

Курс молекулярной биологии

Основы генной инженерии

**Генетическая инженерия -
конструирование *in vitro* функционально
активных генетических структур
(рекомбинантных ДНК)**

**Захарова Ирина Борисовна,
к.б.н., доцент**



Werner Arber



Daniel Nathans



Hamilton O. Smith

В 1978 году Даниэль Натанс, Вернер Арбер, и Хамилтон Смит удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие рестриктаз.

В 1970 году впервые выделена рестриктаза

Формально датой рождения генетической инженерии следует считать 1972 год, когда в Стенфордском университете П. Берг, С. Коэн, Х. Бойер с сотрудниками создали **первую рекомбинантную ДНК**, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага и E. coli.

- Показали как создать новую реплицирующуюся генетическую структуру, объединив разные генетические элементы
- Создали экспериментальную базу для технологии рекомбинантных ДНК
- Показали, что плазмиды могут служить носителями и векторами клонированных генов

Ферменты, используемые в молекулярном клонировании

- Эндонуклеазы рестрикции
- ДНК-лигазы
- Обратная транскриптаза
- Таq-полимераза
- Терминальная трансфераза
- ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова)
- Нуклеазы
- Щелочные фосфатазы

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)

Эти ферменты, впервые открытые как часть системы рестрикции–модификации ДНК у бактерий, специфически гидролизуют молекулы двухцепочечных ДНК при наличии в них определенных последовательностей нуклеотидов, называемых *сайтами рестрикции*.

Номенклатура

Hind III *Hinc* I первые буквы видового названия бактерий, в которых они обнаружены - *Haemophilus influenzae*, *d*, *c* - штаммы d и c. Цифры отражают последовательность открытия соответствующих рестриктаз в клетках бактерий одного вида.

Классификация рестриктаз.

Тип	Кофакторы	Структура	Особенности гидролиза ДНК
I	АТР, SAM, Mg ²⁺	Состоят из трех субъединиц с рестриктазной, метилазной и АТРазной активностями	Сайты узнавания и гидролиза разобщены
II	АТР, Mg ²⁺	Рестриктаза и метилаза – отдельные белки	Узнают специфические сайты в точке расщепления ДНК
III	АТР, Mg ²⁺	Димер с рестриктазной, метилазной активностями	Сайты узнавания и гидролиза разобщены

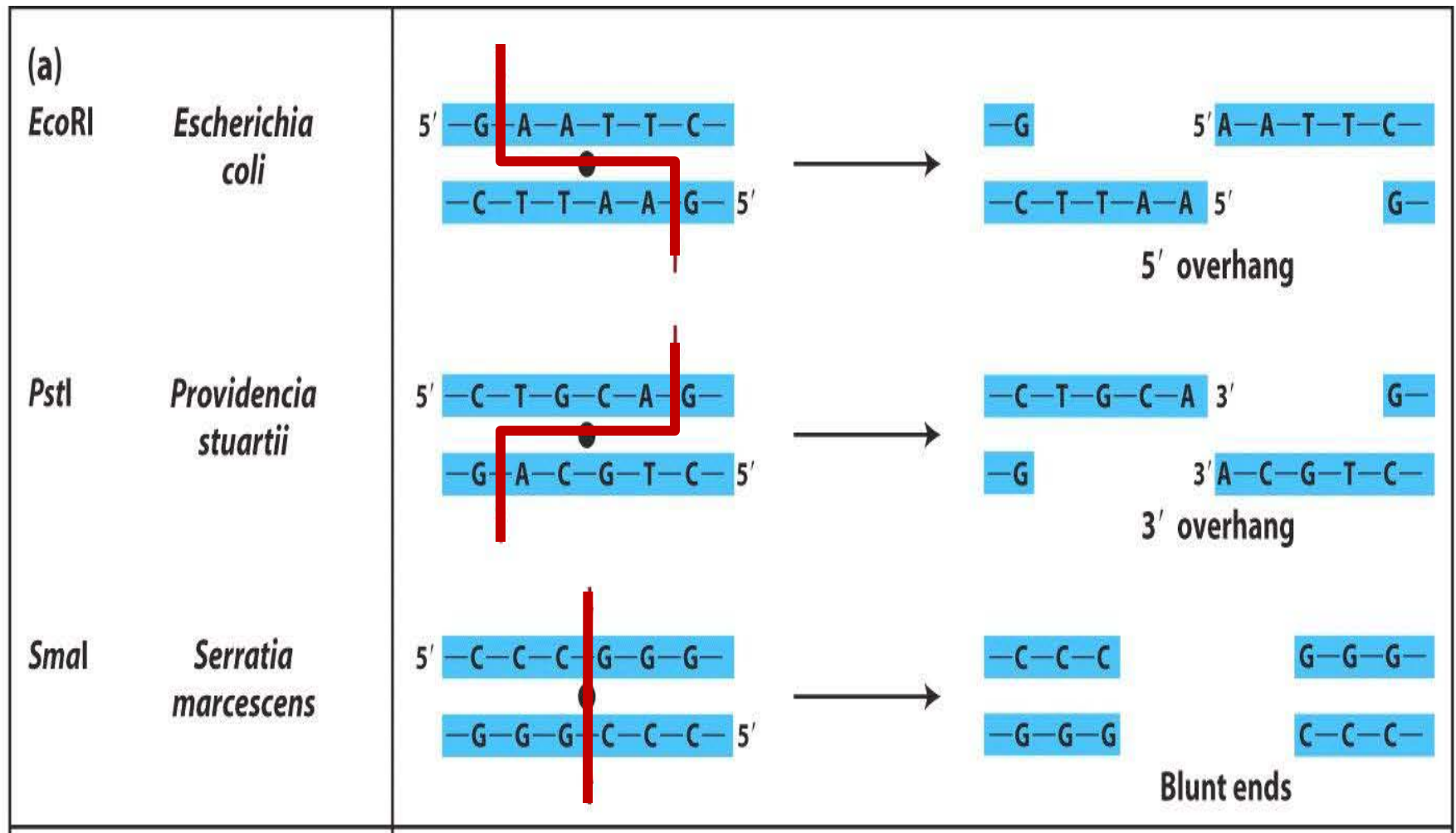
SAM - S-аденозилметионин

Рестриктазы II типа – основные инструменты генной инженерии

- Большинство рестриктаз типа II специфически узнают на ДНК тетра- и гексануклеотидные последовательности
- Для большинства сайтов, узнаваемых рестриктазами типа II, характерно наличие в них симметрии второго порядка, т.е. узнаваемые ими последовательности представляют собой **палиндромы**



Формы разрывов двухцепочечных ДНК, возникающих под действием рестриктаз



Изошизомеры и гетерошизомеры

Изошизомеры — это пары эндонуклеаз рестрикции, распознающие одинаковые последовательности и разрезающие эти последовательности в одинаковых местах:

Sph I (CGTAC[^]G) и **Bbu I** (CGTAC[^]G).

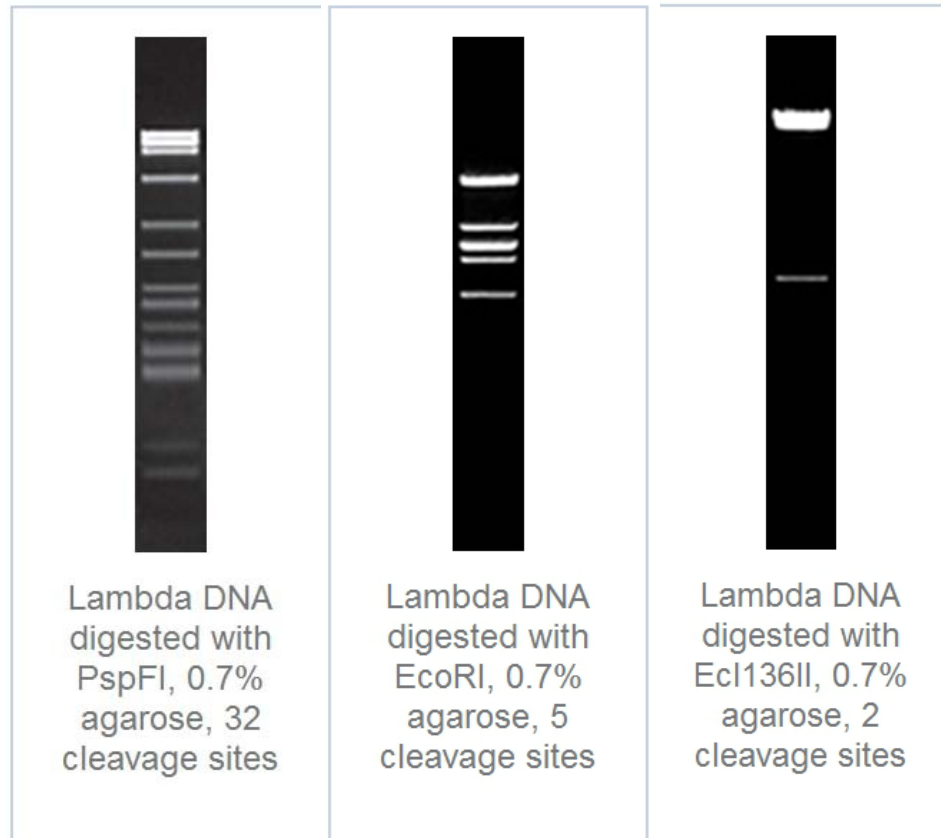
Первый выделенный фермент для узнавания и специфического разрезания заданной последовательности, называют **прототипом**, а все остальные подобные рестриктазы называют **изошизомерами**.

Фермент, узнающий такую же последовательность, но разрезающий её по-другому, называют **гетерошизомером**

Sma I (GGG[^]CCC) и **Xma I** (G[^]GGCCC)

Рестриктазы II типа в зависимости от размера сайта и длины получаемых фрагментов делят на 3 класса:

- 1. мелкощепящие - сайт рестрикации из 4 п.н.**
- 2. среднещепящие - сайт рестрикации - 6-8 п.н.**
- 3. крупнощепящие - сайт рестрикации - 10-14 п.н.**



ДНК-лигазы - объединяют вектор со вставкой и фрагменты ДНК друг с другом, а также замыкают разрезанный вектор в кольцо.

- Наибольшее применение в генно-инженерных исследованиях находит АТР-зависимая ДНК-лигаза бактериофага Т4.
- Т4-ДНК-лигаза осуществляет соединение фрагментов дцДНК, обладающих комплементарными "липкими" или "тупыми" концами.

Щелочные фосфатазы - применяются для повышения эффективности клонирования - для предотвращения лигирования векторных молекул ДНК самих на себя. Удаление фосфата с 5'-концевых нуклеотидов вектора или вставки снижает вероятность самолигирования — смыкания вектора без вставки либо разных вставок друг с другом, а не с вектором.

Полинуклеотидкиназы и Терминальные трансферазы используют для введения концевой радиоактивной (или иной) метки.

Добавление фосфата иногда нужно для компенсации удаленного, а иногда — для замены обычного на меченый (для секвенирования и приготовления зондов).

ДНК-полимераза I *E.coli* и фрагмент Кленова

Фрагмент Кленова – это большой фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli*, у которой отсутствует домен, соответствующий 5'→3'-экзонуклеазе.

Фрагмент Кленова используют

- для синтеза второй цепи кДНК,
- секвенирования ДНК по методу Сэнгера,
- заполнения 5'-выступающих "липких" концов ДНК с образованием "тупых"
- введения концевой радиоактивной метки,
- для удаления 3'-выступающих концов рестрикционных фрагментов ДНК 3'→5'-экзонуклеазой этого фермента.

Использование ПЦР в генной инженерии

- Для получения большого количества клонируемого фрагмента.
- В праймеры можно внести сайты рестрикции для удобства лигирования вставки и вектора.
- Для мечения ДНК, если в реакционную смесь добавить меченые dNTP.
- Для проверки эффективности клонирования.
- Для оценки экспрессии генов.

ПОНЯТИЕ ВЕКТОРА

Векторами для молекулярного клонирования являются молекулы ДНК, которые могут доставлять в клетку-хозяина чужеродную ДНК.

Обязательные свойства:

- 1. любой вектор должен длительное время существовать в популяции клеток-хозяев, т.е. реплицироваться автономно**
- 2. в любом векторе должны быть генетические маркеры, которые позволяли бы обнаруживать его присутствие в клетках, дифференцируя состояния «пустой» и со «вставкой»**
- 3. структура векторной молекулы должна допускать встраивание в нее чужеродной последовательности нуклеотидов без нарушения ее функциональной целостности**

• **Плазмиды** – векторы на основе плазмид были созданы первыми и широко используются до настоящего времени.

• **Фаги**. Первыми были разработаны векторы на основе фага λ E. coli. ДНК фага λ составляет примерно 50 т.п.н. Значительная часть несущественна для размножения фага и может быть заменена на чужеродную ДНК. В фаге можно клонировать фрагмент ДНК до 25 т.п.н.

• **Космиды, фагмиды** – векторы, объединяющие в себе свойства плазмиды и фага. Созданы искусственно. Могут амплифицироваться в бактерии как плазмиды и упаковываться в фаговый капсид. Могут включать вставку чужеродной ДНК до 45 т.п.н.

• **Искусственная дрожжевая хромосома** (yeast artificial chromosome – YAC). Применяются для клонирования больших фрагментов ДНК (от 100 до 1000 т.п.н.) эукариот.

Емкость векторов

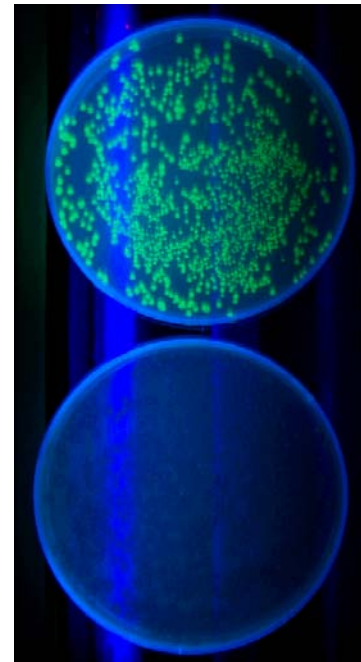
- **Plasmide 15 kbp**
- **Phage λ 25 kbp**
- **Cosmide 45 kbp**
- **BAC : Bacterial Artificial Chromosome 100-350 kb**
- **YAC : Yeast Artificial Chromosome 300-500 kb**

Маркерные гены

Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам

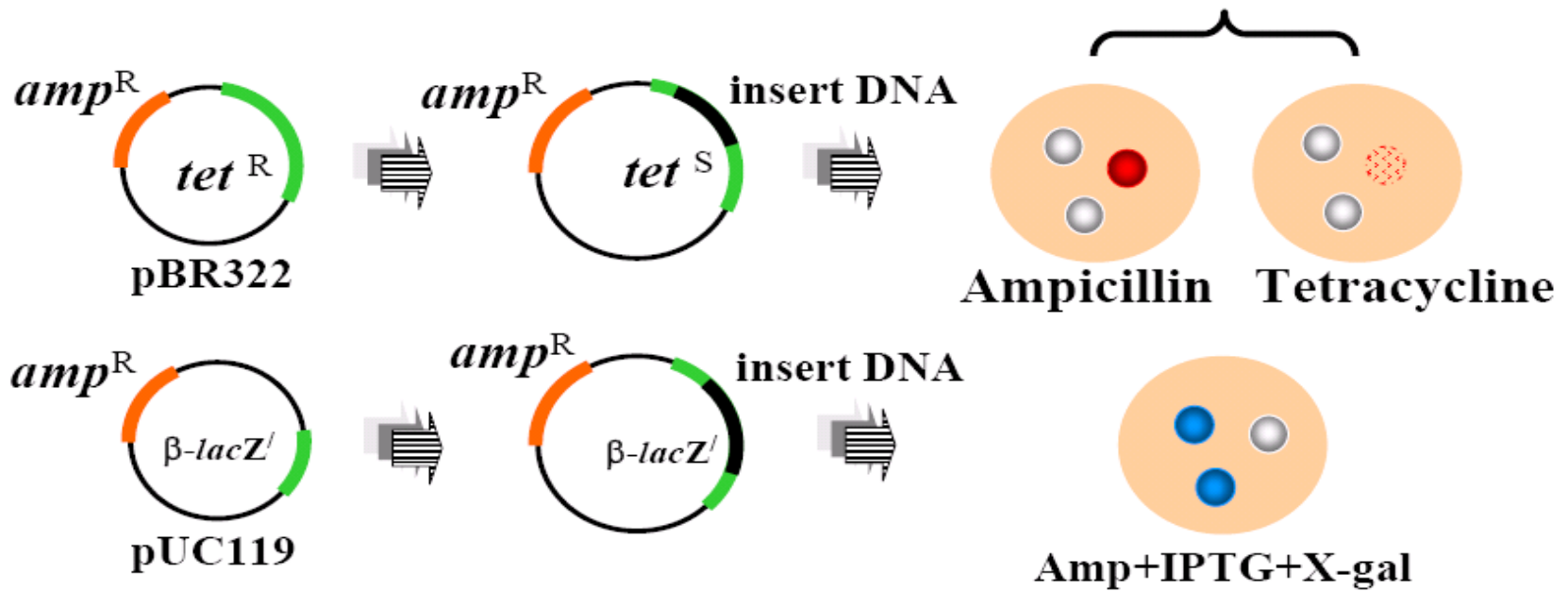
Репортерные гены, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

- **SEAP** (secreted alkaline phosphatase)
- **β - galactosidase**
- **GFP** (green fluorescent protein)



Экспрессия гена GFP в клетках *E.coli*

Векторы первых поколений



Особенности строения плазмидных векторов на примере полифункционального вектора Bluescript.

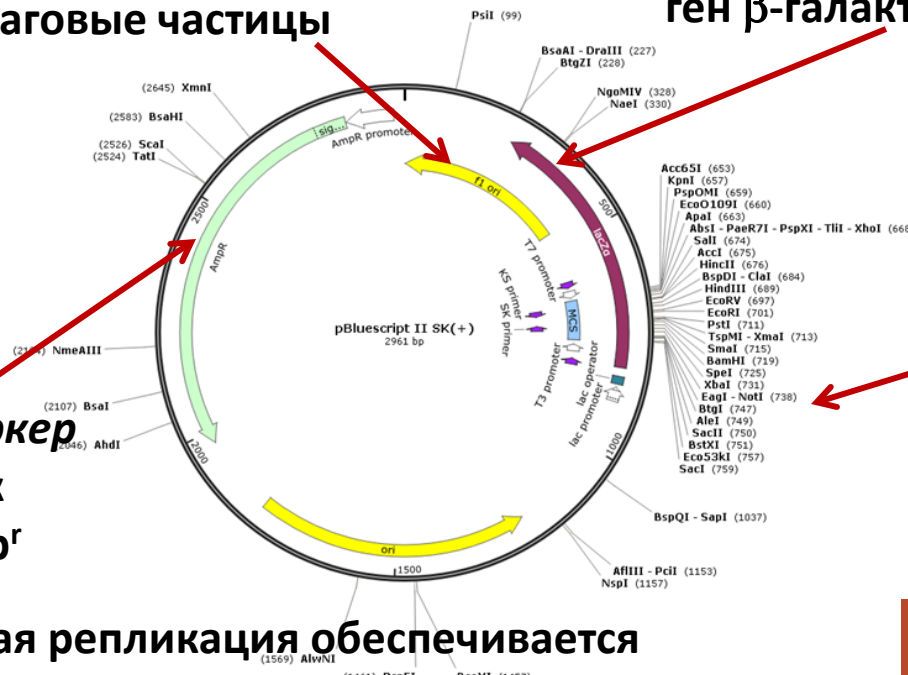
Последовательности фага, необходимые для его репликации и упаковки ее в фаговые частицы

Отбор рекомбинантных клонов ген β -галактозидазы *lacZ*

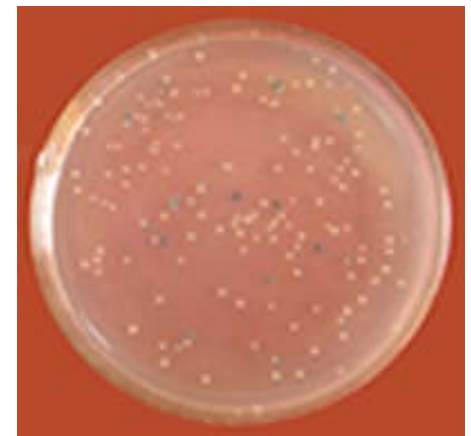
Селективный маркер ген устойчивости к ампициллину Amp^r

Автономная репликация обеспечивается наличием области начала репликации

В результате встраивания клонируемого фрагмента ДНК в полилинкер происходят разрыв гена *lacZ* и инактивация β -галактозидазы – колонии бактерий, содержащие этот вектор со вставкой клонированной ДНК белые; без вставки – синие



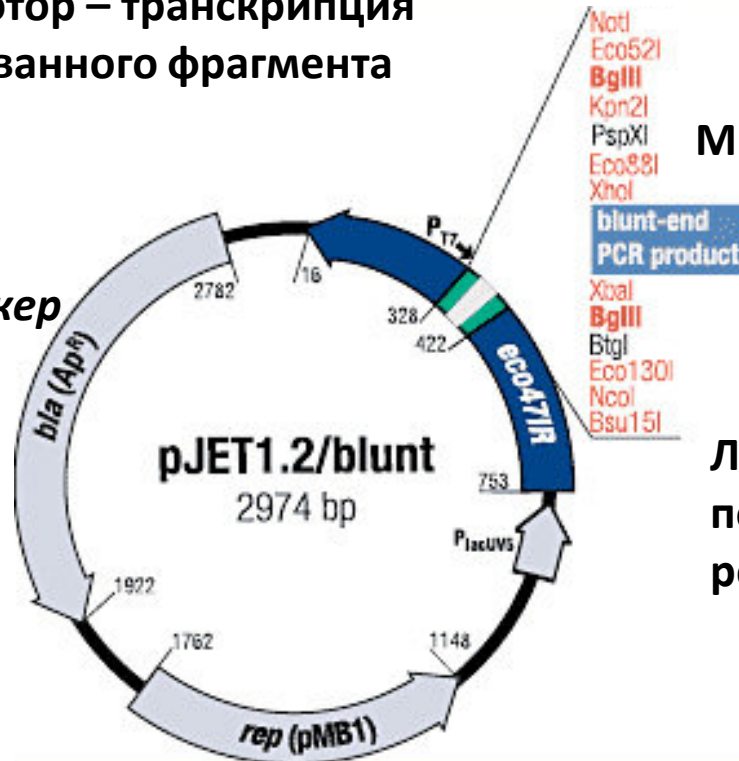
Полилинкер (MCS)



Особенности суицидных плазмидных векторов

T7 промотор – транскрипция клонированного фрагмента

Селективный маркер
Ген β -лактамазы



Multiple cloning site (MCS)

Летальный ген *eco47IR* –
позитивная селекция
рекомбинантных клонов

- Клоны, получившие интактный вектор нежизнеспособны
- Вырастают только колонии бактерий, содержащие вектор со вставкой клонированной ДНК

Компоненты экспрессирующих векторов

Вектор, содержащий необходимые элементы для трансляции клонируемой ДНК называется экспрессионным.

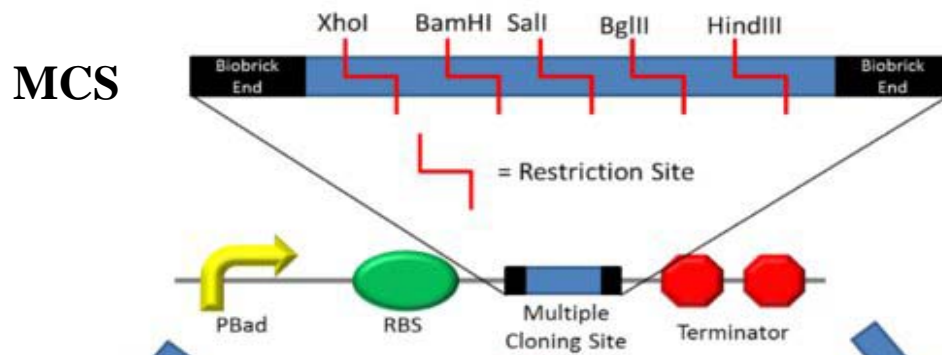
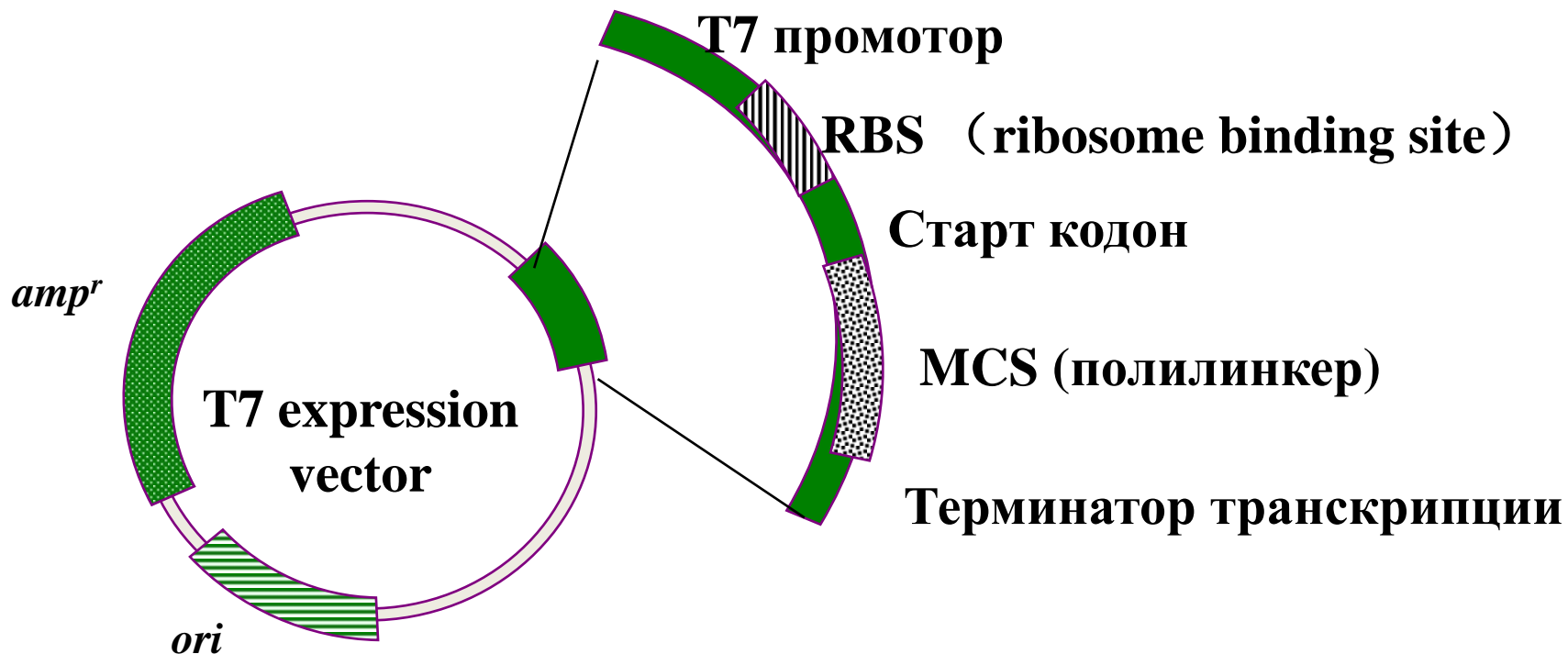
1. Сайт инициации репликации
2. Селективный ген, предназначенный для отличия содержащих рекомбинантную конструкцию клеток от исходных. Чаще всего используют гены устойчивости к различным антибиотикам, например, популярен ген β -лактамазы, придающий устойчивость к ампициллину.
3. Множественный клонирующий сайт (полилинкер, MCS), состоящий из близкорасположенных уникальных сайтов нескольких эндонуклеаз рестрикции (единственных в данном векторе)

4. Сигнальные и регуляторные элементы экспрессии:

- **регулируемый промотор,**
- **регуляторные элементы транскрипции и трансляции (энхансеры и структуры, стабилизирующие мРНК)**
- **сайт связывания рибосом,**
- **терминаторы трансляции и транскрипции**

5. Ген-репрессор транскрипции с векторного индуцибельного промотора

Компоненты экспрессирующих векторов



Система вектор-хозяин

Система вектор-хозяин не может быть произвольной: вектор должен соответствовать клетке-хозяину, его выбор зависит от вида хозяина и целей исследования.

Вектор и хозяин должны быть комплементарны:

- ✓ Совместимость вектора с бактериальным штаммом: есть ли в каждом из них нужные мутации и нет ли нежелательных. Например, не во всех штаммах возможна детекция рекомбинантов с помощью сине-белого теста.
- ✓ Если селекция построена на ауксотрофности, то у штамма должен быть отключен ген какого-то фермента, чтобы проникший в клетку вектор компенсировал дефект аналогичным геном.
- ✓ Если селекция построена на резистентности, штамм должен быть чувствительным к выбранному антибиотику

Этапы клонирования

Получение материала для клонирования: выделение ДНК или РНК, или амплификация нужного локуса.

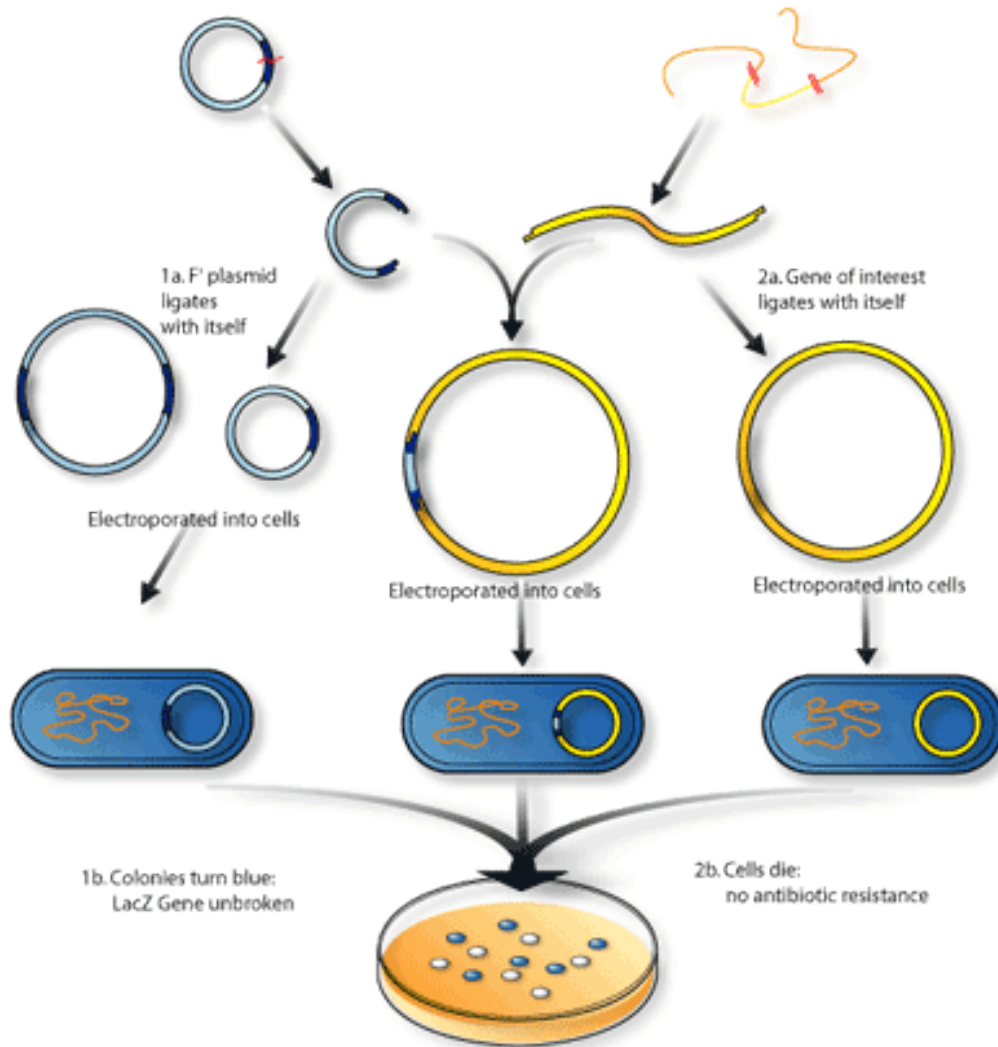
Подготовка вектора и вставки к клонированию: разрезание вектора рестриктазами и модификация концов вектора и/или фрагмента.

Лигирование - фрагмент с нужным геном сшивают с вектором. Для оптимального результата в лигазную смесь рекомендуют вносить вставки в 10 раз больше, чем вектора.

Введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки трансформацией компетентных клеток или электропорацией (электротрансформацией). Трансформированные бактерии при этом приобретают определенные свойства. Каждая из трансформированных бактерий размножается и образует колонию из многих тысяч потомков – клон.

Скрининг - отбор рекомбинантных клонов среди трансформированных бактерий.

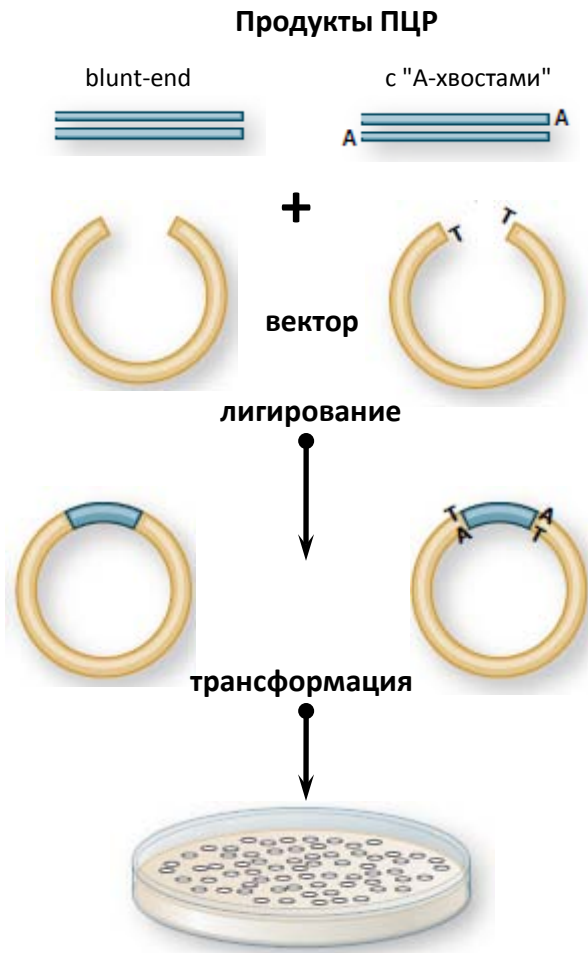
Схема клонирования



Клонирование продуктов ПЦР

Как правило, продукты ПЦР содержат либо тупые, либо 3'-выступающие концы, образующиеся за счет нематричного присоединения аденина Taq-полимеразой.

Варианты традиционного клонирования продуктов ПЦР



ТА-клонирование

Продукты с "А-хвостами" лигируют с вектором с "Т-хвостами" с использованием ДНК-лигазы T4 и последующей трансформацией.

Клонирование по тупым концам (blunt-end)

Фрагменты с тупыми концами соединяются с плазмидным вектором посредством типичной реакции лигирования или с использованием «активированного» вектора, который содержит ковалентно присоединенный фермент, обычно топоизомерзу I, облегчающую соединение вектора и вставки.

Идентификация рекомбинантных бактериальных клонов

Сине-белый тест

Метод основан на принципе α -комплементации гена *lacZ* β -галактозидазы.

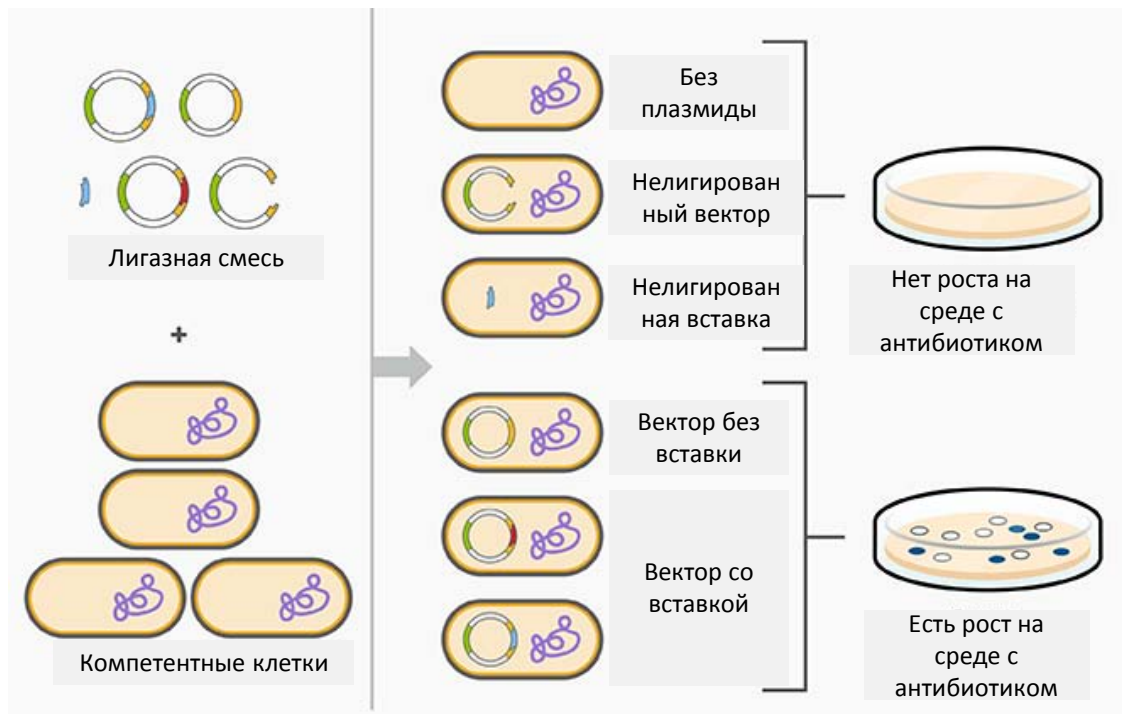
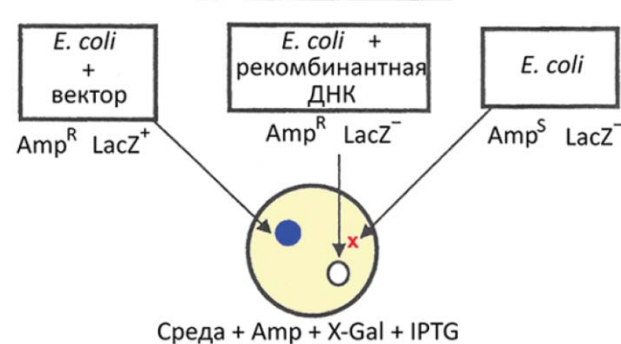
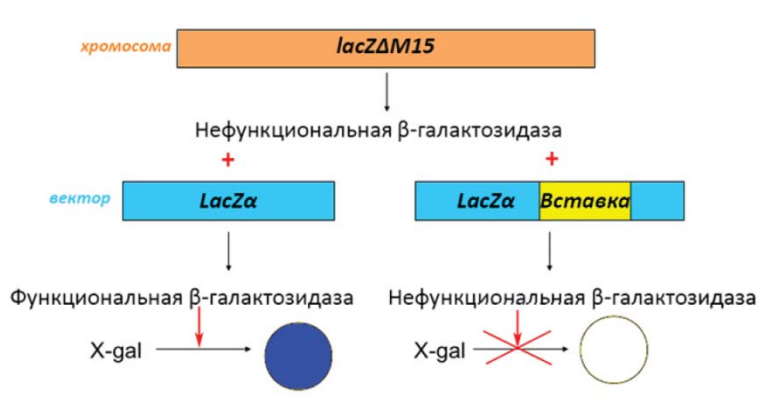
У реципиентного штамма *E. coli* в гене *lacZ* удалили начальный фрагмент (*lacZ* Δ M15), и этот фрагмент — *lacZ* α — поместили в вектор. Соответственно, полноценная β -галактозидаза образуется только в клетке с вектором.

Субстратом для β -галактозидазы и индуктором *lac*-оперона служит лактоза.

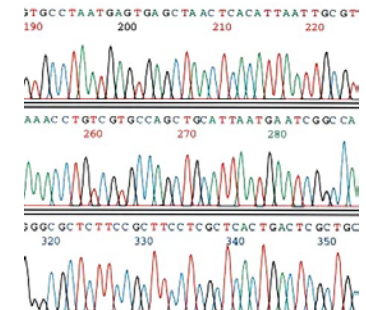
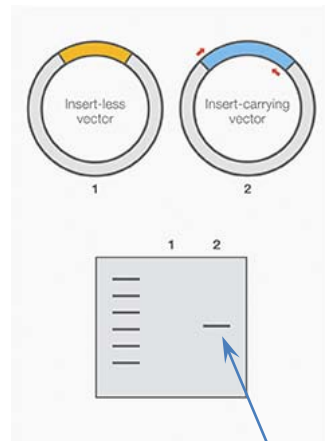
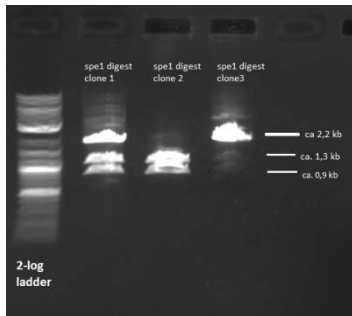
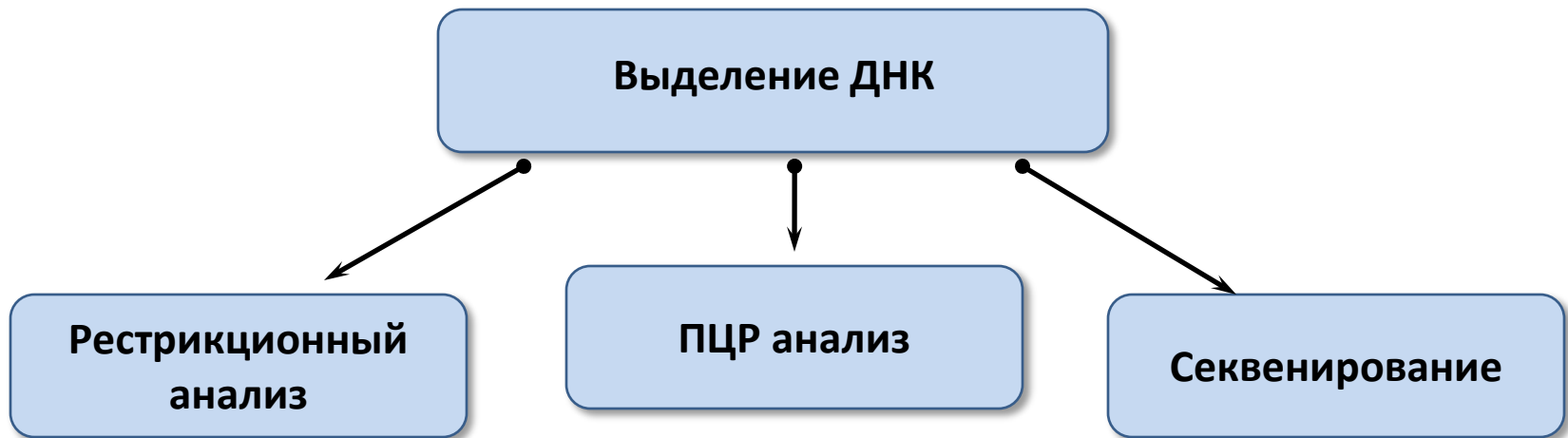
Для выращивания трансформированных бактерий используют богатую среду с антибиотиком, IPTG (индуктор экспрессии *lacZ*) и хромогенным субстратом X-Gal, который расщепляется β -галактозидазой с образованием синего пигмента.



Сине-белый тест

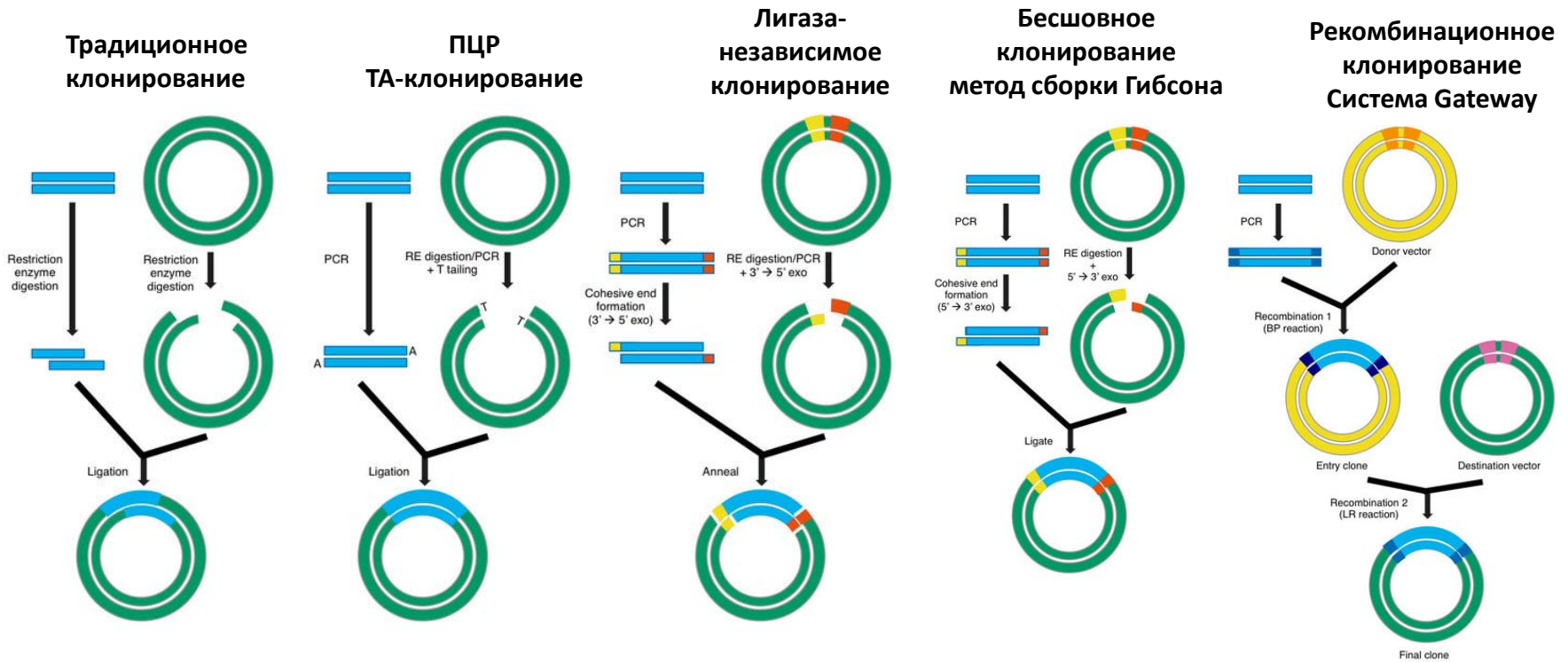


Анализ рекомбинантных бактериальных клонов



Аmplification of the insert

Основные методологии молекулярного клонирования



ПЦР-клонирование включает прямое лигирование ПЦР-генерируемого фрагмента ДНК без использования рестрикционных ферментов для разрезания вставки.

Независимое от лигирования клонирование (ЛИС) обычно выполняется путем добавления к клонируемому фрагменту коротких последовательностей ДНК, гомологичных вектору (с помощью модифицированных праймеров во время ПЦР).

Бесшовное клонирование представляет собой группу методов, позволяющих независимую от последовательности вставку одного или нескольких фрагментов ДНК в вектор.

Рекомбинационное клонирование использует сайт-специфические ДНК-рекомбиназы, способные «обменивать» фрагменты ДНК между двумя молекулами, содержащими сайты рекомбинации.