

Применение высокопроизводительных методов в постгеномных исследованиях

П. В. Сергиев

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40
E-mail: petya@genebee.msu.ru

С развитием высокопроизводительных методов секвенирования геномов происходит лавинообразное накопление информации о нуклеотидных последовательностях генов. Наше понимание функциональной роли генов, механизмов их экспрессии и взаимовлияния все более отстает. Задачей постгеномных исследований видится массовое высокопроизводительное изучение экспрессии, взаимодействий и функциональной роли генов. С этой целью активно разрабатываются и уже используются на практике подходы, составляющие основу инструментария постгеномной биологии.

В геномах живых существ закодирована информация об их строении и функционировании, а также о том, как эти организмы должны реагировать на внешние условия. Сейчас важнейший шаг в изучении любого вида состоит в определении последовательности его генома. Размеры геномов разнятся в пределах от нескольких сот тысяч нуклеотидов у некоторых бактерий до сотен миллиардов у некоторых эукариот. Число генов возрастает вместе с размером генома, но лишь до определенного уровня. К настоящему времени разработаны несколько высокопроизводительных методов определения нуклеотидной последовательности геномов. Это платформы Roche/GS-FLX Titanium (500 миллионов нуклеотидов в день), Illumina/HiSeq 2000 (55 миллиардов нуклеотидов в день) и ABI/SOLiD 5500xl (до 30 миллиардов нуклеотидов в день).

В 2011 г. продолжается взрывной рост информации о нуклеотидных последовательностях. В основной базе данных Генбанк (GenBank) к началу 2011 г. уже содержалось 126 551 501 141 основание. Удешевление процедуры секвенирования продолжается и должно привести в обозримом будущем к определению метагенома всей биосферы.

С развитием высокопроизводительных методов секвенирования получение новой информации о нуклеотидных последовательностях стало заметно опережать наше понимание функции как отдельных генов, так и всей их совокупности. В 2000 г. Пеер Борк сформулировал проблему: в каждом новом геноме примерно 30% генов осуществляют неизвестную нам пока функцию. Более того, достоверность предсказания функции оставшихся 70% генов тоже составляет около 70%, т.е.

мы находимся примерно в том состоянии, что и географы в эпоху Великих географических открытий – общие очертания уже понятны, но очень много еще предстоит сделать, чтобы понять полную картину мира. Изучая живой организм, мы должны определить тип и степень взаимовлияния всех генов, продукты которых оказывают влияние друг на друга.

Изучить ген, значит ответить на несколько вопросов (рис. 1). Во-первых, нужно узнать, что будет с клеткой или организмом, если ген инактивировать или временно «выключить». С этим связан также вопрос о том, могут ли мутации в областях генома, удаленных от данного гена, уменьшить или увеличить последствия инактивации этого гена. Все гены работают в разных условиях. Некоторые нужны всегда, некоторые только при определенных обстоятельствах. Очень многое в понимании того, зачем нужен ген, дает изучение условий, в которых он работает, т.е. когда возникает необходимость в продукте этого гена. Поскольку работа гена осуществляется в несколько этапов, мы должны изучить все эти этапы. Во-вторых, необходимо узнать, когда ген транскрибируется. В-третьих, когда он транслируется. В-четвертых, с какими молекулами (белками, РНК, ДНК, малыми молекулами) он взаимодействует. Если ген кодирует фермент, то какие реакции

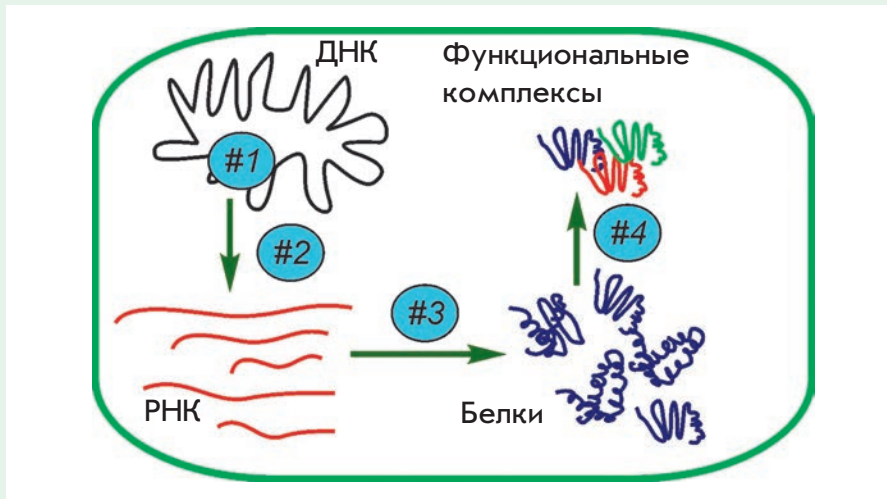


Рис. 1. Схема функционирования гена и вопросы, на которые необходимо ответить при изучении гена. Схематично показаны и подписаны ДНК, РНК, белки и функциональные комплексы. Стрелками показаны пути экспрессии гена и функционирования продукта гена. В синих кружках обозначены вопросы, на которые нужно ответить: (#1) Каков фенотип нокаута гена? (#2) Как ген транскрибируется? (#3) Как мРНК, соответствующая гену, транслируется? (#4) С какими компонентами клетки взаимодействует продукт гена?

он катализирует. Если не фермент, то в каких процессах он участвует.

Развитие постгеномных технологий не может быть эффективным без методической базы, позволяющей изучать функциональные взаимодействия множества генов и их продуктов. При этом необходимо развитие методов, позволяющих изучать как экспрессию всех генов при определенных условиях, так и методов, основанных на генетических манипуляциях с каждым геном из полного набора генов организма.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА СТАДИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Как следует из предложенной Фрэнсисом Криком центральной догмы молекулярной биологии, экспрессия генов происходит в два этапа. Сначала ген транскрибируется при помощи РНК-полимеразы, в результате

чего появляется соответствующая РНК. Иногда именно РНК является функциональным продуктом гена, и тогда экспрессия гена тождественна транскрипции и созреванию РНК. Чаще РНК-копия гена представляет собой мРНК и транслируется с помощью рибосом, в результате чего образуется белковый продукт. Для того чтобы «измерить» экспрессию гена используются методы, определяющие количество РНК или белка. При постгеномных исследованиях необходимо измерять количественные характеристики экспрессии множества, а в идеальном случае — всех генов организма.

В настоящее время стандартным методом измерения количества всех разновидностей РНК в клетках служит гибридизация на микрочипах (рис. 2А). Для определения уровня экспрессии гена с использованием микрочипов из клеток выделяют

суммарную РНК и с помощью обратной транскрипции создают кДНК. Эта кДНК модифицируется флуоресцентными красителями. Обычно сравнивают два образца кДНК, окрашенных красителями Су3 и Су5. Смесь кДНК, окрашенных разными красителями, гибридизуют на микрочипе, на который нанесены олигонуклеотиды, комплементарные отдельным разновидностям кДНК. Соотношение интенсивностей флуоресценции Су3 и Су5 в области микрочипа, соответствующей определенному гену, служит мерой относительной экспрессии этого гена в образцах. В современных микрочипах используются от десятков тысяч до миллиона и более специфичных олигонуклеотидных проб, покрывающих с многократной избыточностью известные гены практически любого модельного организма.

В настоящее время технология микрочипов постепенно уступает место технологии высокопроизводительного секвенирования (рис. 2Б). Для определения всего спектра РНК, присутствующих в клетке, могут быть применены те же технологии, что и для высокопроизводительного определения нуклеотидной последовательности отдельных геномов. Итогом такого эксперимента служит определение множества, до миллиардов, коротких последовательностей, содержащихся в суммарной РНК (транскриптом). С помощью компьютерного анализа можно выровнять эти короткие последовательности с последовательностью генома и выяснить, какие участки генома транскрибируются. Количество относящихся к данному гену коротких фрагментов РНК, выявленных с помощью высокопроизводительного секвенирования, может служить мерой экспрессии гена.

Высокопроизводительное секвенирование РНК имеет зна-

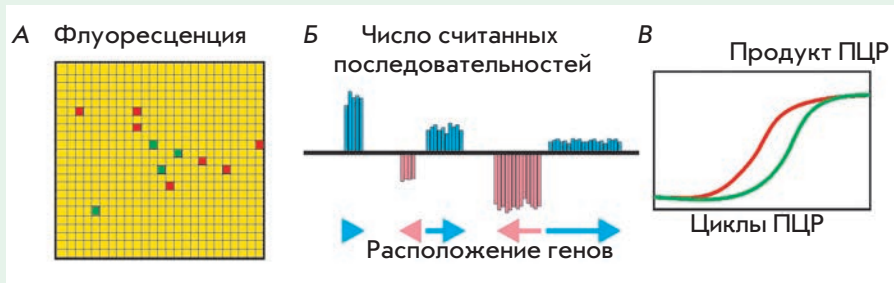


Рис. 2. Высокопроизводительные методы изучения транскрипции гена. **А** – Схема изучения уровней транскрипции с помощью микрочипов. Флуоресцентная метка вносится с помощью обратной транскрипции. Зеленым и красным флуоресцируют кДНК из двух сравниваемых образцов, помеченных флуорофорами Cy3 и Cy5. Сетчатый прямоугольник – микрочип с нанесенными на него олигонуклеотидными зондами. Желтые области – области, где количества соответствующей РНК в образцах совпадают; красные и зеленые – области, где преобладает кДНК, меченная Cy5 или Cy3 соответственно. **Б** – Схема изучения транскриптома методом высокопроизводительного секвенирования. Итогом использования метода служит график распределения обнаруженных секвенированием последовательностей по геному. Частота встречаемости последовательностей, относящихся к транскрипту, показанная синими и розовыми столбцами, служит количественной мерой экспрессии. **В** – Схема изучения экспрессии методом количественного ПЦР-анализа кДНК (RT qPCR). На графике схематично показаны кривые накопления продуктов ПЦР, соответствующих двум различным генам, в зависимости от числа циклов ПЦР. Более раннее появление продукта свидетельствует о большем количестве соответствующей мРНК в транскрипте.

чительные преимущества перед микрочипами, поскольку не предъявляет никаких требований к предварительной аннотации данного участка генома как гена. Таким образом происходит выявление множества транскриптов, не известных заранее. Кроме того, высокопроизводительное секвенирование РНК также позволяет непредвзято, т.е. не основываясь на известных заранее гипотезах, определять начало и конец транскрипта, а также варианты, образующиеся в результате альтернативного процессинга.

Обычно результаты изучения транскриптома, полученные при использовании как микрочипов, так и высокопроизводительного секвенирования РНК, в случае наиболее интересных генов проверяют с помощью количественной ПЦР кДНК (RT

qPCR) (рис. 2В). Этот метод основан на амплификации одного фрагмента кДНК (ампликона), сопряженного с количественным определением получающегося продукта в зависимости от цикла ПЦР. С этой целью измеряют интенсивность флуоресценции либо интеркалирующего в ДНК красителя, либо красителя, связанного со специально подобранным ДНК-зондом. Метод RT qPCR превосходит по надежности метод гибридизации на микрочипах и, в некоторой степени, даже высокопроизводительное секвенирование РНК. Основным недостатком RT qPCR – это возможность его использования для измерения количества только одного транскрипта в одном эксперименте. Этот недостаток можно преодолеть несколькими путями. Во-первых, использование 96-

и 384-луночных ПЦР-планшетов и соответствующих приборов позволяет детектировать множество транскриптов одновременно. В современных приборах, таких, как 7900HT («Applied Biosystems») или CFX384 («Bio-Rad»), интенсивность флуоресценции измеряют при четырех-пяти длинах волн одновременно. Кроме того, возможность автоматической загрузки планшетов из стопки повышает максимальную производительность прибора до 20 000 образцов за запуск. Этой производительности хватает для изучения экспрессии всех генов бактерии и даже примитивных эукариот. Для пипетирования такого количества ПЦР применяют автоматизированные станции, такие, как установленная в Центре коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова станция на основе Janus Extended («Perkin Elmer»).

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НА СТАДИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Согласно центральной догме молекулярной биологии, экспрессия генов, кодирующих белки, происходит в два этапа. мРНК, образуемая в результате транскрипции гена, должна быть считана (транслирована) рибосомой. Рибосома синтезирует белок согласно закодированной в мРНК информации. Хотя экспрессия генов регулируется по большей части на стадии транскрипции, трансляция мРНК тоже подвержена регуляции. Известно множество интереснейших механизмов регуляции экспрессии на стадии трансляции. Еще больше механизмов, регулирующих трансляцию отдельных мРНК, предстоит понять. Для системного понимания механизмов регуляции экспрессии генов необходимо не только измерять уровни РНК, но и определять относительные количества белков

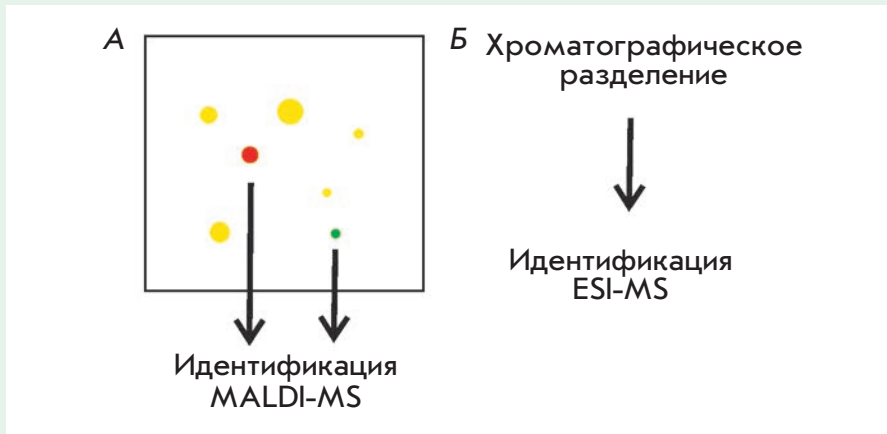


Рис. 3. Методы изучения протеома. **А** – Схема изучения количественных соотношений белков в двух образцах с помощью двумерного гелевого электрофореза. Стадия мечения заключается в модификации образцов белков сукцинимидными эфирами флуоресцентных красителей Су3 и Су5. После мечения образцы смешивают и разделяют на одном двумерном геле. Пятна, окрашенные желтым, соответствуют белкам, количество которых одинаково в обоих образцах. Зеленые и красные пятна соответствуют белкам, количество которых повышено в том или другом образце. Идентификация белков проводится с помощью гидролиза протеазой и масс-спектрометрического анализа полученных пептидов. **Б** – Схема изучения количественных соотношений белков в образце с помощью хроматографии. Препарат суммарного белка разрезают протеазой, полученные пептиды разделяют жидкостной хроматографией и анализируют с помощью масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией.

в клетке. Измерением количества белков занимается протеомика. Эта область науки, безусловно относящаяся к постгеномным технологиям, имеет свой инструментарий.

Стандартным методом изучения совокупности белков клетки остается двумерный белковый гелевый электрофорез (рис. 3А). Наиболее распространена система двумерного гелевого электрофореза Protean («Bio-Rad»). Как и при изучении транскриптома с помощью микрочипов наиболее информативно сравнение двух образцов, модифицированных разными флуоресцентными красителями. Как правило, используются Су3 и Су5, присоединяемые к белкам с помощью реакции гидроксисукцинимидных эфиров красителей с остатками лизина в молекулах белков. Образцы белков, моди-

фицированные Су3 и Су5, смешивают и подвергают сначала разделению по величине изоэлектрической точки. Таким способом можно отделить друг от друга белки, имеющие нейтральный заряд при различных значениях pH. Затем белки разделяют по массе с помощью гелевого электрофореза в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия. После разделения белков гелем сканируется на сканере флуоресценции, и по соотношению флуоресценции Су3/Су5 можно судить об относительном количестве того или иного белка в исходных образцах. Считается, что разрешающая способность каждого метода разделения составляет примерно 100 белковых полос, таким образом теоретически можно различить до 10 000 типов белков. К сожалению, в реальности такого разре-

шения достичь не удастся в силу нескольких причин. Во-первых, распределение белков клетки по изоэлектрической точке и массе не идеально. Большинство белков имеют достаточно схожие свойства. Во-вторых, количество белков в клетке различается на несколько порядков величины. Часто встречающиеся белки легко детектировать с помощью двумерного гелевого электрофореза. Редкие – практически невозможно. Таким образом, двумерный гелевый электрофорез надежен в определении количества нескольких сотен самых распространенных белков.

Идентификация белков из флуоресцирующих пятен двумерного геля проводится с помощью масс-спектрометрии. С этой целью белок разрезают на фрагменты специфической протеазой, такой, как трипсин. Затем с помощью MALDI-масс-спектрометрии анализируют массу фрагментов. В современных протеомных лабораториях чаще всего используются приборы Ultraflex («Brucker») и AB SCIEX 5800 («AB Sciex»).

Альтернативой и дополнением двумерному гелевому электрофорезу в разделении всего протеома клетки служит жидкостная хроматография с детекцией пептидов масс-спектрометром с электроспрей-ионизацией (рис. 3Б). С использованием подобных систем потенциально возможен анализ всего протеома, однако основная сложность заключается в чрезвычайном многообразии протеолитических фрагментов, получающихся при гидролизе всей совокупности клеточных белков. Без модификации белков флуорофорами, применяемой при изучении протеома с помощью двумерного гелевого электрофореза, необходимы специальные методы, позволяющие сравнивать количества белков в двух образцах только

с помощью масс-спектрометрии. Таким методом служит мечение изотопными довесками (iTRAQ). При использовании этого метода образцы белков модифицируют химически идентичными довесками, состоящими из двух частей. Эти части легко расщепляются в специальных масс-спектрометрах, имеющих режим фрагментации. Суммарные массы довесков, использующихся для мечения двух образцов, до фрагментации одинаковы. Таким образом, в масс-спектрометре одновременно анализируются два идентичных пептида с химически идентичными и равными по массе довесками, происходящими из двух образцов белка. Отличия в массе появляются только после разделения довесков на два фрагмента. Массы фрагментов отличаются, поскольку имеют различный изотопный состав. Соотношение количества фрагментов с различающейся массой будет таким же, как соотношение белков в исходной смеси.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ РЕПОРТЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Использование современных методов протеомного анализа позволяет сравнивать количество большинства белков клетки в различных образцах. Тем не менее, протеомный анализ не может определить, на какой стадии изменилась экспрессия – на стадии транскрипции или трансляции. Для изучения каждой стадии экспрессии по отдельности, а также элементов гена, важных для того или иного механизма регуляции экспрессии, применяются репортерные конструкции. При использовании этого метода изучаемый ген заменяется на ген, кодирующий белок, количество которого в клетке легко измерить. В настоящее время в качестве репортерных конструкций широко при-

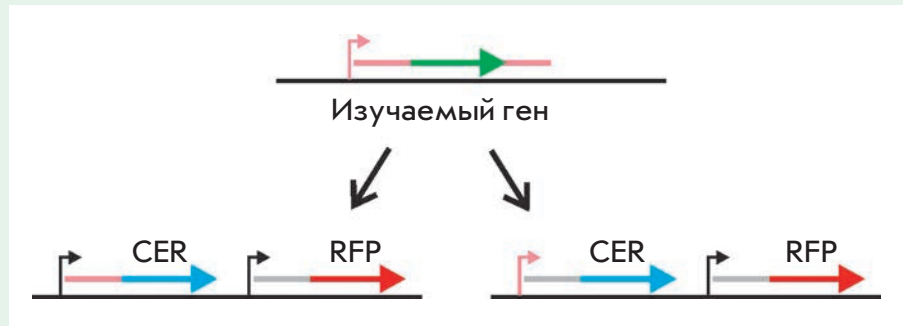


Рис. 4. Схема изучения экспрессии гена на стадиях транскрипции и трансляции с помощью репортерных конструкций. Изучаемый ген показан зеленым. Промотор и нетранспируемые участки выделены розовым. Ген красного флуоресцентного белка показан красным, а ген синезеленого – синим. Перед геном синезеленого флуоресцентного белка встраивают промотор (справа) или 5'-нетранспируемую область (слева) изучаемого гена. Экспрессия гена красного флуоресцентного белка используется в качестве внутреннего стандарта.

меняют гены β-галактозидазы, люцифераз различного происхождения и флуоресцентных белков. При создании репортерной конструкции можно использовать по отдельности элементы изучаемого гена, отвечающие за транскрипцию (промотор) и трансляцию (как правило, 5'-нетранспируемая область). Количество белка-репортера в клетке оценивают, измеряя количество продуктов модельной ферментативной реакции или, в случае флуоресцентных белков, интенсивность флуоресценции. Внутренним контролем служит сходный репортерный ген, экспрессия которого не зависит от регуляторных элементов изучаемого гена. Основная проблема при использовании репортерных конструкций – трудность их получения и детекции экспрессии для множества изучаемых генов. Метод репортерных конструкций чрезвычайно информативен в случае одного или нескольких генов, но чрезвычайно трудоемок при изучении множества, а в идеальном случае – всех генов организма. Этот недостаток можно преодолеть, используя автома-

тизированные методы клонирования репортерных конструкций и определения продуктов их экспрессии. В нашей лаборатории используются возможности автоматизированной станции на основе Janus Extended («Perkin Elmer»), установленной в Центре коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова. Автоматизированная станция позволяет выполнять клонирование, трансформацию бактерий и детекцию экспрессии репортерных генов в автоматическом высокопроизводительном режиме. В качестве репортерных генов используются гены красного флуоресцентного белка из *Entacmaea quadricolor* и синезеленого усовершенствованного варианта белка из *Aequorea macrodactyla* (рис. 4). В отличие от β-галактозидазы и люцифераз *Photinus pyralis* и *Renilla reniformis*, количества флуоресцентных белков можно измерять без разрушения клеток и использования ферментативных реакций. Эти преимущества существенно упрощают и удешевляют анализ экспрессии множества репортерных конструкций в одном эксперименте.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ ГЕНОВ

Изучение функции генов не сводится к изучению их экспрессии. Для понимания функциональной роли продуктов генов необходимо выяснить, с чем взаимодействует продукт гена и к каким последствиям для клетки приводит его отсутствие. Компоненты клетки, взаимодействующие с продуктом изучаемого гена, обычно выявляют с помощью аффинного выделения продукта гена – белка или РНК. Компоненты клетки, выделяющиеся вместе с изучаемым белком или РНК, разделяют и идентифицируют. Для аффинного выделения используют либо антитела к изучаемому белку, либо типовые аффинные довески, присоединяемые к белку с помощью изменения гена этого белка. Подобная процедура не представляет особых трудностей в случае одного или нескольких белков, но становится очень трудоемкой при изучении множества белков. Получение антител к каждому белку клетки пока не представляется возможным, в отличие от высокопроизводительного изменения генов в геноме. Подобного же уровня технологии должны применяться для изучения фенотипа клеток, лишенных одного из белков. Если инактивация гена не летальна, то необходимо получить штамм или линию клеток, лишенных этого гена, т.е. провести «нокаут». Если инактивация гена приводит к нежизнеспособности, то необходимо встроить перед геном искусственно регулируемый промотор, т.е. провести «нокдаун». Для масштабирования этих исследований на всю совокупность генов требуется автоматизировать методы манипуляции с геномом. В настоящее время такие возможности имеются только для бактерий и дрожжей. Уже созданы

обширные коллекции штаммов бактерии *Escherichia coli* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в каждом из которых инактивирован один из генов. Также имеются частичные коллекции штаммов этих организмов, в каждом из которых один из генов содержит область, кодирующую аффинный довесок. Эти коллекции уже позволили провести частичный экспериментальный анализ фенотипов инактивации генов и изучить частичный интерактом клетки, т.е. провести каталогизацию контактов между компонентами клетки.

Сейчас высокоэффективный анализ функциональной роли генов находится на заре своего развития. Даже для модельной бактерии *E. coli* фенотипы всей совокупности штаммов нокаутов анализировали только по скорости образования колоний в различных условиях выращивания. Не создано пока и всеобъемлющей коллекции штаммов, в которых важные для жизнеспособности гены находятся под контролем регулируемых промоторов. В нашей лаборатории с использованием автоматизированной станции на основе Janus Extended («Perkin Elmer»), установленной в Центре коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова, начаты работы по введению тетрациклин-активируемого промотора перед важными для жизнеспособности генами *E. coli*.

Наиболее интересным представляется сочетание высокопроизводительных методов манипуляции с геномами, такими, как создание штаммов, содержащих «нокауты» и «нокдауны» генов, и методов высокопроизводительного анализа экспрессии генов. Подобное сочетание позволит выявить взаимное влияние активности каждого из генов на каждый ген. Заполнение подобной «ма-

трицы взаимовлияний» позволит полностью установить все регуляторные пути клетки. Основная проблема на пути решения этой задачи состоит в необходимости выполнять чрезвычайно большой объем экспериментальной работы, растущий пропорционально квадрату числа генов. Определение «матрицы взаимовлияний» всех генов *E. coli*, например, потребует постановки 17 млн экспериментов. Разумеется, это максимальное число, которое можно уменьшить за счет отсева заведомо незначительных результатов. Системное изучение взаимовлияния генов потребует полной автоматизации и существенного удешевления экспериментов. Так, для анализа экспрессии генов представляется возможным только использование репортерных конструкций на основе флуоресцентных белков, начатое в нашей лаборатории. Этот метод требует значительных вложений на этапе создания репортерных конструкций, но позволяет впоследствии проводить измерения только на основе флуоресценции, без использования каких-либо ферментативных реакций.

Важнейшую задачу постгеномной биологии представляет системный анализ всех стадий экспрессии генов, взаимовлияния экспрессии генов, функциональной роли продуктов генов и взаимодействий между продуктами генов. Созданная таким образом «матрица взаимовлияний» позволит понять функционирование всей сети регуляторных взаимодействий внутри клетки, а в перспективе управлять любыми внутриклеточными механизмами. ●

Автор благодарит
О.А. Донцову за ценные
замечания и комментарии
к тексту статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watson J.D. // *Genome Res.* 2001. V. 11. № 11. P. 1803–1804.
2. Lewin B. *Genes VIII*. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, 2004. 1027 p.
3. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D., Ostell J., Sayers E.W. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39 (Database issue). P. D32–37.
4. Kennedy J., Flemer B., Jackson S.A., Lejon D.P., Morrissey J. P., O'Gara F., Dobson A.D. // *Mar. Drugs.* 2010. V. 8. № 3. P. 608–628.
5. Bork P. // *Genome Res.* 2000. V. 10. № 4. P. 398–400.
6. Crick F.H. // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1958. V. 12. P. 138–163.
7. Ramsay G. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. № 1. P. 40–44.
8. Hoen P.A., Ariyurek Y., Thygesen H.H., Vreugdenhil E., Vossen R.H., de Menezes R.X., Boer J.M., van Ommen G.J., den Dunnen J.T. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 21. P. e141.
9. VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. // *Biotechniques.* 2008. V. 44. № 5. P. 619–626.
10. Mathews M., Sonenberg N., Hershey J.W.B. *Translational control in biology and medicine*. 3rd ed. Cold Spring Harbor monograph ser. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. 934 p.
11. Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M. *Translational control of gene expression*. 2nd ed. Cold Spring Harbor monograph ser. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. 1020 p.
12. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
13. Chakravarti B., Gallagher S.R., Chakravarti D.N. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2005. Chapter 10. P. Unit 10 23.
14. Link A.J. *Methods in molecular biology*. Totowa, N.J.: Humana Press, 1999. V. xvii, 601 p.
15. Brewis I.A., Brennan P. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2010. V. 80. P. 1–44.
16. Chalkley R. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 658. P. 47–60.
17. Treumann A., Thiede B. // *Expert Rev. Proteomics.* 2010. V. 7. № 5. P. 647–653.
18. Ghim C.M., Lee S.K., Takayama S., Mitchell R.J. // *BMB Rep.* 2010. V. 43. № 7. P. 451–460.
19. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
20. Rizzo M.A., Springer G.H., Granada B., Piston D.W. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 4. P. 445–449.
21. Casadaban M.J., Chou J., Cohen S.N. // *J. Bacteriol.* 1980. V. 143. № 2. P. 971–980.
22. Nordeen S.K. // *Biotechniques.* 1988. V. 6. № 5. P. 454–458.
23. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // *Mol. Syst. Biol.* 2006. V. 2. P. 2006–2008.
24. Chu A.M., Davis R.W. // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 416. P. 205–220.
25. Butland G., Peregrin-Alvarez J. M., Li J., Yang W., Yang X., Canadien V., Starostine A., Richards D., Beattie B., Krogan N., et al. // *Nature.* 2005. V. 433. № 7025. P. 531–537.
26. Hu P., Janga S.C., Babu M., Diaz-Mejia J.J., Butland G., Yang W., Pogoutse O., Guo X., Phanse S., Wong P., et al. // *PLoS Biol.* 2009. V. 7. № 4. P. e96.
27. Howson R., Huh W.K., Ghaemmaghami S., Falvo J.V., Bower K., Belle A., Dephoure N., Wykoff D.D., Weissman J.S., O'Shea E.K. // *Comp. Funct. Genomics.* 2005. V. 6. № 1–2. P. 2–16.
28. Nichols R.J., Sen S., Choo Y.J., Beltrao P., Zietek M., Chaba R., Lee S., Kazmierczak K.M., Lee K.J., Wong A., et al. // *Cell.* 2011. V. 144. № 1. P. 143–156.

ОТ РЕДАКЦИИ

Поднятая тема чрезвычайно актуальна. Действительно, в последнее время во многих научных учреждениях появились самые современные, в том числе уникальные, приборы. Это обстоятельство позволяет существенно повысить уровень исследований не только в этих институтах, но, при правильном обеспечении доступа к информации, и в других центрах. Редакция считает своим долгом распространять такую информацию, и эта тема будет продолжена в следующих номерах журнала «Acta Naturae».