

ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Расшифровывая тайны структуры генов, ученые начали их выделять и синтезировать. 30 лет назад тех, которые верили в успех этих начинаний было мало, и никто даже не предполагал нынешние успехи генной инженерии и исключительно важные последствия этого.

Первые шаги были проделаны *Beckwith* и *Shapiro*, которые в 1969 году впервые изолировали и сфотографировали оперон лактозы бактерии *E. Coli*. Год спустя *G. Khorana* удалось синтезировать первые гены прокариот используя ту же технику, а в 1977 году был синтезирован ген соматостатина, кодирующий гормон гипофиза. После открытия обратной транскриптазы были синтезированы другие гены млекопитающих (для гемоглобина, овальбумина, инсулина и др.). Однако полученные гены не были активными, потому что не имели ни собственных систем для репликации, ни необходимых последовательностей для начала транскрипции, а так же для последующего синтеза кодируемых ими белков. Эти трудности были преодолены путем внедрения синтетических генов в плазмиды бактерий или в вирусы. Для внедрения генов в плазмиды используются специальные ферменты, которые расщепляют ДНК в специальных сайтах – ферменты рестрикции (Нобелевская премия за 1978 г).

Достижения в генной инженерии имеют большое теоретическое и практическое значение. Изолирование или

синтез генов позволили искусственным путем получить важные естественные продукты (инсулин, соматостатин, интерферон), однако ученые надеются на значительно большие достижения в этой области. Речь идет не только о новой фармацевтической индустрии, которая могла бы производить антибиотики, гормоны, противовирусные вакцины, но и о возможностях проведения этиологической терапии - генной терапии, корректируя мутантные гены или замещая их и, таким образом, решать очень сложные проблемы по излечению генетических болезней.

На сегодняшний день существует много технических возможностей для прямого или непрямого изучения последовательности нуклеотидов ДНК- носителя генетической информации. Интересующий ген выделяют из одного организма (клетки организма), далее - изменяют его структуру и опять вводят, но уже в другой организм, где синтезируется белок, кодируемый введенным геном. Все действия по манипуляции с ДНК называются генетическим термином - *метод (техника) рекомбинантных ДНК*.

Для анализа нуклеиновых кислот необходимы следующие этапы:

- выделение из клеток и очистка молекул ДНК или РНК;
- изолирование интересующего фрагмента нуклеиновой кислоты;
- мультипликация изолированного фрагмента;
- анализ последовательностей интересующего фрагмента (определение последовательности нуклеотидов, определение экспрессии и позиции гена в геноме).

Выделение нуклеиновых кислот

ДНК выделяют из любой ядерной клетки независимо от используемой ткани (к примеру, у человека можно использовать клетки пятен крови, слюны, волосных луковиц, эпителия и др.)

Для выделения нуклеиновой кислоты используются биохимические методы, которые включают: разрушение клеток, денатурацию белков и отделение их от ДНК протеазами, дифференциальное центрифугирование и окончательная очистка ДНК, которая производится органическими растворителями.

Для выделения определенной молекулы мРНК используются клетки, где активно экспрессируется интересующий ген (например мРНК гена инсулина можно выделить из β -клеток поджелудочной железы, мРНК глобиновых генов - из клеток-предшественников эритроцитов.)

Получение фрагментов ДНК для исследования

В геномной ДНК кодирующие последовательности чередуются с некодирующими. Для изолирования нужного фрагмента можно использовать два пути:

- прямой - расщепление ДНК генома на фрагменты с помощью фермента и отбор интересующих фрагментов;
- непрямой, через получение комплементарной ДНК (кДНК) на основе мРНК.

Рестрикция ДНК

Ферментативное расщепление молекул ДНК осуществляется с помощью **ферментов рестрикции** (ФР), которые распознают специфические двухцепочечные последовательности, названные **сайтами рестрикции** (СР). Ферменты рестрикции встречаются у прокариот, они отвечают за расщепление чужеродной ДНК (например, вирусов). Сайты рестрикции представлены 4-6-8-12 парами нуклеотидов, которые образуют палиндромы (рис. 11.1). Соответствующие последовательности ДНК прокариот метилированы и поэтому не распознаются собственными рестриктазами.

В результате воздействия разных ФР можно получить фрагменты ДНК с одноцепочечными липкими концами или с двухцепочечными нелипкими концами.

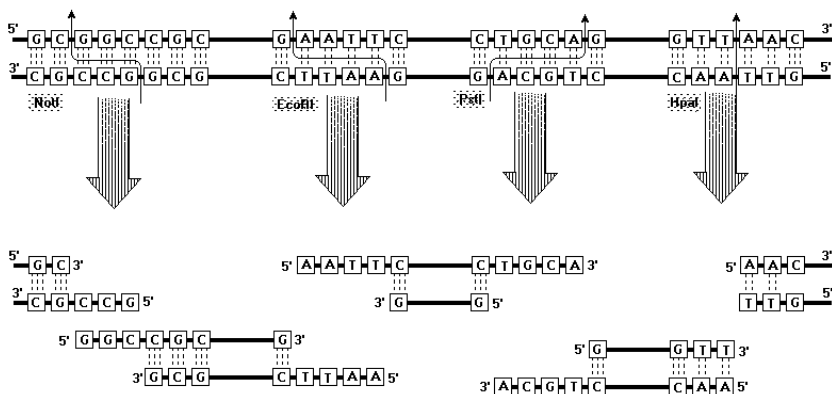


Рис. 11.1. Гидролиз ДНК при помощи ферментов рестрикции. Образование липких и нелипких концов

ДНК генома эукариот (включая геном человека) содержит разные СР, распределенные случайно вдоль макромолекулы. Используя ферменты рестрикции, можно получить фрагменты ДНК разной длины. Сравнивая фрагменты рестрикции, полученные в результате воздействия разных рестриктаз, можно построить *рестрикционные карты* молекул ДНК, которые представляют собой локализацию СР для различных рестриктаз.

Синтез кДНК

Из ткани, где экспрессируется интересующий ген, выделяется тотальная мРНК. На основе мРНК с участием *обратной транскриптазы* (РНК-зависимой ДНК-полимеразы) синтезируется молекула комплементарной ДНК. кДНК отличается от геномной ДНК отсутствием интронов и состоит только из кодирующих последовательностей (экзонов). Синтез кДНК состоит из следующих этапов (рис. 11.2):

(1) выделение мРНК;

- (2) добавление коротких последовательностей oligo(dT), которые служат праймерами для синтеза цепи кДНК;
- (3) фермент обратная транскриптаза синтезирует одну комплементарную цепь ДНК на матрице мРНК. Она образует на 3' конце цепи петлю;
- (4) гидролиз мРНК;
- (5) синтез комплементарной цепи кДНК. Петля служит праймером для ДНК-полимеразы;
- (6) удаление петли с помощью S₁-нуклеазы.

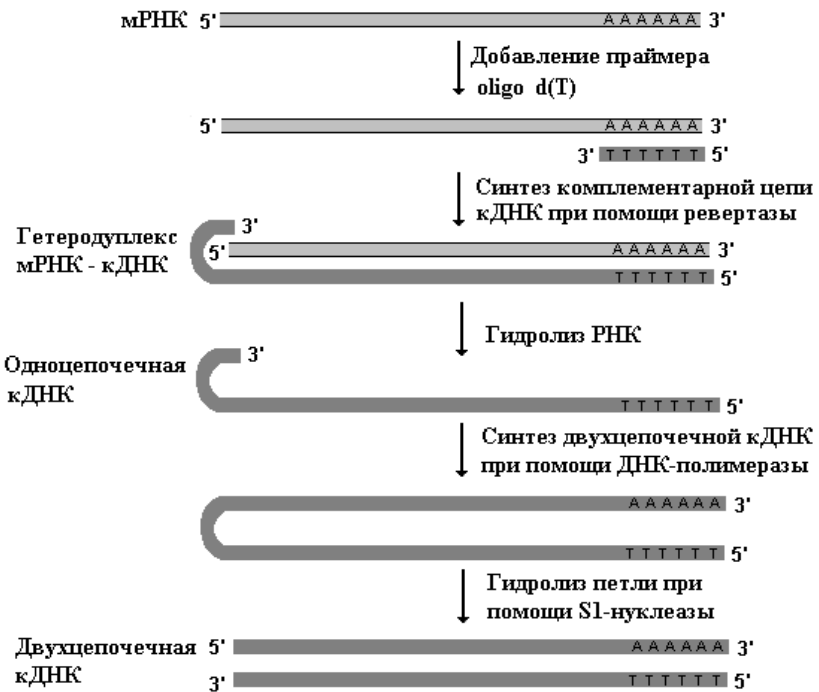


Рис. 11.2. Получение кДНК

Клонирование ДНК

Процесс получения большого числа копий интересующей последовательности (фрагмента) ДНК с использованием методов получения рекомбинантных ДНК *называется*

ся клонированием ДНК. Процесс осуществляется как *in vivo*, так и *in vitro* (ПЦР).

Клонирование ДНК *in vivo*

Клонирование ДНК заключается в изолировании фрагмента ДНК, его соединении с вектором и размножении его в клетке-хозяине.

Векторами для клонирования являются молекулы ДНК, которые реплицируются независимо от хромосом хозяина, даже тогда, когда искусственно в них встраивают фрагмент чужеродной ДНК. Для самовоспроизведения вектор должен содержать два элемента:

- последовательность ***ori*** (начало репликации);
- ген, кодирующий белки SSB, которые подготавливают матрицу для репликации.

В качестве вектора используются плазмиды R, бактериофаг λ , вирус обезьян SV-40, космиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и другие. Выбор вектора для клонирования зависит от величины клонируемого фрагмента: маленькие фрагменты до 15 kb могут клонироваться в плаزمиде, фрагменты до 50 kb в космидах и бактериофагах, фрагменты более 300 kb - в искусственных хромосомах BAC или YAC.

В качестве **клетки-хозяина** при клонировании используют бактерии (для плазмид, космид, бактериофагов, BAC), дрожжевые клетки (для плазмид и YAC), растительные клетки (для плазмид, вирусов), клетки животных (для вирусов). Существуют векторы, которые реплицируются в разных клетках-хозяинах - **челночные векторы**.

Гибридные молекулы, образованные из ДНК вектора и чужеродного фрагмента ДНК, называются **рекомбинантными ДНК**. Рекомбинантные ДНК могут быть получены следующим образом (рис. 11.3):

- выделение фрагмента ДНК для клонирования (участок ДНК или ген) и выбор вектора для клонирования;
- расщепление интересующего фрагмента и вектора той же рестриктазой, которая образует липкие концы;
- соединение полученных фрагментов фосфодиэфирными связями при помощи ДНК-лигазы, которая комплементарно соединяет липкие концы фрагментов.



Рис. 11.3. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидных векторах

Рекомбинантные молекулы вводятся в клетку-хозяин для клонирования. Через определенное время, благодаря независимой репликации вектора, образуются многочисленные копии исследуемого фрагмента или гена. Рекомбинантные молекулы выделяются из клетки хозяина, очищаются и разрезаются теми же рестриктазами, которые были использованы при их получении. Выделенные клоны ДНК используются для определения первичной структуры (последовательности нуклеотидов в молекуле), для рестрикционного картирования, получения молекулярных зондов,

анализа функции соответствующих генов, синтеза необходимого белка (например инсулина, соматотропина, интерферона и др.).

Аmplификация ДНК *in vitro*

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является методом амплификации *in vitro* фрагментов ДНК. При этом используется феномен гибридизации ДНК-ДНК и свойство полуконсервативной репликации. Гибридизация осуществляется после специфического распознавания нуклеотидных фрагментов в интересующей цепи ДНК некоторыми короткими последовательностями ДНК, называемыми **праймерами** нуклеотидный состав которых известен. От праймеров продолжается синтез комплементарных цепей амплифицируемой ДНК, который осуществляется термоустойчивой ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой).

ПЦР протекает циклически через последовательное чередование следующих этапов (рис. 11.4):

- (1) денатурация ДНК нагреванием до $+96^{\circ}\text{C}$;
- (2) отжиг (гибридизация) праймеров при температуре до 50°C ;
- (3) элонгация комплементарных фрагментов ДНК при температуре 72°C .

Эти этапы повторяются 23-35 раз. Вновь синтезированные молекулы ДНК служат матрицей для синтеза новых цепей (таким образом, из одной молекулы ДНК в первом цикле образуются две молекулы, во втором 4 и т.д., а через 30 циклов число копий превышает миллиард).

Библиотеки ДНК

Набор фрагментов клонированной ДНК клетки, ткани, организма образует библиотеку ДНК. Она используется для прямого молекулярного анализа фрагментов ДНК или получения ДНК-зондов.

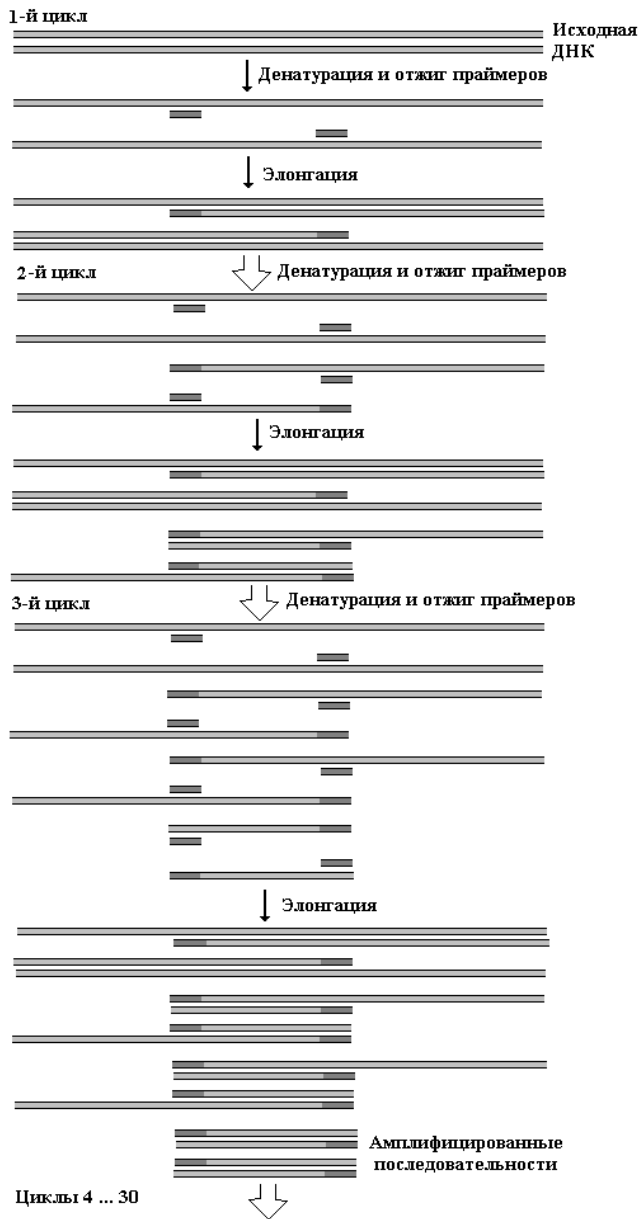


Рис. 11.4. Принцип ПЦР

Геномная библиотека

Набор клонированных фрагментов ДНК, которые содержат одну и более копий всех фрагментов геномной ДНК, называют *геномной библиотекой*. Геномные библиотеки используются для поиска интересующего гена с помощью специальных зондов и его выделения.

Геномные библиотеки создаются двумя способами:

- вся геномная ДНК расщепляется одной рестриктазой, образующиеся фрагменты клонируются с помощью бактериофагового или космидного вектора;
- геномная ДНК разрезается рестриктазами, которые узнают последовательности из 4-х пар нуклеотидов. При таком частичном расщеплении только часть сайтов рестрикции разрезается.

Хромосомные библиотеки

Величина генома человека очень большая и необходимы сотни тысяч клонов для представления всего генома. С целью облегчения работы сконструированы библиотеки каждой хромосомы. У человека созданы **24 хромосомные библиотеки** (для каждой хромосомы). Если известно, в какой хромосоме локализован ген, то исследоваться будет библиотека клонов данной хромосомы.

Выделение отдельных хромосом возможно из-за отличия их по размерам и по строению. Они разделяются методом проточной цитометрии.

Библиотеки кДНК

Набор клонов, полученных на основе комплементарной ДНК, называется *библиотекой кДНК*. Будучи синтезированной на основе мРНК, кДНК соответствует только активным транскрибируемым генам, которые специфичны для данной клетки, ткани. Клонировается кДНК в фаговых или плазмидных векторах. Однако в отличие от фрагментов полученных путем рестрикции, молекулы кДНК не содержат

липких концов и для введения их в вектор к этим фрагментам "пришиваются" адапторы с липкими концами.

Гибридизация нуклеиновых кислот

Одним из свойств нуклеиновых кислот является способность к образованию гибридных молекул. Гибридные молекулы ДНК образуются при соединении двух одонитевых фрагментов от разных молекул ДНК, в одну двухцепочечную стабильную молекулу при соответствующих температуре, концентрации ионов и рН. Гибридизация ДНК обусловлена комплементарностью последовательностей азотистых оснований, составляющих эти цепи. Если цепи комплементарны, то они объединяются в двухцепочечную молекулу.

Типы гибридизации:

1. ДНК-ДНК, где одна цепь ДНК является зондом;
2. РНК-ДНК, где зондом является одна из цепей гетеродуплекса.

Важнейшим применением феномена гибридизации является получение молекулярных зондов. Молекулярные зонды представляют собой фрагмент ДНК или РНК, чаще с известной последовательностью, меченные или немеченные (при помощи радиоактивных предшественников), которые при гибридизации могут узнавать интересующие фрагменты в исследуемой молекуле нуклеиновой кислоты.

С точки зрения практического использования молекулярные зонды представляют собой прямые пути к ДНК, при помощи которых можно определить некоторые мутантные гены, даже в пренатальном периоде.

Типы молекулярных зондов;

1. "горячие" зонды – меченные радиоактивным фосфором ^{32}P или серой – ^{35}S , которые очень чувствительны, однако имеют короткий период жизни и являются опасными для

исследователей; обнаруживаются при помощи автордиографии (отпечаток на фото-пленке);

2. "холодные" зонды – фрагменты нуклеиновых кислот, меченные нейтральным химическим веществом напрямую, с использованием ферментов или флуорохромов и косвенно - биотина.

Контроль знаний:

1. Дайте определение: рекомбинантная ДНК, клонирование, клонирующие векторы, рестриктаза, сайт рестрикции, кДНК, библиотека ДНК, фрагменты рестрикции, молекулярный зонд, гибридизация ДНК.
2. Каковы этапы получения исследуемого гена из клетки?
3. Какие свойства у рестриктаз?
4. Какие векторы используются для клонирования и в чем их отличия?
5. Каковы этапы получения кДНК?
6. В чем состоит значение клонирования ДНК?
7. Для чего создаются библиотеки ДНК?
8. В чем заключается гибридизация ДНК?
9. С какой целью используются молекулярные зонды?