

Генная инженерия

Лекция3. Типы молекулярных векторов (бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. ШАРИПОВА

Векторы на основе плазмид

Регион для клонирования с уникальными сайтами рестрикции



Достоинства:

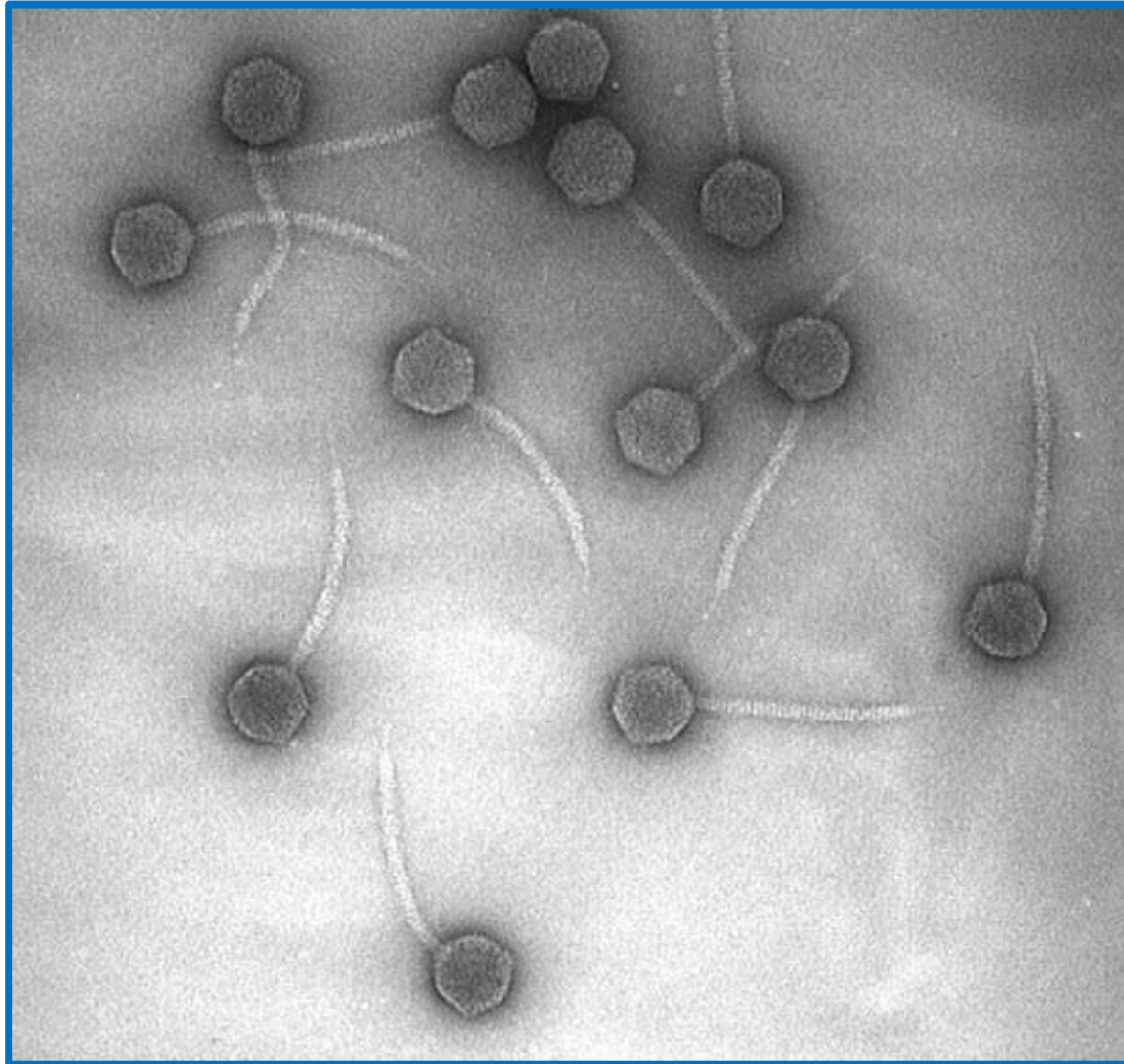
- 1) Автономная репликация
- 2) Небольшой размер
- 3) Наличие уникальных сайтов рестрикции для молекулярного клонирования
- 4) Наличие селективного маркера

Недостатки: с помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК размером до 10 кб
С увеличением размера вставки вектор элиминирует при пассировании

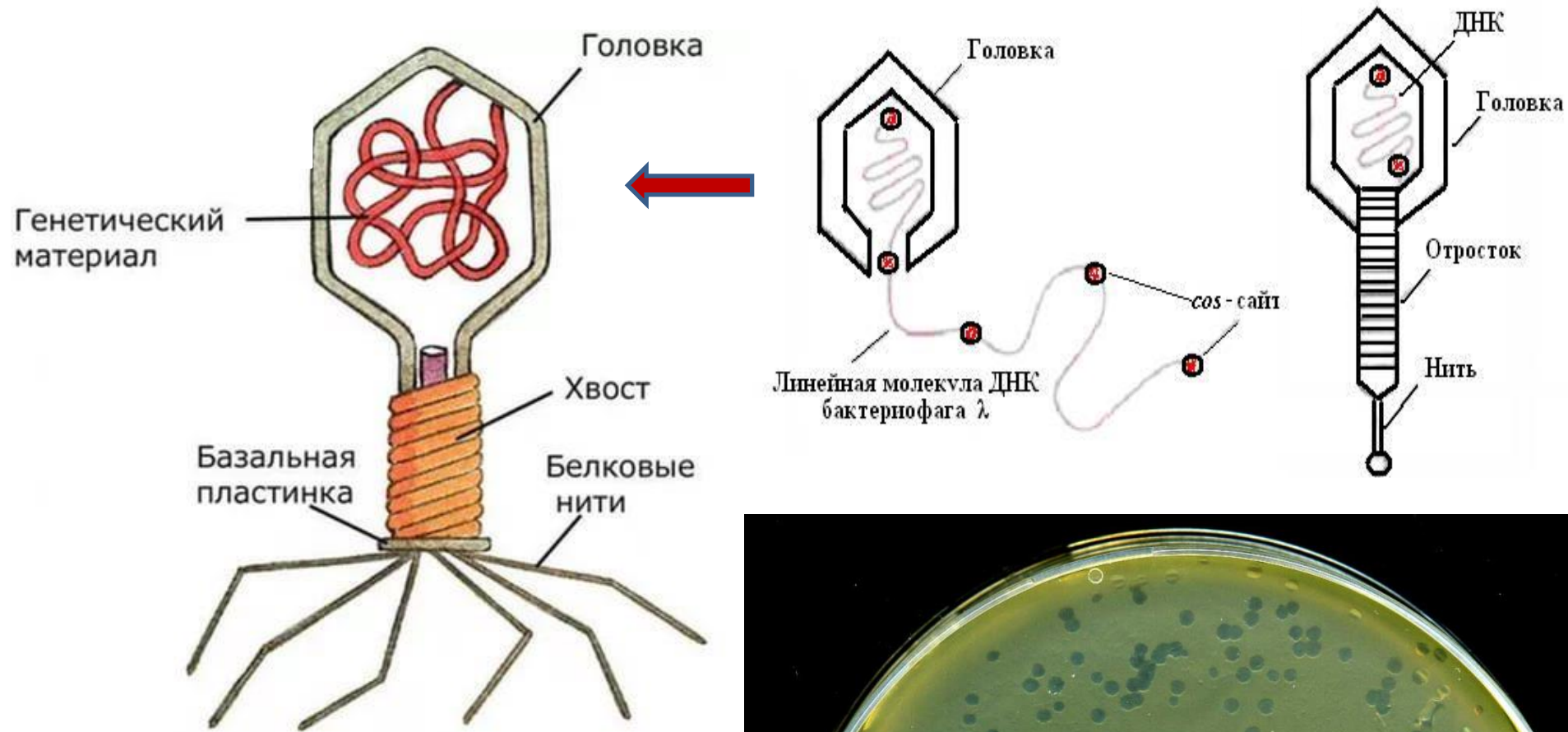
Векторы на основе фага лямбда

- Векторы на основе бактериофага лямбда *E. coli* созданы для геномных библиотек
- Проникновение бактериофага в клетку приводит:
 - К литическому циклу развития - фаг размножается и через 20 мин лизирует клетку с высвобождением 100 новых фаговых частиц
 - При альтернативном варианте ДНК фага включается в хромосому *E. coli* как профаг (состояние лизогении)
 - В определенных условиях интегрированная фаговая ДНК высвобождается и запускается литический цикл развития

Бактериофаг лямбда



Самосборка бактериофага лямбда (головка, отросток и ДНК)

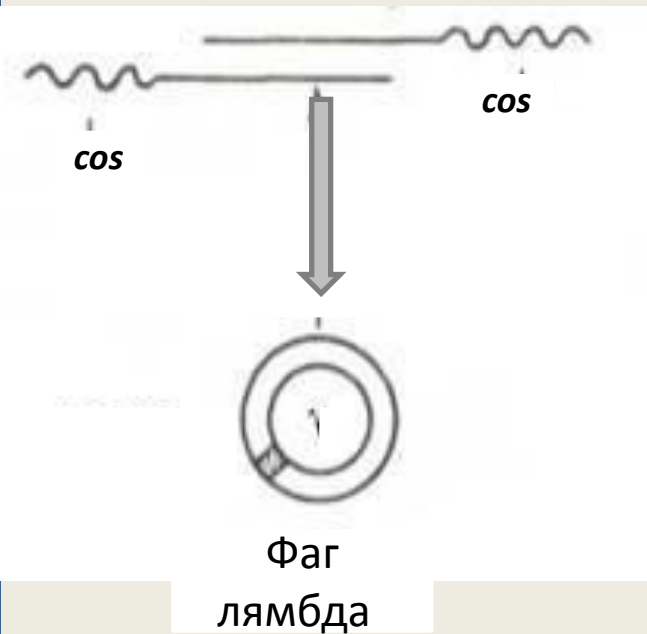


Самосборка зрелых фаговых вирионов происходит в цитоплазме



ДНК бактериофага лямбда

- ДНК фага лямбда - линейная дц ДНК (48502 п.о.) с оц 5'-концами из 12 нуклеотидов (cos-сайты)



В зрелых вирионах ДНК находится в форме линейной молекулы

В клетке ДНК циклизуется по cos-сайтам и функционирует в кольцевой форме

Фаговая ДНК упаковывается в головки в цитоплазме

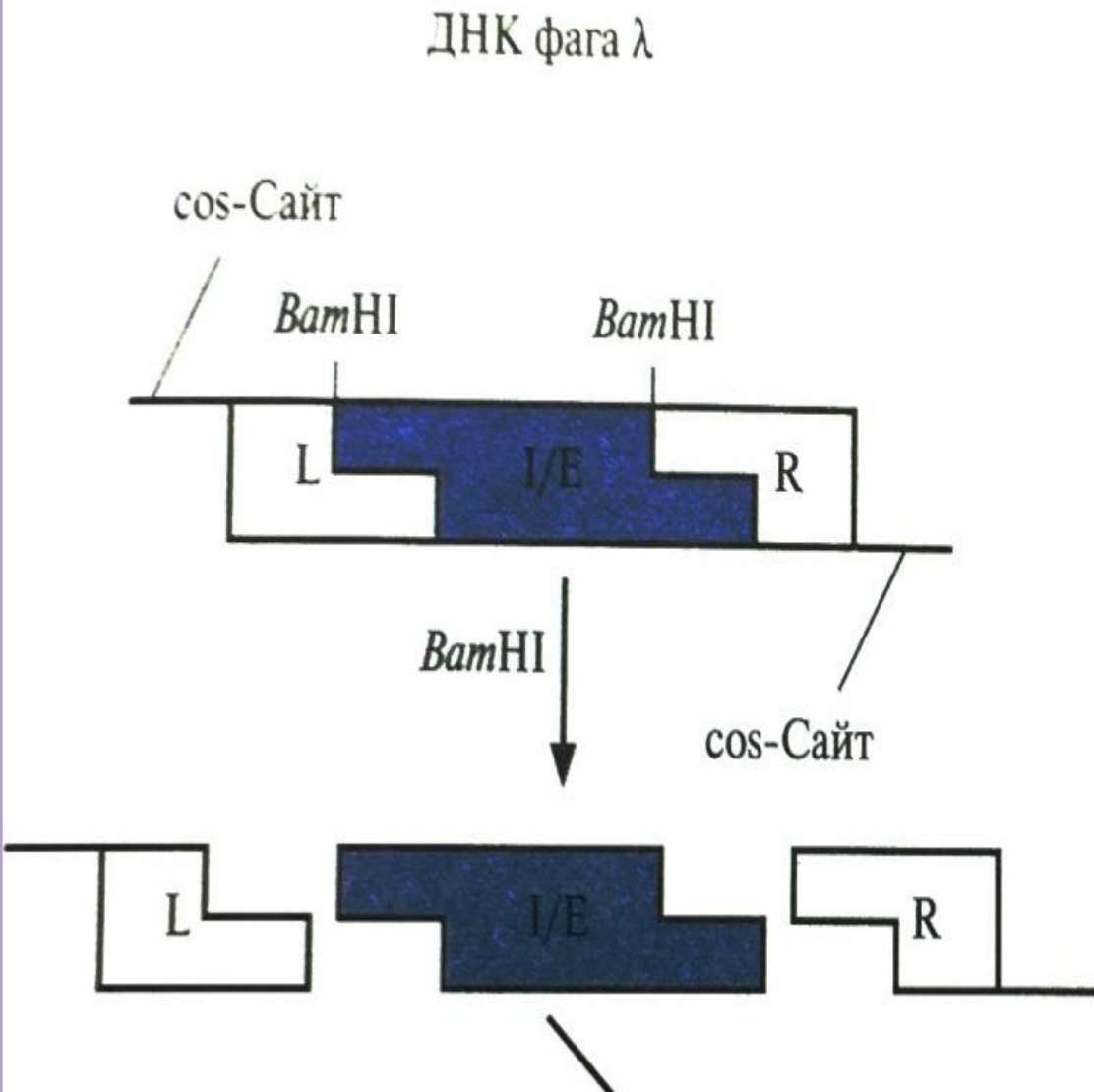
- **Упаковочная реакция лежит в основе клонирования : смешав в пробирке пустые головки, рекомбинантную ДНК и отростки можно получить зрелые фаговые частицы**

Геном фага лямбда



- ДНК фага составляет 50 т. п. н.: из нее фрагмент 20 т. п. н. (заштрихован) отвечает за встраивание в хозяйскую ДНК и несущественен для размножения фага
- Этот фрагмент меняют на гетерологичную ДНК
- Рекомбинантная молекула реплицирует в клетке как ДНК фага лямбда по литическому пути развития

ДНК фага лямбда имеет два BamHI-сайта, фланкирующих участок размером около 20 кб

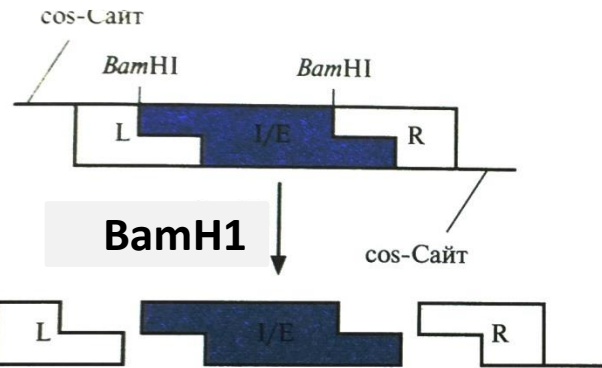


При гидролизе фаговой ДНК рестриктазой *Bam*HI образуются три фрагмента:

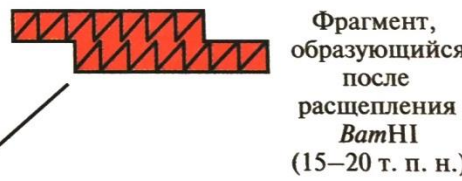
- L-левое плечо (информация о **головке** и **отростке** фага лямбда)
- R-правое плечо (информация о **репликации фаговой ДНК** и **лизисе** клетки)
- Средний сегмент замещается чужеродной ДНК

Векторная ДНК фага лямбда

ДНК для клонирования

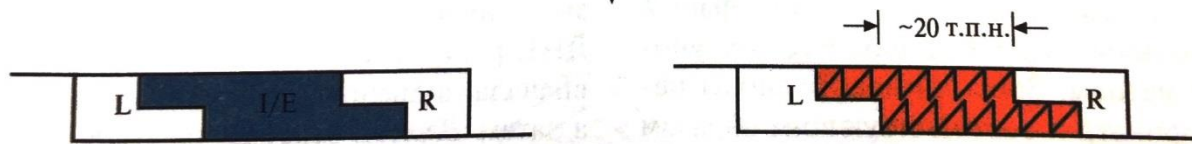


BamHI



Фрагмент, образующийся после расщепления BamHI (15-20 т. п. н.)

ДНК-лигаза



упаковка

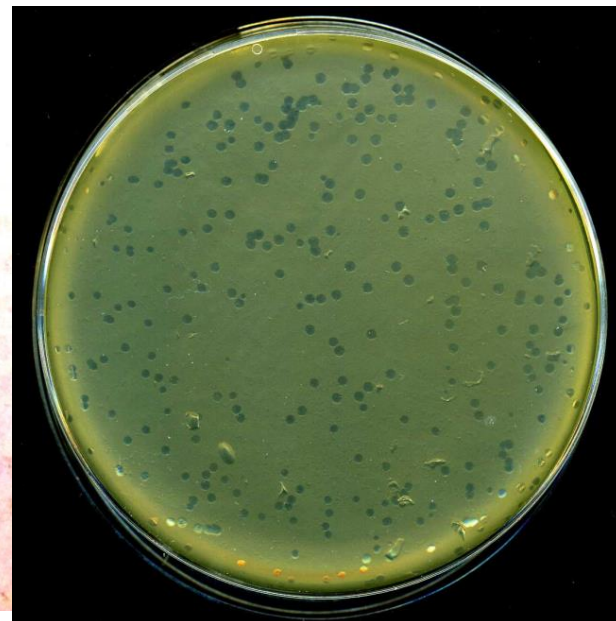
Трансформация *E. coli*-P2

Бляшки не образуются

Бляшки образуются

Схема клонирования в фаг лямбда

В основе клонирования лежит упаковочная реакция: смешав в пробирке пустые головки, рекомбинантную ДНК и отростки можно получить зрелые фаговые частицы



Клонирование в ДНК фага лямбда

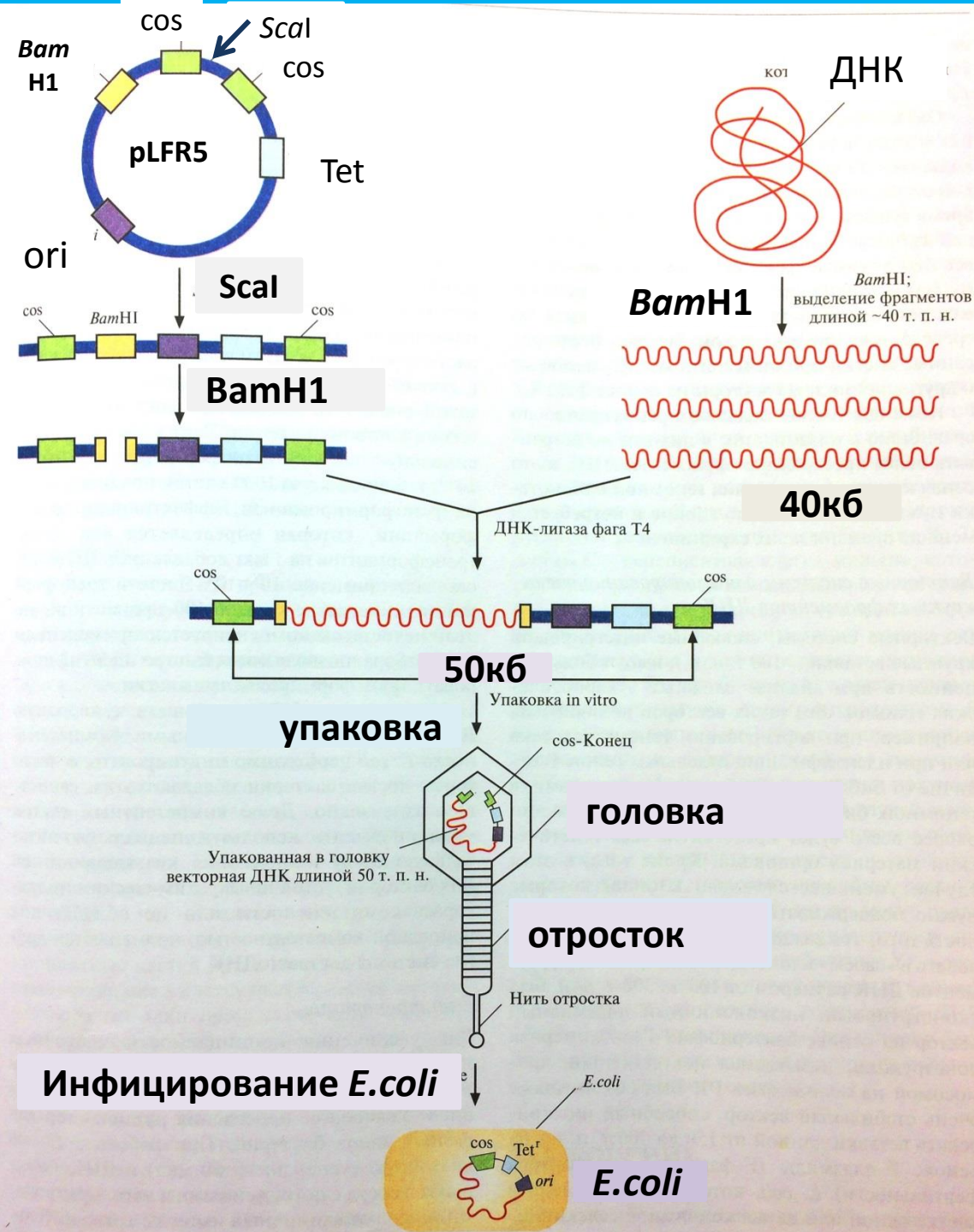
- ДНК для клонирования расщепляют рестриктазой BamHI, и отбирают фрагменты размером до 20 кб
- Фаговую и чужеродную ДНК смешивают в одной пробирке и обрабатывают ДНК-лигазой. Лигированная смесь содержит разные комбинации ДНК: ДНК фага лямбда и рекомбинантную ДНК
- Молекулы ДНК *in vitro* смешивают с головками и отростками фага лямбда: **происходит самосборка зрелых фаговых вирионов.**
- ***В фаговые головки упаковываются фрагменты около 50 кб, больше 52 кб не уместятся в головку, ДНК менее 38 кб после упаковки дают не инфицирующие фаговые частицы***
- Отбор рекомбинантных фагов: ими инфицируют клетки *E. coli*, в хромосому которых интегрирован фаг P2
- Клетки *E. coli*-P2 приобретают иммунитет на бактериофаги, способные к интеграции в хромосому: полноценные фаги не включаются в клетки, а рекомбинантные фаги с deletированной областью интеграции - включаются

Преимущества клонирования на фаге лямбда

- Можно клонировать до 20 кб чужеродной ДНК
- Эффективность внедрения фагов составляет 100% (при трансформации - 10^{-4})
- Идеально подходит для клонирования токсичных продуктов, их трудно клонировать на плазмиде. Хозяйские клетки быстро лизируют и токсичность для их жизнедеятельности не актуальна.
- Эти векторы являются эффективными векторами экспрессии, так как имеют сильные промоторы

Космиды

- **Космиды** – это плазмиды с *cos*-сайтами фага лямбда, обладают свойствами плазмидных векторов и векторов на основе фага лямбда
- **Космиды** могут нести до 40 кб чужеродной ДНК и реплицироваться в клетках *E. coli* как плаزمида
- Ген устойчивости к антибиотику обеспечивает рост бактерий на селективной среде
- С помощью *cos*-сайтов космиды могут быть упакованы в лямбда вирион. Фаговые частицы обеспечивают проникновение гибридной ДНК в клетку, происходит замыкание ДНК в кольцо по *cos*-сайтам и ее репликация по плазмидному типу.



1. Космида pLFR-5 (6 кб) имеет два cos-сайта, разделенных сайтом рестрикции
2. ДНК для клонирования гидролизуют **BamHI** и фракционируют фрагменты по **40 кб**
3. Космиду обрабатывают рестриктазой **Scal** с образованием линейной молекулы ДНК и затем рестриктазой **BamHI**
4. Препараты чужеродной и векторной ДНК смешивают и лигируют
5. Продукты лигирования содержат **40 кб** вставку чужеродной ДНК, имеют суммарную ДНК размером 50 кб и способны упаковываться *in vitro* в головки фага лямбда
6. Фаговый фермент узнает **cos**-последовательности ДНК и катализирует упаковочную реакцию

Преимущества космидных векторов

- В космидный вектор можно встраивать **до 40 кб**
- ДНК космидного вектора способна **эффективно доставлять** рекомбинантную ДНК с помощью фага лямбда
- Удобны для создания **геномной библиотеки** нужно меньшее число клонов и потребуется меньше времени на их скрининг

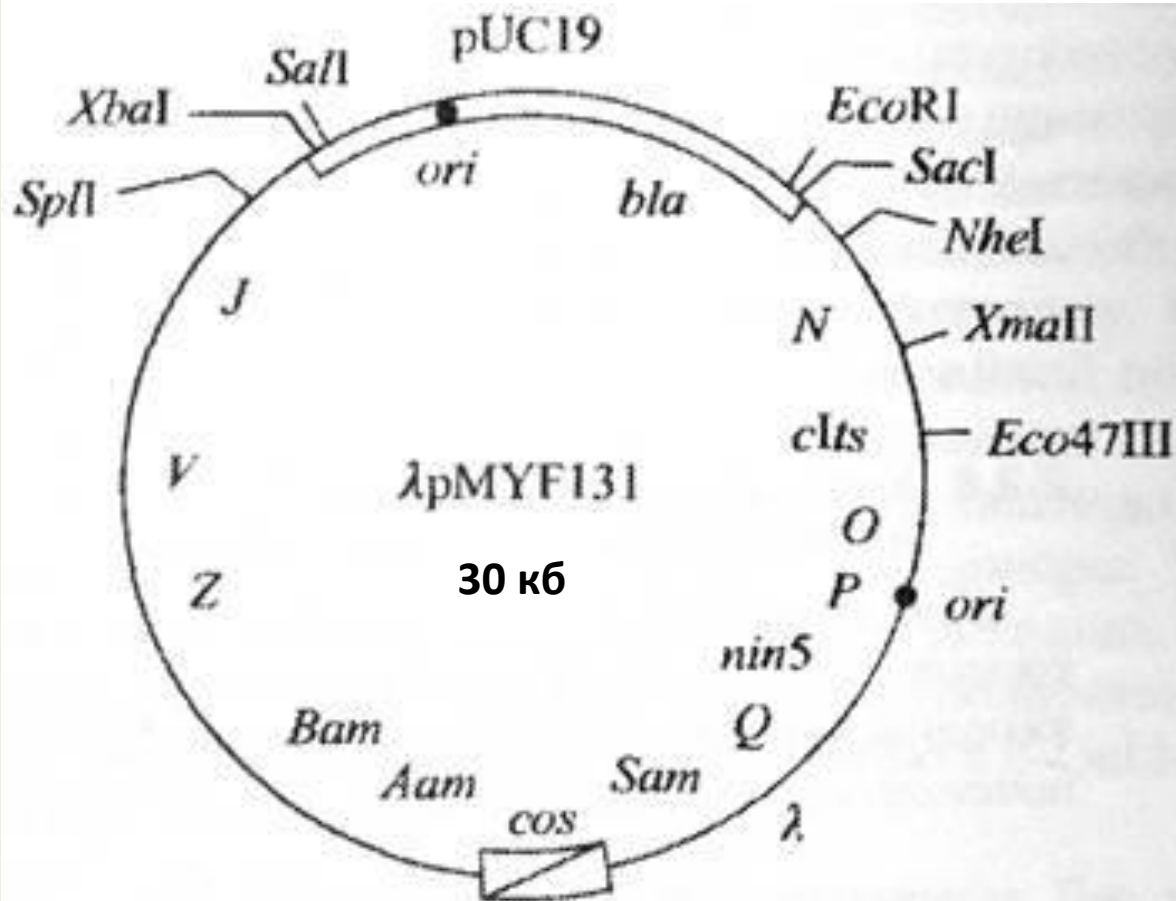
Фазмиды

- **Фазмиды** – это искусственные гибридные векторы на основе ДНК фага лямбда и плазмиды. Фазмиды могут развиваться как фаги и как плазмиды.
- **Фазмида** имеет размер 30 кб. В ее состав входит до 70% генома фага, включая *cot*-сайты и *ori*-последовательность фага лямбда и 30% ДНК плазмиды с *ori*-сайтом и маркером.
- **Фазмида** содержит все гены, необходимые для литического развития фага лямбда, но не способна к образованию негативных колоний, поскольку 30 кб ДНК не упаковывается в капсиды.
- При встраивании 20 кб чужеродной ДНК *in vitro* происходит увеличение размера вектора, что придает фазмиде свойства полноценного инфекционного фага.
- **Фазмидную ДНК** выделяют из клеток бактерий как плазмидную ДНК, гидролизуют рестриктазой, лигируют с продуктами гидролиза чужеродной ДНК, предназначенной для клонирования, а затем проводят упаковку рекомбинантной ДНК в капсиды фага лямбда.

Карта фазмиды

➤ Вектор имеет все гены для литического развития фага λ , но лизис бактерий не вызывает, т.к. из-за размера (30 кб) не способен упаковываться в капсид

➤ Встройка чужДНК (20кб) увеличивает размер фазмиды, что дает возможность упаковки в капсид и развития как фаг



Преимущества фазмид

- Применение **упрощает процедуру отбора** рекомбинантных векторов, поскольку только рекомбинантные фазмиды образуют на бактериальном газоне фаговые бляшки
- Преимущество фазмид перед фаговым вектором в том, что нет необходимости проводить процедуру удаления внутреннего «балластного» фрагмента ДНК
- Фазмидный вектор существует в клетке в виде плазмиды, а клонотека хранится в виде суспензии гибридных фагов.

Клонирование ДНК в одноцепочечных векторах

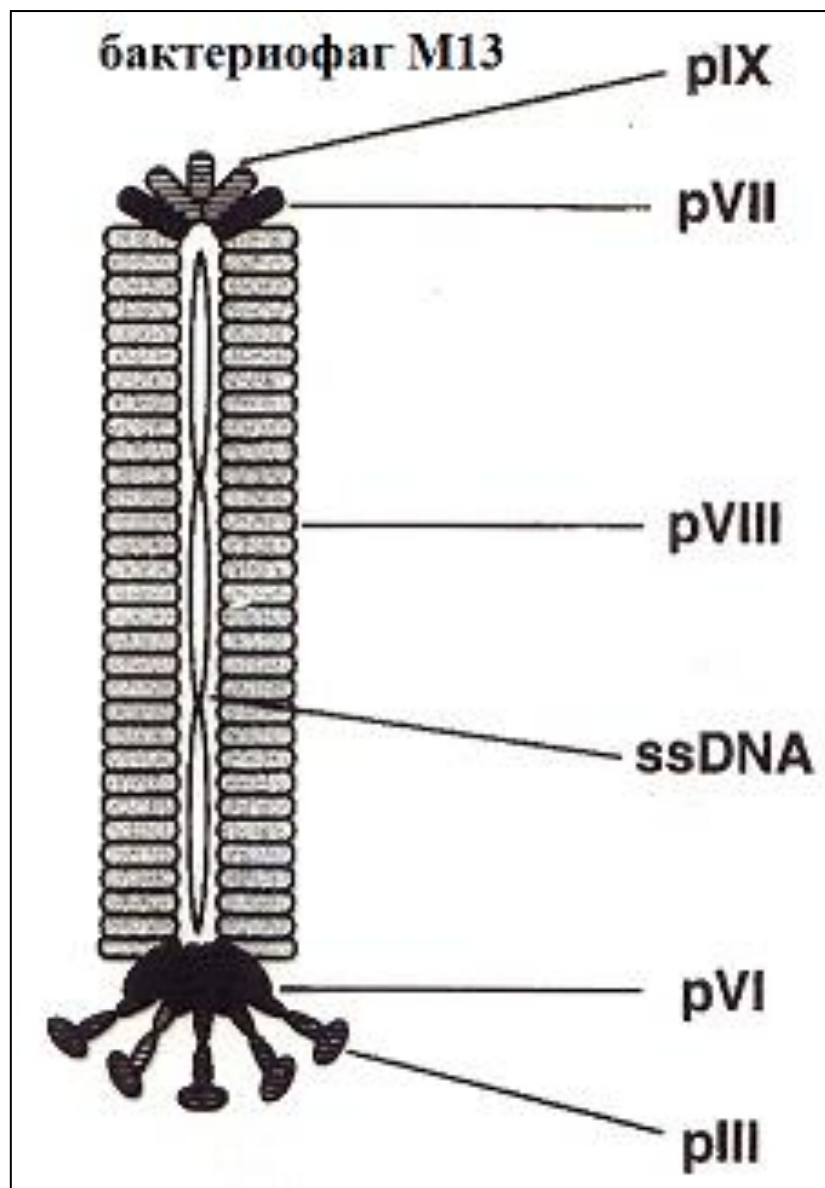
- Используют нитевидные фаги *E. coli*: M13, fd и f1
- Длинные (900 нм) и тонкие (7 нм) вирионы фагов представляют кольцевую оцДНК длиной 6407 нуклеотидов (M13) и 6408 нуклеотидов (fd и f1)
- ДНК упакована в трубочку из 2700 копий основного оболочечного белка pVIII, закрытую на концах молекулами 4-х минорных оболочечных белков
- Нитевидные фаги адсорбируются на F-пилях *E. coli* и способны инфицировать только F⁺-клетки бактерий



Courtesy of Robley Williams, Stanford University, Emeritus, and Harold Fisher, University of Rhode Island

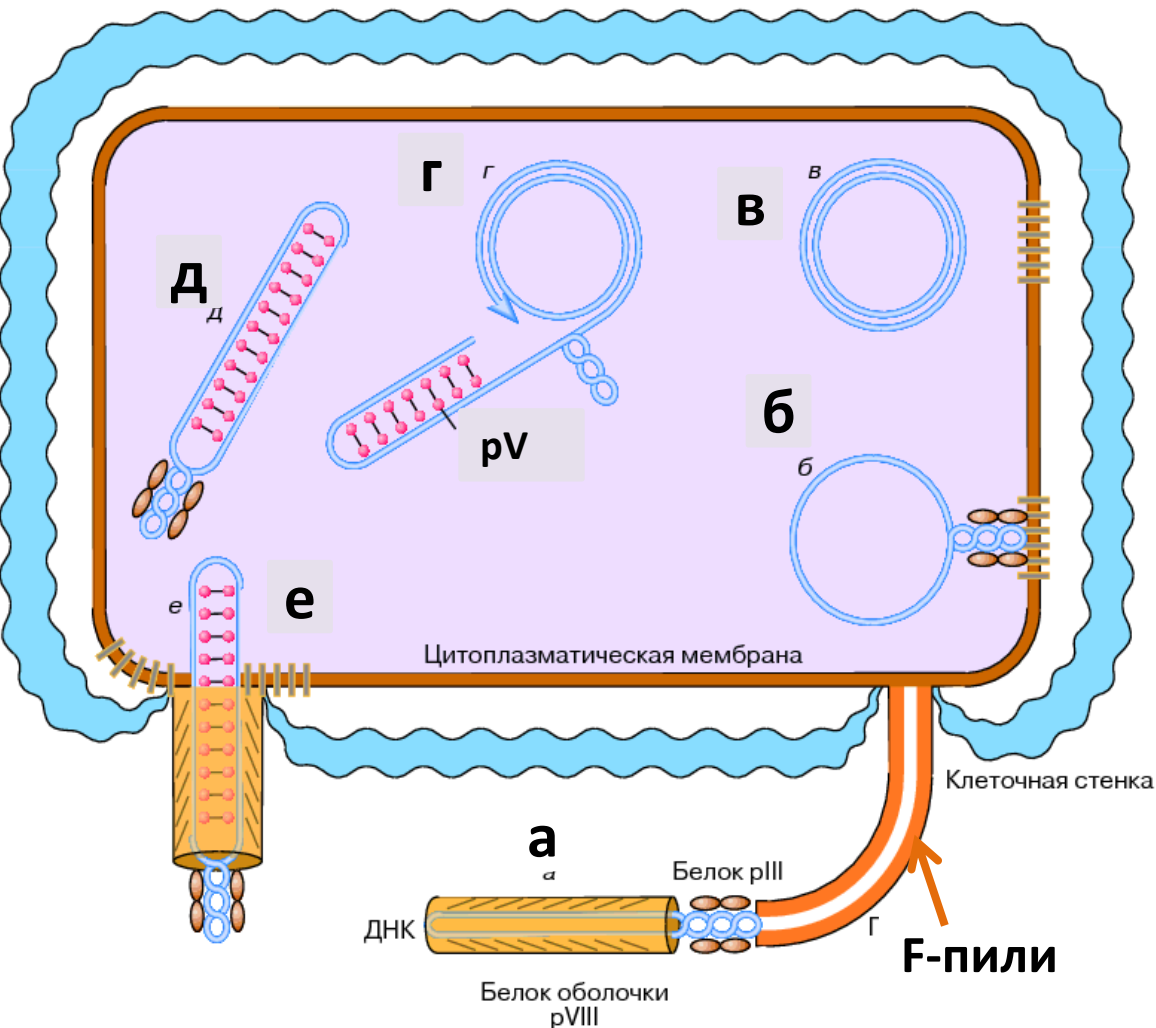
Electron micrograph of the filamentous bacteriophage M13

Бактериофаг М13



Нитевидный бактериофаг М13 представляет кольцевую оцДНК, упакованную в белковую трубочку из 2700 одинаковых белковых субъединиц (рVIII), закрытую на концах 4 минорными оболочечными белками

Цикл развития нитевидного фага



а) адсорбция фага на F-пили на поверхности клетки

б) ДНК фага проникает в цитоплазму

в) достройка второй цепи в клетке

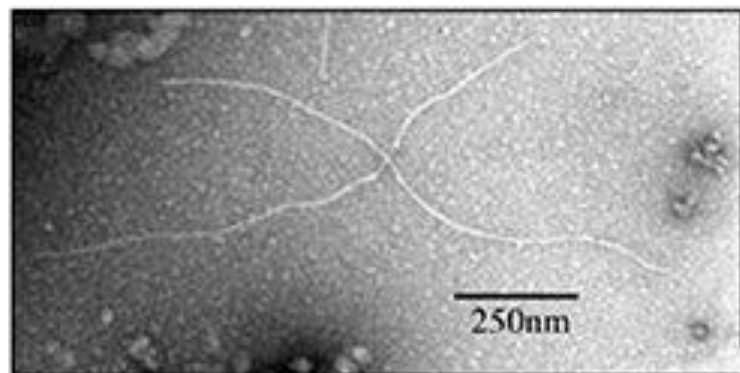
г) репликация до 300 копий на клетку

д) покрывается фаговым белком pV

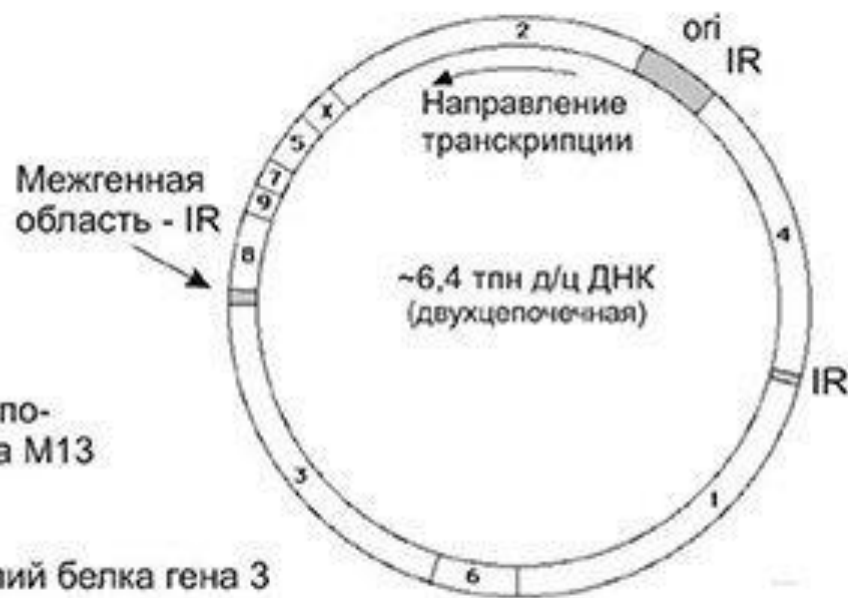
е) при выходе из клетки pV замещается pVIII на мембране

новые фаги выходят из клеток без лизиса

Бактериофаг М13



а



б

а) М13 под электронным микроскопом и схема его строения

б) На геномной карте отмечены темные участки, куда вставляют чужеродную ДНК

Характеристика M13-ДНК

- Не содержит генетических маркеров
- Не содержит сайтов для рестриктаз, образующих липкие концы
- Для конструирования используют межгенную IR-область размером 500 нуклеотидов, куда вносят вставки без нарушения жизнеспособности фага
- По величине вставка не имеет ограничений (большие вставки спонтанно элиминируют)

Схема создания гибридных фагов М13

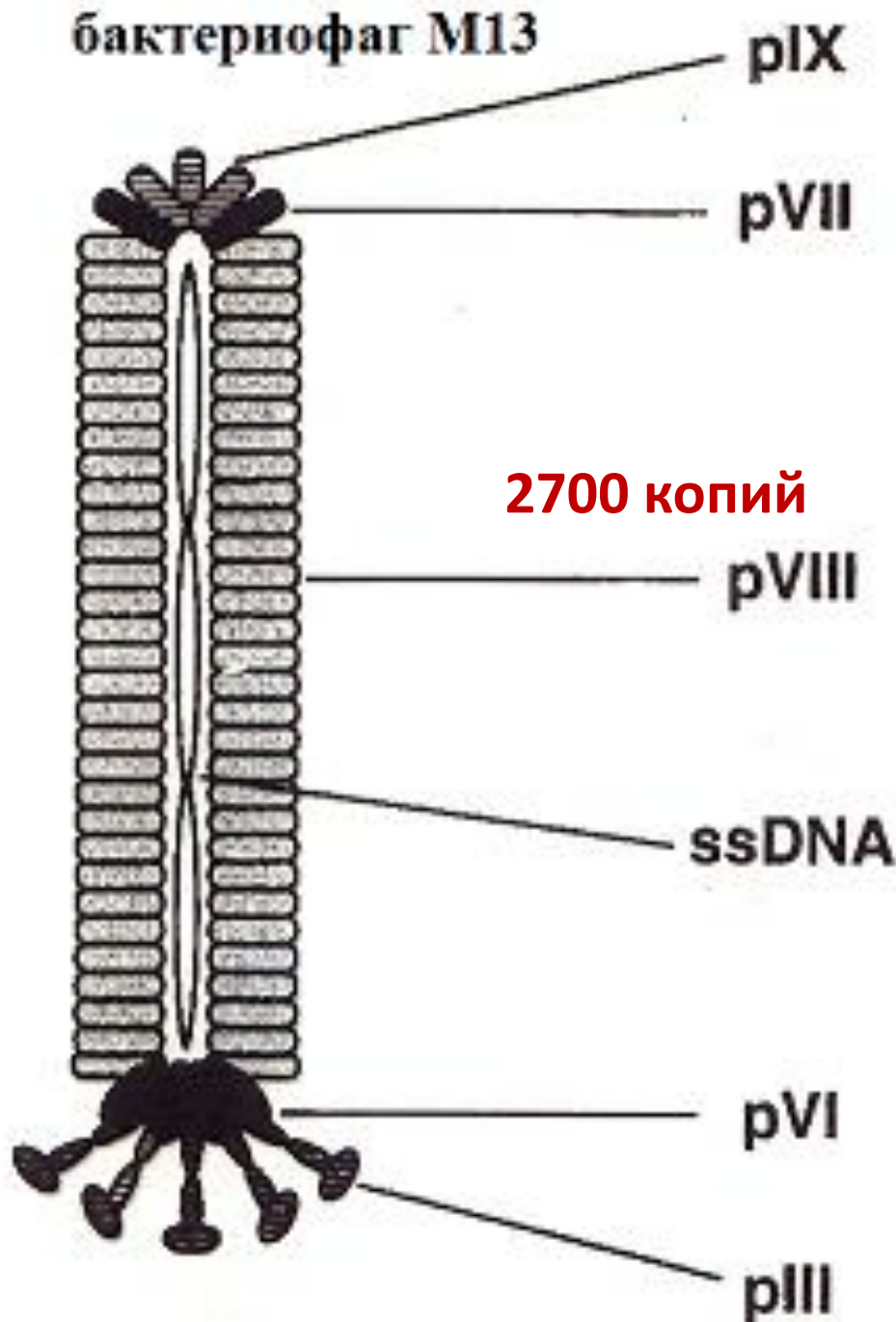


- После встраивания чжДНК гибридные фаги образуют при инфекции клеток *E. coli* на среде с Xgal бесцветные бляшки, в то время как фаг М13 с *lac*-опероном формирует бляшки синего цвета

Применение

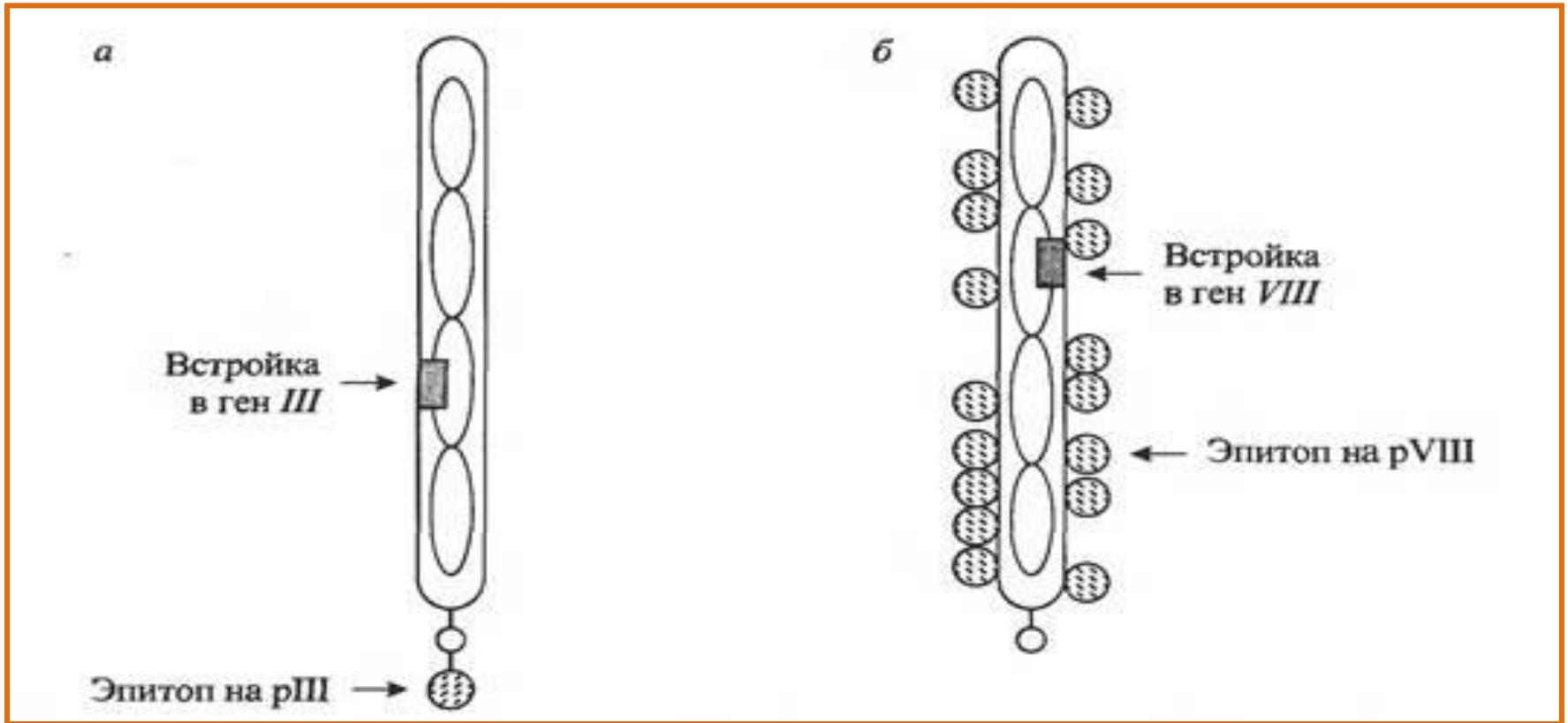
- Клонирование в векторы на основе M13 и fd используют в методе **фагового дисплея** для:
 - анализа пептидных библиотек
 - изучения белок-пептидных взаимодействий
 - изучения белок-ДНК взаимодействий
- **Суть метода**: чужеродную ДНК встраивают в гены белков вирусной оболочки, клонированные последовательности экспонируются на поверхности вирусных частиц в виде гибридных белков

Фаговый дисплей



- чжДНК встраивают в ген фага, отвечающий за синтез белка-капсида (рIII и рVIII)
- Фаг экспрессирует целевой белок на оболочке
- Исследуют взаимодействие целевого белка с другими белками, пептидами или последовательностями ДНК
- **Создают фаговые белковые библиотеки, которые используют для скрининга и тестирования**

Эпитопы на поверхности капсидов M13

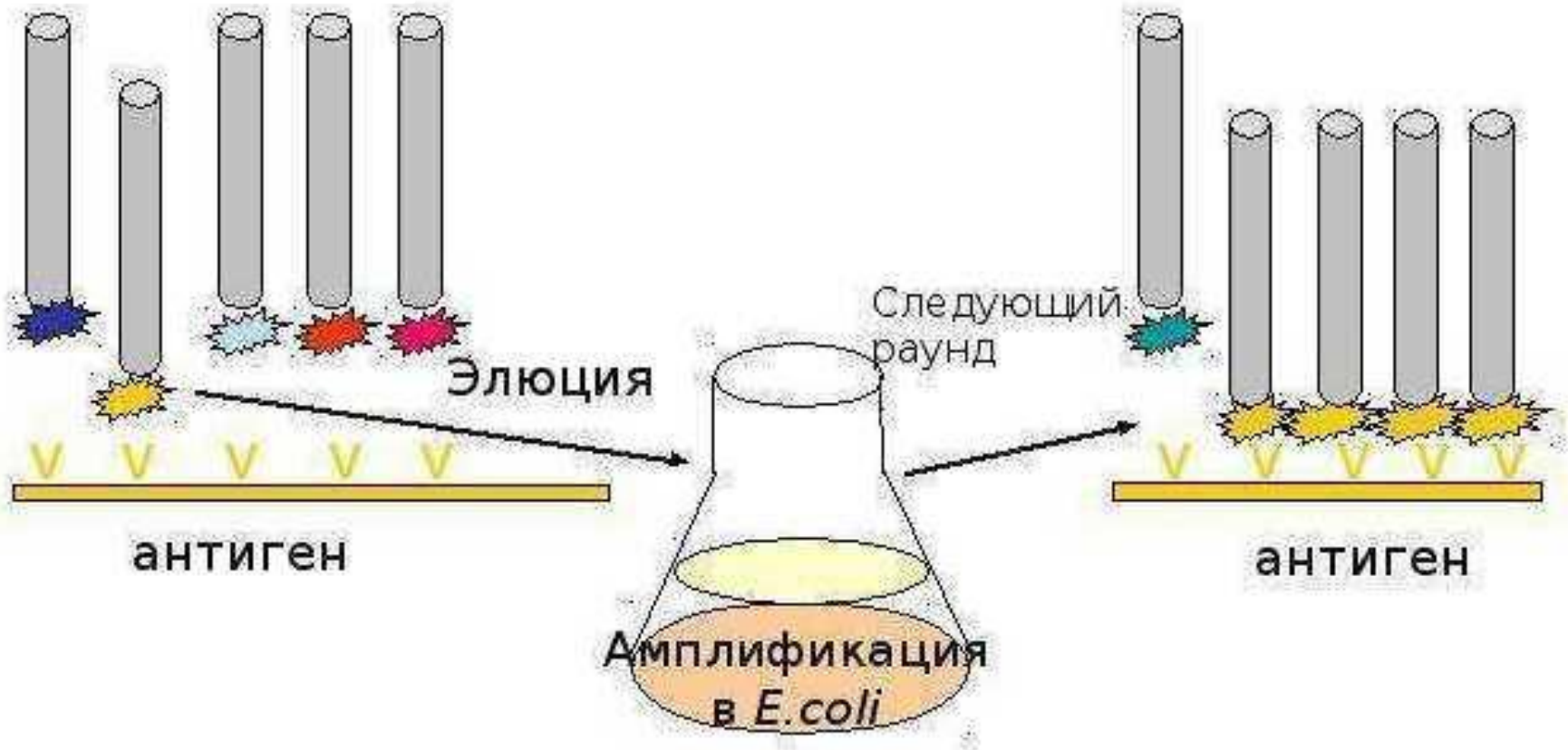


- Фаговый дисплей - высокоэффективный метод скрининга антител, которые взаимодействуют с экспонирующими на поверхности гибридными белками.
- интересующий вариант фага можно выделить и размножить для дальнейшего изучения

Фаговый дисплей

Аффинная селекция (биопенинг)

Библиотека фагов

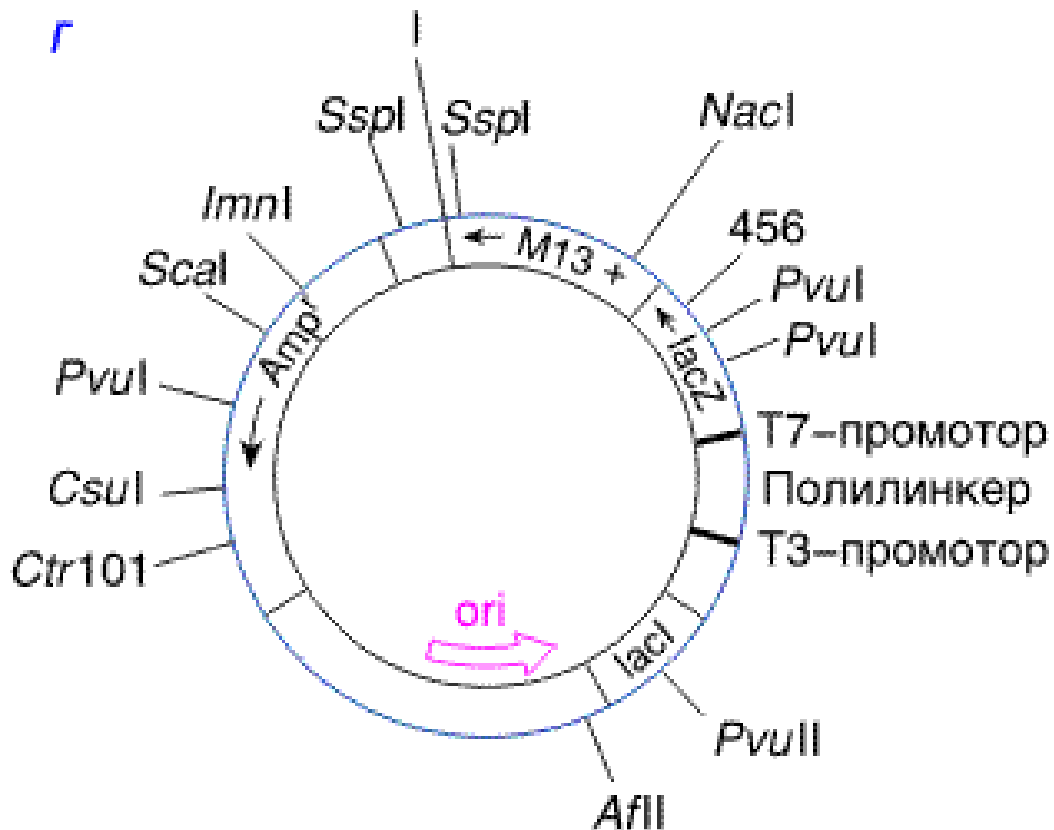


Выделение специфических антител методом обогащения-биопенинг

Фагмиды

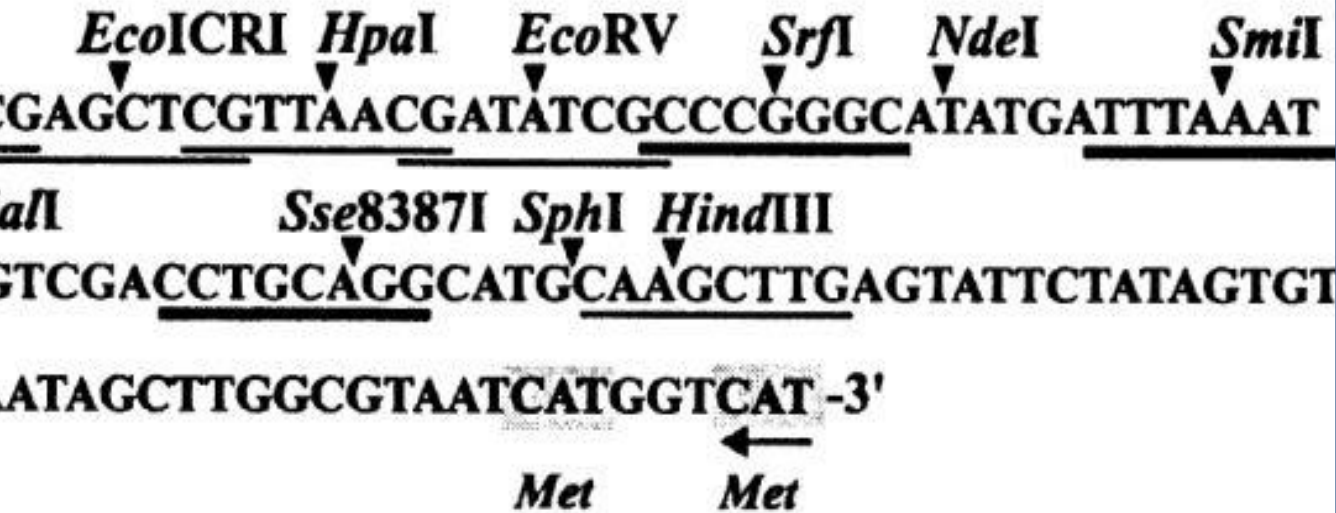
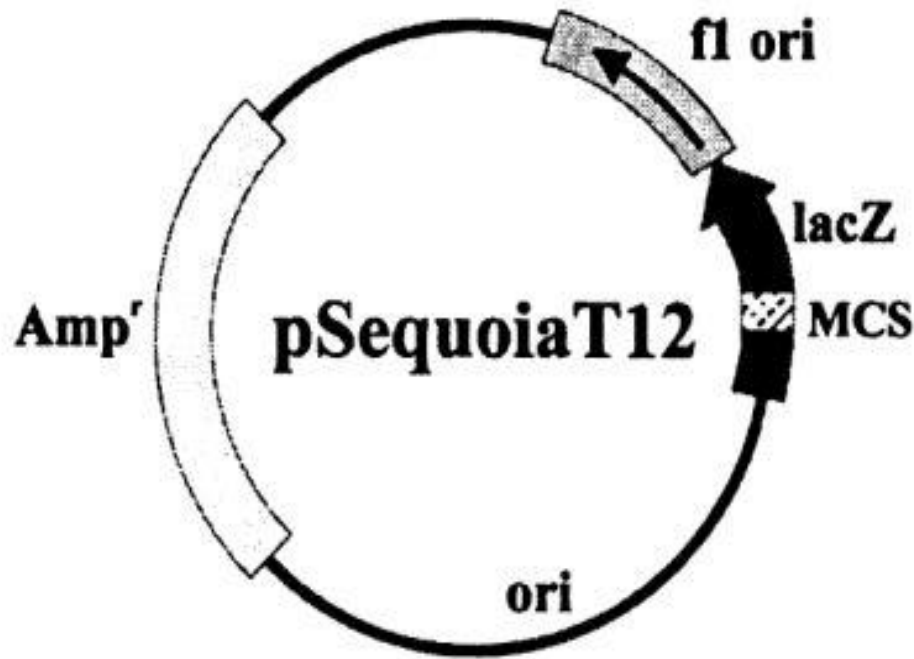
- **Фагмида** – вектор, являющийся искусственным гибридом между плазмидой и репликативной формой однонитевого фага
- Для получения **фагмиды** плазмидную ДНК лигируют с репликативной формой ДНК однонитевого фага
- Внутри клеток-хозяев фагмиды размножаются как плазмиды потому, что у них, отсутствуют гены, необходимые для сборки фаговой частицы.
- Они размножаются как фаги, если хозяин инфицирован вспомогательными фагами, которые поставляют белки для упаковки.

Вектор Bluescript



ФУНКЦИИ:

- Встраивание чужДНК в ген lacZ дает возможность отбора на среде с Xgal
- Вектор содержит сильные T7- и T3-промоторы, чтобы получать препаративные количества мРНК
- Вектор обладает фрагментом фага M13 и может работать как фагмида



1) У векторов pSequoia отсутствуют сайты узнавания для частощепающих рестриктаз с тетрануклеотидными сайтами узнавания

2) Уникальной чертой вектора является наличие сайтов узнавания для октануклеотидных рестриктаз

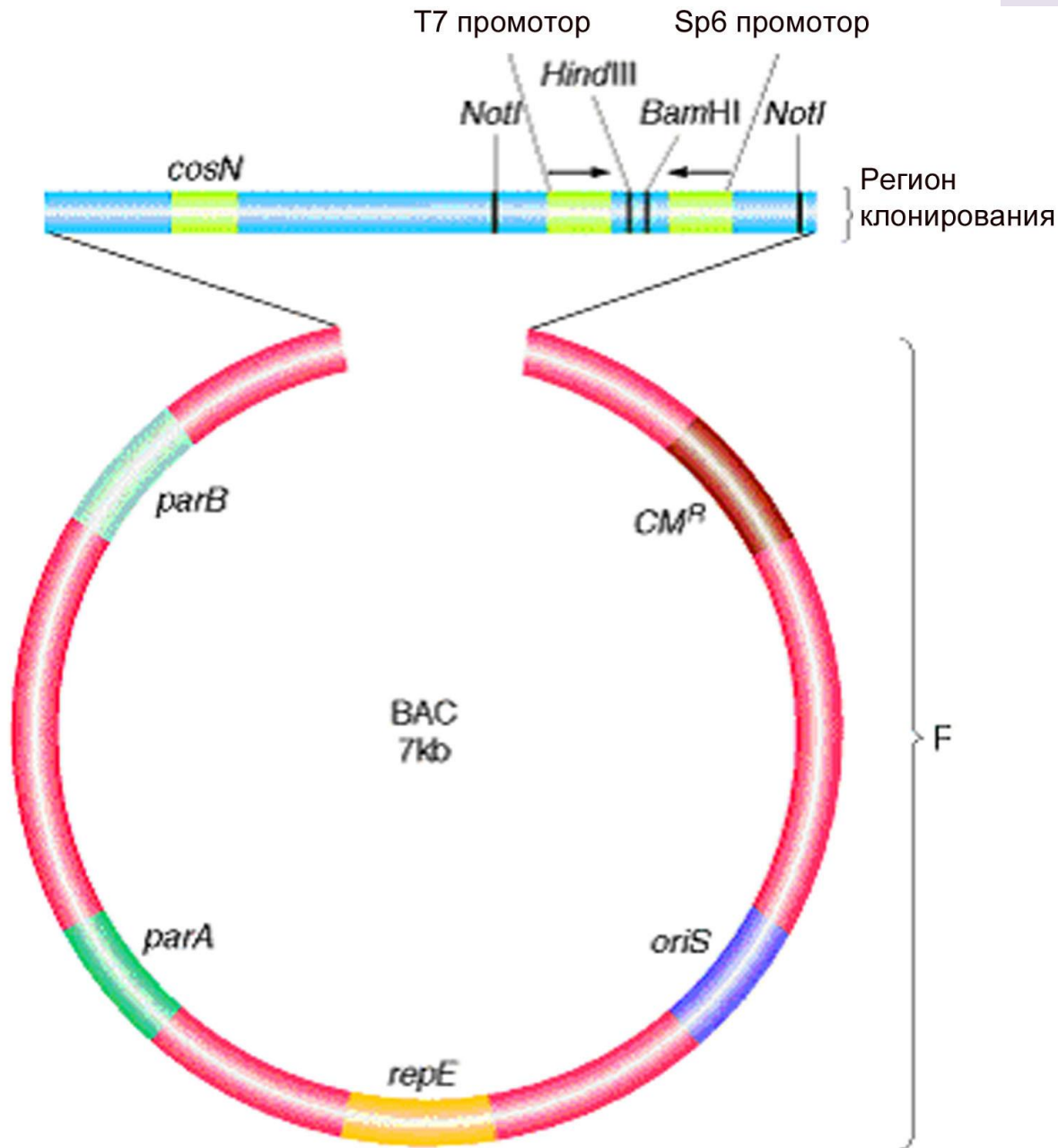
Преимущество фагмидных векторов

- Фагмиды применяют для разработки технологии фагового дисплея белков, пептидов и антител
- В составе фаговых капсидов экспрессируются целевые последовательности, которые после сборки фага экспонируются на его поверхности
- Вирионы с гибридными молекулами на поверхности фага легко тестировать и белки выделить для дальнейшего изучения
- Рутинные генно-инженерные процедуры проводят на фагмидных векторах, а не на оцДНК фага

Искусственные бактериальные хромосомы

- В 1992 г. японские исследователи описали новую бактериальную векторную систему для клонирования ДНК размером до 300 кб
- Эта система названа бактериальная искусственная хромосома - ВАС (Bacterial Artificial Chromosome)
- Основа вектора – F-плазмида

Структура ВАС



Регуляторные локусы от F-плазмиды :

oriS – инициация репликации

repE – контроль репликации

parA и *parB* – контроль копийности и распределения

В ВАС встроены:

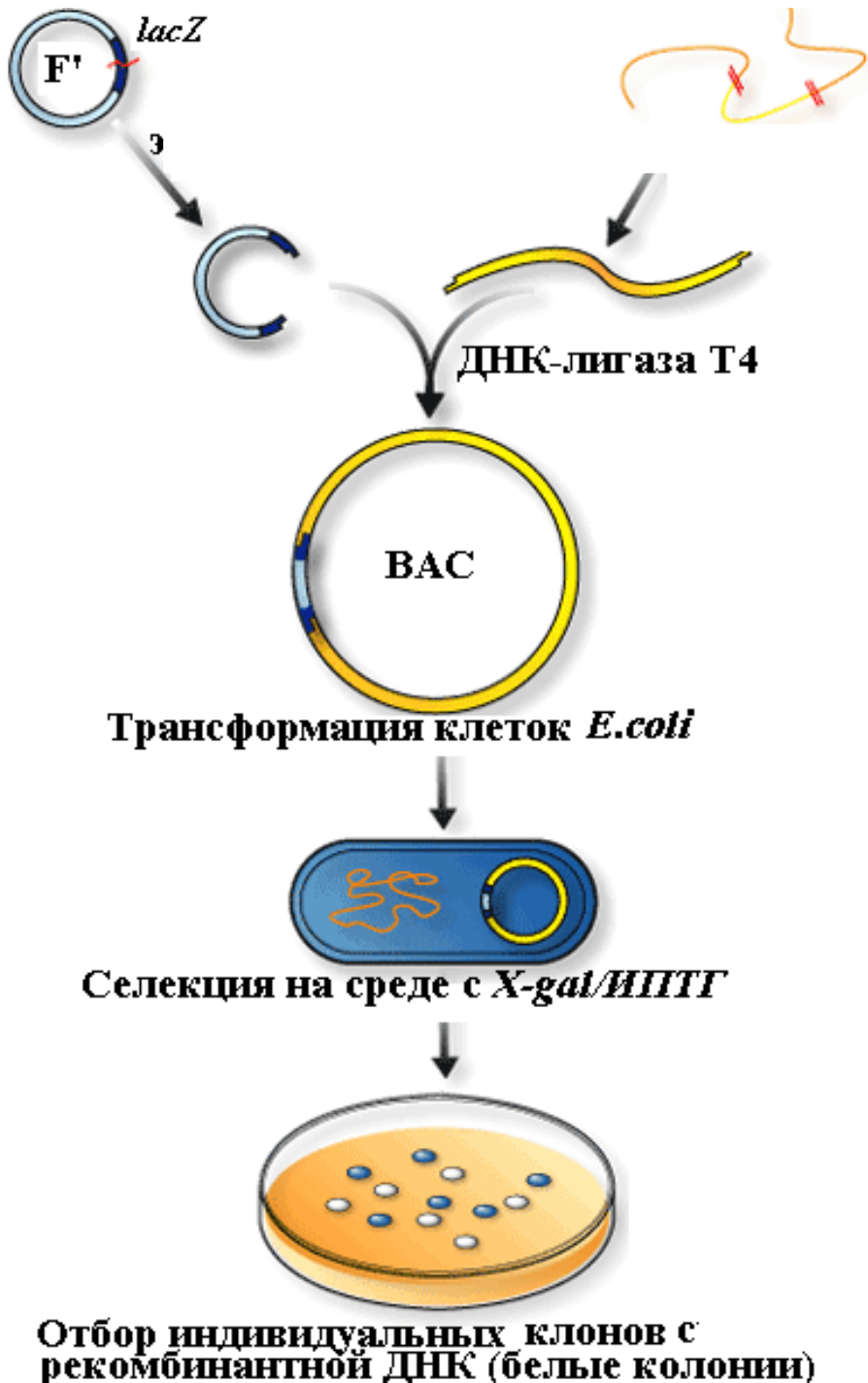
- *cos*-сайты фага лямбда
- сайты рестрикции *BamHI* и *HindIII* для клонирования
- Промоторы фагов T7 и Sp6 для эффективного синтеза целевой ДНК
- сайты *NotI* для крупнощепящей рестриктазы

Характеристики ВАС

- Размер вставки **до 300 кб**
- Пассирование клонов продемонстрировало высокую стабильность
- Аналогами ВАС-векторов являются РАС-векторы, которые созданы на основе фага P1.
- ВАС и РАС векторы используют при анализе сложных геномов, они сыграли важную роль при секвенировании генома человека.
- ВАС и РАС векторы используют для создания библиотек эукариотических геномов.

Клонирование в ВАС-вектор

Разработка технологии ВАС сопровождалась многочисленными модификациями, чтобы большие вставки чужеродной ДНК (до 300 кб) оставались стабильными и правильно копировались при делении бактерии-хозяина.



AC – artificial chromosomes

YAC

Yeast

Artificial Chromosomes –

дрожжевые

искусственно созданные

хромосомы

BAC

Bacterial

Artificial Chromosomes –

искусственные

хромосомы бактерий

PAC-P1

Phage-derived

Artificial Chromosomes –

искусственно

полученные мини-

хромосомы

бактериофагов,

и «сверхдлинные»:

MAC

Mammalian

Artificial Chromosomes –

искусственные

хромосомы животных

HAC

Human

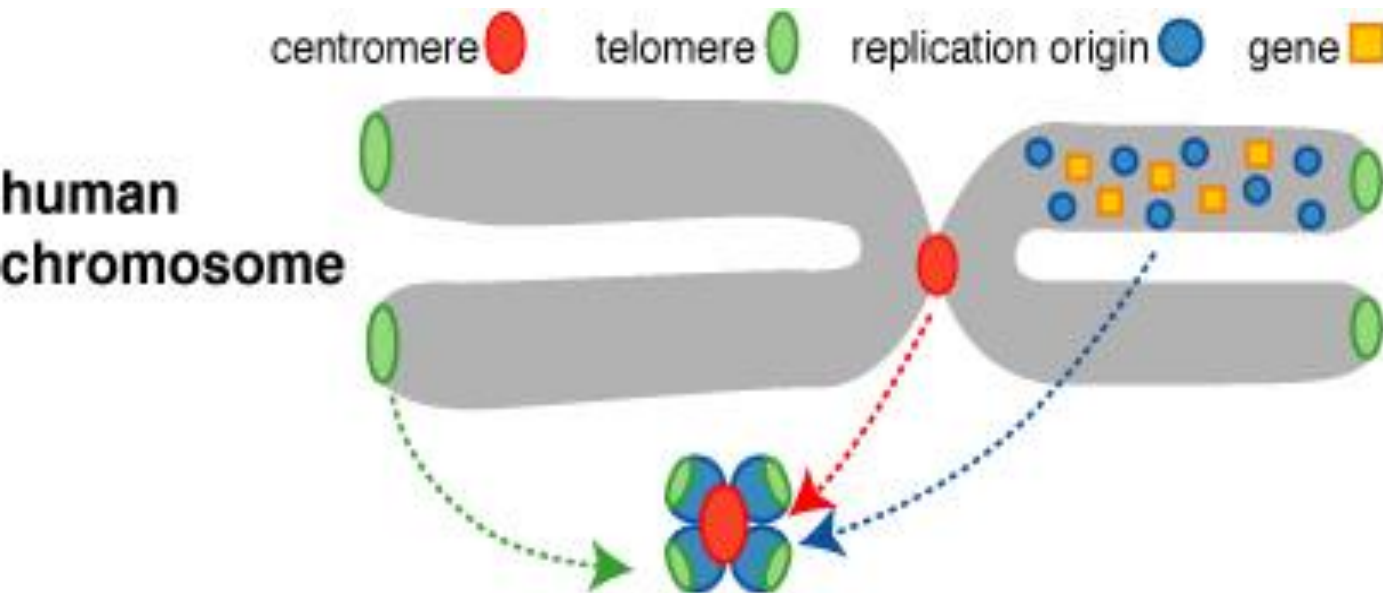
Artificial Chromosomes –

искусственно

полученные хромосомы

человека

НАС-искусственная хромосома человека



НАС(human artificial chromosome)

- Constructed artificially in cultured human cells.
- Constructed by minimum DNA elements for the maintenance of chromosome function
- Enable gene introduction of desired sequences

Векторы, используемые для молекулярного клонирования

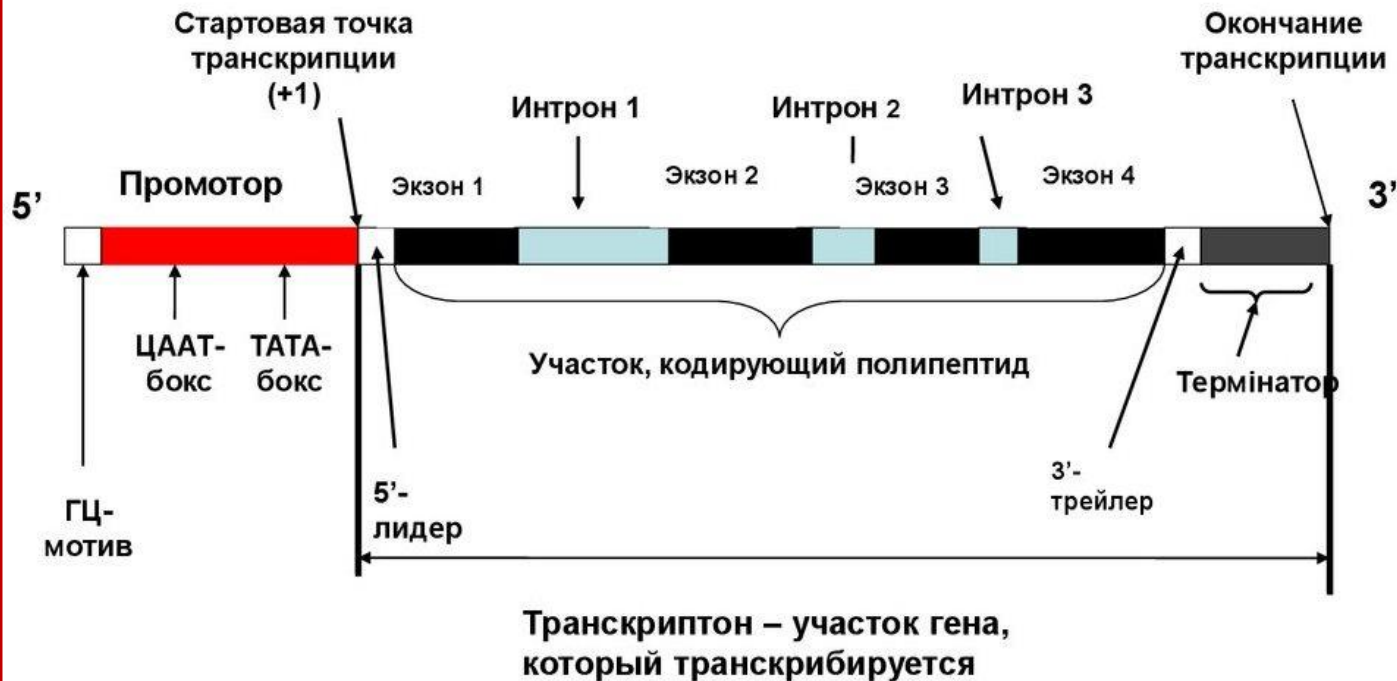
Вектор	Оптимальная величина вставки, кб
Плазмида	10
Вектор на основе фага λ	20
Космида	40
Фазмида	20
Фагмида	до 100
Векторы на основе однонитевых фагов	до 100
ВАС и РАС	до 300

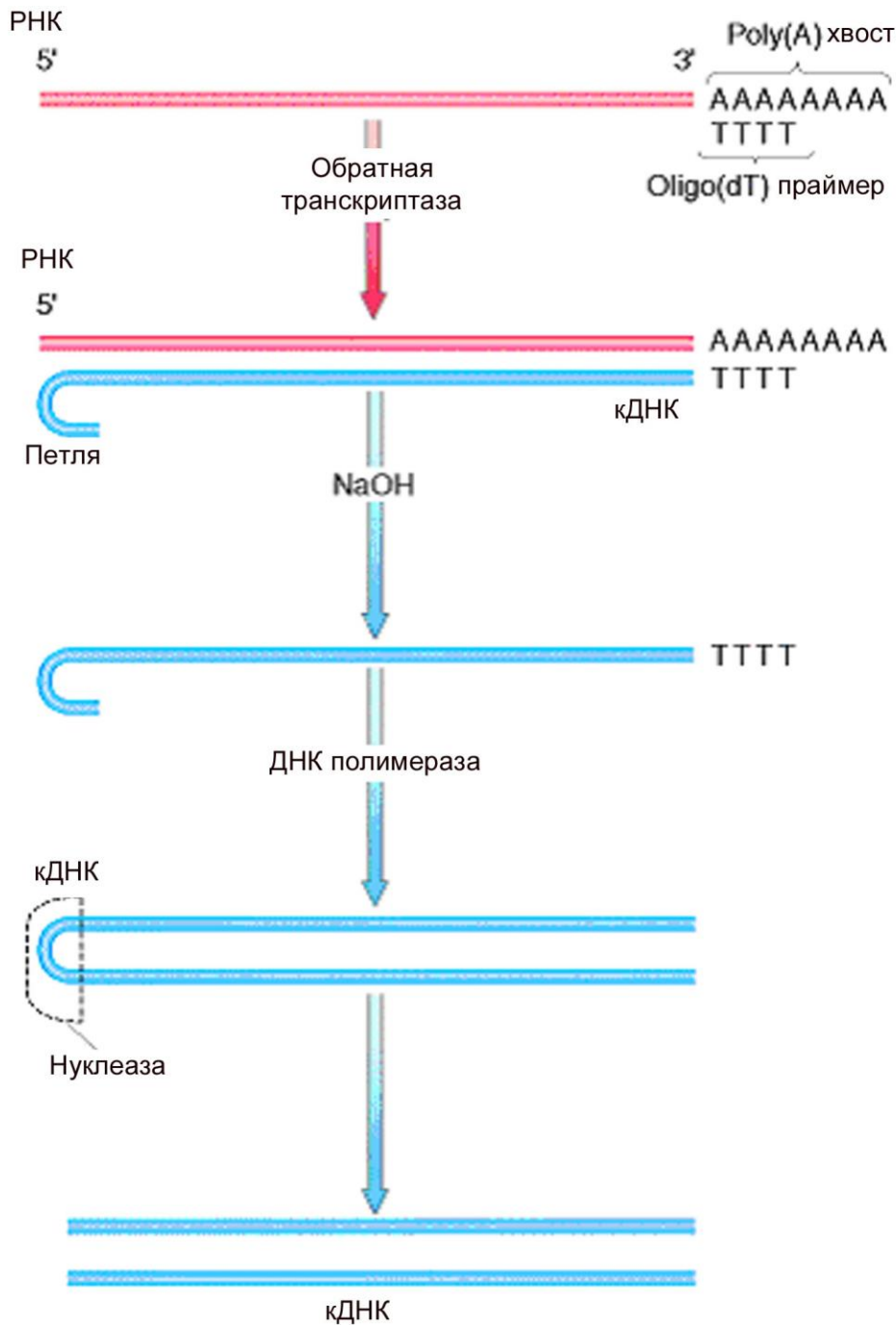
Характеристика хозяев для векторов с чужеродной ДНК

- 1) Организм клеток хозяина должен иметь генотип, соответствующий эффективной репликации вектора.
- 2) Рост на недорогих средах, отсутствие патогенности, способность принять чужеродную ДНК и поддержание ее стабильности при культивировании.
- 3) Фундаментальные знания генетики и биохимии микроорганизмов, знание последовательности генома бактерий, степень разработки генно-инженерных методов. Лидером при выборе штамма-хозяина являются бактерии *E. coli*.
- 4) Недостатком *E. coli* является условная патогенность, их среда обитания - кишечный тракт человека. Даже непатогенные штаммы *E. coli* продуцируют эндотоксины.
- 5) *E. coli* секретируют белки в периплазму и это затрудняет очистку, разрушение клеток ведет к дополнительной контаминации конечных продуктов.
- 6) Достоинство *B. subtilis* в непатогенности, они секретируют белки в среду. Технология клонирования для них не развита так совершенно, как для *E. coli*. Ограничением является нестабильность бациллярных плазмид.

Клонирование генов эукариот

Строение гена эукариот, кодирующего белок





Клонирование генов эукариот

Из-за разницы в строении генов прокариот и эукариот клонирование генов эукариот осуществляют путем создания библиотеки кДНК.

Процедура включает:

1. Получение клеток
2. Изоляция суммарной РНК из клеток
3. Выделение мРНК на колонке с олигоТ
4. Получение кДНК

Геномные библиотеки

- Разделение геномной ДНК на клоны и введение их в клетки-хозяева называют созданием геномной библиотеки (банк клонов, банк генов)
- Библиотеки делят на полные (весь геном) и неполные (часть генома)
- Способ создания – обработка ДНК рестриктазами
- В зависимости от величины фрагментов выбирают вектор-носитель
- Вектор трансформируют в организм хозяина, *E. coli* или дрожжей, для хранения
- Современные высокотехнологичные методы получения геномных библиотек основаны на применении роботизированного (автоматизированного) производства микропланшетов для хранения клонов, а также нитроцеллюлозных и нейлоновых мембран

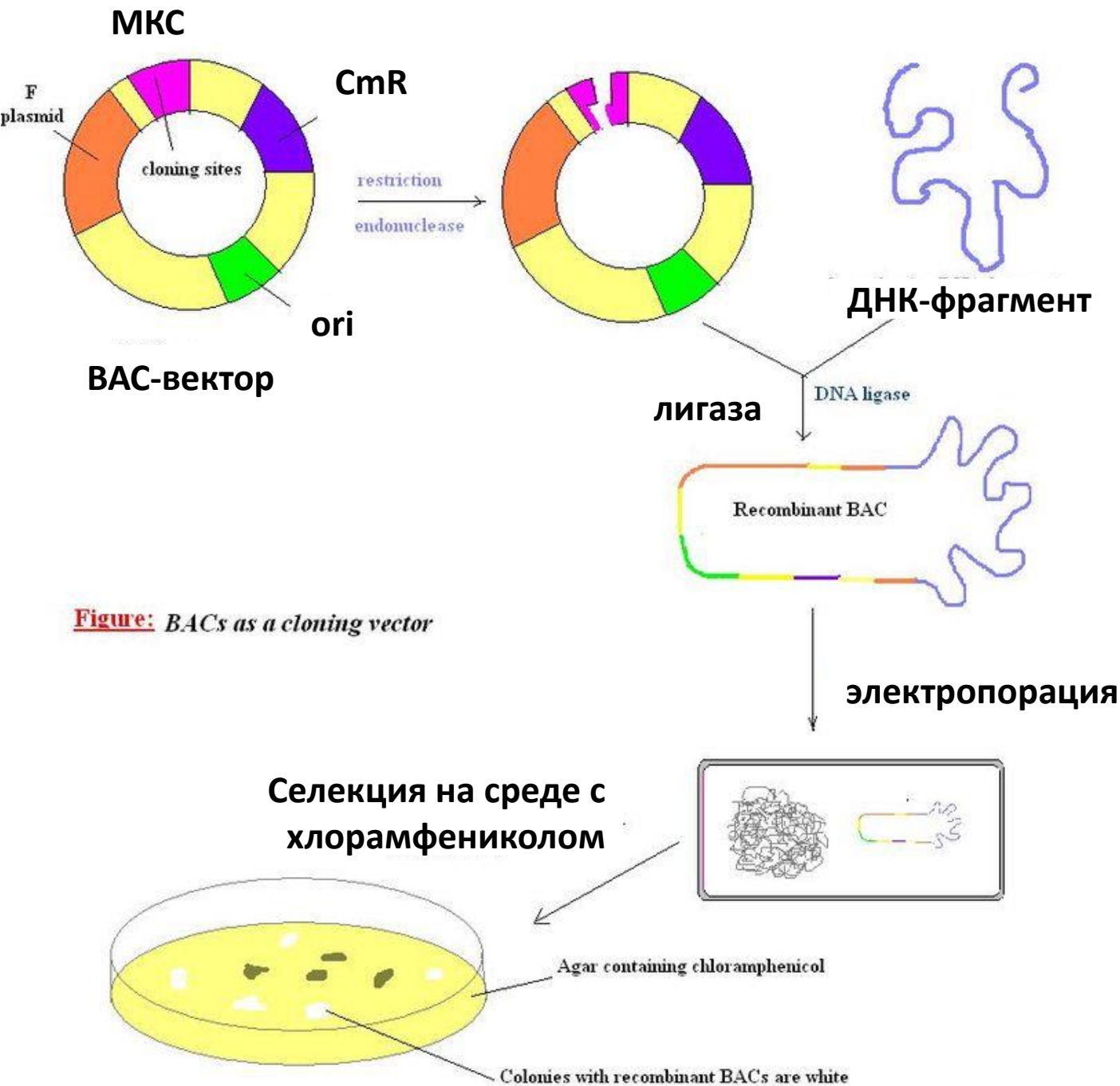


Figure: *BACs as a cloning vector*

Схема
создания
геномной
библиотеки
с помощью
ВАС-вектора

ДНК на микрочипе

