РАЗВИТИЕ РАБОТ ПО РАЗРАБОТКЕ ЭЛЕКТРОННОЙ КОЛЛЕКЦИИ И БАЗЕ ДАННЫХ «BIOLUMBASE»

Бояндин А.Н., Медведева С.Е., Котов Д.А., Ланкин Ю.П., Попова Л.Ю.
Институт биофизики СО РАН, Красноярск

Бояндин А.Н.
Медведева С.Е.
Котов Д.А.
Ланкин Ю.П.
Попова Л.Ю.
Институт биофизики СО РАН

Развитие и расширение электронной коллекции светящихся микроорганизмов «BiolumBase», с включением в нее более широкого спектра сведений прикладного характера будет способствовать решению широкого круга задач биологии, медицины, экологии и биотехнологии, в которых используются трансгенные микроорганизмы, несущие lux-гены в различных конструкциях. Предусмотрена разработка программных средств, обеспечивающих доступ к базе данных через сеть Интернет, обработку запросов пользователей, включающих поиск и сортировку имеющейся информации. Работа пользователей с имеющимися данными будет осуществляться с использованием стандартных Интернет-обозревателей (таких, как Internet Explorer). Дорабатываются прикладные программы, предназначенные для наполнения таблиц и функционирования информационной системы. Будет значительно увеличен объем содержащейся в базе данных информации, в том числе количество цитируемых научных публикаций, касающихся фундаментальных и прикладных исследований, проводимых с использованием природных и трансгенных микроорганизмов с клонированными биолюминесцентными системами, а также применения таких микроорганизмов для практических нужд.

Актуальность «BiolumBase» определяется широкими возможностями использования светящихся трансгенных микроорганизмов как для фундаментальных исследований, так и для прикладных целей. К настоящему времени в мире накоплены сотни трансгенных микроорганизмов с клонированными в различных конструкциях биолюминесцентными системами светящихся природных организмов. Биолюминесценция в видимой области спектра – уникальное природное явление. Оно характерно для живых организмов, встречающихся на различных ветвях эволюционного древа; при этом подавляющее большинство светящихся организмов обитает в водных экосистемах. Однако использование в практических целях находят не столько природные светящиеся организмы, сколько несветящиеся организмы, в которых клонируют репортерные биолюминесцентные системы. Это обусловлено многими причинами. Одна из них связана с хорошей изученностью физиолого-биохимических характеристик и структуры генома традиционных объектов генетики, молекулярной биологии и биотехнологии, таких как *Escherichia coli*, бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*. Следующий момент связан с тем, что для использования нативных морских светящихся бактерий необходим специфический состав среды с определенным уровнем солености, в противном случае биолюминесценция будет слабой. Это ограничивает их использование для тестирования пресных вод и других объектов. Привлекательной в клонировании lux-генов в несветящихся микроорганизмах является возможность использования различных промоторов, при индукции или ингибировании которых будет увеличиваться или уменьшаться продукция клонированных генов, регистрируемая прибором по изменению интенсивности люминесценции. Без выделения ферментов или других белков может быть изучена регуляция работы того или иного оперона, что важно как для решения фундаментальных задач биологии, так и для расширения сфер использования биолюминесценции в биотестировании и в биомониторинге. Представляя собой безопасную ферментную систему, продуцирующую свет в видимой области спектра, в результате окислительно-восстановительной реакции, биолюминесцентные опероны находят все большее применение. Основные направления использования связаны с экологией (мониторинг клеток микроорганизмов в окружающей среде, оценка концентраций веществ-загрязнителей), здравоохранением (слежение за патогенами в подопытных животных в процессе лечения), молекулярной биологией (для изучения регуляции работы бактериальных оперонов), аналитической химией и биохимией для создания различных направленных биотестов. Один из аспектов применения биолюминесцентных систем связан с изучением сохранения и распространения в

различных условиях рекомбинантных ДНК. Рекомбинантные ДНК широко используются в современной биотехнологии, что потенциально является фактором, угрожающим естественному генетическому фонду. В связи с этим одна из актуальных задач микробной экологии заключается в оценке степени риска случайной или эффективности целенаправленной интродукции ТМ в природные экосистемы. Во всем мире идет поиск экспериментальных моделей, позволяющих достоверно оценивать эффективность экспрессии рекомбинантных ДНК в процессе их использования, и отслеживать их судьбу в результате попадания в условия, где их распространение нежелательно. Гены lux-оперонов, клонированные в несветящихся микроорганизмах хорошо зарекомендовали себя в качестве модельных систем для изучения последствий случайной или целенаправленной интродукции трансгенных микроорганизмов в окружающую среду. Результаты мониторинга ТМ по биолюминесцентному сигналу подтверждаются более сложными методами молекулярной биологии. В связи с развитием генно-инженерных технологий, активно исследуется возможность использования клонированных lux-оперонов или их фрагментов для прогнозирования стабильности экспрессии чужеродных генов в различных условиях существования организма-хозяина. Такие маркерные системы созданы для большого количества микроорганизмов, а также для высших организмов и растений (рис.1).

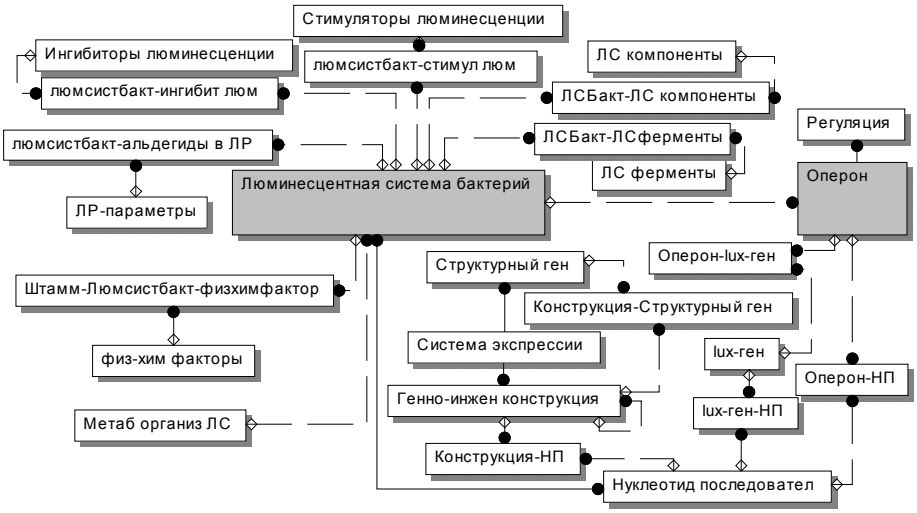

Рис.1. Центральный блок «BiolumBase» для описания биолюминесцентных систем в природных и трансгенных микроорганизмах и возможностей их прикладного использования

Однако, несмотря на огромный объем в мире информации такого рода, эти сведения крайне разобщены и рассредоточены по различным источникам. Их систематизация впервые в мире была осуществлена именно в электронной коллекции «BiolumBase». Очевидно, что дальнейшая систематизация сведений о свойствах светящихся природных и трансгенных микроорганизмов должна проводиться при обеспечении свободного доступа к базе данных всех заинтересованных специалистов. База данных «BiolumBase» уже сейчас может быть использована при поиске культур природных и трансгенных светящихся бактерий для фундаментальных исследований в различных областях биологии. Однако, для успешного их использования в решении различных прикладных задач необходима модернизация существующей БД с учетом внесения дополнительных сведений по имеющемуся опыту использования светящихся трансгенных микроорганизмов. В сети Интернет нет баз данных, отражающих возможности применения биолюминесцентных систем в фундаментальных исследованиях и различных технологиях. Информационная система разрабатывается в технологии Клиент/Сервер, как наиболее перспективной для проектов такого масштаба. В качестве сервера базы данных в настоящее время используется Sybase Adaptive

Server Anywhere. В дальнейшем планируется использование Microsoft SQL Server под управлением операционной системы Microsoft Windows 2000 Server. Этот сервер значительно более надежен при работе с большими объемами информации, а также более функционален и удобен в администрировании. Доработка и модернизация существующего клиентского программного обеспечения, предназначенного для внесения и правки содержащейся в базе данных информации, будет проводиться с использованием системы программирования Borland C++ Builder 6.0. Проектирование системы и модификация структуры базы данных осуществляются с помощью CASE - средства Computer Associates ERwin 4.0. В качестве web-сервера будет использован Internet Information Server (IIS), работающий под управлением Windows 2000 Server. Планируется использовать технологию ASP (Active Server Pages), встроенную в IIS, для динамического отображения информации по запросам внешних пользователей. SQL-сервер и web-сервер будут располагаться на отдельных компьютерах, находящихся в Институте биофизики СО РАН, причем в целях безопасности только web-сервер будет иметь прямое подключение к сети Интернет. Взаимодействие SQL-сервера и web-сервера будет осуществляться через локальную сеть. Интерфейсные гипертекстовые (HTML) страницы будут включать специальные электронные формы для формирования запросов пользователя к базе данных; результаты обработки таких запросов будут динамически отображаться на web-страницах, генерируемых программным обеспечением сервера. Средства проектирования и разработки информационной системы позволят выполнять работу в соответствии со стандартами ISO 9000. Используемые технологии позволят организовать надежную защиту содержащейся в базе данных информации и ее доступность через сеть Интернет.

Аналогичные проекты баз данных созданы для отдельных групп микроорганизмов (BSD, http://bsd.cme.msu.edu; http://biocyc.org/) и даже видов, например, E.coli K-12 - EcoCyc Database, которые отражают информацию по объектам. Однако в рамках этих баз данных не рассматриваются трансгенные штаммы с клонированными lux-генами. Достаточно подробно представлены в Gene Bank описания нуклеотидных последовательностей биолюминесцентных оперонов из типовых видов светящихся бактерий. Полностью типовые виды светящихся бактерий представлены в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC, http://www.atcc.org,), в Национальной Коллекции Промышленных и Морских микроорганизмов (http://www.ukncc.co.uk) и частично во Всероссийской Коллекции микроорганизмов (ВКМ, ИБФМ РАН, Пущино). Трансгенные микроорганизмы с маркерными генами биолюминесценции наиболее полно описаны в коллекции DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany, http://www.dsmz.de).

Работа подержана грантом РФФИ № 04-05-64188, Лаврентьевским молодежным грантом СО РАН № 75 и грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых № МК-3562.2004.4.