

# Получение продуцентов с помощью генной инженерии



# 1. Сущность и задачи генной инженерии.

Генная инженерия, или техника рекомбинантных ДНК, - это совокупность приемов, позволяющих **in vitro** перенести генетический материал из **одного организма** (источника генов) в **другой** (реципиент) так, чтобы обеспечить **наследование этих генов** в новом для них организме.

Одной из главных задач генной инженерии является **получение организмов с желаемыми свойствами.**

# 1. Сущность и задачи генной инженерии.

Методами генной инженерии возможно **преодолевать межвидовые барьеры**, то есть переносить гены и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим (напр., от человека или животного - бактериям, растениям и др.).

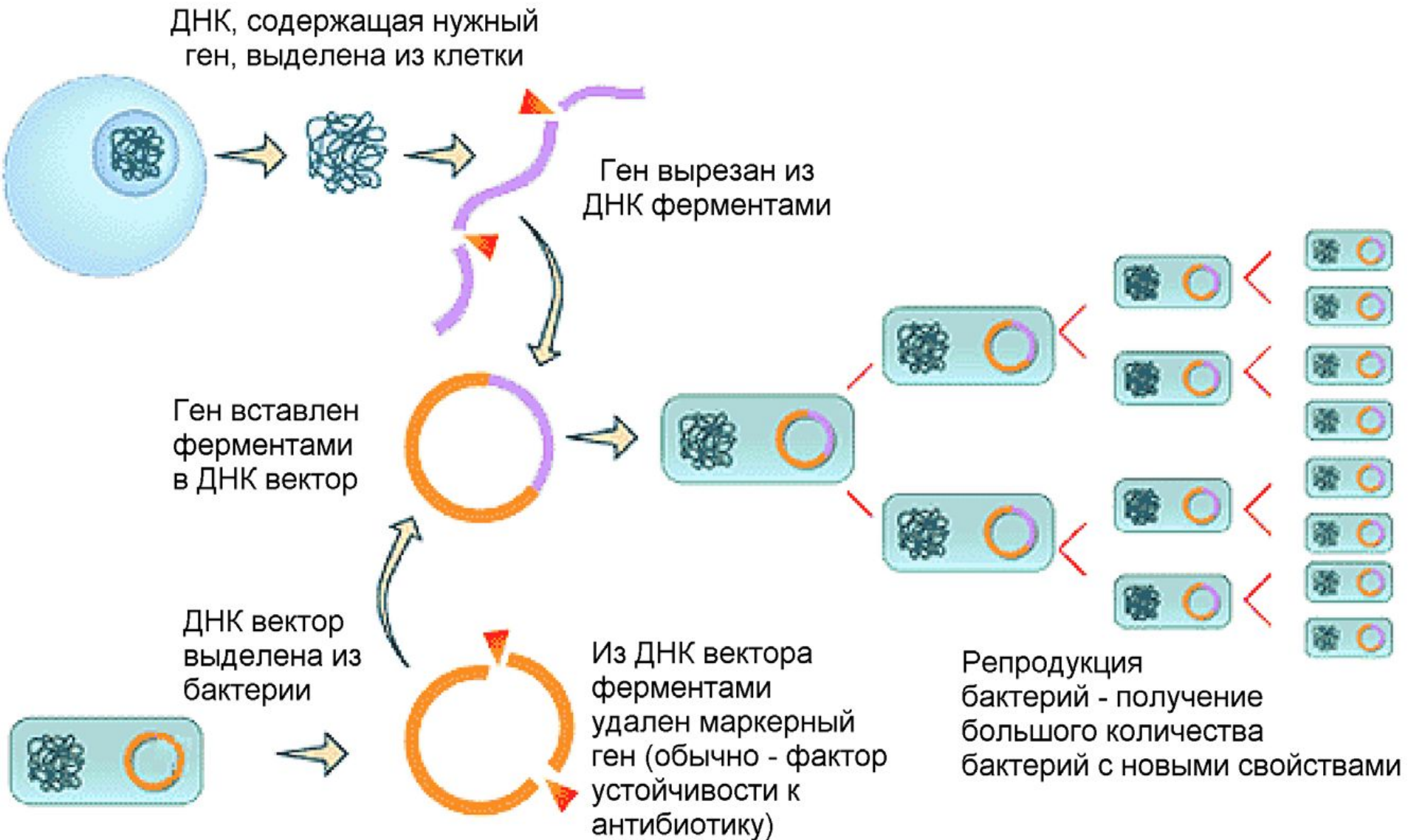
**Генетически модифицированные** микроорганизмы (трансгенные или рекомбинантные), обладающие сверхпродукцией **получены для производства инсулина, соматотропина, интерферона и многих других белков.**

## 2. Этапы получения генетически модифицированных микр–продуцентов

- I выделение нужного (целевого) гена;
- II встраивание гена в генетический элемент, способный к репликации (вектор);
- III введение вектора в организм-реципиент;
- VI идентификация (скрининг) и отбор клеток, которые приобрели желаемый ген или гены.

**I Выделение нужного (целевого) гена** – один из главных этапов в генетической инженерии. Существует два основных способа получения гена: ***синтез и выделение из ДНК.***

# Схема основных этапов генетической инженерии



# I.1) Синтез гена осуществляется 2-мя путями

**А. Химико-ферментативный синтез генов** применяют наиболее часто.

Химическим путем синтез олигонуклеотиды или праймеры (короткие одноцепочечные фрагменты ДНК - 8-16 нуклеотидов), а гены синтезируют ферментативным методом с помощью ПЦР.

# I.1) Синтез гена осуществляется 2-мя путями

## ***Б. Синтез генов с помощью обратной транскрипции на мРНК.***

Выделяют мРНК соответствующего гена из полирибосом и используют ее в качестве матрицы для фермента ревертазы.

Метод основан на универсальной способности обратных транскриптаз синтезировать двунитевую ДНК (кДНК) на однонитевых РНК-матрицах.

## I.1) Синтез гена осуществляется 2-мя путями

Гены также могут быть получены из уже созданных геномных библиотек, которые представляют собой совокупность фрагментов геномной ДНК какого-либо организма или из библиотек кДНК.



I. 2) Выделение гена из ДНК клетки с нужными свойствами.

Необходимо точно знать расположение гена и вырезать его при помощи рестриктаз. Каждая из рестриктаз узнает свой **сайт рестрикции** и разрезает ДНК либо внутри сайта, либо в непосредственной близости от него.

II Встраивание гена в генетический элемент, способный к репликации (вектор).

Выделенный или синтезированный ген не может самостоятельно встраиваться в ДНК клетки-мишени и тем более начинать функционировать. Для переноса целевого гена создают специальную конструкцию - **вектор**, несущий полученный ген и способный встраиваться в геном клетки.

## II 1. Требования к генетическим векторам:

- вектор должен **быть небольшим и содержать сайты рестрикции** для нескольких рестриктаз, должен **обладать определенной емкостью**;
- вектор должен иметь точку начала репликации (**ori**), т.е. автономно реплицироваться, накапливаться в многочисленных копиях в клетке хозяина и сохраняться в дочерних клетках при делении материнской;

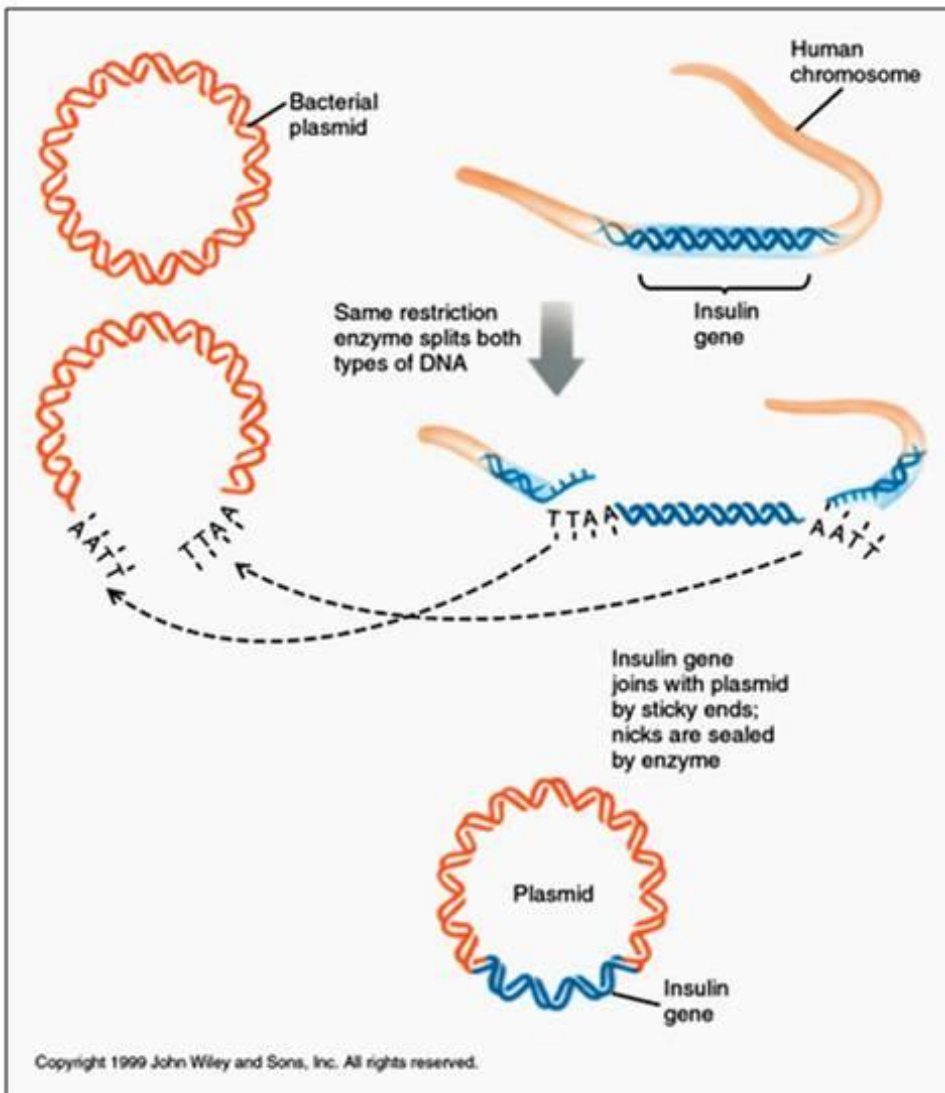
## II 1. Требования к генетическим векторам:

иметь **функциональный ген промотор** (прокариотический или эукариотический), способный экспрессироваться в клетке;

- должен **иметь маркерный ген**, позволяющий различать гибридные клетки для **эффективной селекции**;

- должен **быть способным передаваться в клетку** соответствующего организма.

# Генная инженерия

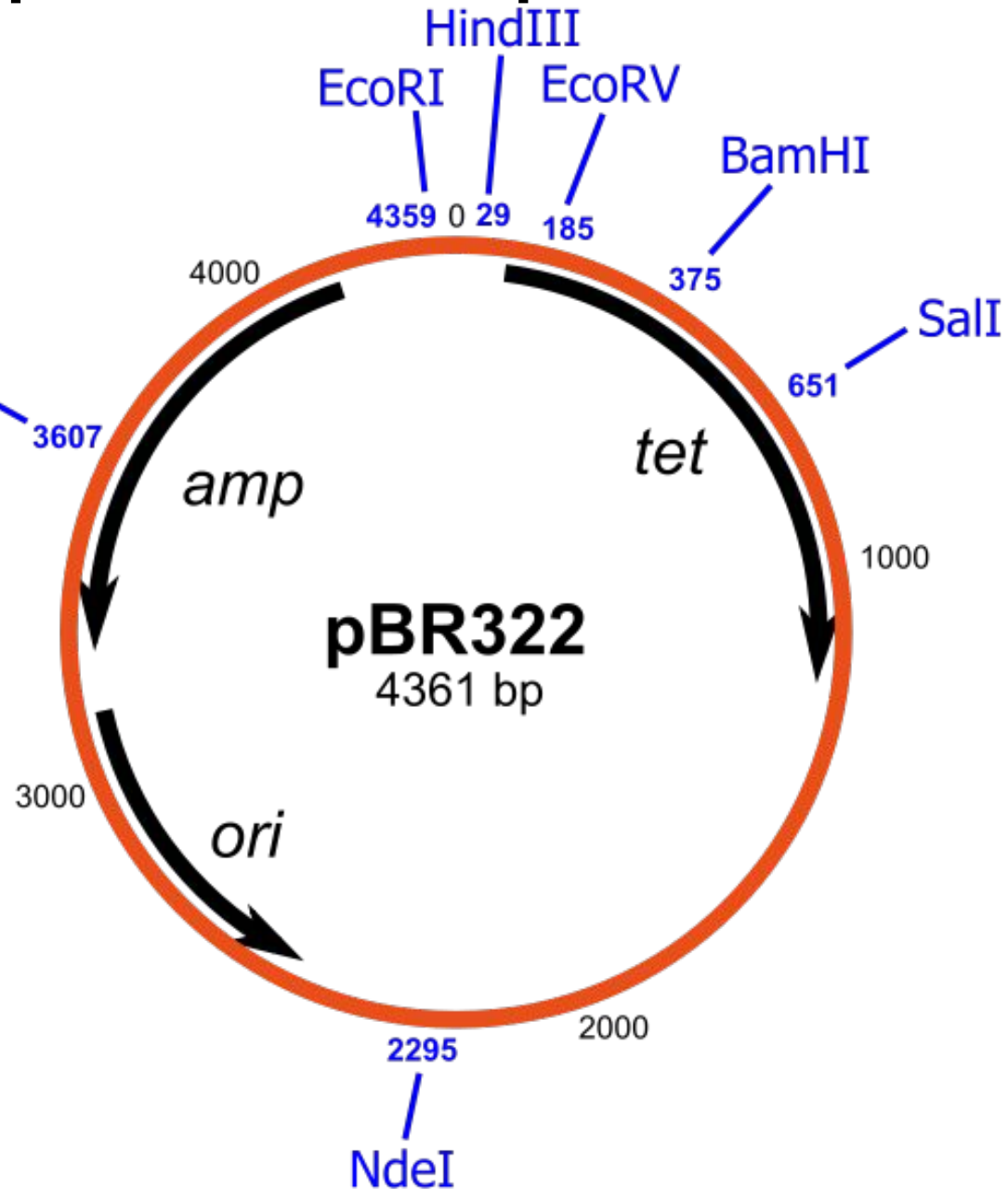


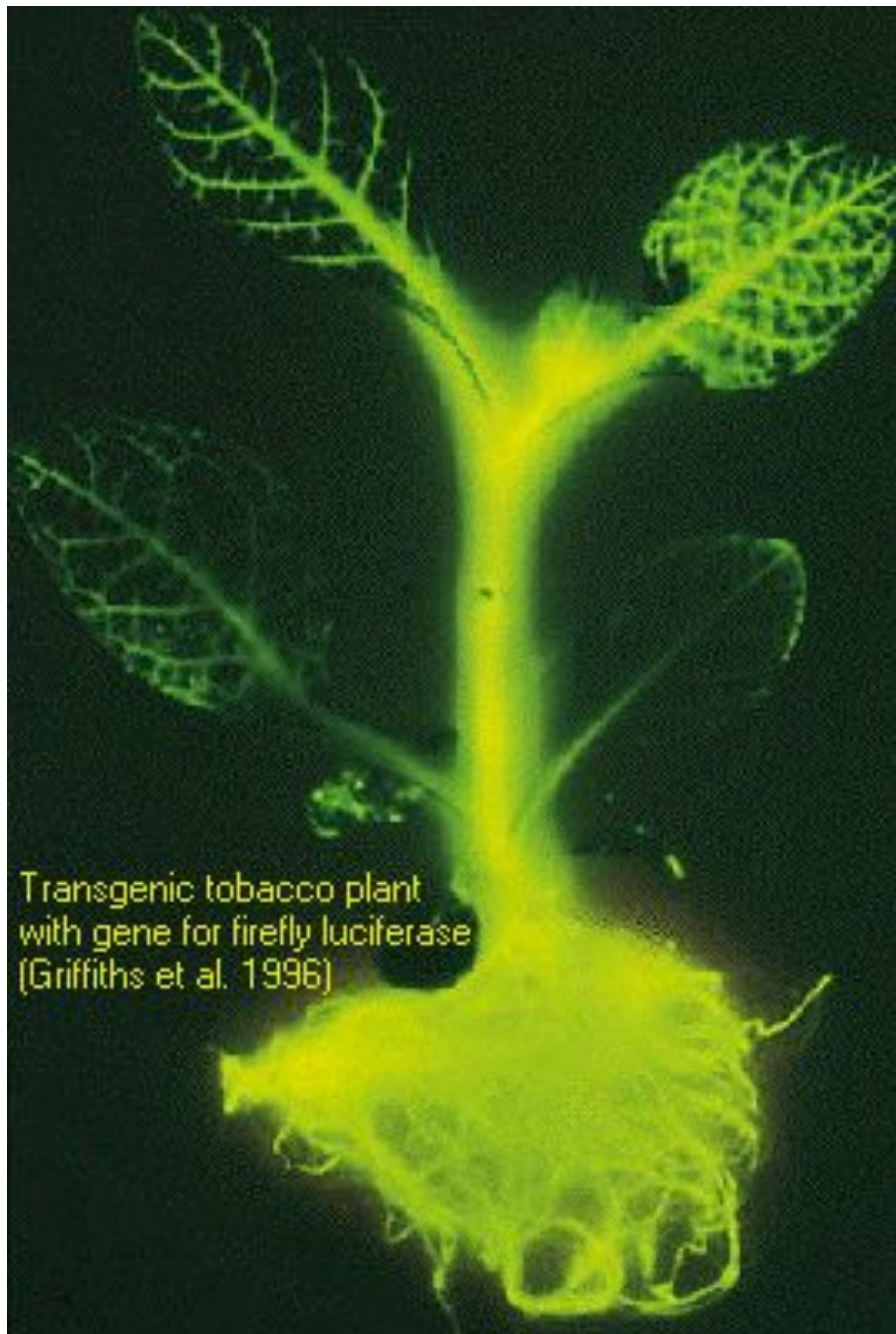
«Вырезании» генов проводят с помощью специальных «генетических ножниц», ферментов — *рестриктаз*, затем ген «вшивают» в вектор — *плазмиду*, с помощью которого ген вводится в бактерию.

«Вшивание» осуществляется с помощью другой группы ферментов — *лигаз*. Причем вектор должен содержать все необходимое для управления работой этого гена — промотор, терминатор, ген-оператор и ген-регулятор. Кроме того, вектор должен содержать маркерные гены, которые придают клетке-реципиенту новые свойства, позволяющие отличить эту клетку от исходных клеток.

# Генетическая карта плазмиды pBR322.

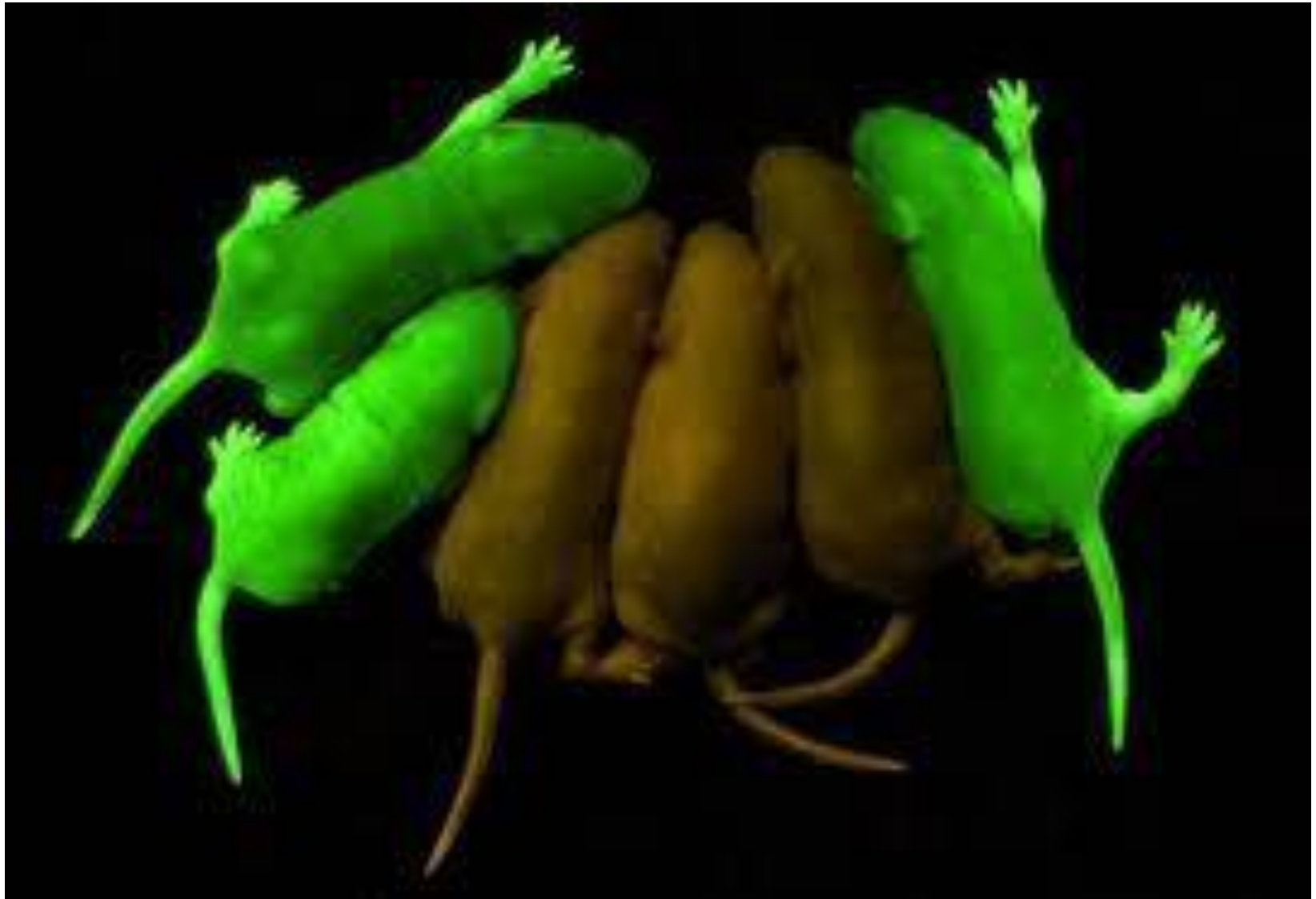
Одна из наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования. pBR322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*. Эта плазмида несет **гены** устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину (ген *amp*) и тетрациклину (ген *tet*), а также уникальные сайты для *Bam*HI, *Hind* III и *Sal* I в гене *Tet*





Transgenic tobacco plant  
with gene for firefly luciferase  
(Griffiths et al. 1996)

**Маркерные  
гены  
флуоресценции  
у  
генномодифици  
рованного  
растения**



**Маркерные гены флуоресценции у  
генномодифицированных мышей**



## II 2. Характеристика векторов для переноса генетической информации в прокариотические клетки.

В качестве **прокариотических** векторов чаще используют **плазмиды бактерий, бактериофаги.**

**Плазмиды бактерий** способны реплицироваться независимо от хромосомы это их **главное свойство.** Плазмиды могут быть выделены из клетки и использованы в неповрежденном, нативном состоянии. В векторной плазмиде *E.coli* **pBR322** есть **маркерные гены** устойчивости к ампициллину и к тетрациклину.

## II 2. Характеристика векторов для переноса генетической информации в прокариотические клетки.

Бактериальные клетки, содержащие такой вектор, устойчивы одновременно к ампициллину и тетрациклину. Плазмидные векторы удобны для клонирования небольших фрагментов (до 10 тыс. пар оснований) геномов, т.е. плазмидные векторы обладают небольшой емкостью.

## II 2. Характеристика векторов для переноса генетической информации в прокариотические клетки.

**Бактериофаги** – вирусы бактерий способны встраиваться в геном клетки хозяина (вызывать лизогенизацию).

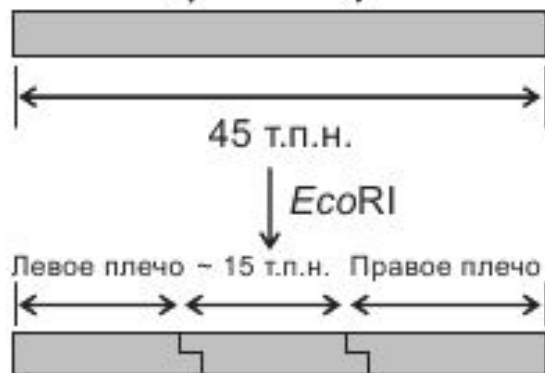
Бактериофаги широко распространены в природе — их выделяют из воды, почвы, организмов различных животных и человека. Большинство фагов ДНК-содержащие вирусы, имеют смешанный тип симметрии капсида. Широко используют векторы на основе бактериофагов *E.coli* -  $\lambda$  и **M13**.

## II 2. Характеристика векторов для переноса генетической информации в прокариотические клетки.

Из ДНК фага удаляют области, **не существенные для репликации** в клетках *E.coli*, и оставляют сайты, предназначенные для проникновения и встраивания фага в геном клетки хозяина (фаговый вектор должен проникнуть в клетку и встроиться в геном). В эту же область **встраивают целевой и маркерные гены**. На основе бактериофага  $\lambda$  можно сконструировать векторы емкостью до 25 т.п.н.

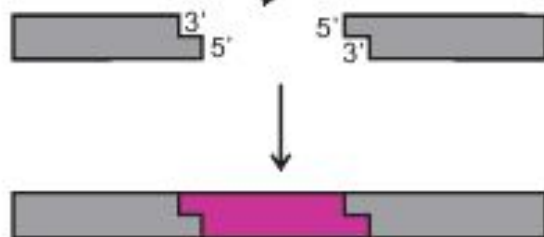
## ДНК фага λ

*EcoRI*    *EcoRI*



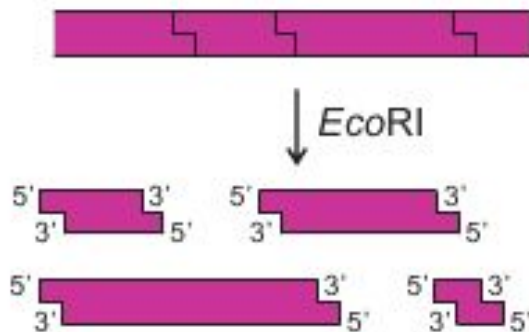
Не влияет на репликацию фага

Плечи содержат все гены необходимые для репликации, но слишком малы для упаковки



Упаковка ДНК в частицу фага λ  
заражение клеток *E. coli* для  
размножения фага и клонирования ДНК

## Клонлируемая ДНК



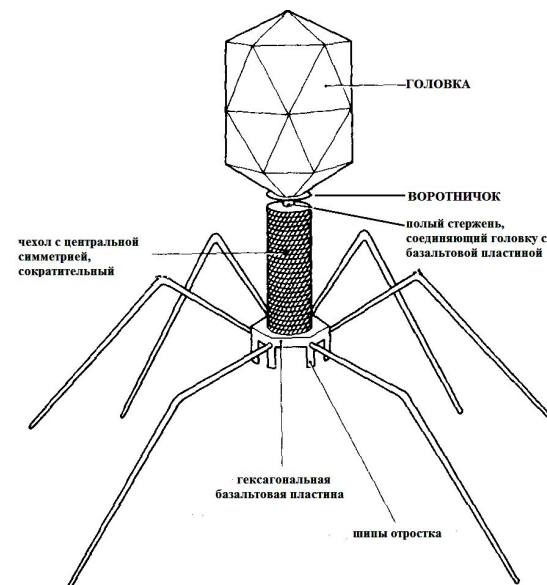
Рестрикционные фрагменты  
различного размера

15 т.п.н.



Фрагмент подходящего  
размера для упаковки

# Схема создания векторной конструкции использовани ем фага



## II 3. Характеристика векторов для переноса генетической информации в эукариотические клетки.

В качестве **эукариотических** векторов используют вирусы животных и растений, **Ti** плазмиды агробактерий (***Agrobacterium tumefaciens***), а также искусственно сконструированные векторы, способные реплицироваться как в бактериальных, так и в эукариотических клетках (челночные векторы).

## II 4. Создание генетической конструкции.

Очищенную кольцевую плазмиду *E.coli* **pBR322** обрабатывают ферментом рестриктазой ***Bam*H1**, которая специфически разрезает плазмиду в единственном сайте, расположенном в гене устойчивости к тетрациклину, так что образуется ***линейная молекула с липкими концами***. Такие молекулы смешивают с подготовленным участком ДНК (с нужным геном), содержащим комплементарные липкие концы.

# Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

Рестриктазы	Участки распознавания и места разреза ДНК
Bam I	$5' - \overset{\vee}{\text{Г}} - \text{Г} - \text{А} - \text{Т} - \text{Ц} - \text{Ц} - 3'$ $3' - \text{Ц} - \text{Ц} - \text{Т} - \text{А} - \text{Г} - \underset{\wedge}{\text{Г}} - 5'$
EcoR I	$5' - \overset{\vee}{\text{Г}} - \text{А} - \text{А} - \text{Т} - \text{Т} - \text{Ц} - 3'$ $3' - \text{Ц} - \text{Т} - \text{Т} - \text{А} - \text{А} - \underset{\wedge}{\text{Г}} - 5'$
Hind III	$5' - \overset{\vee}{\text{А}} - \text{А} - \text{Г} - \text{Ц} - \text{Т} - \text{Т} - 3'$ $3' - \text{Т} - \text{Т} - \text{Ц} - \text{Г} - \text{А} - \underset{\wedge}{\text{А}} - 5'$
Hae III	$5' - \text{Г} - \text{Г} - \overset{\vee}{\text{Ц}} - \text{Ц} - 3'$ $3' - \text{Ц} - \text{Ц} - \underset{\wedge}{\text{Г}} - \text{Г} - 5'$
Hpa II	$5' - \overset{\vee}{\text{Ц}} - \text{Ц} - \text{Г} - \text{Г} - 3'$ $3' - \text{Г} - \text{Г} - \text{Ц} - \underset{\wedge}{\text{Ц}} - 5'$
Sma I	$5' - \text{Ц} - \text{Ц} - \text{Ц} - \overset{\vee}{\text{Г}} - \text{Г} - \text{Г} - 3'$ $3' - \text{Г} - \text{Г} - \underset{\wedge}{\text{Г}} - \text{Ц} - \text{Ц} - \text{Ц} - 5'$



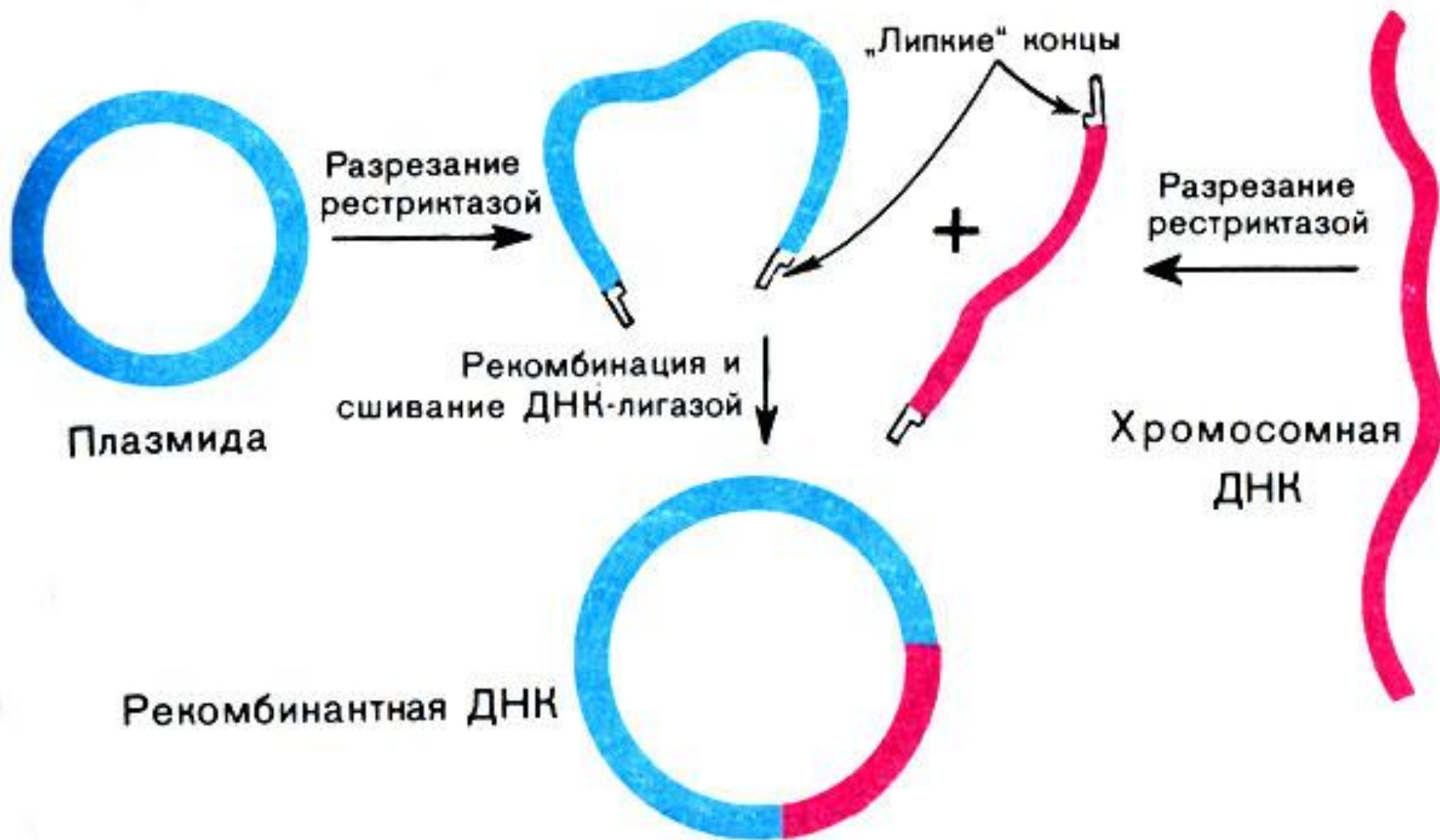
# Выделение генов из ДНК проводят с помощью рестриктаз



а) схема действия фермента рестриктазы ***EcoRI*** на двухцеп мол ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза;

б) фрагменты **ДНК** с **липкими концами** после разрезания ферментом ***EcoRI***. Возможно расщ-е ДНК со сдвигом, при этом одна из нитей выступает на несколько нуклеотидов. «**Липкие**» концы в силу своей комплементарности вступают во взаимодействие.

# Схема получения рекомбинантной ДНК по Коену -Бойеру



## II 4. Создание генетической конструкции.

Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул. Далее смесь обрабатывают ДНК-лигазой для сшивания комплементарных концов нужного гена и вектора.

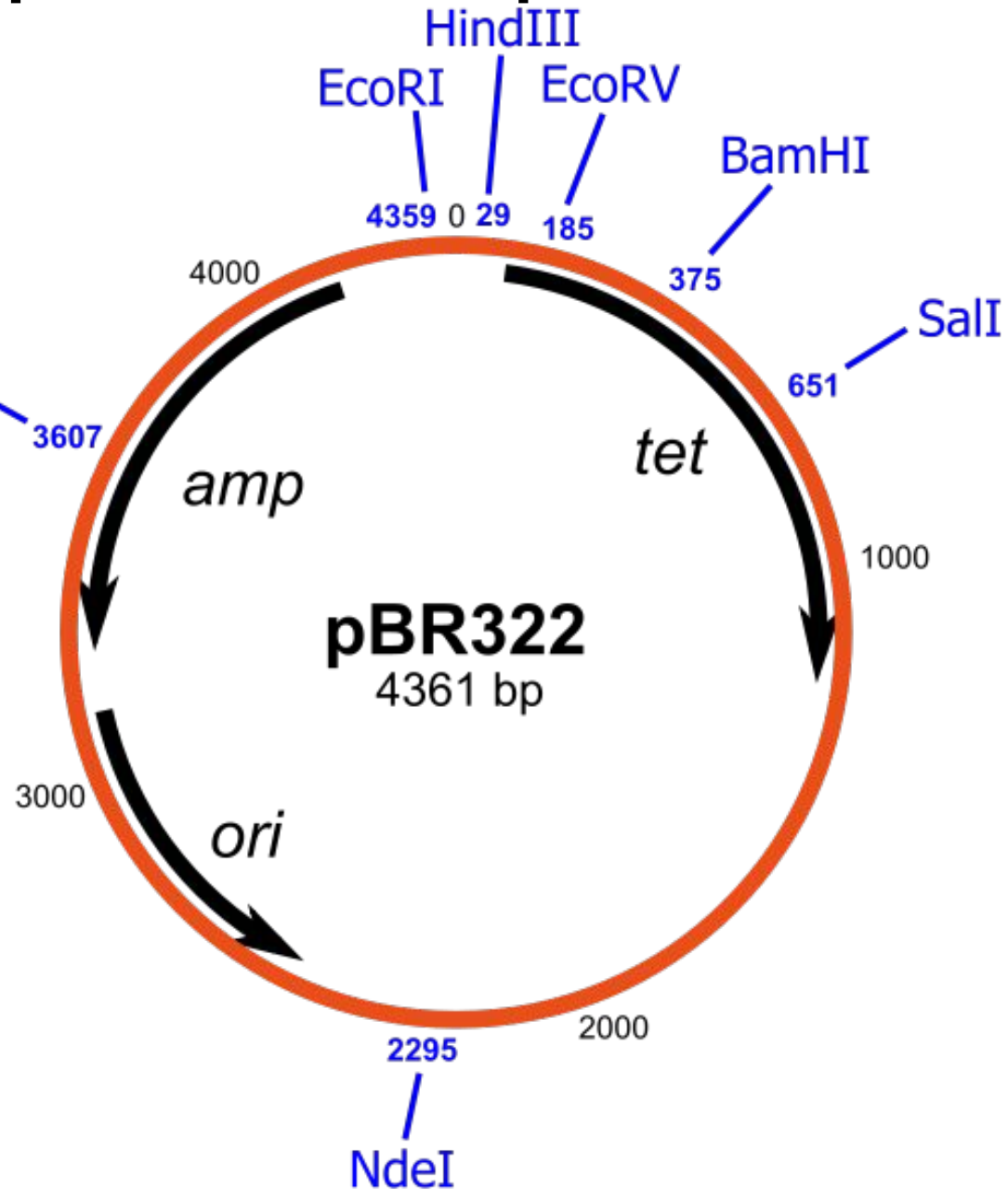
## II 4. Создание генетической конструкции.

При включении **фрагментов ДНК** в участок гена резистентности к тетрациклину, **устойчивость к тетрациклину** из-за этой вставки **нарушается**, и все **рекомбинантные плазмиды сохраняют устойчивость** только к **ампициллину**.

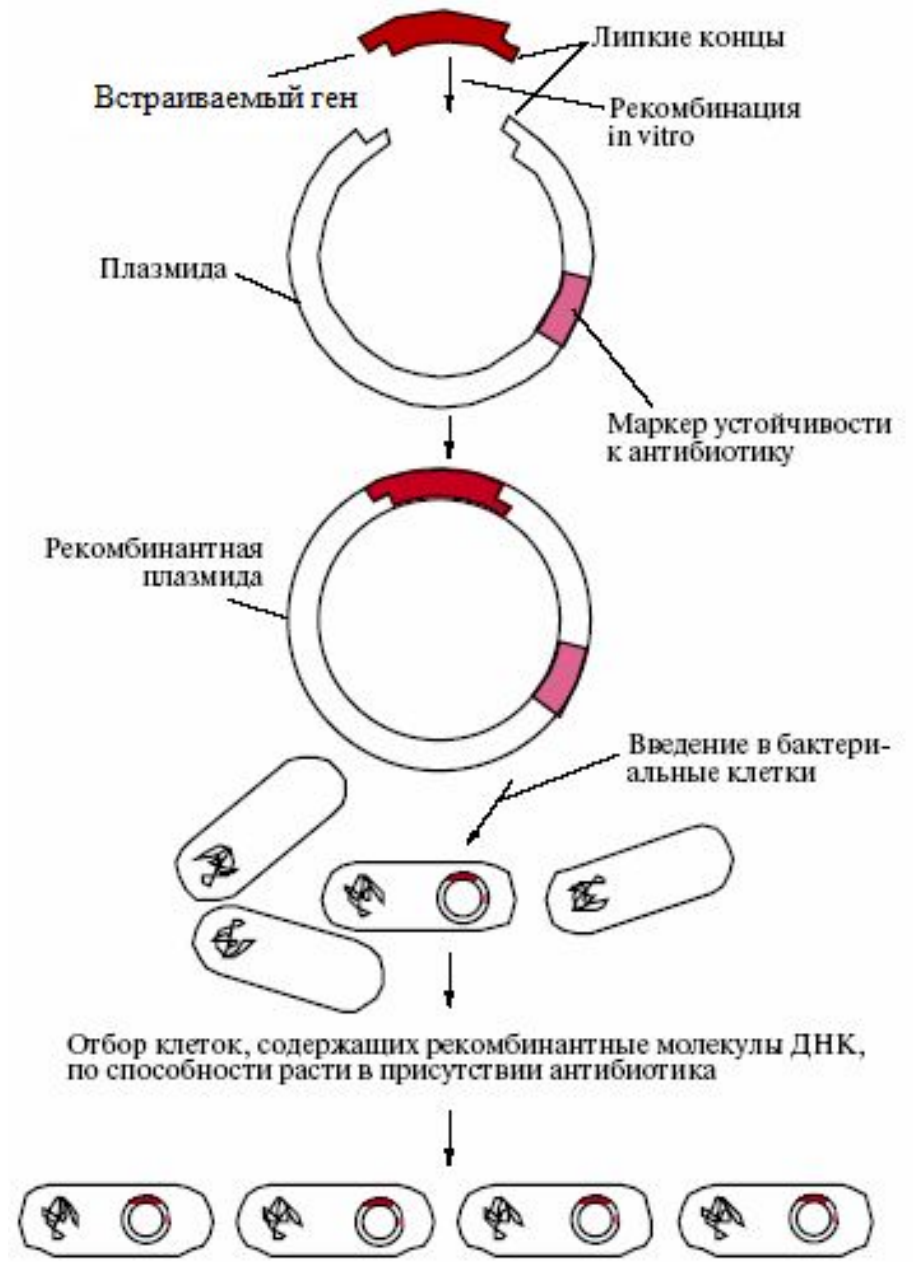
Таким образом, высевая клетки на среды с антибиотиками, **можно отобрать клоны**, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК.

# Генетическая карта плазмиды pBR322.

Одна из наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования. pBR322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*. Эта плазида несет **гены** устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину (ген *amp*) и тетрациклину (ген *tet*), а также уникальные сайты для *Bam*HI, *Hind* III и *Sal* I в гене *Tet*



Введение гена в плазмиду *E. coli* и клонирование рекомбинантной ДНК в клетках.



### III Введение вектора в организм-реципиент.

**Для того чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться в ее геном (интегрироваться в хромосому) и реплицироваться за ее счет (как лизогенные бактериофаги), либо быть способной к автономной репликации (как плазмиды).**

### III Введение вектора в организм-реципиент.

Для введения вектора **делают клетки компетентными** путем обработки **хлористым кальцием, полиэтиленгликолем, тепловым ударом** или **лизоцимом**, после чего добавляют к ним векторные конструкции.

Векторы в бактериальные, грибные, растительные или животные клетки **вводят разными путями**, в том числе **естественными** способами, которые широко распространены в природе:



В эту же область **встраивают маркерные гены**, для отличия рекомбинантной ДНК от исходного вектора. Ёмкость бактериофага  $\lambda$  до 25 т.п.н.

### **III Введение вектора в организм-реципиент.**

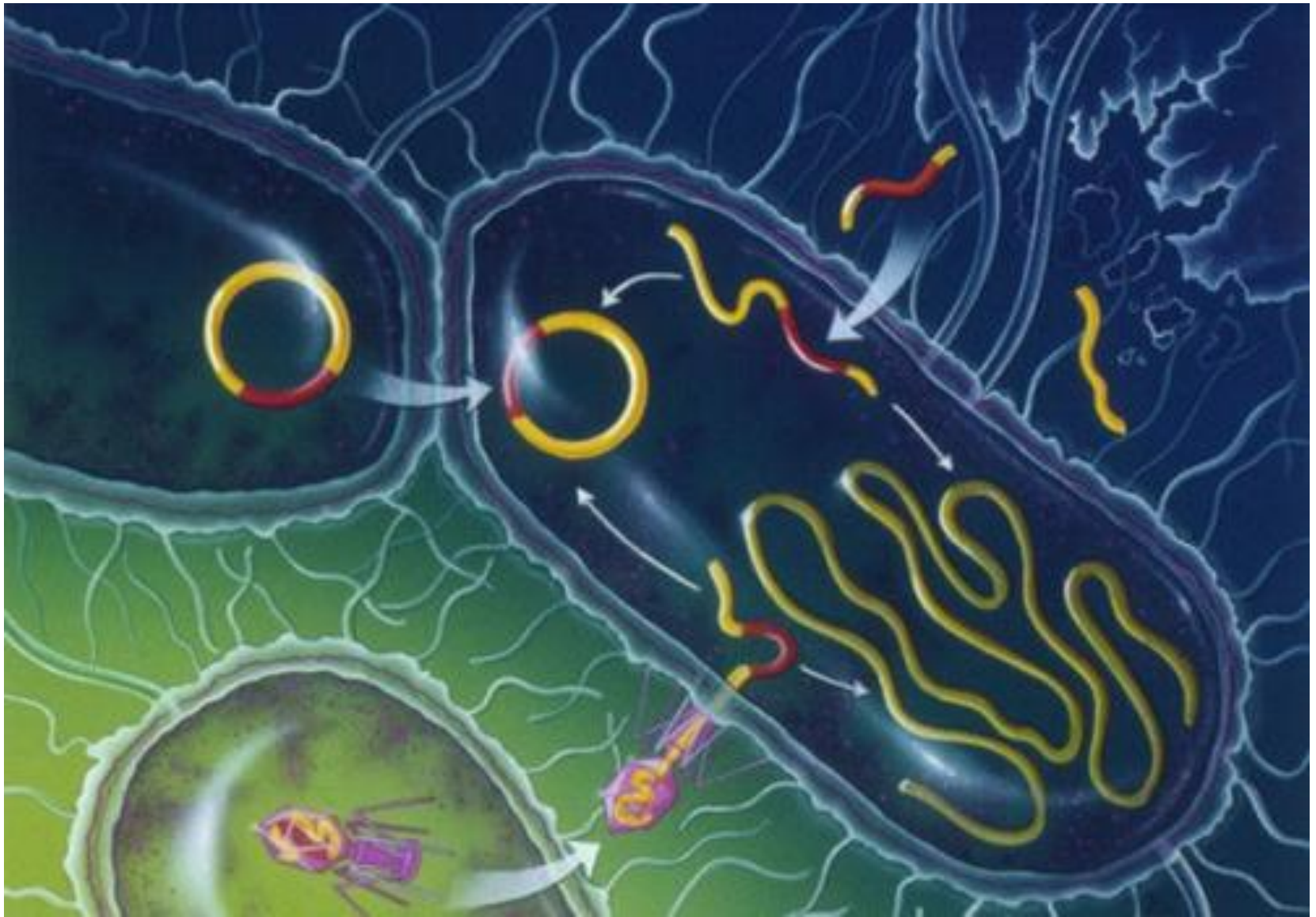
***Для того чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки***, она должна либо встроиться в ее геном (интегрироваться в хромосому) и реплицироваться за ее счет (как лизогенные бактериофаги), либо быть способной к автономной репликации (как плазмиды).

### III Введение вектора в организм-реципиент.

а) **конъюгация** – генетический материал клеток при сближении переходит из одной клетки в другую в виде плазмиды;

б) **трансдукция** – передача клетке генетического материала через вирус (эукариотических клеток) или фаг;

в) **трансформация** – это проникновение фрагментов нативной ДНК через оболочку клетки.



## VI Идентификацию (скрининг) и отбор клеток, которые приобрели желаемый ген или гены

осуществляют уже после клонирования в клетках *E. coli*.

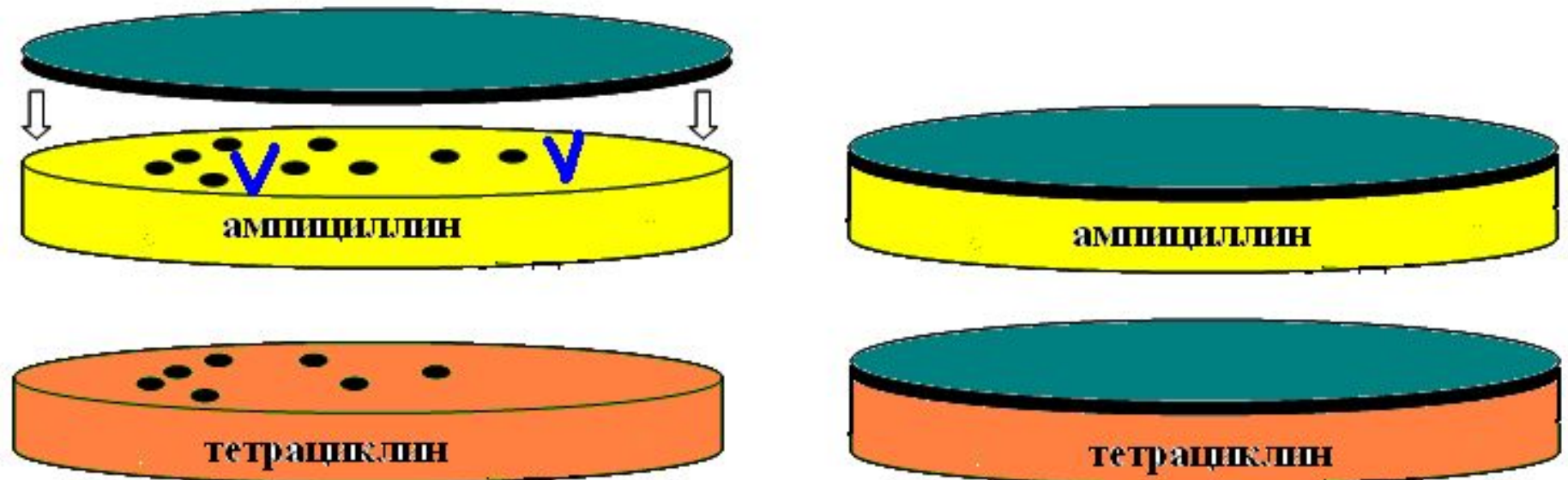
**Сначала клетки после** трансформации высевают на питательную среду, содержащую **ампициллин**, так как трансформированные и нетрансформированные клетки устойчивы к ампициллину (это позволяет выявить клетки как с «пустым» вектором, так и со «вставкой»).

## VI Идентификацию (скрининг) и отбор клеток, которые приобрели желаемый ген или гены

***На втором этапе*** проводят ***разделение этих двух вариантов***. Клетки, выросшие на среде с ампициллином, переносят на среду с тетрациклином методом перепечатки (делают пересев с точным расположением колоний на среде).

Клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину, поэтому не будут расти на среде с тетрациклином.

## Идентификация и отбор клеток, которые приобрели нужный ген



**Сначала** клетки после трансформации высевают на питательную среду, содержащую ампициллин. В таких условиях **могут вырасти** только те клетки, **в которых присутствует интактный ген bla** - или в составе интактной плазмиды pBR322, или в составе гибридной плазмиды; **нетрансформированные клетки чувствительны к ампициллину**. Сайт BamHI расположен в гене tet плазмиды pBR322, встраивание в этот ген фрагмента ДНК прерывает кодирующую последовательность, и устойчивость к тетрациклину утрачивается. Т. о., **клетки, несущие гибридную плазмиду, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину**, а клетки, получившие интактную плазмиду pBR322, несут ген tet и устойчивы как к ампициллину, так и к тетрациклину. **На втором этапе** проводят разделение этих двух вариантов. Клетки, выросшие на среде с ампициллином, переносят на среду с тетрациклином методом перепечатки.

**Ti-плазмиды (Tumor inducing? – индукция новообразований)** агробактерии, которая в естественных условиях вызывает у растений образование опухолей (корончатых галлов) в местах проникновения бактерии **Agrobacterium tumefaciens**



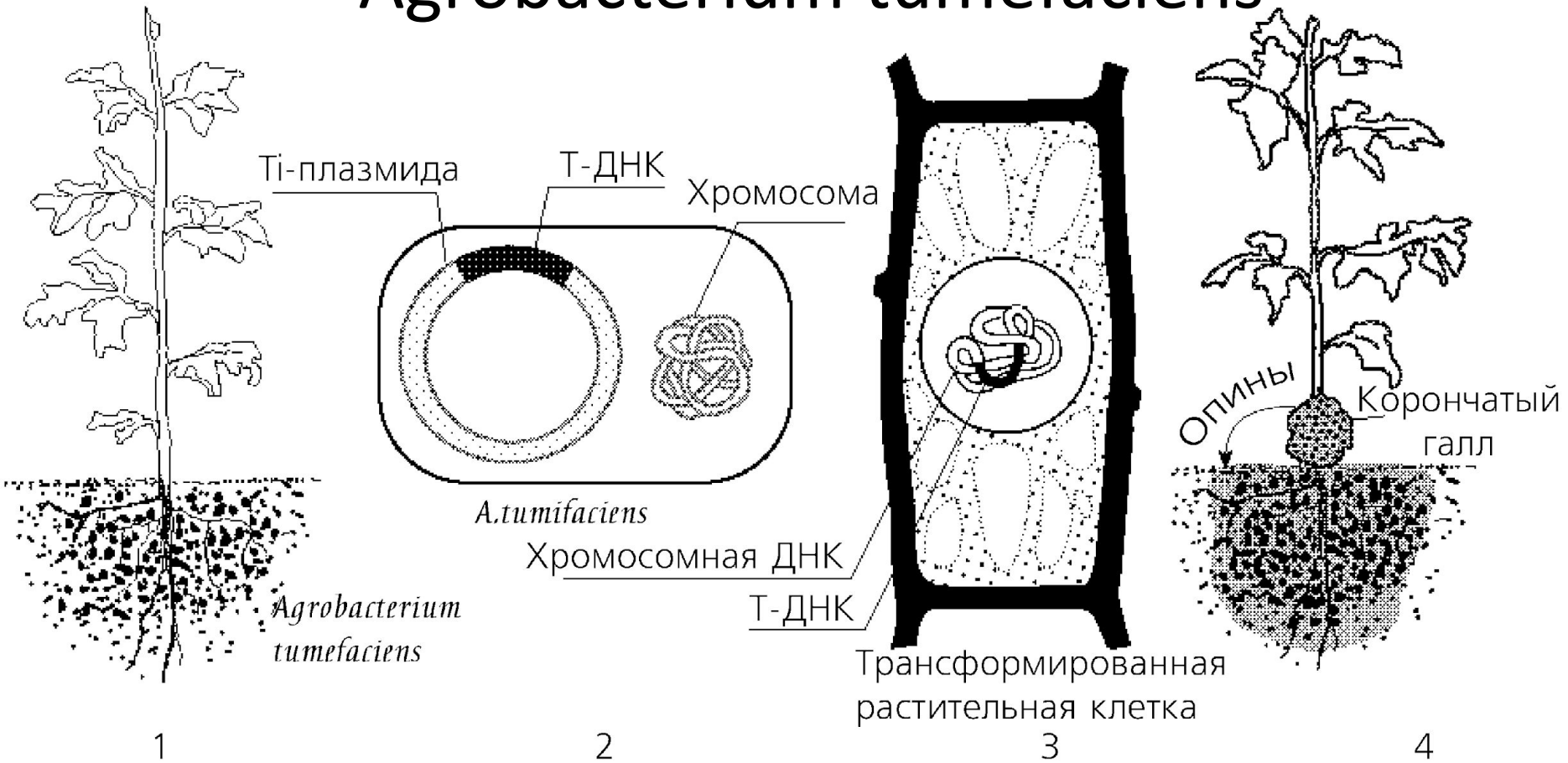
**Галлообразование на морковном ломтике привитом Agrobacterium tumefaciens.**



**корончатый**

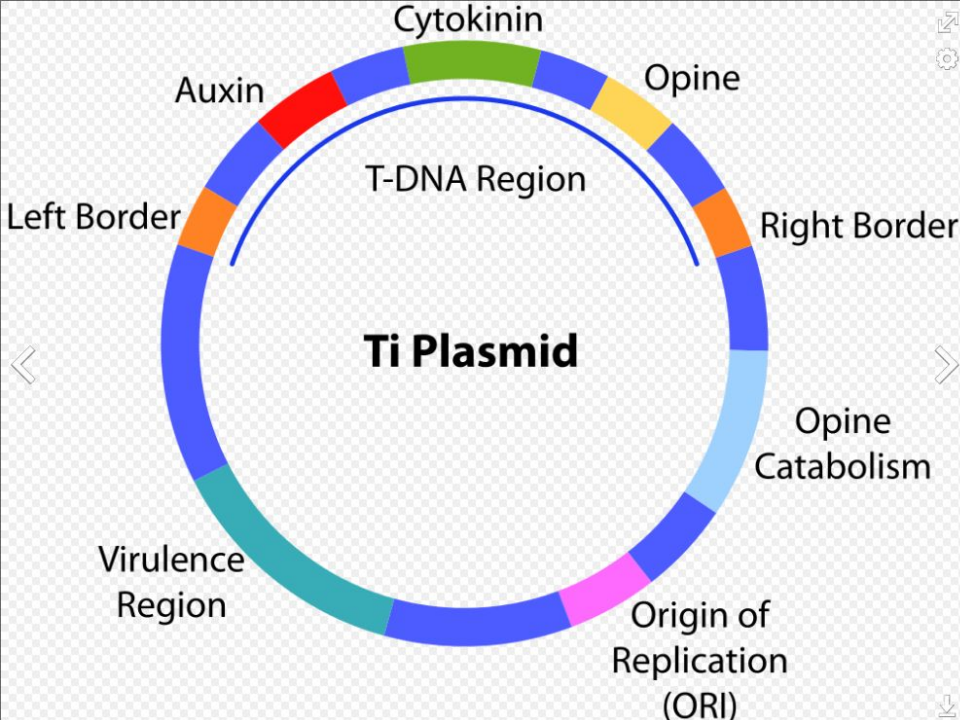


# Генетическая колонизация растения *Agrobacterium tumefaciens*



1- агробактерии существуют в ризосфере;  
2 - строение *A. tumefaciens*; 3 – встраивание Т-ДНК в геном; 4 – образование опухоли





В состав Ti-плазмиды входят участок, встраивающийся в геном растения (Т-ДНК-область), гены **vir-области**, обеспечивающие перенос Т-ДНК в

фитогормонов (**ауксинов** и **цитокининов**) и **опинов** (производных аминокислот).



Т. о., кроме **T-ДНК** в плаزمидах имеются область, кодирующая функцию конъюгации (Tra), область репликации (Ori V) и область вирулентности (Vir).

Важно отметить, что **все гены, ответственные за перенос и интеграцию генов T-области**, находятся не в ней самой, а рядом — в области вирулентности—vir-области.

**T-области** ограничены прямыми повторяющимися последовательностями по 24—25 п. н., и любая ДНК, вставленная между этими повторами, будет принята за T-область и перенесена в растительную

# Создание коинтегративного вектора на основе Ti-плазмиды:

Pp - расщепление рестриктазой

В результате этого T-ДНК со встроенным геном включается в нативную

Ti-плазмиду, замещая нормальную ДНК. Получаются клетки *A. tumefaciens*, несущие Ti-плазмиду со встроенными в T-сегмент нужными генами. Далее их перенос в кл растения осуществляется обычным способом,

