2 kb) не е представен, тъй като движейки се много по-бързо, вече е излязъл от гела.

AA - нормален (здрав) индивид; AS - хетерозиготен (носител на болестта); SS - хомозиготен (болен).

Освен мутации, които засягат рестрикционни места в кодиращи райони на гените, има много случаи, в които мутацията засяга рестрикционно място извън кодиращ участък, но здраво свързан и близко разположен до променения ген, който причинява заболяването.

16.7.2. Установяване на мутации чрез алел-специфични проби

В случаите, когато мутациите не засягат рестрикционни места, методът, разгледан в т. 16.7.1, е неприложим. Използват се други техники чрез алел-специфични проби. За целта се синтезират изотопно белязани олигонуклеотидни проби, които са комплементарни на къса ДНК секвенция, която ни интересува. Пробите са два вида:

- 1) комплементарни на нормалната секвенция;
- 2) комплементарни на секвенцията, съдържаща мутацията.

Участъкът от генома, който съдържа мутантния ген, се амплифицира с PCR и пробите от ДНК се поставят в тесни ивици върху нитроцелулозна хартия. Тази техника се нарича **slot blotting** (slot означава процеп, прорез, to slot - вмъквам, вметвам). След това хартията се обработва с двата вида проби. Авторадиографията показва коя от двете проби се свързва с ДНК, т.е. дали алелът е нормален или съдържа мутация. При хетерозиготни носители има и от двата алела, един нормален, и един с мутация.

Това изследване може да се проведе и чрез гел-електрофореза и метода Southern blot. Но описаният по-горе метод "slot blotting" е по-прост и по-лесно изпълним за скринингови изследвания.

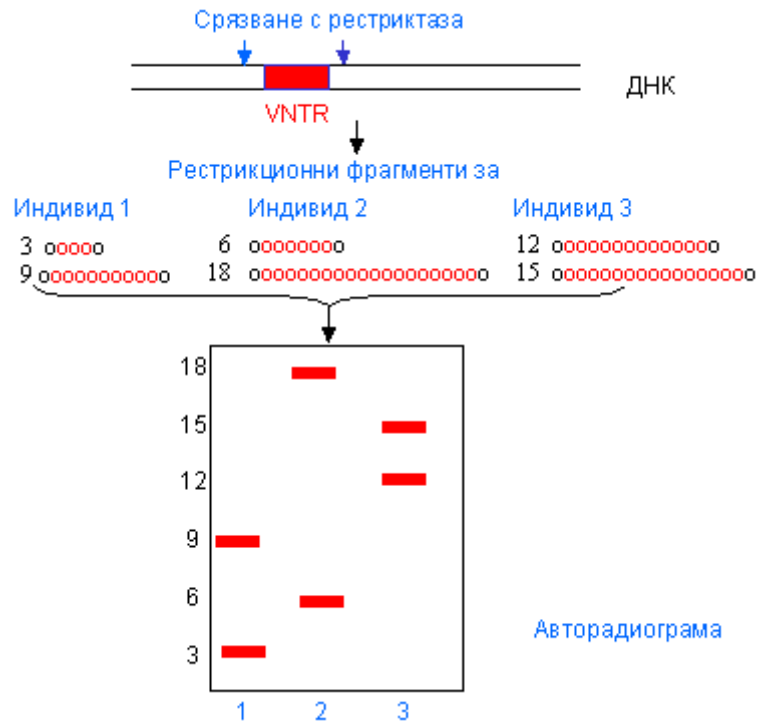
16.7.3. Установяване на мутации чрез PCR

Ако участък от ДНК, съдържащ мутация, има известна секвенция, това може да се използва за клинични изследвания. За целта се синтезира олигонуклеотидна проба, комплементарна на интересувания ни участък с мутация. Пробата ще се свързва комплементарно само с ДНК, получена от индивид с тази мутация. Пробата може да се използва като праймер за PCR. Ако ДНК се амплифицира чрез PCR, праймерът няма да се свърже към нормална ДНК и няма да има амплификация. Свързването на праймера към ДНК от даден пациент и амплифицирането на неговата ДНК ще означава, че матричната ДНК от този индивид съдържа мутацията.

Получени са голям брой проби. Всяка от тях е специфична за определена мутация (свързва се селективно към участък от геномната ДНК) и е различно белязана. Тези специфични и различно белязани проби могат да се използват като праймери в една и съща полимеразна верижна реакция. Пробите, които действат като праймери и се амплифицират, са тези, които съответстват на мутациите в ДНК-матрицата на изследвания индивид.

16.7.4. Установяване на тандемни повтори с вариращ брой (VNTR)

Някои участъци в генома са хипервариабилни (виж [т. 3.5.5](#)). Те съдържат тандемни повтори с вариращ брой в различните индивиди. За означаване на този вариращ брой се използва английското съкращение VNTR (variable number of tandem repeats), а хипервариабилните участъци се наричат VNTR-участъци. Срязването с рестриктази, които разпознават места в близост с VNTR-участъци, води до фрагменти, съдържащи тези участъци, и които са с различна дължина в различните индивиди в зависимост от различния брой на повторите (фиг. 16-8). Пробите, които идентифицират тези фрагменти, се свързват към или близо до повтора.



Фиг. 16-8. Доказване на рестрикцияни фрагменти, получени от ген с вариращ брой на тандемни повтори (VNTR) в три различни индивиди. Дължината на фрагментите е различна в зависимост от броя на повторите. За индивид 1 са получени два фрагмента с 3 и 9 повтори, за индивид 2 - с 6 и 18 повтори, за индивид 3 - с 12 и 15 повтори. Фрагментите са разделени чрез електрофореза, хибридизирани с белязана проба и визуализирани чрез авторадиография.

Получените профили с рестрикцияни фрагменти от тези хипервариабилни участъци могат да се използват за идентифициране на индивиди със същата точност, както и чрез RFLPs фингерпринти (виж т. 16.7.1). В същност, именно за този рестрикционен метод, при който чрез VNTR се установяват индивидуални различия, е въведен първоначално терминът "ДНК фингерпринтинг".

Този метод намира много широко приложение в съдебната медицина за доказване на родствени връзки, а също за доказване и осъждане на криминални престъпници. Индивидите, които са с близки родствени връзки, имат много по-близки профили (ДНК фингерпринти), отколкото при далечно родство. Само еднояйчни близнаци имат идентични профили.

16.7.5. Генетични консултации

Генетичните консултации имат важна роля, за да не се допусне предаване на дефектни гени в потомството. Евентуални кандидати за сключване на брак, които са носители или са болни от дадено наследствено заболяване, могат да бъдат изследвани и информирани за възможните увреждания на бъдещите деца. Така те могат да решат дали да се женят и имат деца или не, т. е. дава им се възможност за избор.

За голям брой наследствени заболявания са въведени скриниращи изследвания, основани на рекомбинантните ДНК технологии, разгледани в тази глава. Тези изследвания са доста скъпи, но цената изглежда незначителна, ако се сравни с

финансовите и психологични трудности на семейството и на обществото като цяло за отглеждане на увредени деца.

Скриниране може да се извърши преди забременяване. При настъпила бременност фетусът може да се изследва за генетичен дефект. Ако има такъв, може да се приложи лечение. В повечето случаи колкото по-рано започне лечението, толкова по-добър резултат се получава.

Изискванията за въвеждане на масов скриниращ тест са следните [1]:

1. Заболяването да има сравнително висока честота.
2. Заболяването да може да се установи до няколко дни след раждането.
3. Заболяването да може да бъде идентифицирано посредством характерен биохимичен маркер, който се измерва лесно и бързо, преди да са настъпили необратими увреждания.
4. Ако се разчита само на клиничните проявления, заболяването ще бъде пропуснато и това ще доведе до тежки необратими увреждания на бебето.
5. Заболяването да е лечимо.

Пример за заболяване, отговарящо на тези изисквания, е фенилкетонурията (виж [т. 2.5.3](#) и списъка със [Симулации на клинични случаи](#), от където може да изберете симулацията "Марина"). Честотата (приблизително 1:10000) е сравнително висока. Заболяването може и трябва да се установи още в първата седмица след раждането. На всеки 10 седмици пациентът губи по 5 IQ единици от своя интелект. След тригодишна възраст, ако не са вземани никакви мерки, детето остава идиот с тежки увреждания. Фенилкетонурията се установява лесно по увеличената концентрация на фенилаланин в кръвта. Без скринирация тест, фенилкетонурията лесно може да бъде пропусната, защото в първите дни след раждането се проявява по много неспецифичен начин. Неспокойствие, раздразнителност, повръщане, екзема се проявяват след 30-ия ден. Мускулният тонус се променя след 4-ия месец - възможни са парализи и гърчове. Постепенно се засилват поведенчески отклонения, микроцефалия. Целта е да се предотвратят тези крайни тежки увреждания, още преди да са настъпили. Заболяването е лечимо, ако лечението започне колкото може по-скоро след раждането.

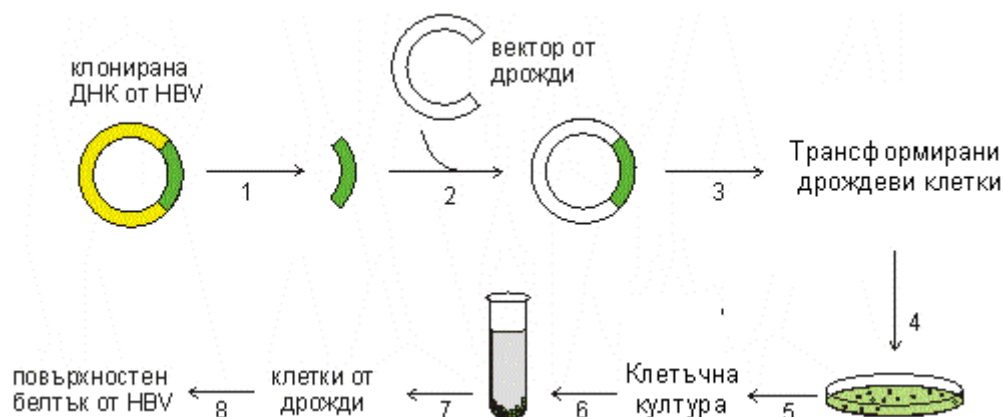
Необходимостта от генетична консултация е поставена като проблем и в клиничния случай "Сандра", като засега на читателите е предоставена възможността сами да отговорят на него. Желаетелите да разработват продължението да пишат до kossekov@medfac.acad.bg.

16.7.6. Производство на ваксини

Класическите ваксини представляват инфекциозни агенти, които са убити и отслабени (променени, така че да не могат да се размножават във ваксинирания индивид). И в двата случая съществува опасност ваксината да съдържа примеси от живи инфекциозни агенти. Известни са случаи, когато именно чрез не добре пречистена ваксина настъпва заразяване.

Тъй като в същност човешката имунна система образува антитела спрямо антигени - повърхностни белтъци по повърхността на микроорганизма, тези белтъци могат да се получат чрез рекомбинантни ДНК технологии напълно пречистени от инфекциозния агент [2]. Така напълно се изключва възможността за заразяване. Първата такава

ваксина е произведена и се използва за изграждане на имунитет против вируса на хепатит В (HBV) - виж фиг. 16-9.



Фиг. 16-9. Производство на ваксина срещу вируса на хепатит В (HBV) чрез рекомбинантни ДНК технологии.

- 1 - изолиране на гена за повърхностен белтък в HBV;
- 2 - включване на гена във вектор от дрожди;
- 3 - трансформиране на дрождевите клетки;
- 4 - селекция на дрождите, които съдържат вектора с гена за повърхностен белтък в HBV;
- 5 - размножаване на дрождите в клетъчна култура;
- 6 - изолиране на клетките чрез центрофугиране;
- 7 - разрушаване на клетките от дрожди
- 8 - изолиране на повърхностен белтък от HBV

Напоследък се прилага нов подход за имунизации, при който за ваксина се използва ДНК, очистена от белтъци [3]. Тази ДНК се получава от бактериални плаزمиди, от които са премахнати белтъците. Тя може да влиза в различни типове клетки и да се експресира в клетките-реципиенти. В нея има ограничен набор от генетична информация, при което се изключва възможността за заразяване. Секвенциите в тази ДНК кодират антигенни участъци от патогена. Експресията им става посредством клетъчна транскрипция и транслация. Механизмът на имунния отговор не е изяснен, но са получени обнадеждаващи резултати срещу доста вируси, бактерии и паразитни микроорганизми. Очаква се този подход да бъде ефективен и при изработване на ефективни ваксини срещу вируса на СПИН, туберкулоза и малария.

16.7.7. Производство на човешки терапевтични белтъци

Друго важно приложение на рекомбинантните ДНК технологии е производството на човешки белтъци, които се използват за терапия на различни заболявания [4, 5].

Инсулин

Един от първите човешки белтъци с лечебни свойства, който бе произведен чрез рекомбинантни ДНК технологии, е инсулин (фиг. 18-9). (За структура, функции и механизъм на действие виж

[т. 2.2.2,](#)

[т. 2.3.5,](#)

[т. 2.5.4,](#)

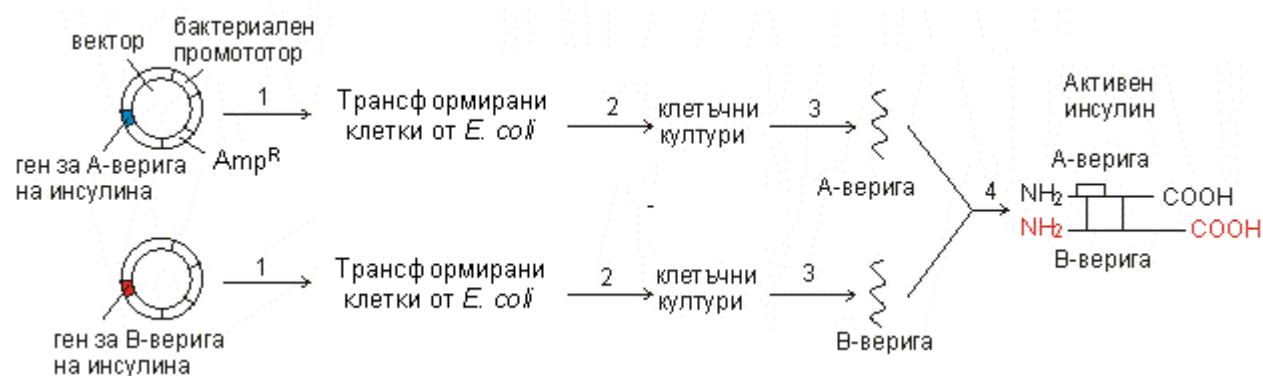
[т. 17.7.4,](#)

[т. 17.7.5,](#)

[т. 17.7.6](#) и

[глава 18](#)). Инсулинът е необходим за терапия на захарен диабет. Полученият чрез генно инженерство инсулин има предимството, че не предизвиква алергични реакции, които често се проявяват при лечение с инсулин от животински видове.

Гените за верига А и верига В се изолират и включват в плазмиди, с които се трансформират клетки на *E. coli*. Бактериалните клетки се размножават в клетъчни култури, при което те синтезират инсулиновите вериги. Последните се изолират и пречистват. След това се смесват при условия, позволяващи нагъване и образуване на дисулфидните връзки. Получава се активен инсулин.



Фиг. 16-10. Производство на човешки инсулин в *E. coli* чрез рекомбинантни ДНК технологии. Amp^R - ген за резистентност към ампицилин.

По същия начин в *E. coli* се произвежда **човешки растежен хормон**, който е необходим за лечение на деца с недостатъчност на този хормон.

Други по-сложни белтъци се получават в култури от клетки на бозайници. Такива белтъци са:

- **фактор VIII**, необходим за кръвосъсирването. Липсата му води до хемофилия. Преди въвеждане на производството му чрез генно инженерство, има много случаи на заразяване на пациенти със СПИН или хепатит при преливане на кръв или при употреба на фактор VIII от заразна кръв.

- **алтеплаза** или тъканен плазминогенов активатор (виж

[т. 4.4.8](#) и

списъка със **Симулации на клинични случаи**, от където може да изберете симулацията "Васил"). Тази протеаза активира плазминоген в плазмин, а последният разгражда фибриновите съсиреци, запушили коронарните артерии при инфаркт на миокарда и спират притока на кислород към сърцето. Производството на алтеплазата в човешки клетъчни култури е много по-скъпо от получаването на бактериална стрептокиназа. Алтеплазата обаче има важни предимства, че не предизвиква алергични реакции и се понася по-добре от пациентите. Алтеплазата е по-селективна от стрептокиназата и активира плазминогена само във фибриновия съсирек.

Стрептокиназата активира плазминогена във фибриновия съсирек и в течната фаза, където циркулира фибриноген. Това води до плазминемия и кървене. Алтеплазата не предизвиква плазминемия.

- растежни фактори

Един от тях е еритропоетин, който се използва при някои анемии да стимулира образуването на еритроцити. Така се получават и интерлевкини, които се използват след трансплантации на костен мозък и след химиотерапия да стимулират образуването на бели кръвни клетки и така да се намали риска от инфекции.

Човешки белтъци могат да се получават и в трансгенни животни, които са така променени, че да излъчват тези белтъци в млякото.

16.7.8. Генна терапия

Генната терапия включва изолиране на нормални гени и включването им в патологични клетки, така че нормалният ген да се експресира, при което патологичната клетка се възвръща към нормално състояние. Такъв подход е много примамлив, като се има предвид че са известни над 4000 наследствени заболявания, повечето от които фатални или с умствени увреждания. Доскоро генната терапия се провеждаше само на експериментално ниво, в клетъчни култури или в животни. В последните години генната терапия започва да се превръща в реалност, както личи от приведените по-долу примери [6-9].

Лечение на аденозин дезаминазна недостатъчност.

Ензимът аденозин дезаминаза катализира превръщането на аденозин в инозин (виж [т. 9.2.1](#)) и на дезоксиаденозин в дезоксиинозин. Дефектът в гена за този ензим се онаследява като автозомално рецесивно заболяване. Недостатъчност на аденозин дезаминазата води до тежка комбинирана имунна недостатъчност по неизяснен механизъм. Известни са над 30 мутации, свързани с това заболяване. Деца с този дефект умират още през първите години след раждането от инфекциозни заболявания, с които не могат да се справят.

За първи път на пациентка с това заболяване (малко 4-годишно момиче) бе приложена генна терапия през 1990 г. Изолирани Т клетки от нейната периферна кръв са били стимулирани в клетъчна култура с подходящи растежни фактори. Генът за аденозин дезаминазата е бил включен в тези клетки с помощта на специално конструиран ретровирус, т. е. преносът на гена е бил осъществен чрез ретровирусно инфектиране. Този ретровирус е бил модифициран така, че да съдържа гена за аденозин дезаминаза и този ген да може да се експресира в човешките клетки, но вирусът да не може да се реплицира.

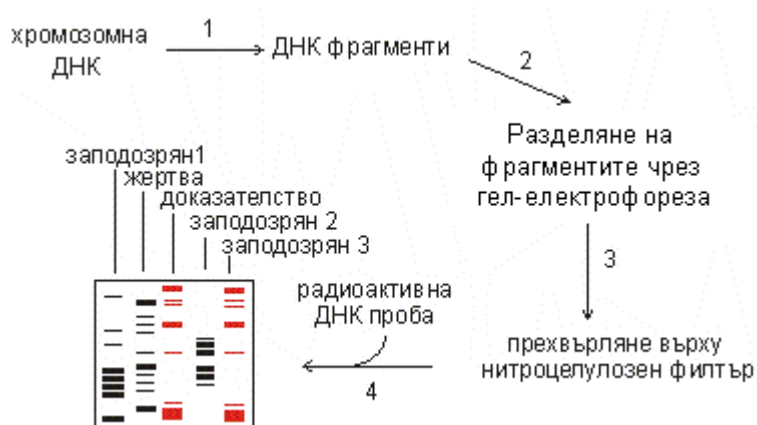
Модифицираните Т клетки, съдържащи вече нормален ген за аденозин дезаминаза, са били въведени отново в кръвта на пациентката. Дори 10% активност на ензима от нормата са били достатъчни да нормализират пациентката. Момичето, 10 години по-късно, на 13 годишна възраст е било живо и добре, като процентът на генно-корегирани Т клетки е бил 20-25% от всички Т клетки.

Подобни данни има и за Х-свързана тежка комбинирана имунна недостатъчност в две деца на 8 и 11 месеца. При това заболяване се нарушава диференциацията на Т и килърните лимфоцити поради мутация в една цитокинова субединица α_c . В този случай са били третирани не зрели Т клетки, а стволови клетки с ретровирусен вектор, носещ α_c ДНК за нормална α_c субединица. Така е било осигурено по-високо ниво на генна трансдукция. И при двете деца имунната система е била нормализирана за три месеца.

16.7.9. Съдебна медицина

Рекомбинантните ДНК технологии оказват неограничена услуга на съдебната медицина. Преди тяхното въвеждане идентификацията на криминални престъпници е било много по-трудно и несигурно. Както бе споменато и както личи от досегашното изложение минимално количество материал (косъм, капка кръв или сперма) е достатъчно за изследванията, тъй като ДНК във взетите проби може да бъде амплифицирана. Приведеният по-долу пример за установяване на изнасилвач илюстрира значението на рекомбинантните ДНК технологии.

Младо момиче е намерено мъртво в парка на малко градче. При прегледа на трупа се установява, че момичето е изнасилено. Лекарят от полицейският екип събира сперма от вагиналната течност, а също и засъхнала кръв под ноктите на момичето. Предполага се, че спермата и кръвта са на изнасилвача и убиеца. Макар и в минимално количество, ДНК от тези проби е успешно амплифицирана чрез PCR. Междувременно полицията открива трима мъже, с които жертвата е разговаряла няколко часа преди вечерта на убийството. Взетите от тях ДНК проби са анализирани и сравнени с ДНК на жертвата и с доказателството (сперма, събрана от вагината на жертвата) - виж фиг. 16-11. ДНК от третия заподозрян и ДНК от спермата показват един и същи рестрикционен профил.



Фиг. 16-11. Сравнителен анализ на ДНК от жертвата, доказателството при огледа (сперма, събрана от вагината) и трима заподозрени за престъплението.

1 - срязване на ДНК с рестриктази; 2 - гел-електрофореза на ДНК-фрагментите; 3 - Southern blot; 4 - хибридизация с радиоактивна проба и автордиография за визуализиране на пробите.

Някои съдилища засега се възпротивяват срещу прилагане на ДНК анализ поради технически проблеми - необходими са специално оборудвани лаборатории, стриктно спазване на процедурите и пр. Освен това като се има предвид колко изключително мощна е PCR за амплифициране, трябва да се избегне опасността да се амплифицират примеси от ДНК, които не са свързани с даден случай.

16.7.10. Трансгенни животни

Трансгенни животни са тези, които се развиват от оплодена яйцеклетка с включен в нея чужд ген. Поради това те имат този ген във всяка своя клетка. Създаването и наблюдението над такива животни позволяват да се установи ролята на определен ген за растежа и развитието на цялото животно, което е нов успех и бележи нов етап в развитието на рекомбинантните ДНК технологии в сравнение с описаните досега методи за получаване на големи количества от продукта на даден чужд ген в бактерии и клетъчни култури.

Изследванията с трансгенни животни биха могли да помогнат за анализ на регулаторни елементи в ДНК, експресия на гените по време на диференциация, тъканна специфичност, потенциалната роля на онкогенни продукти за растежа и диференциацията и за индукцията на туморогенезата. Особени надежди се възлагат за корегирание на генетични болести в ранното ембрионално развитие като се замести дефектния ген в развиващия се зародиш.

Най-често използваната процедура за получаване на трансгенни животни включва клониране на определен ген, свързан към неговия собствен промотор или пък свързан към чужд промотор, който може да се регулира избирателно. Приготвят се много копия от този комплекс ген-промотор и се инжектират в пронуклеуса на оплодена яйцеклетка. Чуждата ДНК се включва случайно в хромозомната ДНК. Ако чуждият ген разкъса важен клетъчен ген, зародишът може да умре. Обикновено при инжектиране на чуждата ДНК в хромозомата се получават и нелетални мутации.

Мишка с ген за растежен хормон от плъх

В този случай трансгенна мишка е получена от оплодена миша яйцеклетка, в която е въведен ген за растежен хормон от плъх [10]. Генът е присъединен в близост с участък, където е т. нареченият металотионеин I (MT-I) промотор за растежен хормон. Добавеният в храната $ZnSO_4$ може да активира този промотор и да започне транскрипция на плъшия ген за растежен хормон. Постоянната свръхекспресия на плъшия растежен хормон води до получаване на двойно по-големи мишки от контролните.

Нулева или нокаутирена мишка

Създаването на животни с избран увреден ген във всяка клетка позволява да се изследва ролята на този ген (ако мутацията не е летална) [11]. Процедира се по следния начин: определен рекомбинантно получен и пречистен ген се инактивира. Обикновено това става като в него се вмъкне друг ген, осигуряващ резистентност към определен антибиотик. Така едновременно интересуваният ни ген се инактивира, като в същото време се създава възможност за селекция благодарение на гена за резистентност към антибиотик. След това промененият инактивиран ген се въвежда в стволена клетка на ембриона, така че той да замести нормалния ген. После променените стволови клетки се инжектират в развиващ се бластоцит и последният се въвежда в приемна майка. В потомството се селектират мишки, в които липсва нормалният ген.

Агънцето Доли

Получаването на жизнеспособно потомство от соматични клетки на бозайник е трудна, но осъществима процедура [12], въпреки че от етична гледна точка много се спори дали човекът, макар и господстващ вид на нашата планета, има право да подбира и променя генетичната информация на други видове. Още по-неприемлива според повечето учени е подобна намеса, когато става дума за клониране на хора.

Клонираната овца, наречена Доли, е получена по следния начин. Клетки от млечна жлеза на шест-годишна овца (порода Finn Dorset), са получени в клетъчна култура. Развитие им се задържа във фаза G_0 от клетъчния цикъл (виж т. 12.9) чрез поддържане на ниско серумно съдържание в средата. От тези неделящи се диплоидни донорни клетки се изваждат ядрата и се пренасят в яйцеклетки от друга порода овце (Scottish Blackface), от които са извадени ядрата. Тези изкуствено "оплодени" яйцеклетки се развиват в култура до стадий морула или бластоцист и след това се пренасят в приемна майка-овца, която да износи зародиша до раждането. Процентът на оживелите имплантирани зародиши е много малък. Чрез този метод от соматични клетки на възрастни животни са получени клонирани крави, мишки и маймуни, а според някои публикации и човек.

16.7.11. ДНК-чипове в диагностиката

Чрез успешното разшифроване на човешкия геном бе получена огромно количество информация, която може да бъде използвана в медицината благодарение въвеждането на нови техники за проследяване на генната експресия и бързо изследване на гените за мутации и вариации в секвенцията на ДНК. Много полезни в това отношение са олигонуклеотидни масиви от стотици или хиляди проби [13, 14]. Всяка от тези голям брой олигонуклеотидни проби е ген-специфична и имобилизирана върху определено място на твърда матрица, наречена **чип (chip на английски)**, т. е всяка проба е фиксирана на определен "адрес". Към генните чипове се добавят белязани нуклеинови киселини (ДНК или РНК) от определени клетки на изследвания организъм. Хибридизацията на тези белязани ДНК или РНК към комплементарна секвенция на някоя от пробите ги имобилизира на определено място върху чипа. Това позволява доказване и количествено определяне на специфични секвенции в изследваната нуклеинова киселина.

16.8. Насоки за самостоятелна работа

1. Прочетете статии [13, 14] за ролята на ДНК-чипове в диагностиката и сравнете с [15] за ролята на белтъчни чипове, съдържащи антитела или функционални белтъци.

2. Потърсете нова информация за клониране на човек, ползвайки например търсещата машина Google [16]. Напишете кратко резюме, обсъдете го с Ваши колеги и го изпратете на автора на курса до 24.12.2003 г. за участие в конкурса за най-добро студентско резюме по темата.

16.9. Литература

1. Gaw, A., R. A. Cowan, D. St. J. O'Relly, M. J. Stewart, J. Shepherd (1999), Screening the newborn for disease. In: Clinical Biochemistry, Second edn., Churchill, Livingstone, 144-145.
2. Marks, D. B., A. D. Marks, C. M. Smith (1996) Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 252.
3. Lewis, P. and L. A. Babiuk (1999) DNA vaccines: a review. Adv. Virus. Res. 54, 129.
4. Trent, R. G. (1993) Molecular medicine. New York, Churchill Livingstone.
5. Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller (1992) Recombinant DNA, Scientific American Books, New York, W. H. Freeman.
6. Blaese, R. M. (1991) Progress toward gene therapy. Clin. Immunol. Immunopathol. 61, 574.
7. Mutani, K., M. Wakamiya and C. T. Caskey (1993) Long-term expression of retroviral-transduced adenosine deaminase in human primitive hematopoietic progenitors. Hum. Gen. Ther., 4, 9.
8. Anderson, W. F. (2000) The best of times, the worst of times, Science 288, 627.
9. Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bpusso, F. Le Deist and A. Fischer (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-XI disease, Science 288, 669.
10. Palmiter, R. D. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature, 300, 611.

11. Leon, C., G. Hechler, M. Freunf, A. Eckly, C. Vial, P. Ohlmann, A. Dierich, M. LeMeus, J. - P. Cazenave and C. Gachet (1999) Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor null mice. *J. Clin Invest.* 104, 1731.
12. Witmut. I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* 385, 810.
13. Freeman, W. M., D. J. Robertson and K. E. Vrana (2000) Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* 29, 1042.
14. Hacia, J. G., L. C. Brody, M. S. Chee, S. P. Fodor and F. S. Collin (1996) detection of heterozygous mutations in *BRCA1* using high density oligonucleotide arrays aand two-colour fluorescence analysis, *Nat. Genet.* 14, 441.
15. G. A. Michaud and M. Snyder (2002) Proteomic approaches for the global analysis of proteins. Review, *Biotechniques*, 33, 1308-1316.
16. Google searching machine - <http://www.google.com>.