

**Пути совершенствования
биообъектов
(селекция, мутагенез,
клеточная и генная
инженерия)**

Методы совершенствования биообъектов:

1. СЕЛЕКЦИЯ

2. МУТАГЕНЕЗ

3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

4. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Селекция и мутагенез

СЕЛЕКЦИЯ И МУТАГЕНЕЗ- СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМА КАК ПРОДУЦЕНТА.

СЕЛЕКЦИОННАЯ РАБОТА С МИКРООРГАНИЗМОМ СОСТОИТ:

1. **В ПОИСКЕ ПРИРОДНЫХ ФОРМ**, КОТОРЫЕ ОБЛАДАЮТ КАКИМИ-ЛИБО ПОЛЕЗНЫМИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА СВОЙСТВАМИ (НАПРИМЕР, СИНТЕЗ БАВ, ВЫСОКАЯ СКОРОСТЬ РОСТА, СПОСОБНОСТЬ УСВАИВАТЬ ДЕШЕВЫЕ СРЕДЫ И ТАК ДАЛЕЕ),
2. **В ДАЛЬНЕЙШЕМ СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ЕГО**,
3. **В СОЗДАНИИ НА ЕГО ОСНОВЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ.**

МЕТОДЫ СОВРЕМЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ -ЭТО ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ, КОГДА МОЖНО ИЗМЕНИТЬ ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ПРОГРАММУ МИКРООРГАНИЗМА.

1. **ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ IN VIVO**
ВКЛЮЧАЕТ
ПОЛУЧЕНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ МУТАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ
ОБМЕНА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ ЖИВЫХ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК.
2. **ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ IN VITRO** ОСНОВАНО НА ПРИМЕНЕНИИ

Мутации – наследственные изменения, резкие скачкообразные изменения последовательности нуклеотидов.

Реверсия- возвращение к исходному генотипу (обратное мутирование).

Ревертанты- мутанты, появившиеся в результате реверсии.

Типы мутаций:

1. Делеция (удаление)- выпадение участков хромосомы или нескольких генов.
2. Дупликация- удвоение генов.
3. Амплификация- увеличение количества отдельных генов или группы генов.
4. Транспозиция- перемещение небольших участков генетического материала в пределах одной хромосомы.
5. Инверсии – изменения чередования генов в хромосоме, вследствие поворота участка хромосомы на 180 градусов.
6. Летальные мутации - это мутации, захватывающие слишком большие участки генома, в результате чего организм погибает.
7. Внутригенные мутации:
 - точечные – изменение последовательности нуклеотидов в пределах одного гена.
 - **транзиция и трансверсия** – выпадение или вставка одного или нескольких оснований, например, **транзиция** – пурин замещается на пурин или пиримидин на пиримидин, **трансверсия** – пурин замещается на пиримидин.

Классификация биообъектов и возможности целевого воздействия на

НИХ

1. Макрообъекты: человек, млекопитающие, рептилии, рыбы, насекомые, растения
2. Микрообъекты:
 - 2.1. Эукариоты – низшие грибы, водоросли (кроме нитчатых)
 - 2.2. Прокариоты – актиномицеты, бактерии, сине-зеленые водоросли.
 - 2.3. Микробиосистемы – ферменты, протопласты.

1.Макрообъекты:

ЧЕЛОВЕК: У НЕГО МОЖНО ВОЗДЕЙСТВОВАТЬ ТОЛЬКО НА ОТДЕЛЬНЫЕ ГЕНЫ, НО ПРОТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА КАК БИООБЪЕКТА В ПЛАНЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

ВОЗРАЖАЕТ ЭТИКА.

ЧЕЛОВЕКА МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ:

1. ДОНОР КРОВИ – НЕОБХОДИМО, ЧТОБЫ ЧЕЛОВЕК БЫЛ ЗДОРОВ, КРОВЬ НЕ ДОЛЖНА БЫТЬ ЗАРАЖЕНА, ПРИ ВЗЯТИИ КРОВИ НЕ ДОЛЖЕН НАРУШАТЬСЯ ГОМЕОСТАЗ.

2. ДОНОР ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ (ПОСЛЕ ЕГО СМЕРТИ). ЧЕЛОВЕК ЯВЛЯЕТСЯ ПРИМЕРОМ ТОГО, КАКИЕ ПРОДУКТЫ МОЖНО ПОЛУЧАТЬ (ИНТЕРФЕРОН, ИНСУЛИН, ГОРМОНЫ ВНУТРЕННЕЙ СЕКРЕЦИИ, РАЗНООБРАЗНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА).

ВОПРОС ЭТИКИ ПРЕПЯТСТВУЕТ
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЧЕЛОВЕКА КАК

1.Макрообъекты:

МЛЕКОПИТАЮЩИЕ: СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК БИООБЪЕКТОВ СОМНИТЕЛЬНО, ХОТЯ В ПРИНЦИПЕ, МОЖНО ДОБИТЬСЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ИНСУЛИНА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗОЙ СВИНЕЙ ИЛИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.

РЕПТИЛИИ: ЯД ЗМЕЙ ЛУЧШЕ СОБИРАТЬ ВЕСНОЙ.

РАСТЕНИЯ: СЕЛЕКЦИЯ И ОТБОР – ЕДИНСТВЕННЫЙ ПУТЬ ИХ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДО НАСТОЯЩЕГО ВРЕМЕНИ. ЧТОБЫ УВЕЛИЧИТЬ ВЫХОД ЦЕЛЕВОГО ПРОДУКТА, СЕГОДНЯ ИСПОЛЬЗУЮТ КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК - ПОЛУЧАЮТ БИОЖЕНЬШЕНЬ, СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ И ДР.

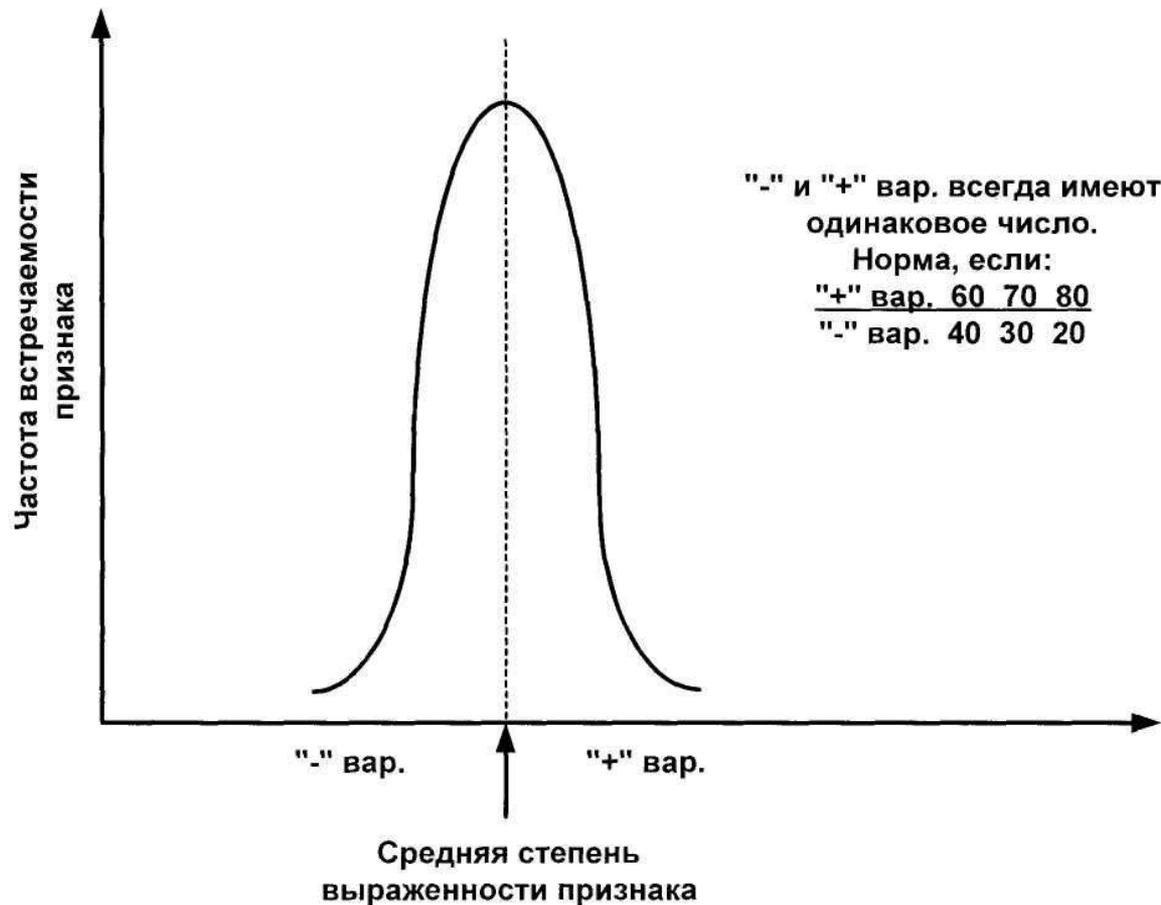
2. Микрообъекты:

ЭУКАРИОТЫ И ПРОКАРИОТЫ: ГЛАВНЫЕ УСПЕХИ ПРИ СЕЛЕКЦИИ И ОТБОРЕ ПОЛУЧЕНЫ У МИКРООРГАНИЗМОВ, Т.К. ОНИ ЛЕГКО РАЗМНОЖАЮТСЯ, ИМЕЮТ БОЛЬШОЕ КОЛИЧЕСТВО МУТАНТОВ И ЛЕГЧЕ ОТБИРАЕТСЯ БИООБЪЕКТ С ИНТЕРЕСУЮЩИМИ БИОТЕХНОЛОГА СВОЙСТВАМИ. МЕТОДОМ ОТБОРА И МУТАГЕНЕЗА БЫЛО ДОСТИГНУТО ПОВЫШЕНИЕ АКТИВНОСТИ У ПРОДУЦЕНТА ПЕНИЦИЛЛИНА С 40-Х ГОДОВ В 100 000 РАЗ, СТРЕПТОМИЦИНА В 20 000 РАЗ.

ТЕ ЖЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛУЧЕНЫ В РАБОТЕ С ПРОДУЦЕНТАМИ ВИТАМИНОВ И АМИНОКИСЛОТ.

Традиционные методы совершенствования- естественный отбор и селекция

Естественный отбор (селекция) Вариационный ряд



Мутации: спонтанные и индуцированные

Спонтанные- неконтролируемые, внезапные или причины которых не установлены.

Индуцированные – под действием мутагенов.

Мутагены: химические и физические

1. Химические мутагены:

- а) нитрозогуанидин – алкилирует основания в репликативной вилке, вызывает мутации по типу трансверсии, транзиции и делеции,
- б) нитрозометилмочевина – вызывает трансверсию
- в) акридиновые красители (акридиновый оранжевый) – вставка другого гена между основаниями
- г) некоторые противоопухолевые антибиотики, которые являются ДНК-тропными агентами.

2. Физические мутагены:

- а) УФ- облучение, при этом образуются димеры пиридиновых оснований, идут мутации по типу транзиции и трансверсии. Изменяется порядок считывания генов на уровне трансляции.
- б) рентгеновское облучение
- в) быстрые нейтроны
- г) гамма-лучи (радиоактивный Со)
- д) ультразвук (Но! при уровнях средней интенсивности ультразвука до 100 мВт/см² (используемых в диагностике) какие-либо существенные изменения в тканях не выявляются)

биотехнологу при совершенствовании

продуцента:

1. Увеличение продуктивности в достижении большого выхода лекарственных веществ на единицу биомассы.
2. Придать продуценту способность использовать менее дефицитные и более дешевые среды.
3. Продуцент не должен ретроингибировать биосинтез конечного продукта.
4. Устойчивость продуцента к вирусным инфекциям (бактериофагам).
5. Нетребовательность к оборудованию, т.е. биосинтез не должен снижаться при несовременной технологии оборудования (например, достижение меньшей вспениваемости культуральной жидкости)
6. Оптимизация свойств продуцента в аспекте медицинской промышленности (продуцент не должен иметь неприятного запаха и т.д.).

ГЛАВНЫЙ ТЕЗИС

БИОТЕХНОЛОГА: УВЕЛИЧЕНИЕ

ВЫХОДА ПРОДУКТА НА

ЕДИНИЦУ БИОМАССЫ

Клеточная инженерия

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ - ЭТО ТЕХНИКА ОБМЕНА ФРАГМЕНТАМИ ДНК, УЧАСТКАМИ ХРОМОСОМ У ПРОКАРИОТ И ЛЮБЫМИ ХРОМОСОМАМИ У ЭУКАРИОТ, НЕЗАВИСИМО ОТ УДАЛЕННОСТИ ОРГАНИЗМОВ В ЭВОЛЮЦИОННОМ ПЛАНЕ.

В СЛУЧАЕ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ НЕТ ВИДОВЫХ И РОДОВЫХ БАРЬЕРОВ, Т.Е. В КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ ОБМЕН ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ МЕЖДУ ОРГАНИЗМАМИ, КОТОРЫЕ В ОБЫЧНЫХ УСЛОВИЯХ НЕ ВСТУПАЮТ В ПОЛОВОЙ ПРОЦЕСС, ЧТО ОТКРЫВАЕТ БОЛЬШИЕ ВОЗМОЖНОСТИ В СОЗДАНИИ БИООБЪЕКТОВ.

В СЛУЧАЕ С КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИЕЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬ ОПЕРИРУЕТ ЦЕЛЫМИ КЛЕТКАМИ.

ТЕХНИКА КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

ТЕХНИКА КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ
ОСНОВАНА НА ТЕХНИКЕ
ПРОТОПЛАСТИРОВАНИЯ.

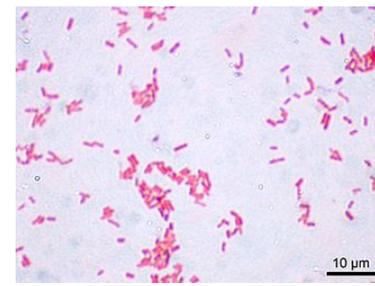
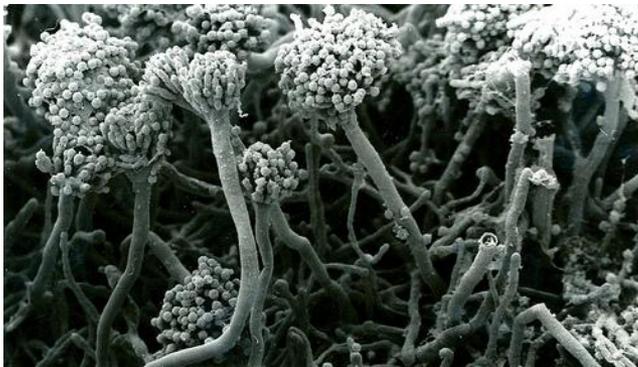
ПРОТОПЛАСТ – ЭТО КЛЕТКА БЕЗ
КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ, ОКРУЖЕННАЯ
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНОЙ.
ПРОТОПЛАСТ ПОЛУЧАЮТ, ОБРАБАТЫВАЯ
КЛЕТКУ ФЕРМЕНТАМИ, КОТОРЫЕ
ГИДРОЛИЗУЮТ ПОЛИМЕРЫ В
КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ.

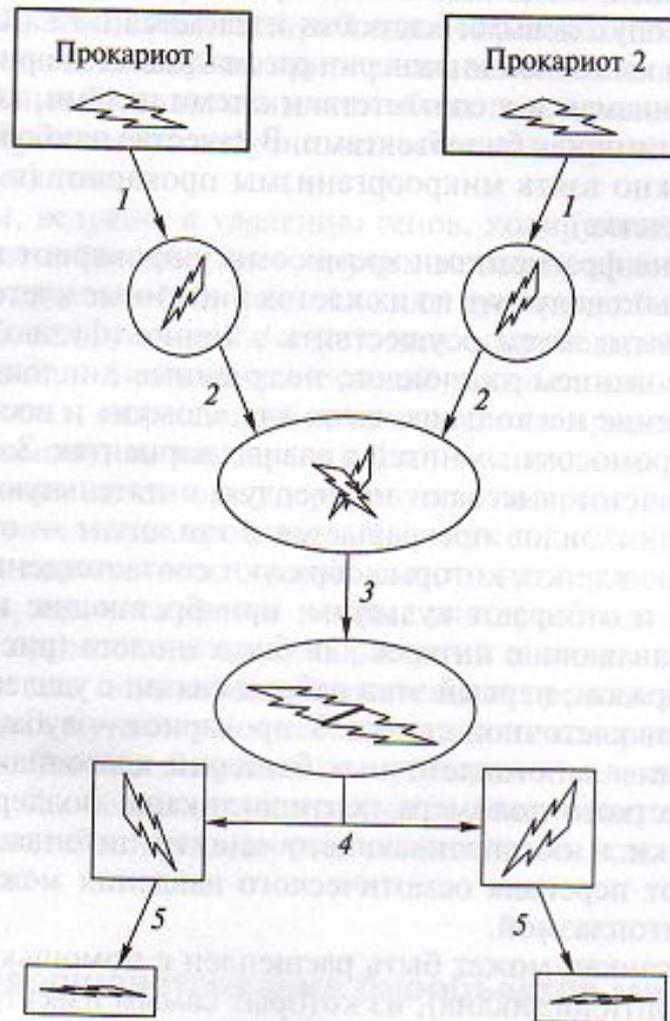
Техника получения гибридных клеток слиянием прокариотов и эукариотов.

Этапы работы:

1. Выбор биообъектов

Берут биообъект, продуцирующий целевой продукт (например, продуцент цефалоспоринов гриб (эукариот) *Acremonium chrysogenum* и с другой стороны биообъект, которому хотят придать свойство продуцировать целевой продукт (например, прокариот *E. coli*).





Формирование протопластов у прокариот:

1 — ферментативная деградация клеточной стенки; 2 — слияние протопластов; 3 — ломка и рекомбинация хромосом, образование диплоидов; 4 — образование гаплоидов с рекомбинантной хромосомой; 5 — регенерация протопластов

Техника получения протопласта

1. Выбор биообъектов.

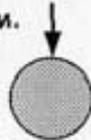


прокариот



эукариот

2. Обработка клеточных стенок ферментами.



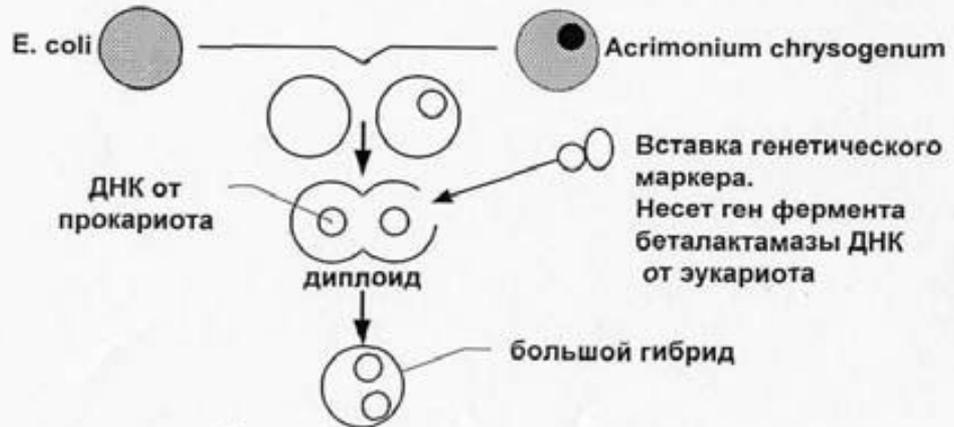
протопласт прокариота



протопласт эукариота

3. Стабилизация протопластов.

4. Слияние протопластов.



5. Регенерация (восстановление стенки протопластов).

6. Хранение гибридов новых продуцентов.

2. Обработка клеточных стенок ферментами.

Прокариоты: лизоцим

Эу (микроскопические грибы): ферментный препарат из пищеварительного тракта виноградной улитки *Helix pomatia*.

3. Стабилизация протопластов

Гипертонический раствор, состоящий из 20%-ных маннита/ сахарозы или 10% р-ра хлорида натрия.

Ионная сила раствора такова, что клетка находится в состоянии тургора, но не лопается, при этом раствором также производится отмывание фермента.

4. Слияние протопластов.

Слияние суспензий протопластов производится в среде ПАВ в полиэтиленгликоле, который нарушает клеточную цитоплазму, и ДНК двух протопластов объединяются. Этот процесс происходит постепенно.

Для облегчения клетке процесса фузии (слияния) клетку необходимо сделать компетентной. Для этого:

1. обрабатывают клетку тяжелыми металлами
2. производят быструю заморозку и оттаивание клеток
3. обрабатывают клетки ферментами.

При слиянии получается протопласт с двумя наборами хромосом – диплоидный набор (при образовании гибрида происходит рекомбинация ДНК).

5. Регенерация (восстановление клеточной стенки протопласта.

Полученный гибрид засевают на плотную питательную среду с необходимыми компонентами для прокариот и эукариот. При этом происходит восстановление клеточной оболочки.

Для того, чтобы отличить гибридную клетку от негибридной, необходимо на уровне 4-ой стадии включить еще один протопласт, несущий маркер. **Маркер** – это участок гена, образующий какой-либо фермент, заявляющий о себе своеобразным путем при высеве на питательную среду. В данном случае маркером является β -лактамаза. В среду добавляют бензилпенициллин и вырастают только те клетки, которые содержат β -лактамазу, расщепляющую его. А так как β -лактамазу содержат только клетки гибриды, то на среде и вырастают только гибриды.

6. Хранение гибридов, новых продуцентов.

инженерии

1-ый метод. Метод перегруппировки генов

Внутри клетки есть определенный набор и последовательность генов. При протопластировании идет перегруппировка генов. Также происходит и активация молчащих генов.

II-ой метод. Слияние или фузия генов.

Прокариот сливают с эукариотом, образуется *рекомбинант*, содержащий кусок одного ДНК и другого ДНК.

III-й метод: Трансформация.

а) клетка с определенным набором генов в ДНК → живой протопласт без

перегруппировки генов → протопласт гибрид-рекомбинант → клетка

б) выделение изолированной ДНК в пробирке - вектор (это фрагмент изолированной ДНК, выделенный из другого микроорганизма (фаг, плаزمиды)

Если есть клетка и изолированная ДНК с нужным геном (вектор, который может быть в виде фага, плазмиды, вируса, космиды

(плазмиды + фаг), то можно выделить вектор в изолированный

При трансформации образуются «+» продуценты с новыми качествами, но в клетке существуют системы репарации (восстановления) молекулы ДНК, и постепенно эти рекомбинанты возвращаются к исходному (дикому) типу. Репарацию преодолевают следующим образом:

1. «+» варианты дополнительно обрабатывают мутагенами для преодоления действия системы репарации;
2. иммобилизация клеток «+» вариантов.

Рисунок 10

Техника клеточной генной инженерии

1 - ый метод: Метод перегруппировки генов.



2 - ой метод: Слияние или фузия генов.



3 - ий метод: Трансформация.



Компетентность

Для того, чтобы прошла трансформация, необходимо сделать клетку

компетентной, т.е. увеличить ее проницаемость. Это достигается

следующим образом:

1. воздействовать на клетку ионами тяжелых металлов (цинк, кобальт, литий, магний)
2. воздействовать на клетку ферментами (лизоцим, комплексный фермент виноградной улитки)
3. быстрое замораживание и оттаивание.

Компетентные клетки легче поглощают вектор, куски ДНК. У них обнажена цитоплазматическая мембрана, которая в некоторых местах выходит на поверхность, и в образующиеся в этих местах “окошечки” легко проникает вектор в виде изолированной ДНК, а также в виде фага, вируса, космиды (космида- изолированная ДНК или плазида+ фаг).

Совершенствование биообъекта методами генной инженерии

Отличие клеточной инженерии от генной инженерии в том, что в генной инженерии имеют дело с изолированными ДНК, с которыми работают in vitro.

Суть технологии: производят соединение фрагментов ДНК in vitro (в пробирке) с последующим введением изолированной ДНК в живую клетку.

Чистая генная инженерия – это техника обмена изолированными фрагментами ДНК. Это происходит с помощью ферментов, которые относятся к эндонуклеазам (например, рестриктазы).

Цель генной инженерии: создание новых продуцентов для выработки новых целевых продуктов (новые лекарственные средства, диагностические и профилактические препараты).

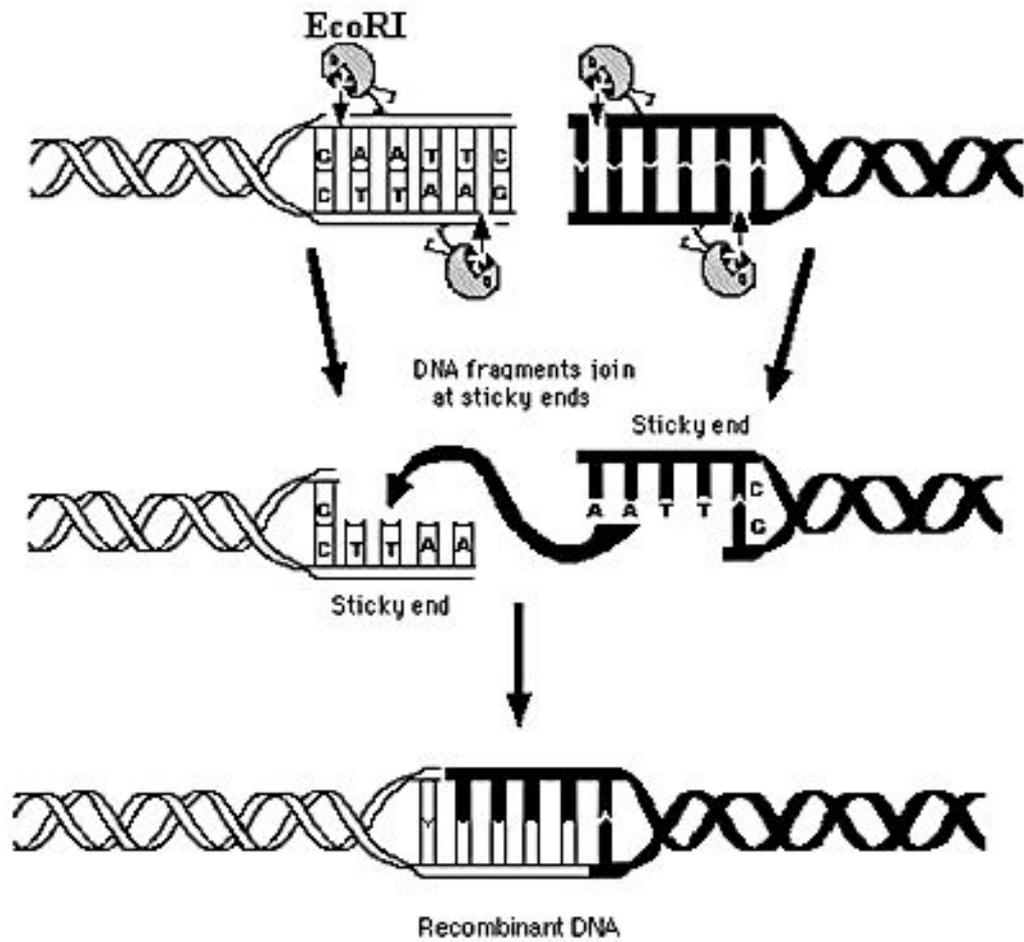
Необходимые условия для осуществления генной инженерии:

1. Нужен такой биообъект, который способен синтезировать чужеродный белок, воспринимать и передавать генетическую информацию.
2. Организм человека не должен отторгать продукт, синтезированный продуцентом.
3. Клетка должна делиться, необходимо, чтобы гены, продуцирующие целевой продукт у клеток, образующихся после деления, экспрессировались (работали).
4. Необходимо иметь транспортное устройство для внесения ДНК в клетку продуцента: вектор в виде плазмид, фага.

Пути введения вектора:

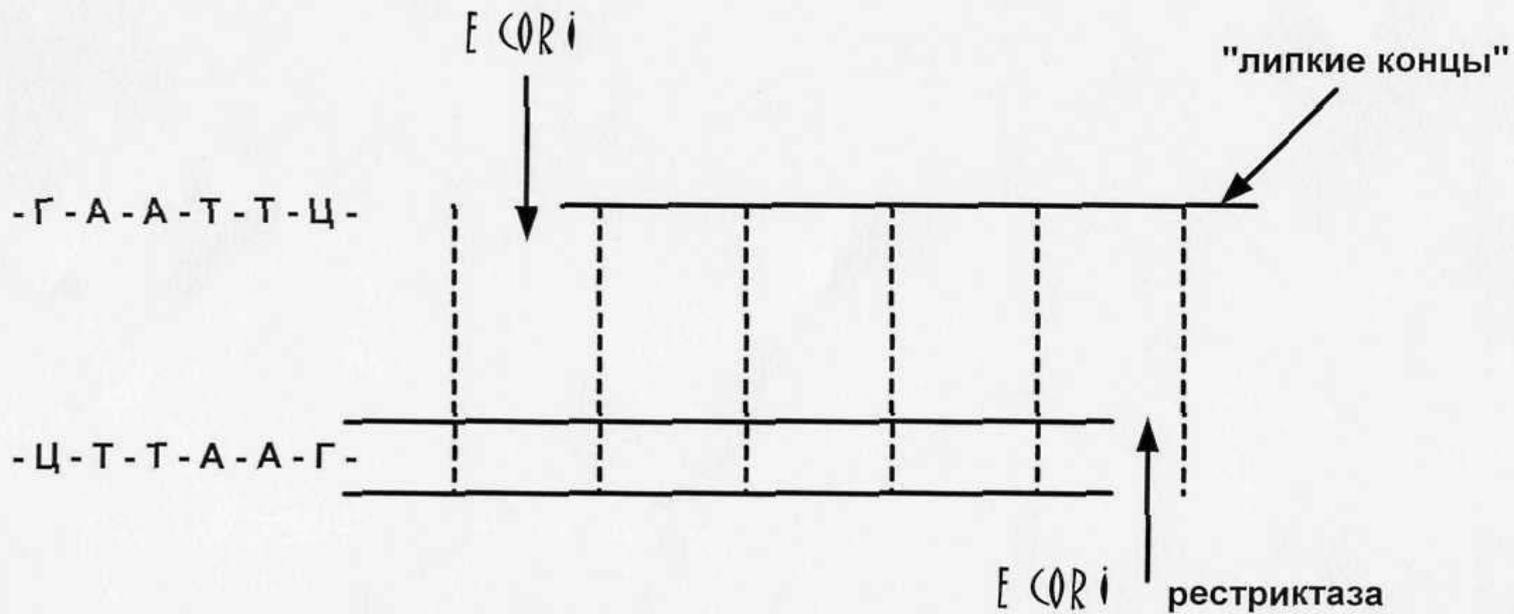
- 1. конъюгация – генетический материал клеток при сближении переходит из одной клетки в другую в виде плазмиды.*
- 2. трансдукция – передача клетке генетического материала через вирус или фаг.*
- 3. трансформация – передача клетке генетического материала изолированной ДНК, в результате чего изменяется геном. Процесс трансформации – перенос генетического материала, при котором фрагмент ДНК, выделенный из клетки донора, поступает в клетку-реципиент.*

В генной инженерии включение нового гена происходит с помощью фермента **рестриктазы**.



Restriction Enzyme Action of EcoRI

Механизм включения нового гена



Техника генноинженерного эксперимента (стадии)

1. Получение ДНК чужеродного фрагмента, который необходимо включить (вклеить) в клетку хозяина. Например, получение ДНК человеческого инсулина.

2. Получение плазмиды из клетки донора

Есть клетка-реципиент (напр. , *E. coli*), из которой мы получаем плазмиды (это элементарная концевая молекула ДНК в 100-1000 раз меньше хромосомы, существует в бактериальных клетках или клетках прокариот, плазмиды несут ограниченное количество генов (не более 30).

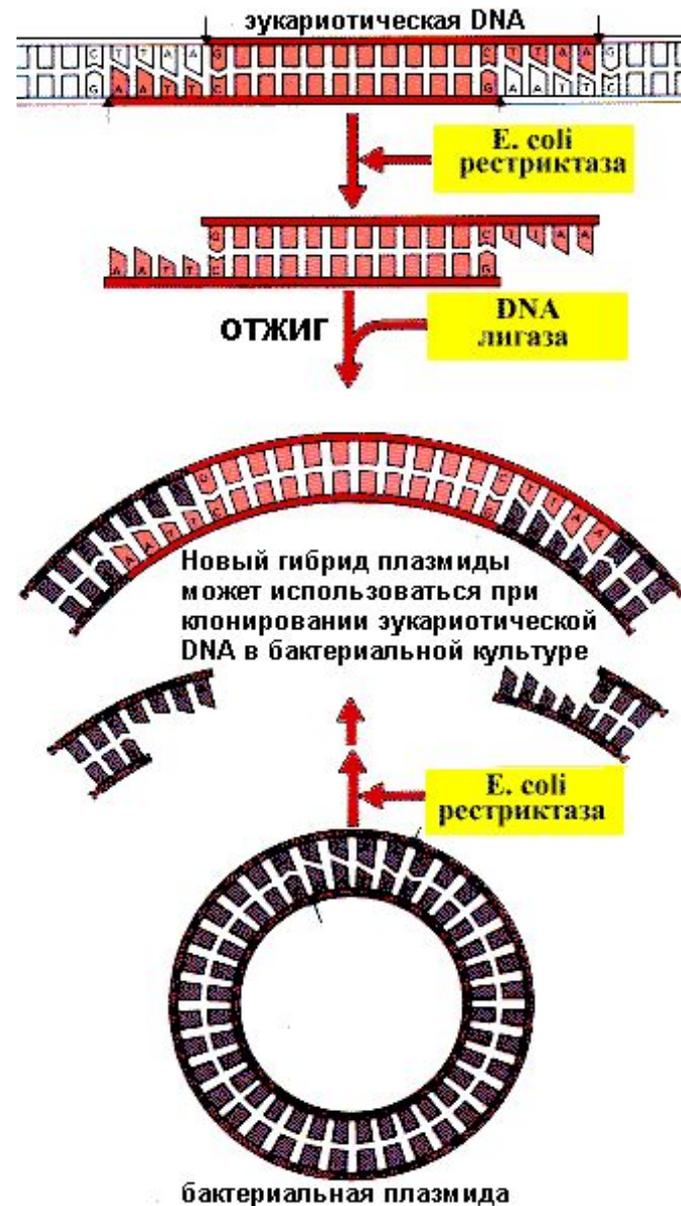
3. Конструирование рекомбинантной плазмиды (вектора)

Вектор – рекомбинант (подготовленная для генно-инженерных манипуляций плаزمида или в виде фага, или в виде изолированной ДНК или вируса) или часть рекомбинантной ДНК, которая обеспечивает проникновение и дальнейшую репликацию этой ДНК в клетке хозяина. Вектор получают с помощью рестриктазы (разрывает фосфодиэфирные связи в строго определенном месте последовательности оснований нуклеотидной цепи)

Большинство методик в генной инженерии включают выделение определенных фрагментов ДНК (DNA) и последующее их соединение с другими фрагментами для получения новых комбинаций генов. Для этих целей используются ферменты, которые специфически разрезают и вновь сшивают молекулы ДНК. Наиболее важной группой ферментов являются **эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)**, катализирующие специфическое расщепление двунитевой ДНК. Известно большое число рестриктаз. Для их обозначения используются сокращенные названия микроорганизмов - продуцентов. Очень часто применяют *EcoRI* — эндонуклеазу, выделенную из *Escherichia coli*. Подобно многим другим рестриктазам, этот фермент расщепляет ДНК по **палиндромной последовательности**, т. е. короткому сегменту ДНК, в котором обе цепи при считывании в направлении 5'→3' имеют одинаковую последовательность. Для *EcoRI* это последовательность **5'-GAATTC-3'**. Гомодимер *EcoRI* расщепляет фосфодиэфирные связи обеих цепей между G и A. Это приводит к образованию комплементарных «липких» концов (AATT), которые удерживаются вместе за счет спаривания оснований. Их, однако, можно легко отделить друг от друга путем небольшого нагревания. При охлаждении липкие концы гибридизуются вновь в правильной ориентации. Места расщепления можно соединить с помощью **ДНК-**

Лигазы

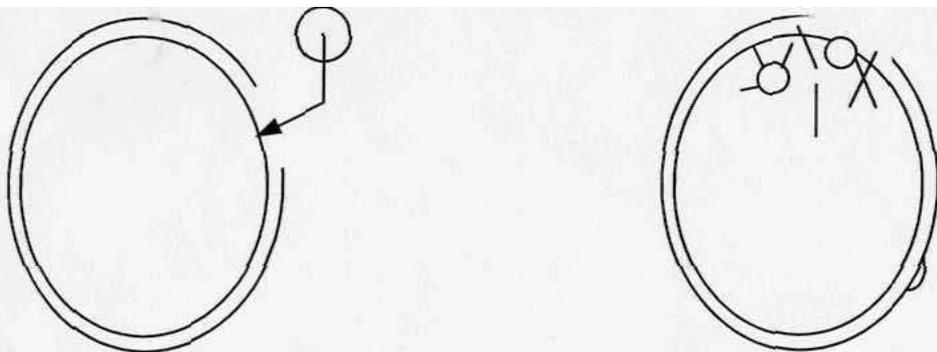
- В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага I показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 году такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.
- Иными словами, ДНК-лигазы сшивают рядом расположенные нуклеотиды, образуя связь между остатками сахаров. ДНК-лигазы абсолютно необходимы в процессах репарации ДНК, в процессах репликации - при удвоении цепи ДНК.
- Существует 2 типа ДНК-лигаз, отличающихся по потребностям в кофакторах и способу действия. ДНК-лигаза *E. coli* в качестве кофактора использует дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага T4 - АТФ в присутствии Mg^{2+} . Лигаза фага T4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с



4. Включение вектора в клетку-реципиент (*E.coli*)

Условием включения вектора в клетку реципиента является то, что цитоплазматическая мембрана ее должна близко подходить к клеточной стенке, когда вектор входит внутрь клетки через окошечки.

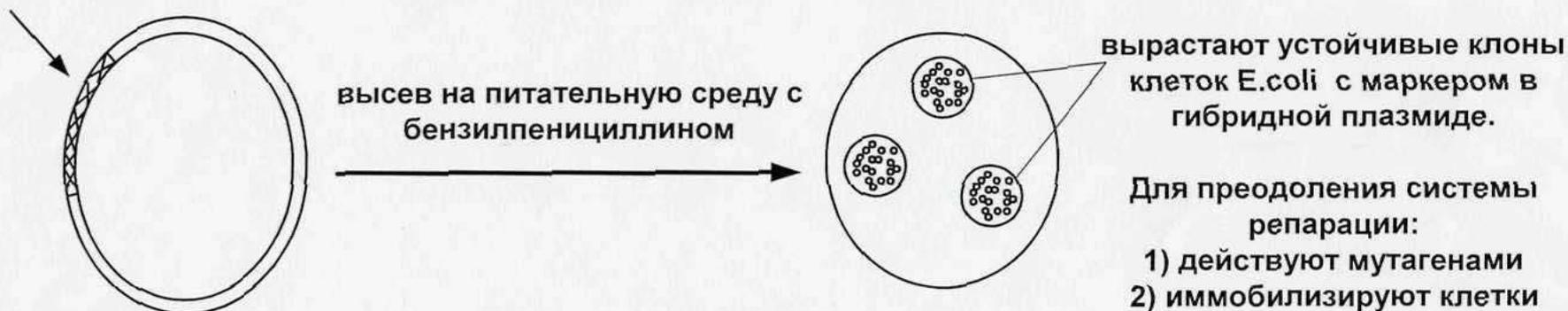
5. Отбор гибридных клонов



Отбор гибридных клонов (идет через ген - маркер)

Ген - маркер (запрограммированное и включенное в плазму свойство).

Например, резистентность к пенициллину (тетрациклину) у прокариот и эукариот.



вырастают устойчивые клоны клеток *E.coli* с маркером в гибридной плазмиде.

Для преодоления системы репарации:

- 1) действуют мутагенами
- 2) иммобилизируют клетки

Ген-маркёр

Также встраивается в вектор, но с помощью другой рестриктазы. Он не имеет значения для биотехнологического процесса, но нужен для отбора продуцента целевого продукта, поскольку векторы воспринимают лишь 0,01-0,1% клеток, т.е. необходимо проверить огромное количество культур, чтобы обнаружить культуру, синтезирующую целевой продукт.

Пример гена-маркёра - ген, кодирующий фермент бета-лактамазу. Клетки *E.coli*, используемые при производстве белков человека генно-инженерным путём, проверяют на проникновение в них вектора с двумя генами - "рабочим" маркёром, затем их высевают на плотную питательную среду с ампициллином (антибиотиком широкого спектра действия). Исходная культура *E.coli* чувствительна к ампициллину, и её появление на среде в виде выросшей колонии означает, что ампициллин был разрушен бета-лактамазой. Этот фермент может кодироваться только геном, находящимся в векторе, т.к. в исходных клетках такого гена нет. Это означает, что в вектор, помимо гена-маркёра был включен и ген, кодирующий целевой продукт.