

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Курс лекций для студентов IV курса факультета
биологии РГПУ им. А.И. Герцена**

Направление 020400 Биология

Профиль Общая биология

**Профессор кафедры Зоологии
проф. Цымбаленко Надежда Васильевна**

д.б.н.,

- **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ
КЛОНИРОВАНИЯ ДНК**

- В настоящее время существует два подхода для получения необходимого количества конкретного участка исследуемой ДНК:
- 1. Клонирование ДНК *in vivo* в клетках прокариот или эукариот (клонирование – получение клона, т.е. совокупности идентичных клеток).
- 2. Амплификация ДНК *in vitro* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для клонирования ДНК *in vivo* нужно:

- ДНК-вставка (ДНК-мишень, ДНК-интереса);**
- ДНК-вектор (генетический вектор клонирования);**
- клетка-хозяин;**
- набор ферментов-инструментов и вспомогательных олигонуклеотидов**

В основе молекулярного клонирования лежит встраивание нужного фрагмента ДНК (*вставки*) в другую молекулу ДНК (*вектор*), которая способна включать в себя новые последовательности ДНК, обеспечивать их перенос в системы, где созданная *in vitro* ДНК будет воспроизводиться *in vivo*, давая начало новому клону клеток, отличающему фенотипически от исходных клеток хозяина (*реципиента*).

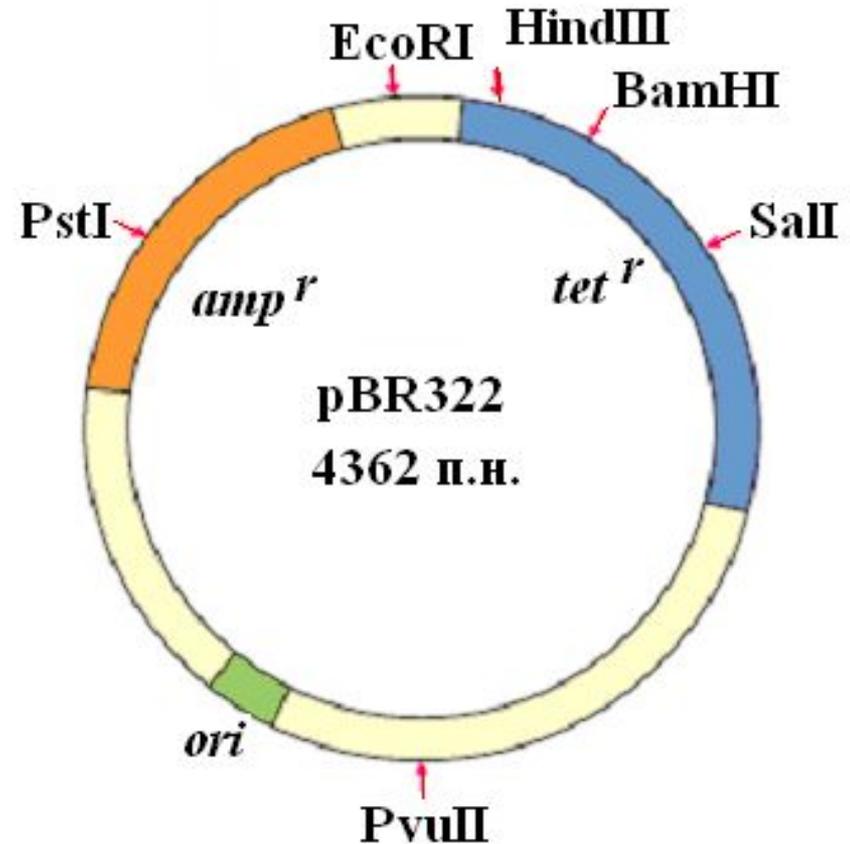
- **Вектор для переноса генетической информации должен удовлетворять ряду основных требований:**
- **1. Способность к автономной репликации, т.е. обладание *ori* (точка инициации репликации).**
- **2. Небольшой размер, поскольку эффективность переноса экзогенной ДНК в *E.coli* значительно снижается при длине плазмиды более 15 т.п.н.**
- **3. Наличие уникального сайта рестрикции для какой-либо РЭ.**
- **4. Наличие селективного маркера, позволяющего вести отбор рекомбинантных ДНК.**
- **5. Обеспечение достаточной копийности рекомбинантной ДНК в используемой биологической системе.**

- **ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ**
- **Плазмиды** – внехромосомные автономнореплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК.
- Плазмидные векторы создают на основе природных плазмид (F-плазмиды, R-плазмиды, плазмиды деградации, криптические плазмиды) методами генной инженерии с использованием ферментов-инструментов.
- Высококопийные плазмиды представлены 10-1000 копиями ДНК на клетку. Низкокопийные присутствуют в клетке в числе 1-4 копий.

Вектор клонирования pBR322

- был создан Боливаром и Родригесом в 80-тые годы прошлого века – один из самых популярных универсальных векторов для
- клонирования ДНК.

Гены устойчивости к тетрациклину (tet^r) и ампициллину (amp^r) содержат уникальные сайты узнавания для HindIII, Sall, BamHI и PstI. Сайты EcoRI и PvuII расположены вне этих генов. Длина вектора — 4361 п.н.

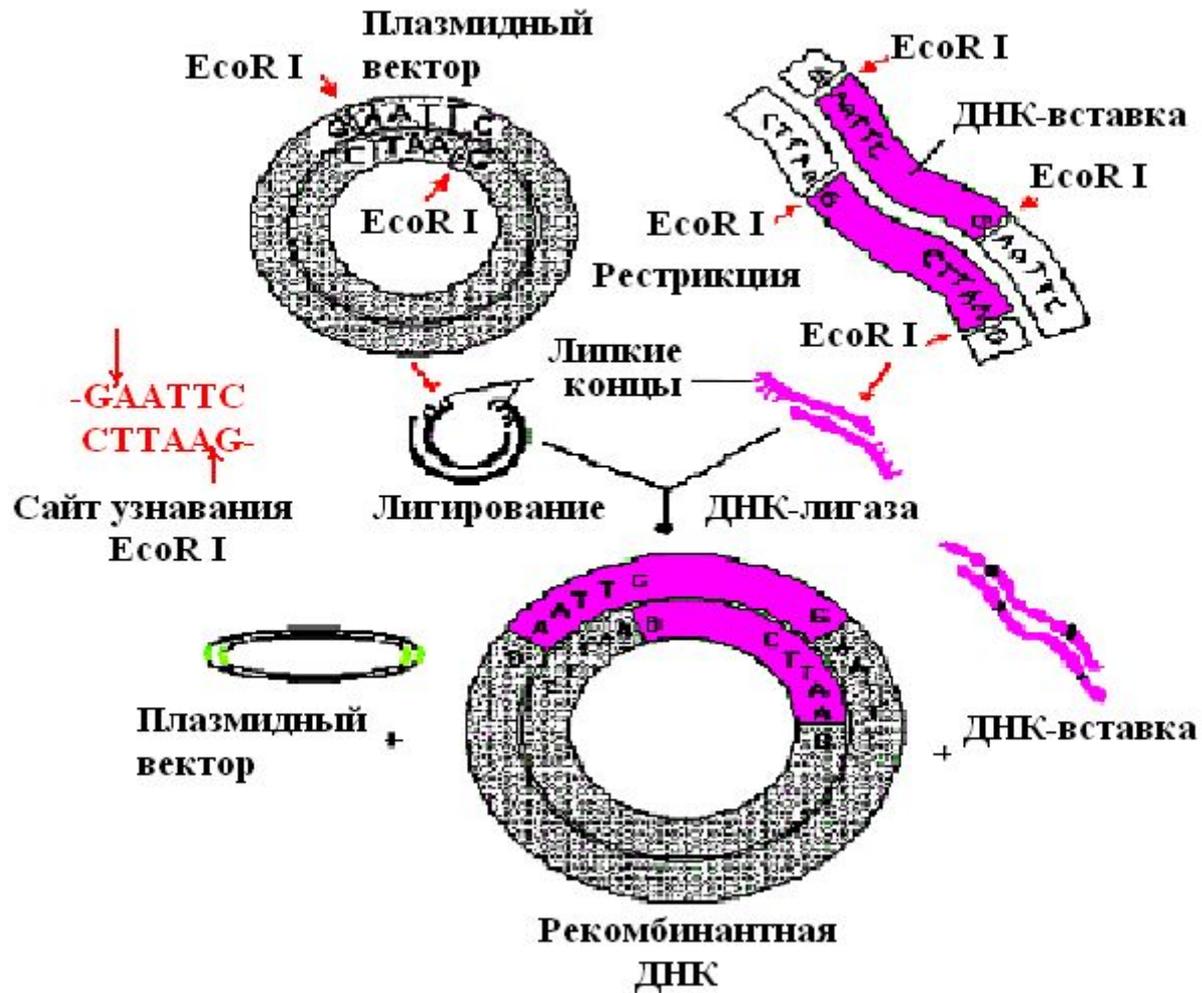


- Фенотипические свойства клеток, содержащих плазмиду pBR322 со вставками и без них

	Рост в присутствии	
	ампициллина	тетрациклина
	—	—
<i>amp^r</i> <i>tet^r</i>	+	+
<i>amp^s</i> <i>tet^r</i>	—	+
<i>amp^r</i> <i>tet^s</i>	+	—
<i>amp^s</i> <i>tet^s</i>	—	—

вставки ДНК
 чувствительный (*s*)
 устойчивый (*r*)

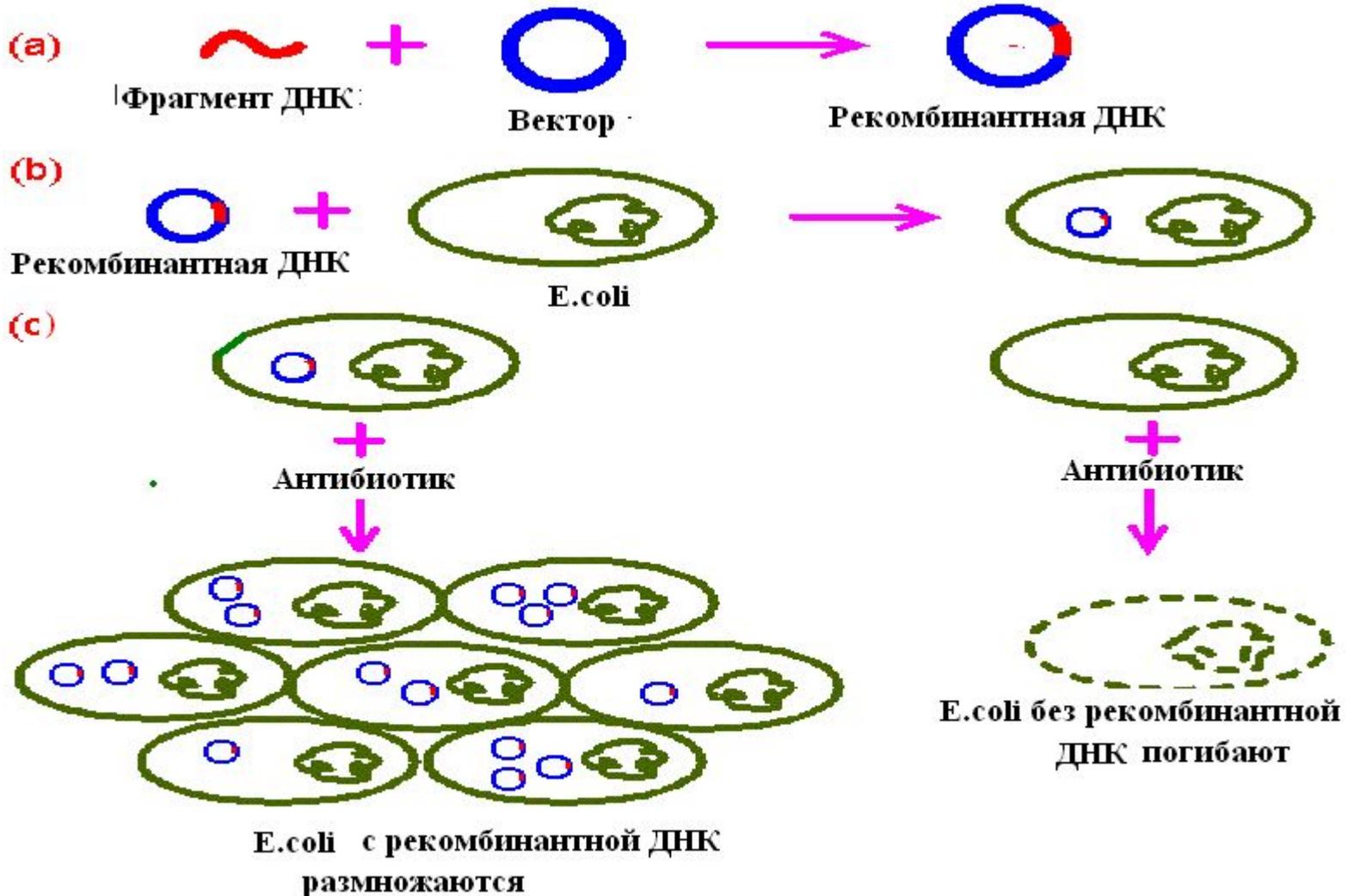
ВСТРАИВАНИЕ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК В ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР



- **Трансформация** – процесс введения рекомбинантной ДНК в бактериальную клетку.
- Клетка-хозяин должна иметь определенный фенотип:
- r^- ; т.е. в ней не должно быть рестриктаз;
- она должна быть неспособна к общей рекомбинации ($recA^-$), чтобы экзогенная ДНК не модифицировалась в результате гомологичной рекомбинации.

- **Частота трансформации** – доля клеток в клеточной популяции, получивших чужеродную ДНК; выражается числом трансформантов к общему числу клеток.
- **Эффективность трансформации** - число трансформантов в расчете на 1 мкг ДНК, взятой для трансформации.
- Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК, называются **КОМПЕТЕНТНЫМИ**.
- 1. Трансформация *E. coli* с помощью обработки хлоридом кальция
- 2. Электропорация – увеличение проницаемости клеток под воздействием импульса тока длительностью ~4,5 мс.
- 3. Введение чужеродной ДНК в составе искусственных бактериальных хромосом (ВАС).
-

- Селективный отбор на основании присутствия –отсутствия резистентности к определенному антибиотику



- (d) **Выделение клона, содержащего рекомбинантную ДНК**

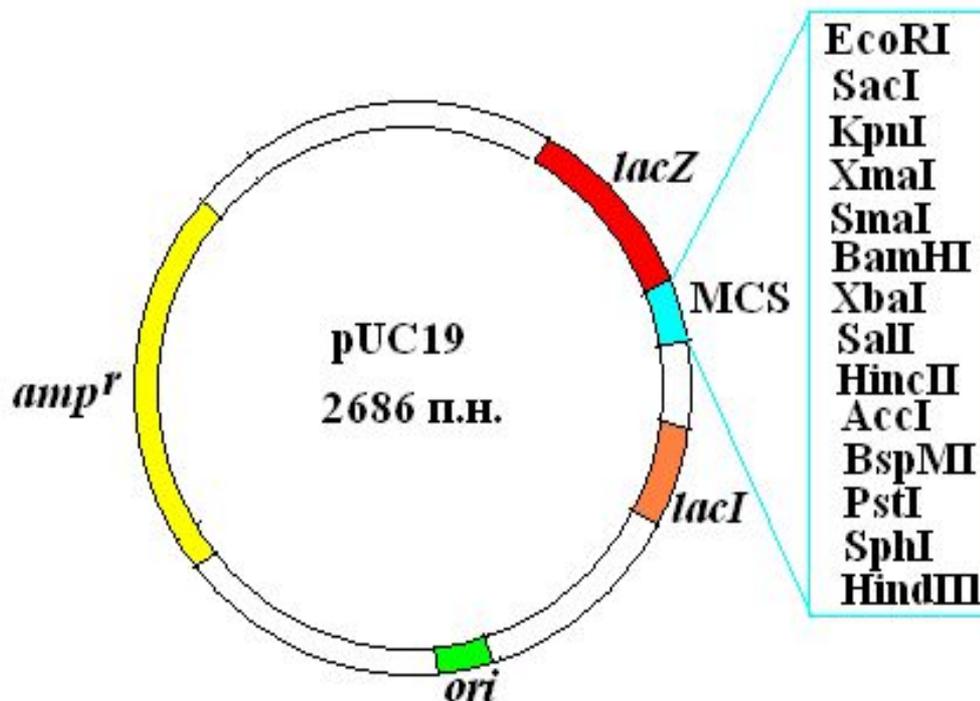
- Эпоха вектора pVR322, начатая Боливаром и Родригесом в самом начале 80-тых годов XX-го столетия, продолжается и по сей день.
- Однако, при всей своей надежности и классическом соответствии всем необходимым для векторов требованиям, этот вектор имеет **всего несколько удобных сайтов для клонирования**. Кроме того, **отбор трансформированных клеток в экспериментах с рекомбинантными ДНК на его основе занимает много времени**.

-
- **Группа векторов семейства pUC**
- “unicom cloning” – обозначает наличие в структуре ДНК полилинкера, который представляет собой последовательность нуклеотидов, составленную из сайтов узнавания ряда эндонуклеаз рестрикции, уникальных для данного вектора.
- Названия индивидуальных векторов из семейства pUC отличаются двузначным числом, а первичная структура разных векторов отличается составом сайтов **MCS** – Multiple Cloning Sites в полилинкере.

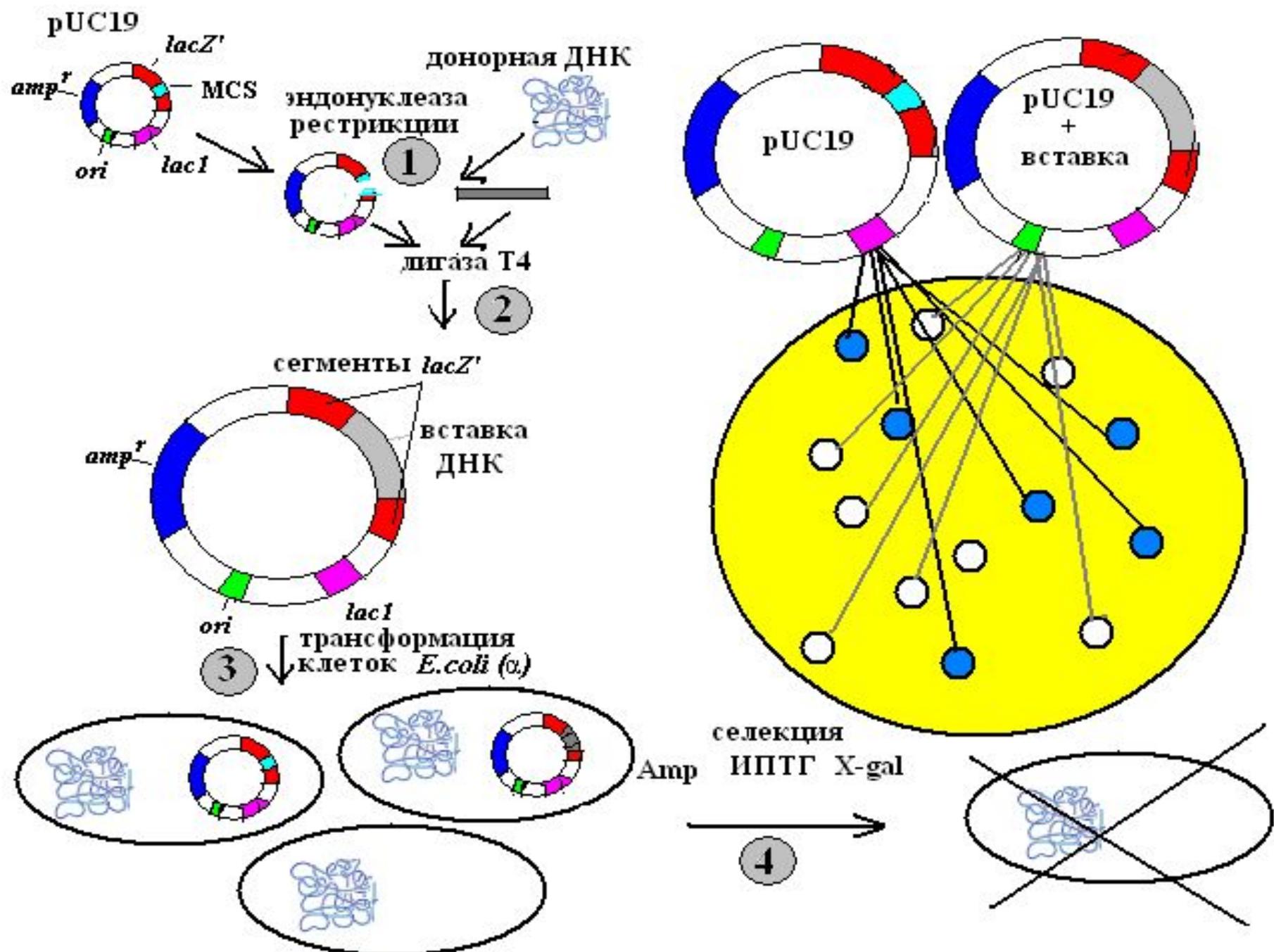
Плазмидный вектор pUC19

pUC19 содержит:

- ген устойчивости к ампициллину (*Amp*);
- регулируемый сегмент гена β -галактозидазы (*lacZ*) лактозного оперона *E.coli*;
- ген *lacI*, кодирующий репрессор, который контролирует экспрессию гена *lacZ*;
- полилинкер – короткую последовательность с множеством уникальных сайтов для РЭ;
- точку начала репликации плазмиды pBR322.



- **ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) – индуктор *lac* – оперона. В его присутствии продукт гена *lacI* не сможет связаться с промоторно-операторной областью гена *lacZ*, и как следствие будут происходить транскрипция и трансляция плазмидного фрагмента гена *lacZ*. Продукт этого фрагмента свяжется с белком, кодируемым хромосомной ДНК (α -комплементация), и в результате образуется активная β-галактозидаза. Субстрат последней 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозил (X-gal) гидролизуетсся с образованием продукта синего цвета, окрашивающего колонии клеток, содержащих немодифицированную плазмиду pUC19. Встраивание вставки ДНК в область полилинкера нарушает целостность последовательности гена *lacZ* в плазмиде, тем самым блокируя синтез активной β-галактозидазы, которая способна расщеплять X-gal. В результате колонии не окрашиваются в голубой цвет.**
-

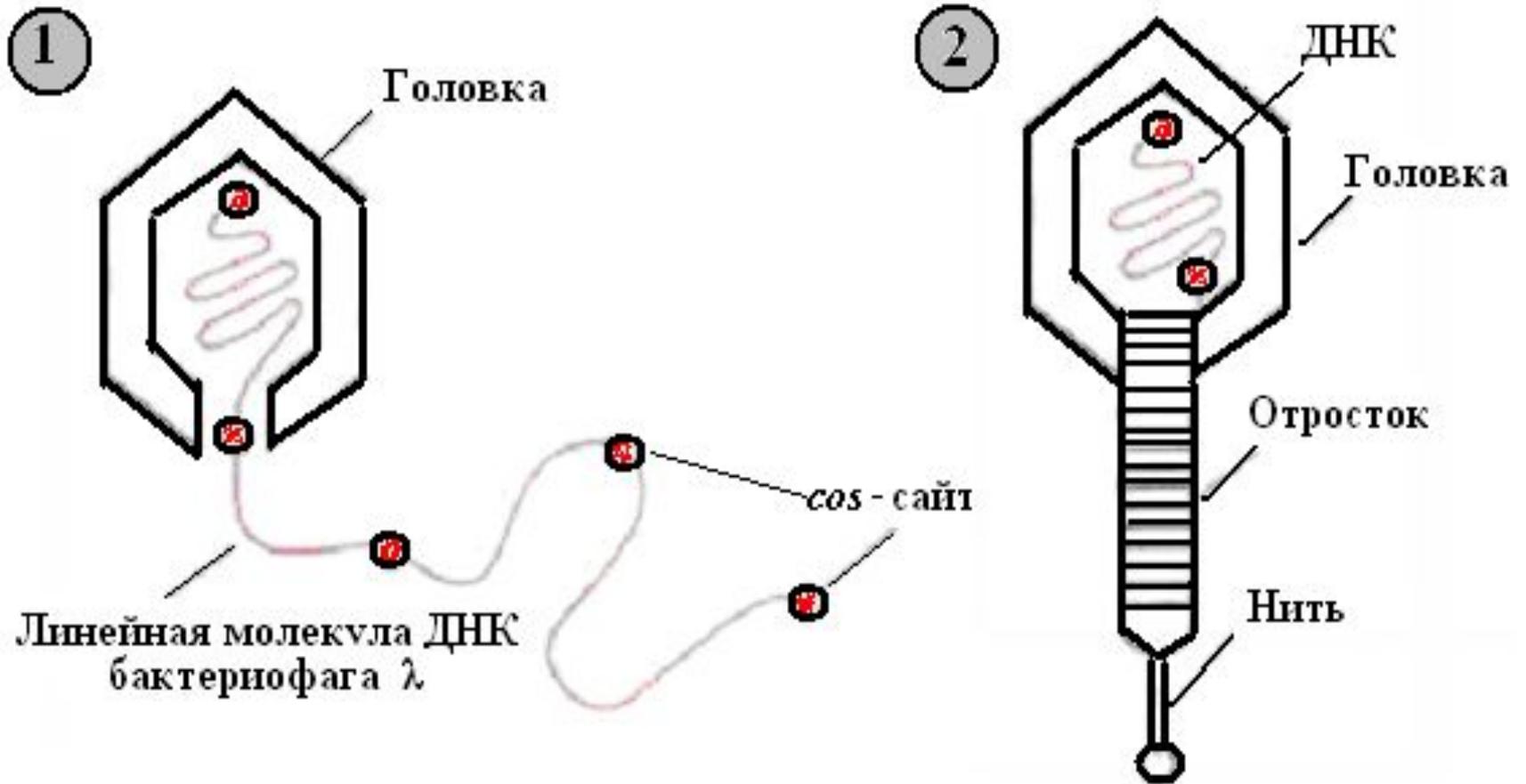


- **ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ КРУПНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК**
- **С помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК до 10 т.п.н. Однако при создании геномных библиотек часто приходится работать с более крупными фрагментами. Для этого были разработаны векторы:**
 - **1. На основе ДНК фагов, в частности, на основе ДНК бактериофага λ E.coli.**
 - **2. Космиды.**
 - **3. Искусственные бактериальные хромосомы (ВАС).**

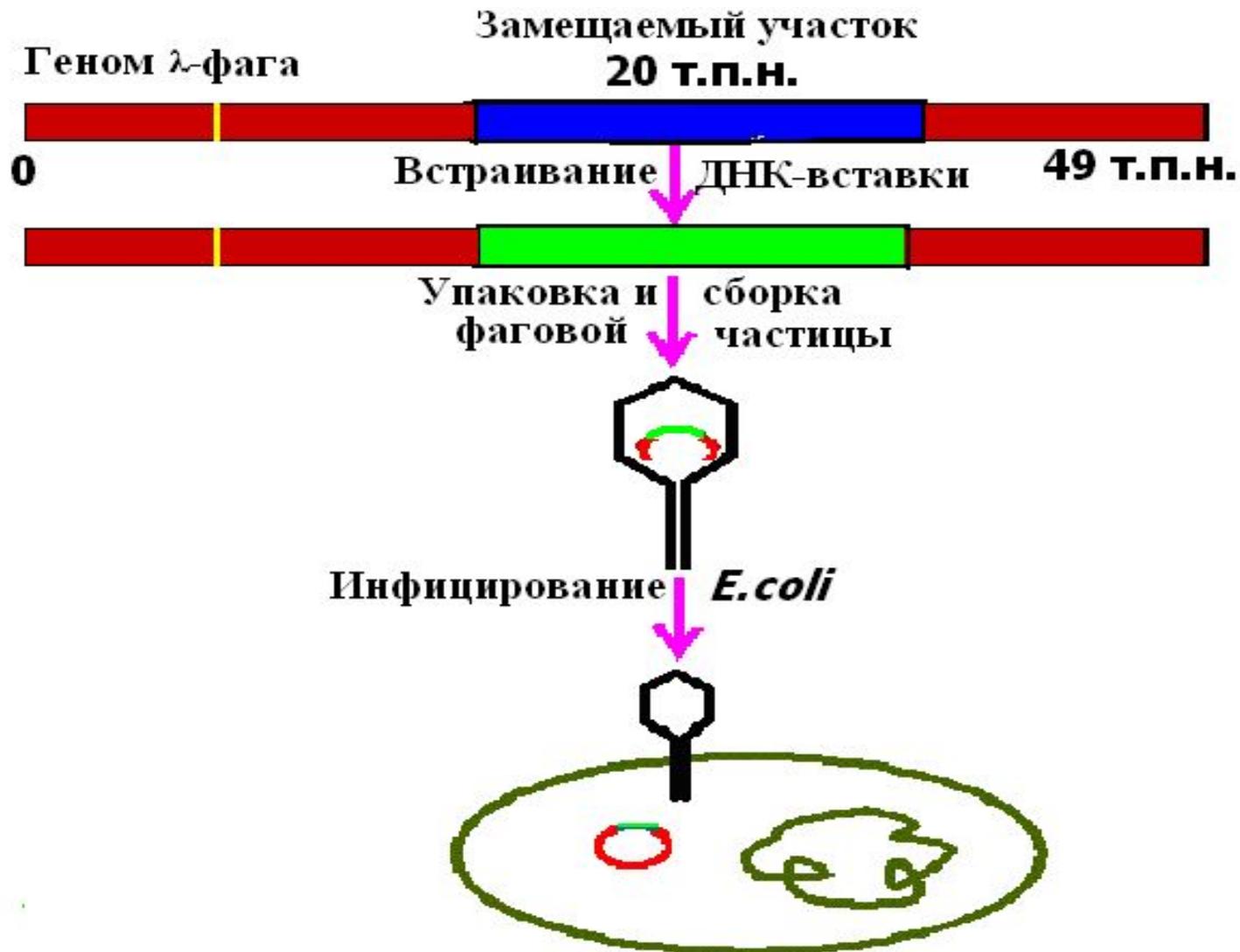
- ***Векторы на основе бактериофага λ.***
- **Два альтернативных пути развития событий при проникновении фага λ в клетки E.coli.:**
- **1. *Литический цикл*** – фаг начинает активно размножаться и примерно через 20 минут клетка разрушается с высвобождением до 100 новых фаговых частиц
- **2. *Состояние лизогении*** – фаговая ДНК включается в хромосому E.coli как профаг и реплицируется в клетке вместе с нормальными бактериальными клетками. Однако при неблагоприятных условиях (нехватка питания) запускается литический цикл

-
- **Литический путь развития фага λ**
- **1. При репликации кольцевой ДНК бактериофага λ образуется линейная молекула, состоящая из повторяющихся сегментов длиной примерно 50 т. п.н. Каждый из этих сегментов представляет собой полноразмерную фаговую ДНК, фланкированную липкими cos-сайтами.**
- **2. Фаговая головка вмещает один такой сегмент, затем к головке присоединяется уже собранный отросток.**
- **Смешав *in vitro* в пробирке пустые головки, фаговую ДНК и собранные отростки, можно получить инфекционные фаговые частицы.**

Литический путь развития бактериофага λ

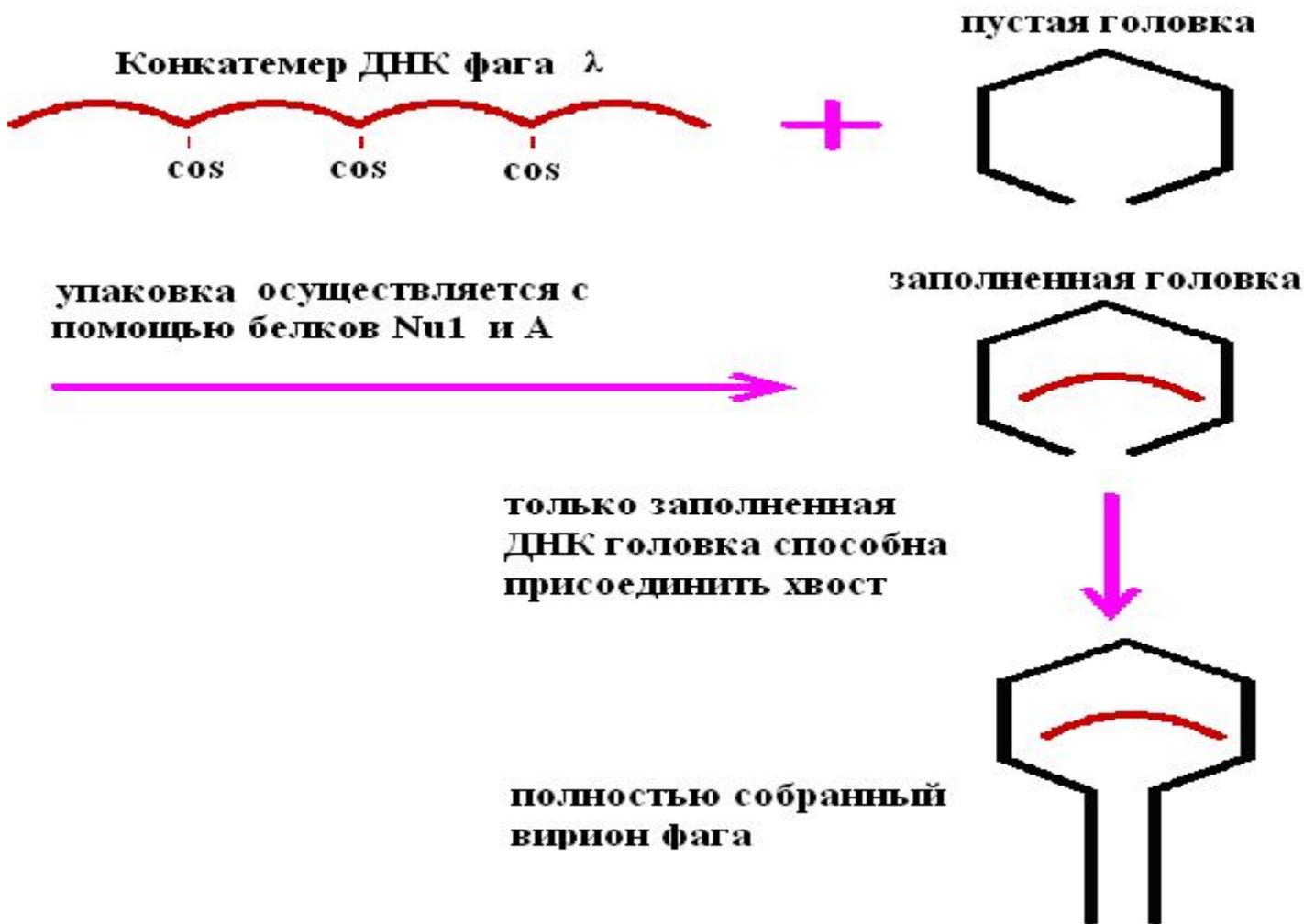


- Рекомбинантные молекулы упаковывают в головки бактериофага λ *in vitro*, и после добавления отростков получают инфекционные фаговые частицы.



- **Приготовление экстрактов для осуществления упаковки *in vitro* ДНК фага λ.**
- **Используют два штамма *E. coli*, каждый из которых лизогенен в отношении определенного мутантного штамма фага λ.**
- **1. Штамм, клетки которого не способны синтезировать белок А (один из полипептидов терминазы).**
- **2. Штамм, клетки которого не синтезируют белок Е (белок головки).**
- **Оба этих белка необходимы для упаковки ДНК фага λ. А и Е - экстракты смешивают и добавляют конкатемерную ДНК фага, которая связывается с терминазой прежде, чем происходит разрезание в *coc*-сайтах, и упаковывается в фаговые головки**

- Упаковка in vitro ДНК фага λ



- Процесс введения рекомбинантной фаговой ДНК со встроенным фрагментом чужеродной генетической информации в клетки-реципиенты основан на естественном природном явлении – **трансдукции** фаговой ДНК.
- **Трансдукция** (лат. *transduction* - перемещение) представляет собой процесс переноса бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом. Таким образом, трансформация бактериальных клеток с помощью рекомбинантных ДНК на основе фаговой ДНК не требует специальной подготовки клеток-реципиентов или какого-либо специального приборного оснащения

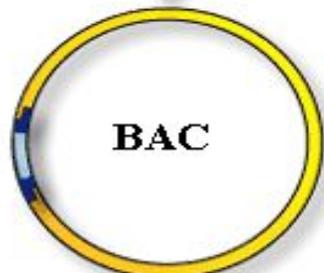
- **Космиды** – один из видов гибридных векторов, которые реплицируются, используя плазмидный тип репликации, и обладают способностью упаковываться *in vitro* в оболочки частиц фага λ. Такие векторы могут включать до 40 т.п.н. чужеродной ДНК.



- **Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК (вставки >100 т.п.н.) имеют большую ценность при анализе сложных эукариотических геномов. Для клонирования фрагментов ДНК размером от 100 до 300 т.п.н. был сконструирован низкокопийный плазмидный вектор на основе бактериофага P1 –искусственная хромосома на основе фага P1. На основе F-плазмиды E.coli создана ВАС (bacterial artificial chromosomes).**



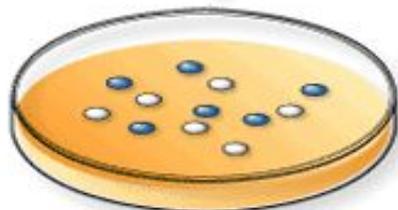
Клонирование фрагментов
размера с



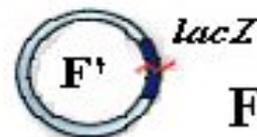
Трансформация клеток *E.coli*



Селекция на среде с X-gal/ИПТГ



Отбор индивидуальных клонов с
рекомбинантной ДНК (белые колонии)



F плаزمида
(фактор фертильности) *E.coli*
с системой *lac Z'* из pUC

- **ВАС - стабильный вектор, способный интегрировать вставки длиной от 150 до 350 т. п. н.**
- **Трансформация бактериальных клеток с помощью рекомбинантных ДНК на основе ВАС проводится методом *электропорации***

-

СРЕДСТВА ДОСТАВКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК В РЕЦИПИЕНТНЫЕ КЛЕТКИ

В настоящее время известно около 40 различных способов доставки рекомбинантной ДНК в клетки, по-разному решающих проблему преодоления плазматической мембраны.

Пока не существует единой классификации методов доставки рекомбинантной ДНК в клетки.

Каждый из методов доставки чужеродной ДНК в клетки имеет свои особенности, преимущества и недостатки в отношении выживаемости клеток, эффективности введения, универсальности, возможностей технического осуществления.

Выбор метода зависит от типа клеток-хозяев и типа использованного вектора, а также от личных предпочтений и возможностей экспериментатора.

ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформация в самом общем значении – это ***процесс введения свободной ДНК в клетку***. В более узком значении термин применяется в основном по отношению к бактериям, обозначая ***процесс поглощения рекомбинантной ДНК компетентными клетками, индуцированный температурным фазовым переходом клеточной мембраны***.

E. coli является самым распространенным организмом при работе с рекомбинантными ДНК, и чтобы обеспечить внедрение в клетки плазмидной ДНК, клетки выдерживают с ледяным раствором CaCl_2 и ДНК, а затем подвергают тепловому шоку при $42\text{ }^\circ\text{C}$ в течение ~ 1 мин.

По-видимому, в результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки.

Оценивается параметрами частоты и эффективности.

*Часто используется этап подготовки компетентных клеток: получение сферопластов – клеток, частично или полностью (протопласты) лишенных наружной ригидной клеточной стенки. Например, только таким способом была осуществлена эффективная трансформация многих грамположительных бактерий родов *Bacillus*, *Listeria*, *Streptomyces* и др.*

Некоторые методики трансформации дрожжей также включают стадии ферментативного удаления оболочки дрожжевой клетки с помощью глюкозидаз.

Для организмов, устойчивых к химическим индукторам компетентности или не обладающих природной компетентностью, применяются другие системы доставки ДНК.

Конъюгация

Существуют бактериальные плазмиды (конъюгативные плазмиды), обладающие способностью создавать межклеточные контакты, через которые они и переходят из одной клетки в другую. Образование контактов между донорной и реципиентной клетками обеспечивается *конъюгативными свойствами плазмид*, а сам *перенос ДНК – мобилизационными*.

При этом конъюгативная плазида может увлекать за собой обычный плазмидный вектор, находящийся в той же клетке. Была продемонстрирована возможность конъюгативного переноса ДНК из бактериальных клеток в культивируемые клетки животных.

В процессе конъюгации переносится только одна цепь донорской плазмиды, на которой затем синтезируется вторая цепь.

Это приводит к тому, что конъюгативно передаваемая плазида не подвергается атаке хозяйских рестриктаз. Эффективность этого метода для бактерий сопоставима с трансформацией.

Вирусная инфекция.

Для внедрения векторов на основе вирусов широко используется природный инфекционный путь заражения клетки-хозяина, который зависит от типа вируса.

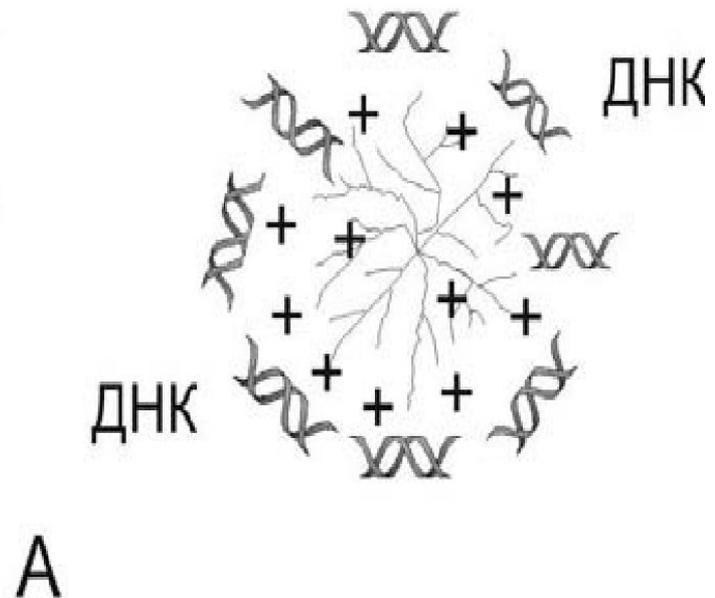
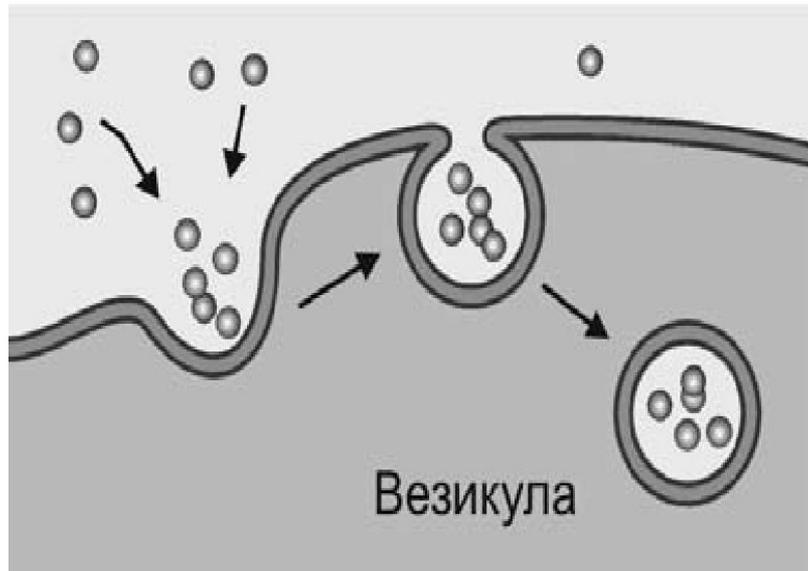
Перфорационные методы.

Одним из популярных методов введения нуклеиновых кислот в клетки-мишени является **электропорация** – временное создание пор в бислойной липидной мембране под кратким воздействием электрического поля. Является универсальным физическим методом трансформации, методика которого разработана практически для всех типов клеток. Электропорация – наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки, требующий, однако, специального прибора электропоратора.

Трансфекция

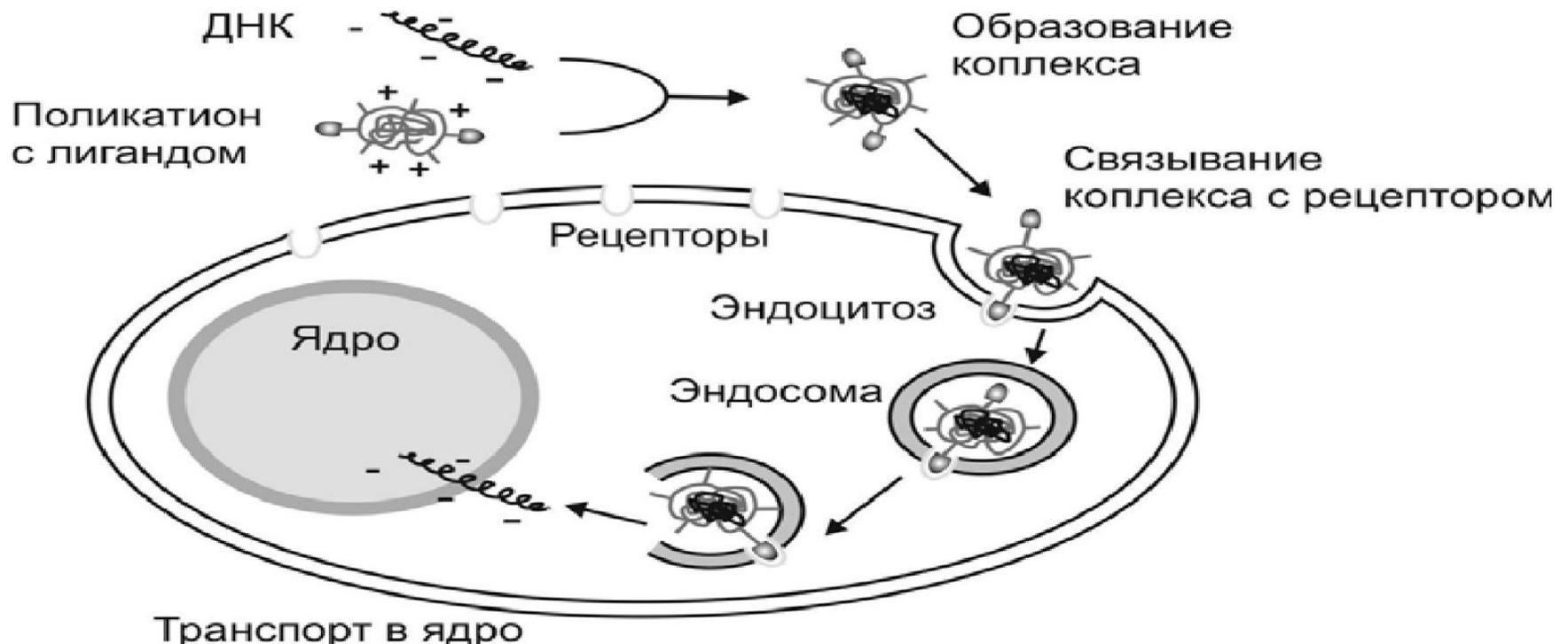
Одним из первых разработанных методов эффективной трансфекции была **инкубация ДНК с ДЕАЕ-декстраном**. Механизм действия ДЕАЕ-декстрана окончательно не установлен, но известно, что он связывается с ДНК и с клеточной мембраной, стимулируя **пиноцитоз**, хотя сам клетками не захватывается.

Эндоцитоз



Полимерные катионы

образуют с нуклеиновыми кислотами устойчивые комплексы с нейтрализованными зарядами, которые могут с высокой эффективностью **транспортировать ДНК и РНК** внутрь клетки, **защищая** от действия **эндонуклеаз** на пути к Ядру. Синтетические нелипидные полимерные катионы в линейной или разветвленной конформации (дендритная форма) могут конденсировать ДНК и РНК в относительно малые частицы, которые затем связываются с клеточной мембраной и проникают в клетку путем неспецифического **эндоцитоза**.



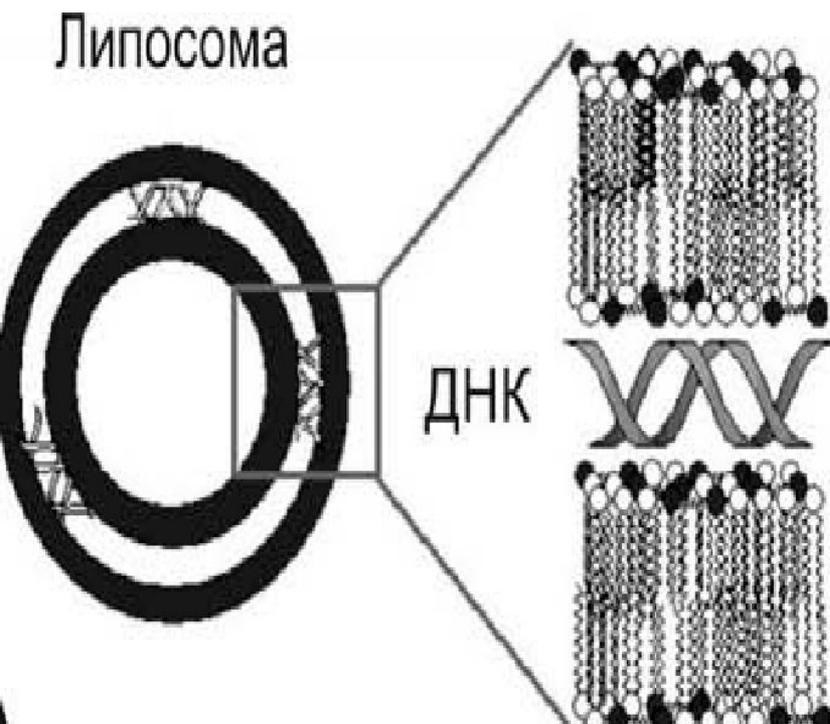
ЛИПОСОМЫ

(ДОТМА (1,2-диолеил-3-N,N,N-триметиламинопропан))

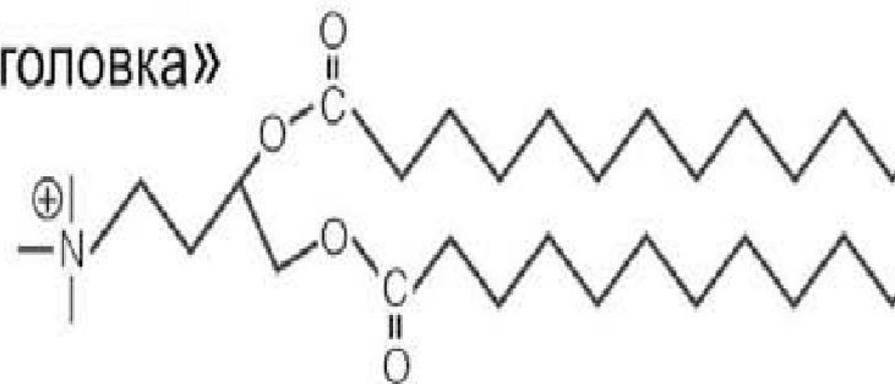
Фелгнером (Felgner, 1987)

Структура комплекса с ДНК (а) и общая структура катионного липидного полимера (б).

Катионные липидные полимеры (линейные и разветвленные), похожие по своей структуре и свойствам на клеточные мембранные фосфолипиды формируют комплексы с ДНК в виде многослойных катионных липосом (а) при простом смешивании реагентов. Такие комплексы проникают в клетку путем эндоцитоза или слияния с клеточной мембраной через липидную часть



Катионная
«головка»



Б

Спейсер

Липид

Микроинъекция

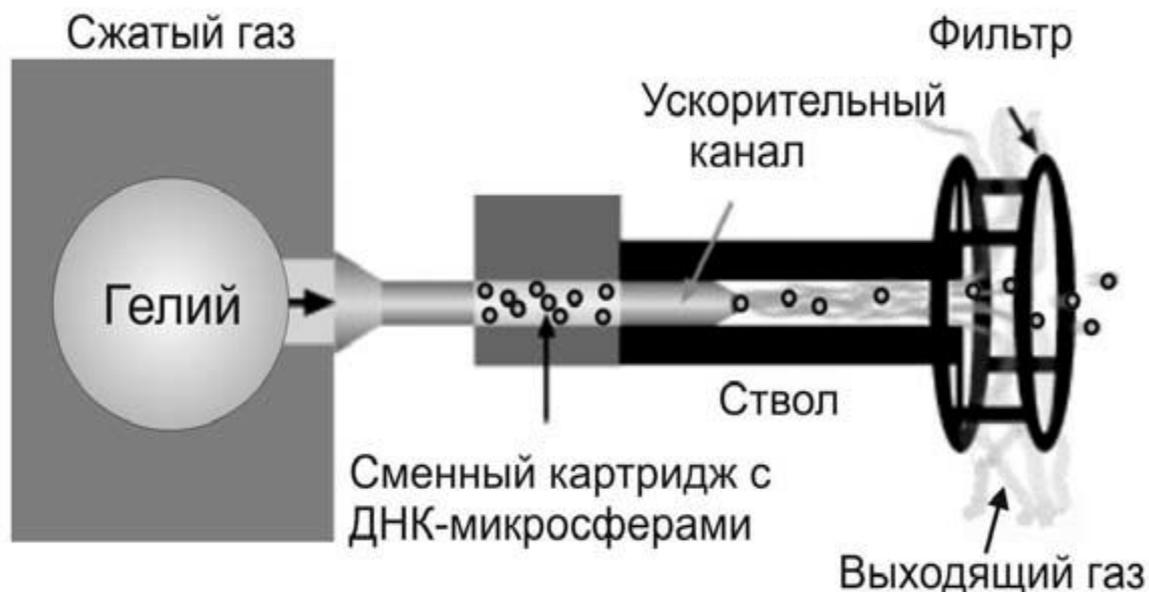
Клеточная мембрана прокалывается микроиглой и раствор, содержащий ДНК, вводится в цитоплазму клетки или напрямую в ядро, если ядро достаточно большое (например, ядро яйцеклетки).



Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0,1–0,5 мк и микроманипулятора. Этот метод позволяет вводить любую ДНК в любые клетки и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Баллистическая трансфекция (биобаллистика, или биолистика)

Обстрел клеток микросферами размером около 1-2 мкм, покрытых ДНК. Применяются микрочастицы золота, вольфрама, силикона и различные синтетические наносферы.



«Генный пистолет» (gene gun), или «генная пушка», который был разработан Д. Сенфордом (J. Sanford) в 1987 г. по устройству сходен с пневматическим оружием.

Стабильная трансфекция чужеродной ДНК в клетку - рекомбинантные ДНК интегрируются в хромосомы клеток-реципиентов и становятся их неотъемлемой частью.

Транзиентная (временная) трансфекция (transient transfection) - молекулы рекомбинантной ДНК существуют и транскрибируются в ядрах во внехромосомном состоянии непродолжительное время.

Стабильное наследование внедренной чужеродной ДНК – основное условие получения трансгенных организмов для хозяйственных целей!