

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 578.5:575.224.4

Н.Б. АХМАТУЛЛИНА, Н.П. КАБЫШЕВА

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ НАПРАВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ

(Институт общей генетики и цитологии МОН РК, г. Алматы)

В обзоре обсуждены исторические пути развития задач направленного мутагенеза и подходов к их решению. Показано, что эти задачи возникли первоначально в связи с желанием повысить производительность сельскохозяйственных животных и растений, промышленных микроорганизмов и вирусов. Современные подходы ориентированы на восстановление нарушенных молекулярно-генетических процессов в клетке и определения тем самым, функциональной роли отдельных областей генома. Современные пути получения направленных мутаций оказали влияние на создание генной инженерии белков.

Направленный мутагенез издавна относится к одной из ключевых проблем общей генетики. Разработки подходов к его изучению соответствовали научно-техническим возможностям отдельных периодов развития теоретических и практических разработок мутагенеза в целом. Первоначально попытки выявления направленных мутаций связывались с направленной селекцией и сводились к получению различных животных или сельскохозяйственных культур с заданными свойствами. В этой связи возник огромный интерес к естественному отбору изучаемых объектов по практически полезным свойствам – повышению урожайности, всхожести, устойчивости к природным, климатическим и другим условиям.

С открытием мутагенных факторов начался период активного изучения индуцированных изменений по этим же параметрам. Настал период бурного развития мутационной изменчивости клеток и организмов. Получены доказательства мутагенного потенциала радиационных, химических и биогенных факторов, определены, тем самым, природа мутаций, механизмы их возникновения и становления, проведена классификация мутаций по многим параметрам: природе возникновения (спонтанные и индуцированные), характеру изменения генотипа (генные, хромосомные) и фенотипа (летальные, условно-летальные, не летальные, морфологические, физиологические и др.), молекулярным механизмам возникновения (замена пар оснований, сдвиг рамки считывания), затрагиванию отдельных или нескольких генов (супресорные, полярные, мозаичные, плеiotроп-

ные) и другие. Такие основополагающие данные получены не только в экспериментах на эукариотических организмах и их клетках, но и прокариотах, а также различных вирусах.

Анализ и обсуждение выявленных закономерностей мутагенеза позволили поднять вопросы специфики и направленности мутационных преобразований, которые нашли в дальнейшем применение в изучении проблем управления мутационным процессом. Первые сообщения о достоверных проявлениях мутагенной специфики появились в 1953 г., когда M. Demerec [1] показал, что при обработке *E. coli* MnCl₂ соотношение между ревертантами по лейцину и фенилаланину доходило 50-60, а после УФ-облучения оказывались менее 1. В том же году появилась работа H.G. Kolmark [2], с доказательствами, что при действии бромэтилметансульфата на *Neurospora*, частота мутации от aden⁻ к aden⁺ в 3880 раз превышает переход от inos⁻ к inos⁺. Принято считать, что сам факт высокой частоты повторного возникновения определенной мутации в пределах сайта указывает на строгую детерминированность одностороннего действия индуцирующего фактора.

С другой стороны появились доказательства наличия "горячих" точек, т.е. районов высокой мутабельности отдельных сайтов. Для фага T4 ими оказались районы гII. Исходя из подобного рода данных Н.П. Дубинин [3] допускал возможности узнавания мутагенов определенными системами в виде сайтов внутри генов. Он писал: "... по видимому, проблема специфической системы взаимоотношения группы нуклеотидов, спо-

собной связываться с мутагеном, будет главной в разрешении важнейшей проблемы современной биологии – проблемы направленных мутаций”.

Таким образом, с первых шагов развития направленного мутагенеза обнаруживалась тесная ее связь с мутагенной специфичностью. По выражению Ш. Ауэрбах [4] этот крайне интересный вопрос уже тогда сулил заманчивые возможности. Она пишет: «еще Де Фриз мечтал об индукции направленных мутаций, которые дадут человеку неограниченную власть над природой». Надо полагать, что такие мечтания стали стимулом поисков новых химических мутагенов и создания выдающимся генетиком 20-го столетия Лауреатом Ленинской премии И.А. Рапопортом самостоятельного направления в генетике, известного как химический мутагенез. И.А.Рапопорт постоянно утверждал, что основным инструментом получения направленных мутаций должны служить химические мутагены, представленные широким разнообразием соединений, обладающих собственными механизмами взаимодействия с генетическим материалом [5].

Анализ специфичности действия огромного числа выявленных природных и химически синтезированных мутагенных факторов подтвердил это убеждение. Еще в 60-70-х годах широко обсуждались результаты внедрения в селекционную практику случайных, т.е. не направленных мутаций, индуцированных различными типами химических мутагенов и преимущества отдельных из них относительно к определенным культурам и изменения конкретных признаков. Получены достаточно убедительные доказательства повышения у озимых пшеницы и ржи под влиянием нитроалкилмочевин (НММ, НЭМ, НДММ) урожайности, всхожести, содержания белка в зерне, устойчивости к грибковым заболеваниям и др. [6,7]. Улучшение различных хозяйствственно-ценных признаков с применением этих и других мутагенов получены у гречихи [8], кукурузы [9], бобовых [10], и др. Умелая направленность селекционного процесса в некоторых случаях приводила к получению строго желаемых результатов и даже созданию определенных сортов. Например, М. Р. Козаченко воздействием этиленоксидом на семена позднеспелого ячменя (сорт Унион) вывел высокоурожайный раннеспелый мутантный сорт ярового ячменя (сорт Харьковский 84) [11],

А.М. Борейко [12] - новый сорт зернобобовых растений, отличающийся высокой урожайностью, повышенным содержанием белка, улучшенным аминокислотным составом белков, повышенным иммунитетом. Воздействием ДАБ и НДММ получены сорта тонковолокнистого хлопчатника Бахар-27 и Аз-НИХИ-78 и др. [13, 14].

В эти же годы активно проводились исследования мутационной изменчивости различных микроорганизмов и вирусов. Так, М.Х. Шигаева со своими учениками [15], Ю.Э. Барташевич [16] тщательно анализировали изменчивость под действием основных супермутагенов отдельных свойств нескольких типов актиномицетов, Г.Д. Засухина и др. [17] – вируса клещевого энцефалита, Н.Б. Ахматуллина и др. [18] – некоторых представителей ортомиксовирусов. Эти работы также сопровождались «направленной селекцией», в результате выделены новые мутантные штаммы и созданы различные способы их получения.

Затем проблема направленного мутагенеза привлекла внимание молекулярных генетиков, которые разработали множество подходов к получению соответствующих мутаций с использованием принципов специфической интродукции. Эти подходы нашли дальнейшее развитие в связи с совершенствованием техники рекомбинантной ДНК и позже конкретизированы как методы получения направленных мутаций путем:

- рекомбинации фрагментов ДНК или РНК;
- химической модификации однонитевых участков ДНК;
- введения в геном модифицированных нуклеотидов;
- использования неполностью комплементарных ДНК-матрице или синтетических олигонуклеотидных затравок;
- использования комплементарных полинуклеотидов, несущих алкилирующие группы.

В этой связи направленный мутагенез определяется теперь как внесение специфических изменений в кодирующие последовательности ДНК, приводящие к соответствующим изменениям в аминокислотных последовательностях [19,20]. При этом возможно получение всех типов мутаций – делеционных, инсерционных и точковых.

Конструирование направленных мутаций начинается с создания *in vitro* клонированных сег-

ментов ДНК, пригодных для последующего лигирования с векторной молекулой. Такая рекомбинантная молекула вводится в клетку, где она амплифицируется при репликации.

К настоящему времени достаточно подробно разработаны олигонуклеотид-направленные мутагенезы с использованием: ДНК фага M13, плазмидной ДНК, ПЦР-амплификации, «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров.

Олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием векторов на основе фага M13 был разработан в лаборатории M. Smith, как модификация метода «спасения маркера» [21]. Позже, J. Zoller и M. Smith [22] разработали относительно простой, специфичный и быстрый способ внесения мутаций в любой клонированный ген. Для этого, прежде всего, необходимо было знать точную нуклеотидную последовательность той области ДНК, которая соответствует мРНК-кодону, подлежащему изменению и характер аминокислотных замен. В основе метода лежит использование ДНК фага M13 *E.coli* в качестве вектора. В двухцепочечную репликативную форму фаговой ДНК встраивают чужеродную ДНК с нужным геном. Для этого сначала выделяют одноцепочечную форму вектора (плюс-цепь M13) и смешивают ее с синтетическим олигонуклеотидом, отличающимся лишь одним нуклеотидом. Этот отличающийся, т.е. неспаривающийся, нуклеотид соответствует тому нуклеотиду кодона мРНК, который необходимо изменить. Далее осуществляется довольно кропотливая процедура гибридизации и репликации. Затем полученными двуцепочечными молекулами ДНК фага M13, теперь уже содержащими некомплементарные нуклеотиды, трансформируют клетки *E. coli*. В результате реплицированные фаговые частицы лизируют клетки *E.coli* и образуют в них бляшки. При этом из-за полуконсервативного механизма репликации, половина образуемых фаговых частиц должна содержать ДНК дикого типа, а другая половина – мутантную ДНК со специфической нуклеотидной заменой. Однако, число полученных бляшек, содержащих фаг с мутантным геном, на самом деле не превышало 1-5%. Это определяется при помощи ДНК-гибридизации с использованием в качестве зонда исходный нуклеотид.

При всей привлекательности метод олигонуклеотид-направленного мутагенеза с использова-

нием ДНК фага M13 весьма трудоемкий. В качестве альтернативы разработаны ряд методов с применением плазмидных ДНК, исключающих необходимость переноса изучаемого гена из плазмиды в фаговую ДНК и обратно из фаговой ДНК в плазмиду. Методы основаны на встраивании ДНК в плазмидный вектор, несущий функциональный ген устойчивости к различным антибиотикам. Для этого клетки *E.coli* трансформируют вектором, несущим ДНК-мишень. Трансформантов отбирают по искомой устойчивости или чувствительности. Клетки, несущие мутантный клонированный ген, идентифицируют с помощью гибридизации.

Еще более простым и быстрым методом считается сайт-специфический мутагенез с использованием ПЦР-амплификации [23, 24]. В этом случае ген-мишень встраивают в плазмидный вектор и проводят ПЦР в 4-х прибрюках с добавлением в каждую из них разные праймеры: а) полностью комплементарные одному из участков клонированного гена или прилегающим к нему последовательностям; б) комплементарные к другому участку, но содержащие один некомплементарный нуклеотид и гибридизуемый с разными цепями. В результате происходит замена обоих нуклеотидов данной пары. Объединенные ампликоны денатурируют, ренатурируют и трансформируют в *E. coli*, в которой точковые мутации, встроенные в клонированный ген стабильно поддерживаются в клетках в виде плазмид.

В другом варианте этого метода при ПЦР-амплификации используются «вырожденные» олигонуклеотидные праймеры. Метод полезен в тех случаях, когда неизвестно, какую нуклеотидную замену в клонированном гене нужно произвести, чтобы получить нужный белок. Суть метода сводится к синтезированию олигонуклеотидных праймеров, в одном из сайтов которых находятся разные нуклеотиды. Гетерогенный по одному сайту набор олигонуклеотидных праймеров позволит получить и соответствующий набор мутантных генов-мишней нуклеотидными заменами в специфическом сайте. Таким образом, мутагенез, индуцируемый с использованием «вырожденных» олигонуклеотидных праймеров можно отнести к разряду методов получения измененных генов со случайными мутациями. Известен и другой метод получения случайных мутаций, связанный с использованием ана-

логов нуклеотидов, по которому ген-мишень встраивают в плазмиду поблизости от двух тесно расположенных сайтов рестрикции. Полученные таким образом плазмиды содержат ген-мишень, в одном или нескольких сайтах которого находятся аналог соответствующего нуклеотида. При репликации плазмиды в трансформированной клетке в клонированный ген включается нуклеотид, отличающийся от нуклеотида исходного гена.

Таким образом, при использовании методов случайного мутагенеза можно получить библиотеки клонов, несущих множество мутаций в различных сайтах. Основным недостатком такого подхода является необходимость последующего тестирования каждого клона для идентификации ответственного за синтез нужного белка. Но иногда прохождение этого трудоемкого пути является единственным возможным.

Подходы сайт-направленного мутагенеза оказались применимыми для решения ряда сложных задач и промышленной биотехнологии. Дело в том, что в настоящее время промышленным способом разрабатываются лишь 90% ферментов, необходимых для использования в биотехнологии, например, в пивоварении, получении аминокислот, осветлении соков, получении спирта, инверсии сахарозы, сыроварении и др. Активность остальных не удовлетворяет требованиям высокоспециализированного, промышленного (*in vitro*) процесса. Большинство ферментов быстро денатурируют при высокой температуре и в присутствии органических растворителей. Оказалось, что к значительному повышению стабильности белковой молекулы может привести образование в ней новых дисульфидных связей путем замены аминокислотных остатков [25]. Чем больше таких связей, тем выше оказывается термостабильность [26]. Однако, при замене надо соблюдать условия, чтобы новые связи не мешали нормальному функционированию белка и не потеряли ферментативную активность из-за нарушения конформации фермента. Во избежание этого заменяемые аминокислотные остатки должны располагаться в активном центре и близко друг к другу. Используя такой метод была предпринята попытка получения термостабильной ксиланазы *Vac. Circulans* – фермента, который можно использовать при производстве бумаги [27].

Имеется положительный опыт уменьшения числа свободных сульфогидрильных групп путем замены цистeinовых кодонов на сериновые [28]. Этот метод оказался полезным для получения интерферона в клетках *E.coli*. Такой интерферон (ИФ β ser-17) не уступал по удельной активности аутентичному нативному ИФ β . В случаях с другими ферментами замена аминокислотных остатков приводила к изменению кинетических свойств ферментов, их потребности в металлических кофакторах, специфичности и стабильности.

Особый интерес для нас представляют вопросы направленного мутагенеза у вирусов. Заметим, что развитие исследований этой проблемы также имеет свою историю. Первоначально предусматривалось получение доказательств мутации вирусов при прямом воздействии на различные вирусы мутагенными факторами и изучение закономерностей мутационного процесса. В 60-70-х годах проанализированы действия множества химических мутагенов на вирусы полиомиелита, везикулярного стоматита, гриппа, оспы, некоторых энцефалитов, кори, герпеса, ящура, бешенства и др. Характеристики полученных мутаций приведены в монографиях Ю.З. Гендон и Н.Б. Ахматуллиной [29, 30]. Некоторые из этих «случайных» (ненаправленных) мутаций использовались в дальнейшем в изучениях ряда фундаментальных вопросов современной генетики и вирусологии, а именно организации и функции генома вирусов с составлением их карт [31], механизмов рекомбинации [32], молекулярно-биологических событий в зараженной вирусом клетке [33], путей получения аттенуированных вирусов [34].

Получение у вирусов направленных мутаций с использованием методов, базирующихся на технике сайт-специфического мутагенеза начали развиваться значительно позже. Вначале в качестве объекта служили различные фаги. Так,

T.Volker и др. [35] и W. Borrias [36] индуцировали мутации в специфических генах фага T4 и фХ174, используя клонированные рестрикционные фрагменты, Р.Салганик и др. [37] произвели направленное воздействие на геном фага T7 полиалкилированными РНК, комплементарными к определенному сайту ДНК.

Гусев с соавторами [38] показали возможность получения направленных мутаций воздей-

ствием мутагенами, специфичными к одноцепочечным участкам ДНК фага λ на месте локального расщепления цепи ДНК ферментом РНК-полимеразой.

Первый пример получения сегмент-направленных мутаций у вируса человека был связан с выделением ts-мутантов у вируса герпеса путем одновременного введения в чувствительные клетки животных неповрежденной ДНК вируса и его EcoR1-фрагмента, предварительно обработанного гидроксиламином [39]. При этом обработанный мутагеном фрагмент путем рекомбинации встраивается в вирусный геном.

У вирусов бешенства [40], везикулярного стоматита [41], кори [42], вирусов парагриппа [43], гриппа [44,45,46] и др. эти мутации индуцированы с использованием метода реконструкции *in vitro* РНП-комплекса из клонированных в плазмидах РНК или отдельных генов.

A. Catchpole и др. [47] включением альтернативных пар оснований в разные сегменты вРНК получили аттенуированный вирус гриппа. Z. Ye и др. [48] путем направленной делеции *in vitro* получили измененный белок M1 вируса A/WSN/33, использованный ими для изучения взаимодействия этого белка с РНК и белковыми компонентами РНП при сборке и «разборке» (disassembly) вирусов. P. Palese с сотр. [49] создали рекомбинант включением в его геном синтетического гена нейраминидазы при трансфекции *in vitro* РНП комплексов.

Таким образом, предпринятые к настоящему времени попытки разработать методы получения направленных мутаций у вирусов также связаны со стремлением познать тонкие механизмы молекулярно-генетических процессов в зараженной клетке и определением функциональной роли отдельных областей генома в процессах транскрипции, трансляции и процессинга как РНК, так и белков. Расширение возможностей получения сайт-направленных мутаций должно повысить вероятность создания вирусов с определенными биологическими свойствами.

Принципиально новый подход к получению направленных мутаций у вируса гриппа был разработан Н.Б. Ахматуллиной [50]. Теоретические и экспериментальные предпосылки подхода исходят из признания фрагментарности генома и его функционирования лишь в составе РНП. Суть предлагаемого подхода заключалась в воздей-

ствии различными мутагенными факторами на отдельные гены (т.е. РНП) с последующим получением реассортантного вируса. В таком случае каждый реассортант будет содержать лишь мутированный ген.

Создаваемый на основе этого подхода метод будет отличаться значительной простотой и абсолютной локализованностью мутагенных воздействий, следовательно, и индукцией предполагаемых мутаций. Очевидно, что создание таких мутантов, которые содержат отдельные мутированные фрагменты РНП, позволит раскрыть структурно-функциональные взаимоотношения различных генов и их продуктов для выражения основных свойств вирусов. Ожидается и большая значимость предлагаемого метода для относительно быстрого получения практически полезных, например вакцинных, штаммов вирусов гриппа. Как известно, вакциные препараты, созданные до настоящего времени, отличаются так называемым «антителенным отставанием», связанным с высокой изменчивостью вируса, что исключает универсальность их действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблемы получения направленных или локализованных мутаций развиваются в трех основных направлениях, использующих: различные виды мутагенной специфичности; технику ДНК-гибридизации; прямую селекцию по желаемому, особенно практически или теоретически ценному признаку.

Развитие исследований проблем направленного мутагенеза на фоне возрастающего уровня научно-технического прогресса постепенно обновляло подходы к их получению и привело к разработке ряда новых методов. Среди них особое место занимают различные методы олигонуклеотид-направленного мутагенеза, называемые также сайт-специфическими. Эти методы ориентированы в основном на восстановление нарушений молекулярно-генетических процессов в клетке внесением изменений в определенные последовательности ДНК и установлению, тем самым, функциональной роли отдельных областей генома. Проблемы направленного мутагенеза, связанные с практической их значимостью пока далеки от разрешения. Намеченный прогресс связан с попытками разработки на основе сайт-специфического мутагенеза методов генетической инженерии белков, призванных повы-

шать активность выпускаемых биотехнологической промышленностью ферментов путем повышения стабильности их к условиям производства *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Demerec M. Reaction of genes of *E. coli* to certain mutagens // Symp. Soc. Exp. Biol. 1953. V. 7. P. 43-54.
2. Kolmark H.G. Differential response to mutagens as studied by the Neurospora reverse mutation test. // Hereditas. 1953. V. 39. C. 270-276.
3. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1986. С. 559.
4. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978. С. 480.
5. Рапопорт И.А., Шигаева М.Х., Ахматуллина Н.Б. Химический мутагенез. Проблемы и перспективы // Алматы. Наука, 1980. С. 336.
6. Моргун В.В., Борейко В.С., Шеренговой П.З., Воробьева В.А. Экспериментальный мутагенез в создании форм озимой пшеницы с улучшенными физико-химическими и хлебопекарными качествами // Химический мутагенез в селекционном процессе. М.: Наука, 1987. С. 53-55.
7. Реммель Х., Каск К. Использование химических мутагенов в селекции озимой ржи на зимостойкость. Отбор морозостойких растений // Химический мутагенез в селекционном процессе. М.: Наука, 1987. С. 113-115.
8. Анохина Т.А. Эффективность индуцированного мутагенеза в селекции на урожай у гомостильной гречихи // Химический мутагенез в селекционном процессе. М.: Наука, 1987. С. 119-124.
9. Степанов К.И. О некоторых физиологических изменениях линий кукурузы, вызванных действием мутагенов // Мутационная селекция. М.: Наука, 1968. С. 275.
10. Соболев Н.А. Выделение мутантов у некоторых зернобобовых культур // Мутационная селекция. М.: Наука, 1968. С. 77-83.
11. Козаченко М.Р. Создание с помощью химического мутагенеза нового сорта ярового ячменя Харьковский 84 / Химический мутагенез в селекционном процессе. М.: Наука, 1987. С. 107-109.
12. Борейко А.М. Получение при помощи химических мутагенов новых сортов зернобобовых растений // Химический мутагенез в селекционном процессе. М.: Наука, 1987. С. 126-127.
13. Мамедов К., Шамаева Н.Н., Кульгина И.А. Новый сорт тонковолокнистого хлопчатника – Бахар 27 // Химический мутагенез в селекционном процессе. М.: Наука, 1987. С. 148-151.
14. Махмудов Т.К., Тагиев А.А. Перспективные мутанты хлопчатника, полученные при действии ДАБ и НДММ // Химический мутагенез в селекционном процессе. М.: Наука, 1987. С. 151-154.
15. Шигаева М.Х., Тулемисова К.А. Сравнительное изучение мутагенного действия этиленимина и ультрафиолетовых лучей на *Actinomyces Longisporus* Kras // Специфичность химического мутагенеза. М.: Наука, 1968. С. 156-162.
16. Бартошевич Ю.Э. Специфичность действия этиленимина и диэтилсульфата на прямых мутациях *Actinomyces erythreus* // Специфичность химического мутагенеза. М.: Наука, 1986. С. 109-124.
17. Засухина Г.Д. Генетические исследования арбовирусов (вирусов клещевого энцефалита и западного лошадиного энцефаломиелита) в аспекте индуцированного мутагенеза. Дисс. докт. М. 1967.
18. Ахматуллина Н.Б. Влияние химических мутагенов на репродукцию и изменчивость ортомиксовирусов // Автореф. докт. дисс. Ленинград, 1984.
19. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск. 2008. С. 177-192.
20. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. С. 589.
21. Smith M. In vitro mutagenesis // Ann. Rev. Genet. 1985. V. 19. P.423-462.
22. Zoller M.J., Smith M. Cite-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA // Nucleic Acids Res. 1982. V. 10. P. 6487-6500.
23. Herlitze S., Koenen M. A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction // Gene. 1989. V. 84. P. 143-151.
24. Landt O., Grunert H. P., Hahn U. A general method for rapid cite-directed mutagenesis using polymerase chain reaction // Gene. 1990. V. 96. P. 125-128.
25. Matsumura M., Signor G., Mathews B.W. Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds // Nature. 1989. V.342. P. 291-293.
26. Nosoh Y., Sekiguchi T. Protein engineering for thermostability // Trends Biotechnol. 1990. 8. P. 16-20.
27. Wakarchuk W.W., Sung W.L., Campbell R.L. et al. Thermostabilization of the Bac. Circulans xylanase by the introduction of disulfide bonds // Protein Eng. 1994. V.7. P.1379-1386.
28. Mark D.F., Lu S.D., Creasey A.A., Yamamoto R., Lin L.S. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene // P.N.A.S. 1984. V.81. P.5662-5666.
29. Генден Ю.З. Молекулярная генетика вирусов человека и животных. М.: Медицина, 1975. 303 с.
30. Ахматуллина Н.Б. Генетика вирусов человека и животных. Алматы. Наука, 1990. 210 с.
31. Mackenzie J.S. Isolation of temperature-sensitive mutants and the construction of preliminary genetic map for influenza virus // J. Gen. Virol. 1970. V.6. P.63-74.
32. Hirst G. Mechanism of influenza recombination // Virology. 1973. V.55. P. 81-93.
33. Palese P., Schulman J.L., Ritchey M.B. Influenza virus genes: Characterization and biologic activity // Perspect Virol. 1978. V. 10. P. 57-71.
34. Spring S.B., Maasab H.F., Kendal A.P. et al. Cold adapted variants of influenza virus A. Comparison of genetic properties of the ts mutants and five cold-adapted variants of influenza virus A // Virology. 1977. V.77. P. 337-343.
35. Volker T.A., Showe M.K. Induction of mutations in specific genes of bacteriophage T4 used cloned restriction fragments and marker rescue // Mol. Gen. Genet. 1980. V.70. P.447-452.
36. Borrias W. E., Wilschut I. J., Vereijken J. M. et.al. Induction and isolation of mutants in a specific region of gene A

- of bacteriophage φ X174 // *Virology*. 1976. V. 70. P. 195-197.
37. Салганик Р. И., Дианов Г.Л., Курбатов В.А. и др. Направленное воздействие на геном бактериофага T7 с помощью транскрипта области ранних генов, несущего множественные алкилирующие группы // Докл. АН СССР. 1978. Т. 239. С. 217-220.
38. Гусев В.А., Каргинов В.А., Кравченко В.В. и др. Модификация операторно-промоторного участка ДНК фага лямбда в составе специфического комплекса с РНК-полимеразой *Escherichia coli* // Докл. АН СССР. 1981. Т. 260. С. 753-756.
39. Chu C. T., Parris D. S., Dixon R. A. F. et al. Hydroxylamine mutagenesis of HSV DNA and DNA fragments: Introduction of mutations into selected regions of the viral genome // *Virology*. 1979. V. 98. P. 168-181.
40. Schnell M.J., Mebtasian T., Conzelmann K.K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 4195-4203.
41. Соколов М.И., Мясникова И.А., Смирнова Н.И., Ахматулина Н.Б., Борисова А. Изменчивость вируса везикулярного стоматита при воздействии УФ-радиации. // Вестник АН КазССР. 1976. № 5. С. 15-20.
42. Radeske F.P., Spielhofer P., Schneider H. et al. Rescue of measles virus from cloned DNA // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 5773-5784.
43. Garsin D.N., Pelet T., Calain P. et al. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxoviruses from cloned cDNA: generation of a novel copy-back non-defective interfering virus // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 6087-6094.
44. Enami M., Luytjes W., Krystal M., Palese P. Introduction of site-specific mutations into the genome of Influenza A virus // *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1990. V.87. P.3802-3805.
45. Fodor E., Devenish L., Engelhardt O.G. et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA // *J. Virol.* 1999. V. 73 (11). P. 9679-9682.
46. Subbarao K., Chen H., Swayne D. et al. Evaluation of genetically modified reassortant H5N1 influenza A vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics // *Virology*. 2003. V. 305. P. 192-200.
47. Catchpole A.P., Mingay L.J., Fodor E., Brownlee G.G. Alternative base pairs attenuate influenza A when introduced into the duplex region of conserved viral RNA promoter of either the NS or the PA gene // *J.Gen.Viro.* 2003.V.84. P.507-515.
48. Ye Z., Liu T., Offringa D.P. et al. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 7467-7473.
49. Palese P., Schulman J.L. Differences in RNA patterns of influenza A viruses // *J. Virol.* 1976. V. 17. P. 876-884.
50. Ахматулина Н.Б. К проблеме направленного мутагенеза // Известия НАН РК, серия биологическая и медицинская. 2002. № 5. С. 21-26.

Резюме

Бағытталған мутагенезді зерттеулер жобаларының тарихи даму жолдарына шолу жүргізілген. Бағытталған мутагенез мәселе алдымен ауылшаруашылық дақылдарының, жануарларының, өндірісте колданылатын микроорганизмдер мен вирустардың өнімділігін арттыруды көздей көтерілген. Қазіргі кезде ол торшадағы молекулалық және генетикалық құбылыстардың дүрыс қалыптастырын бақылауға араласады да, геномның ер белгінін бүтән қалай катынасатының анықтауға жол ашады. Бағытталған мутациялардың қазіргі дамыған жолдары беслоктардың гендік инженериясын құруға есерін тигізуде.

Summary

In this review was discussed historical ways of development of tasks of direct mutagenesis and approaches to their solving. It was shown that these tasks were occurred initially in connection with desire to increase productivity of agricultural animals and plants, industrial microorganisms and viruses. Modern approaches directed on recovery of damages of molecular-genetic processes in cell and determining of functional role of some regions of genome. Modern ways of obtaining direct mutations influenced on creating of protein genetic engineering.