

Лекция 2

Технология рекомбинантных ДНК

Профессор Хрусталева Л.И.

С использованием ряда слайдов,
подготовленных к.б.н.Фесенко И.А.

Технология рекомбинантных ДНК – это совокупность методов, позволяющих:

- клонировать ДНК
- расшифровывать порядок нуклеотидов в ДНК
- выявлять интересующие последовательности ДНК или РНК с целью маркирования признаков и диагностики наследуемых заболеваний
- осуществлять перенос генетического материала от одного организма в другой и т.д.

Рекомбинантная ДНК – это молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, вместе нигде в природе не существующих, фрагментов ДНК .

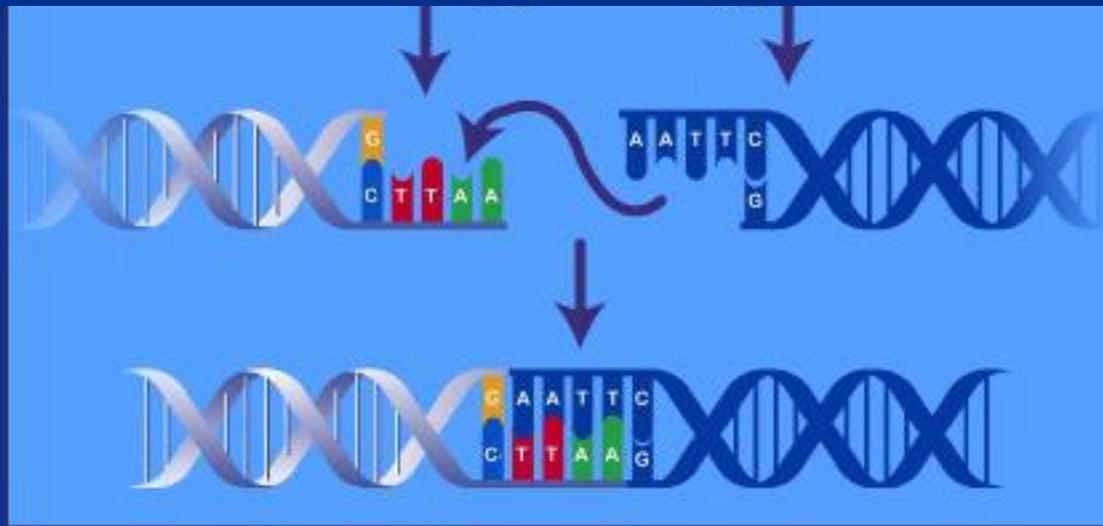
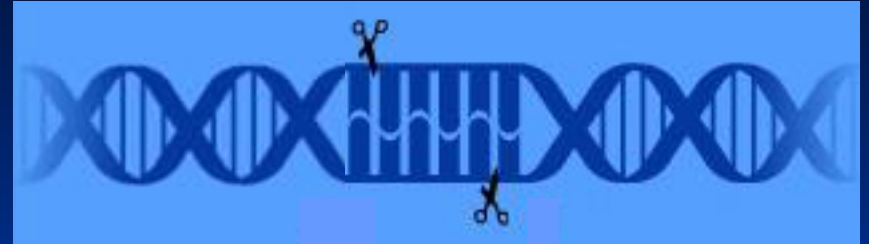
Рестриктаза – бактериальный белок, расщепляющий двухцепочечную молекулу ДНК в специфических участках.



Рестрикция с образованием «тупых» концов



Рестрикция с образованием «липких» концов



ДНК-лигаза – белок, который соединяет 3'-конец одной цепи ДНК с 5'-концом другой цепи ДНК, восстанавливая фосфодиэфирную связь и формируя непрерывную цепь

Схема получения рекомбинантной ДНК



Как получить ген в очищенном виде?

Создание библиотек:

- Геномной ДНК
- кДНК



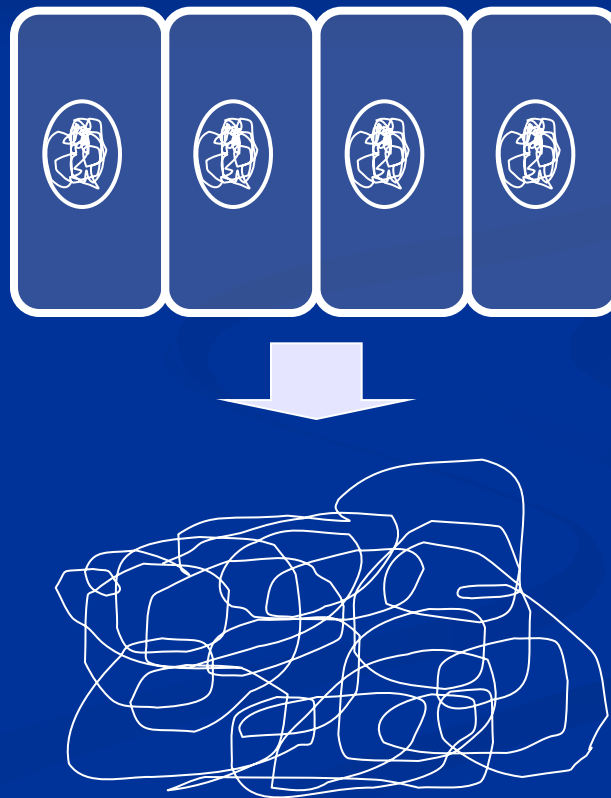
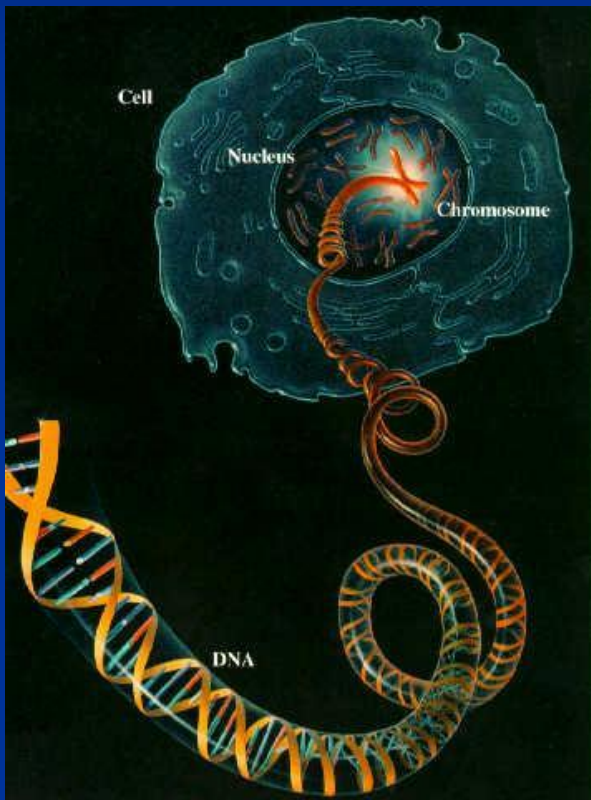
Выявление клонов, несущих интересующий ген



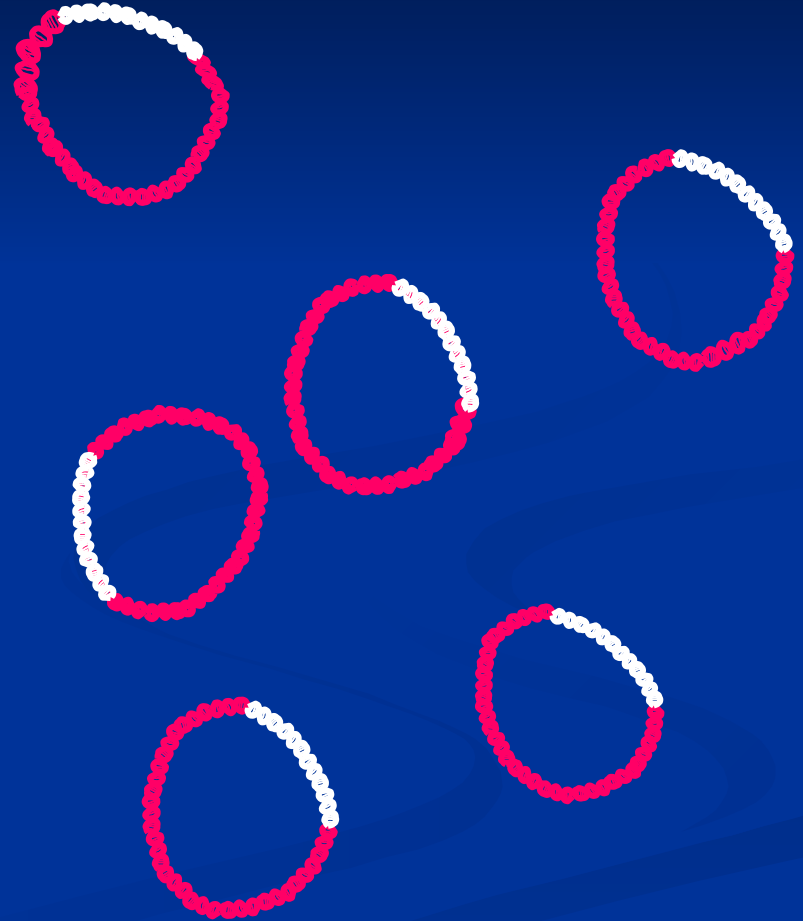
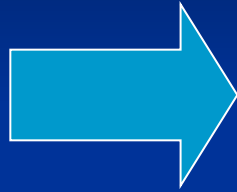
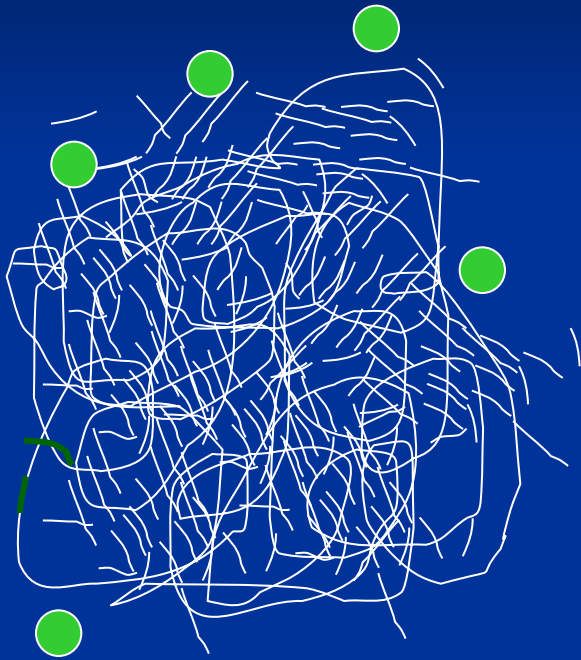
Клонирование ДНК

Создание библиотеки геномной ДНК

1. Из организма – донора нужных генов – экстрагируют ДНК, расщепляют ее рестриктазами и соединяют с вектором с образованием рекомбинантной молекулы

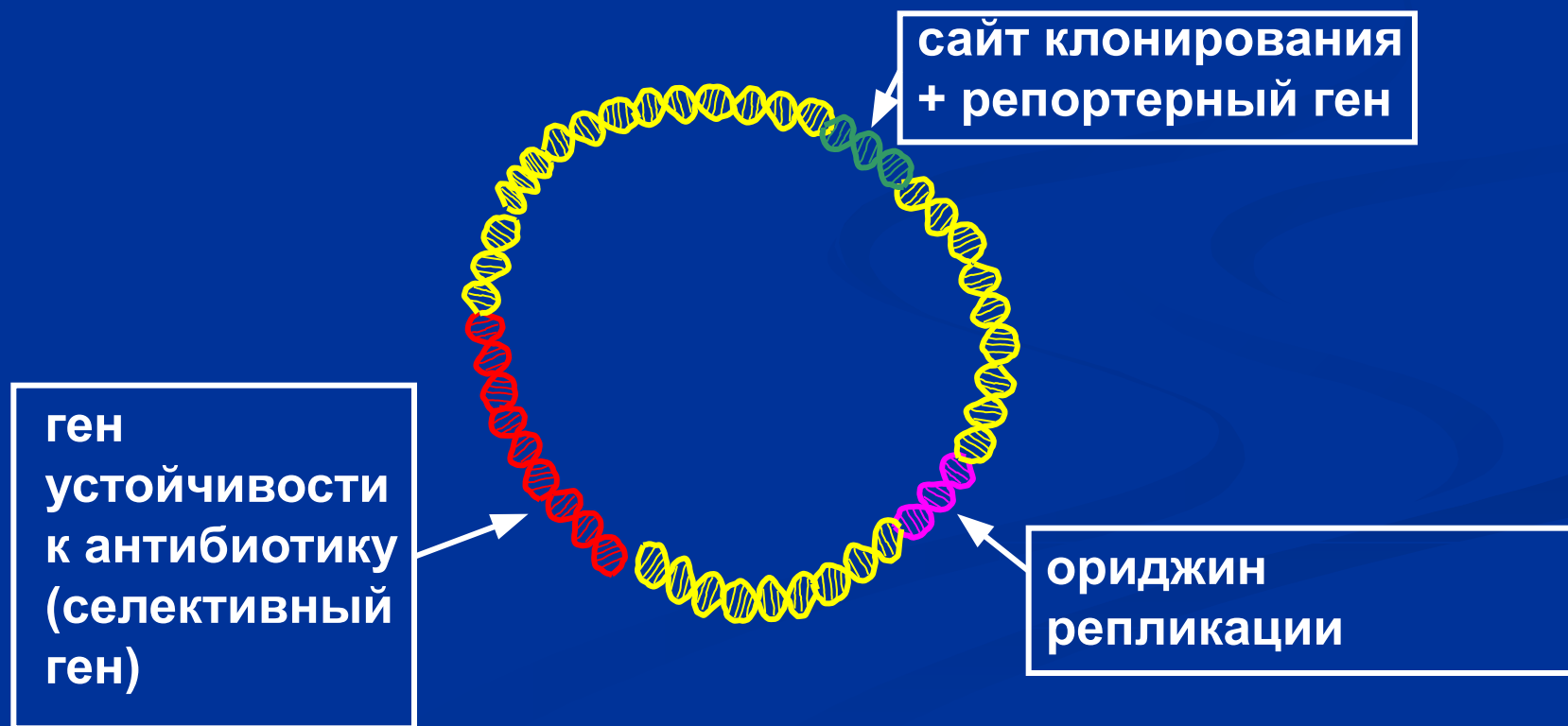


Вектор – самореплецирующаяся молекула ДНК (напр. плазмида), используемая в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиента, а также для клонирования фрагментов ДНК

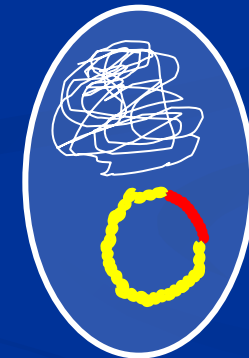
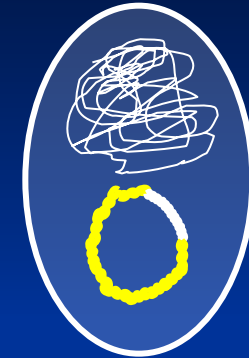
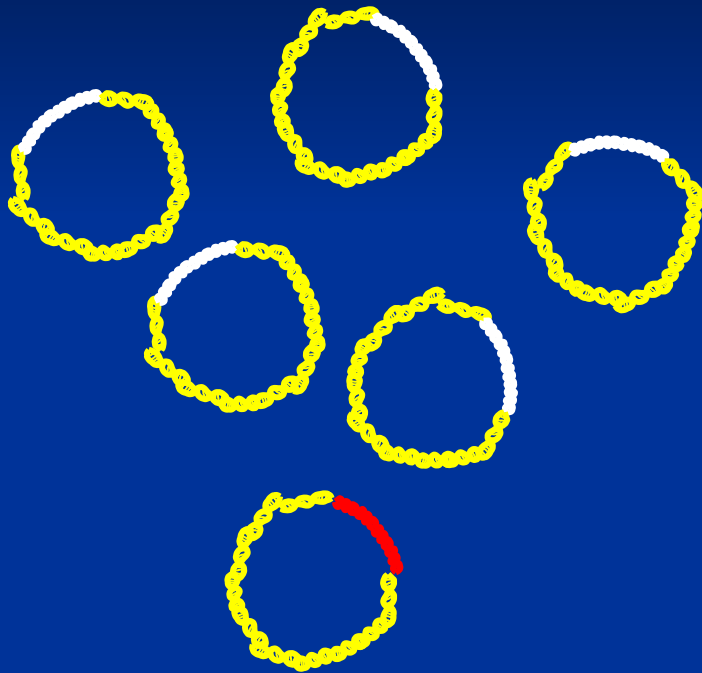


Плазмиды – бактериальные внехромосомные, автономно реплицирующиеся кольцевые молекулы ДНК

Полилинкер – искусственная нуклеотидная последовательность, содержащая несколько сайтов рестрикции



2. Рекомбинантную ДНК вводят в клетку-хозяина (*E. coli*), где она реплицируется и передаётся потомкам. Этот процесс называется *трансформация*.

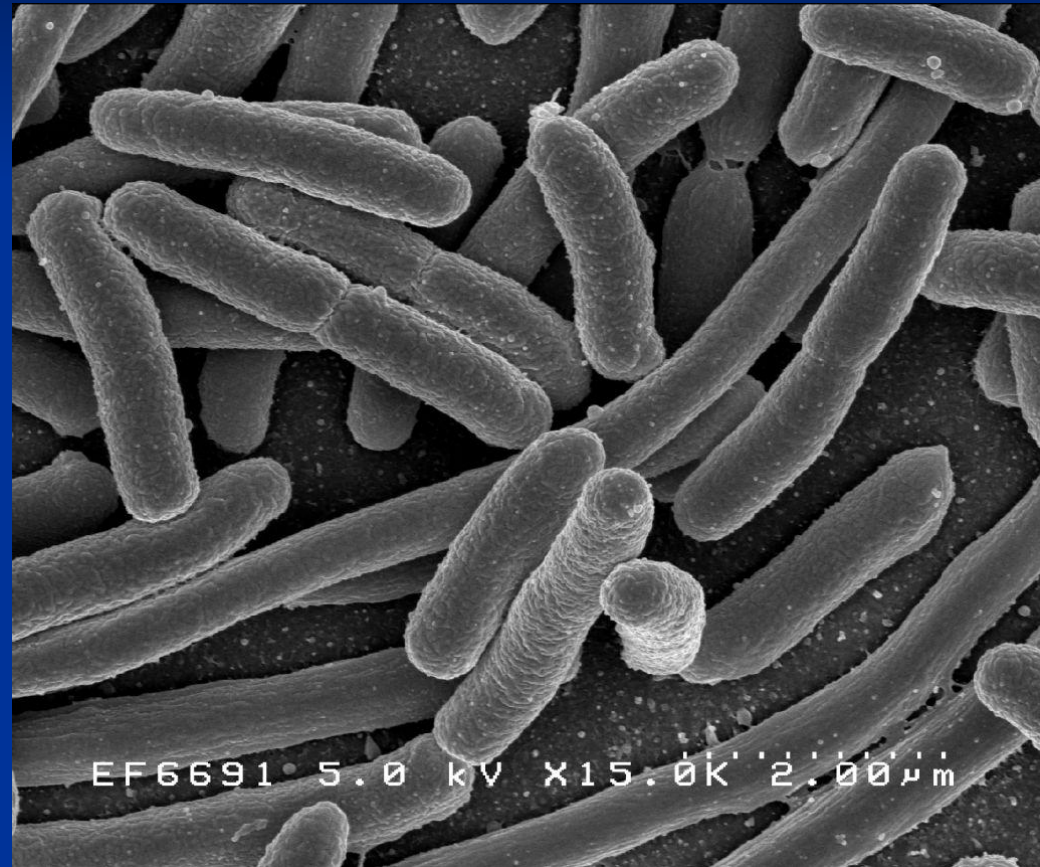


Колония – совокупность потомков одной клетки родоначальницы.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

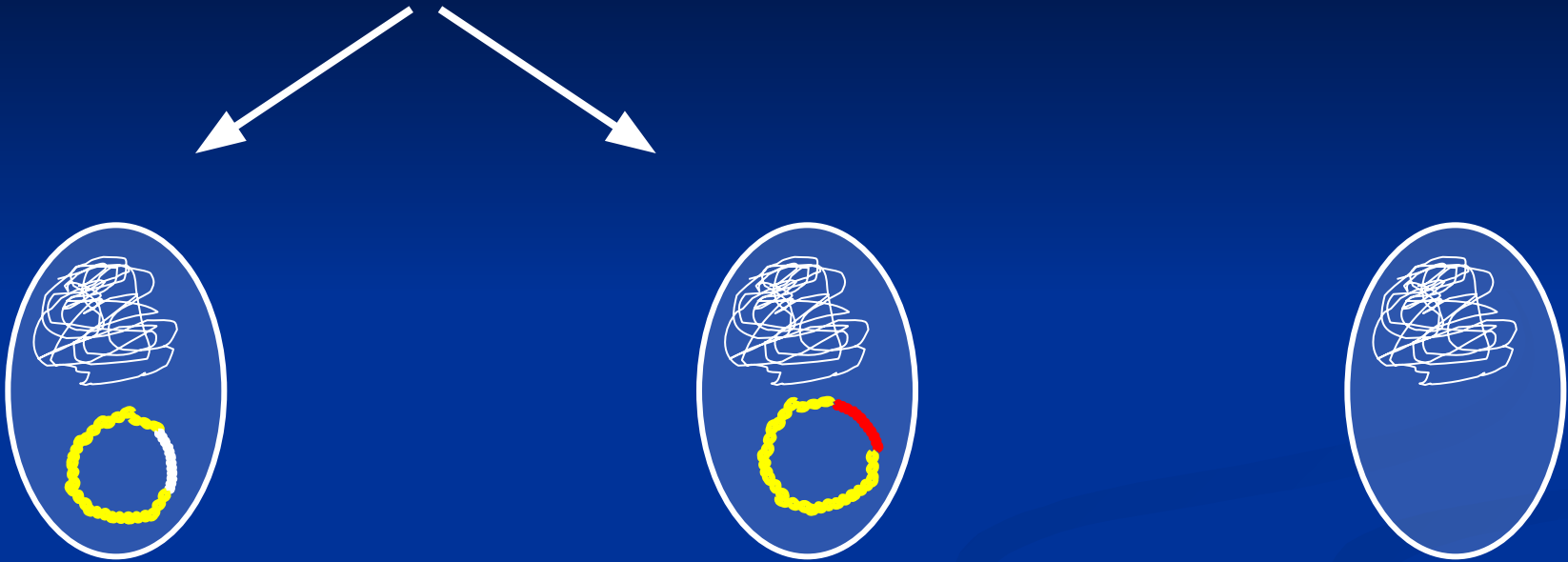
Escherichia coli, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium melitoli*,
Pseudomonas putida

- просто получить
- быстро растут



Клетки кишечной палочки (*E. coli*)

3. Отбор клеток *E. coli*, несущих плазмиду с геном устойчивости к антибиотику.



4. Отбор колоний несущих рекомбинантную ДНК с помощью репортерного гена (синие колонии с плазмидой без вставки белые колонии с рекомбинантной плазмидой)



5. Идентификация клетки, несущей нужный участок ДНК



Гибридизация с использованием ДНК-зонда.
ДНК-зонд – радиоактивно меченная ДНК.

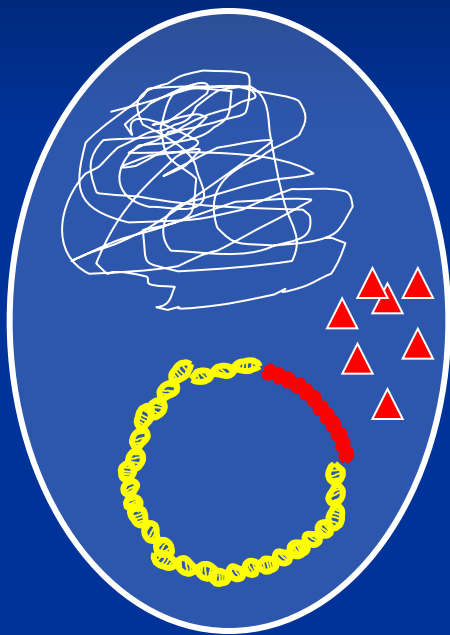
Плазмиды одной колонии содержат клон геномной ДНК.

Совокупность всех клонов геномной ДНК составляют библиотеку геномной ДНК.

Вектор, используемый для клонирования ДНК, называется клонирующий вектор.

Практическое применение рекомбинантных ДНК

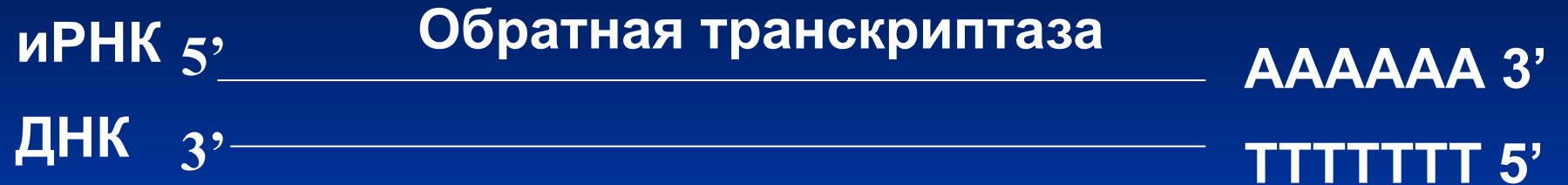
Получение животных белков



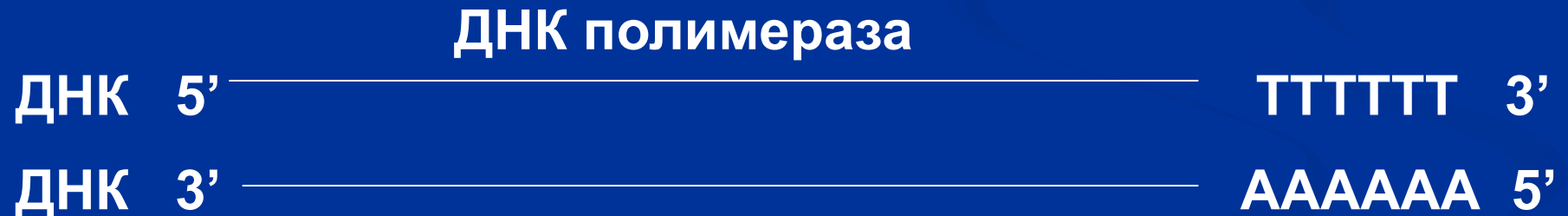
Прокариотический экспрессирующий вектор



Библиотека кДНК (комплементарной ДНК)



Обработка щелочью для разрушения РНК



Рекомбинантный белок – белок, кодируемый геном, который экспрессируется в клонированной рекомбинантной ДНК.

Для достижения эффективной экспрессии гена сконструировано много специфических векторов; для этого проводились манипуляции с целым рядом генетических элементов, контролирующим процессы транскрипции и трансляции, стабильность белков, секрецию продуктов из клетки-хозяина и т. д.

Для стабильной экспрессии клонированного гена важно:

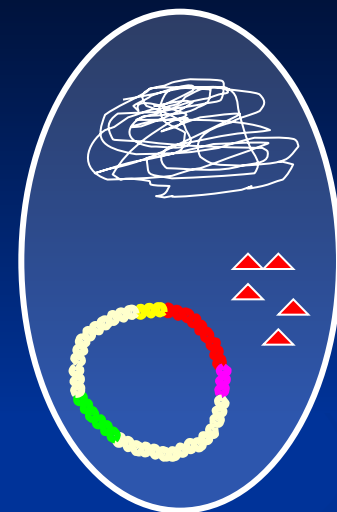
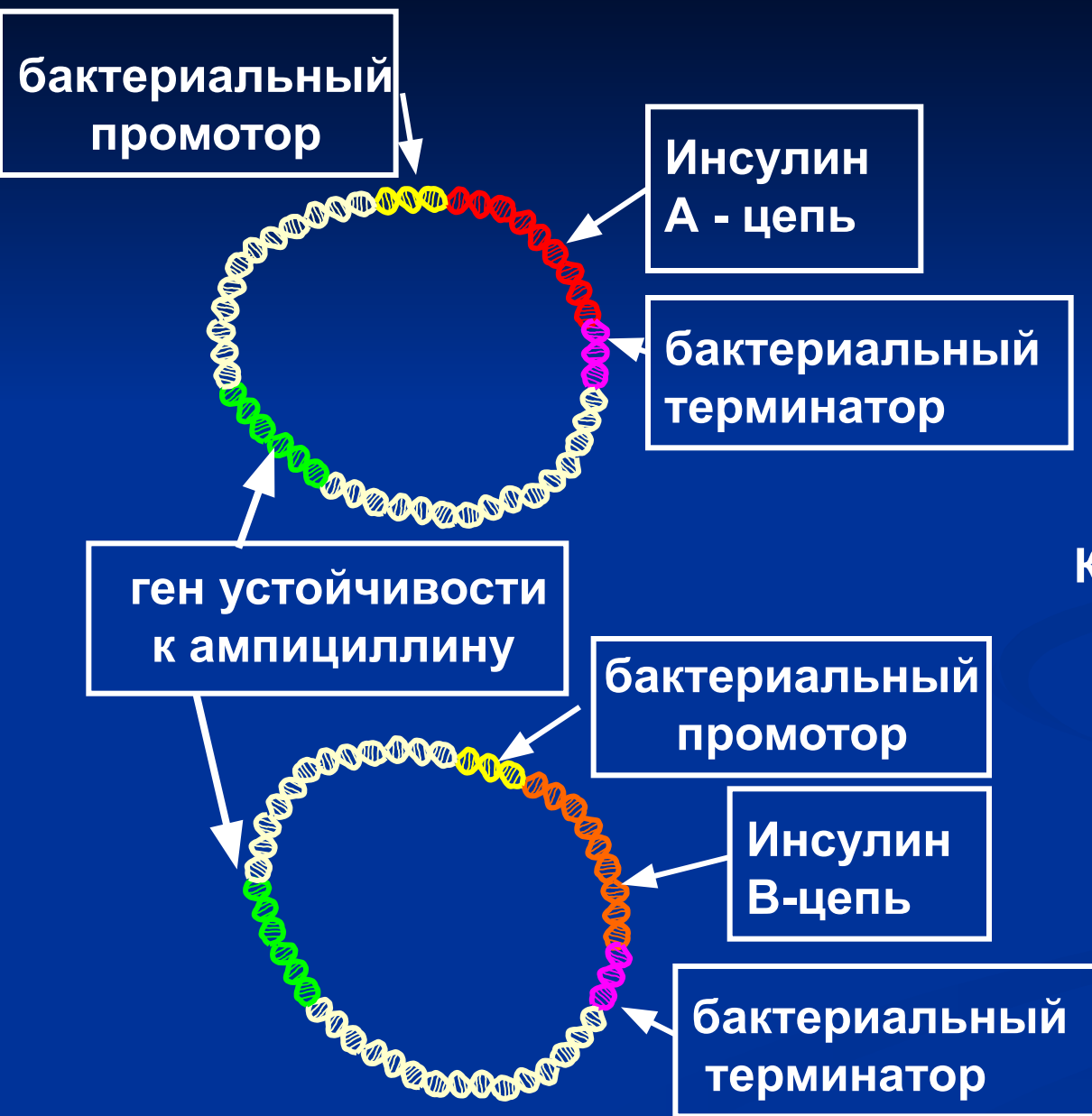
- тип промотора и терминатора транскрипции
- прочность связывания иРНК с рибосомой
- число копий клонированного гена и его локализации
- конечная локализация синтезируемого продукта
- эффективность трансляции в организме хозяине
- стабильность продукта в клетке хозяина

Получение рекомбинантного белка

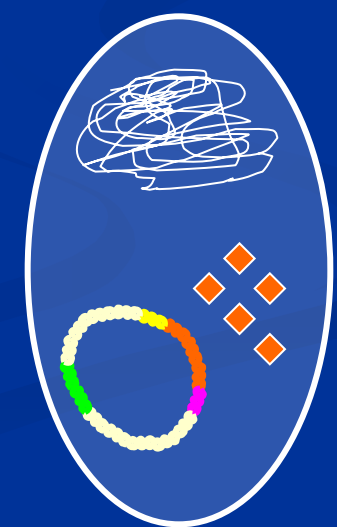
1. Первый шаг, необходимый для получения рекомбинантного белка – это клонирование гена, кодирующего этот белок.
2. Следующий шаг - это введение гена в клетку, где будет происходить синтез белка. Наиболее популярные для этих целей организмы: бактерии, дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих.

Одним из самых ранних применений технологий рекомбинантных белков было производство в бактериальных клетках человеческих белков в медицинских целях.

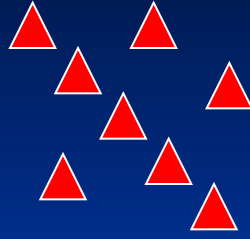
Первый коммерческий биотехнологический продукт разработанный компанией Genentech был человеческий инсулин



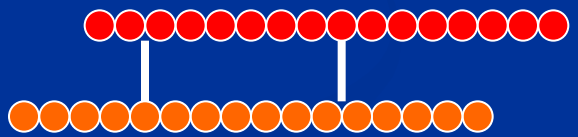
Клетки кишечной палочки (*E. coli*)



Взамен инсулина из поджелудочных желез свиней и коров, диабетики могли использовать нормальный человеческий инсулин



Инсулин А-цепь



Активный инсулин



Инсулин В-цепь



Культура бактериальных клеток, выращивается в ферментерах

Примеры лекарств, производимых с помощью биотехнологии:

Activase – для разрушения тромбов в кровеносных сосудах

Herceptin – лечение рака молочной железы

Neutropin, Humatrope – лечение недостатка гормона роста

Xolair – лечение аллергической астмы

Rativa, Amevive – лечение псориаза

Erogen и Procruif – лечение анемии

Enbrel, Humira, Remicade – лечение ревматоидного артрита

Avonex, Betaseron – лечение множественного склероза

Recombivax – вакцина против гепатита В

Flumist – вакцина против гриппа

Forteo – лечение остеопороза

Reopro – предотвращает тромбообразование

Xigris – лечение сепсиса

**Рекомбинантные белки, которые
используют в
терапевтических целях.**

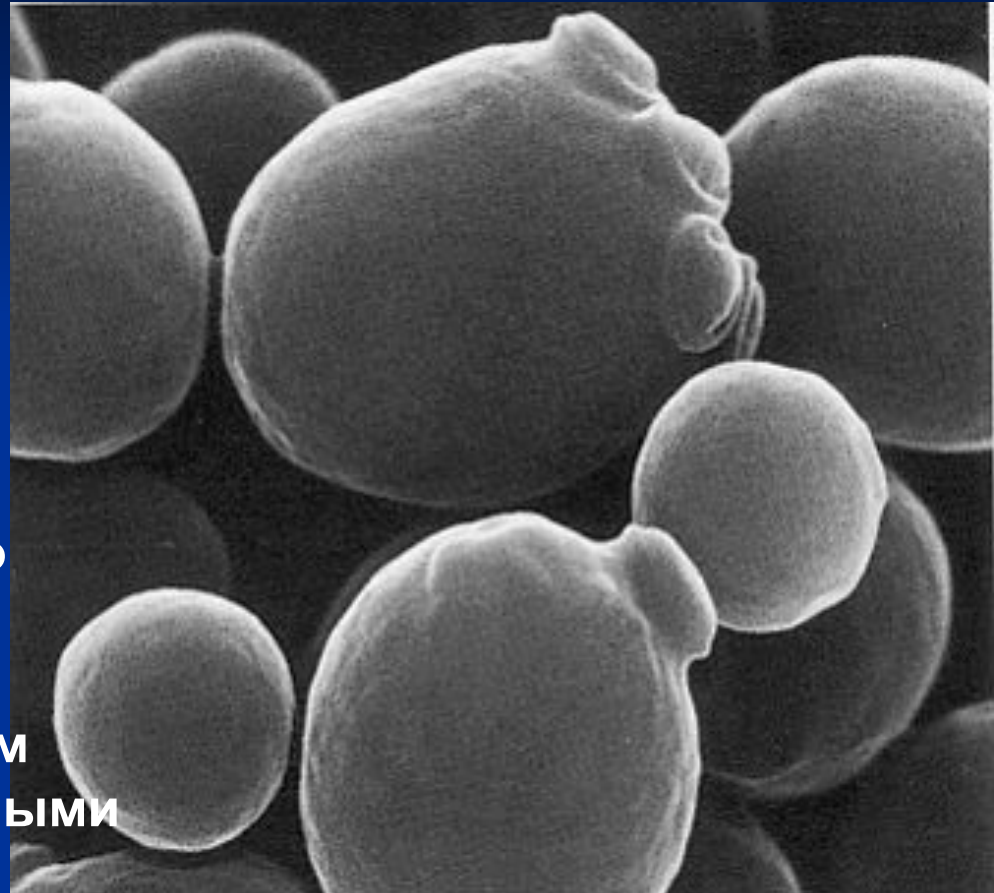
| Год | Продукт | Клиническое применение |
|-------------|------------------------------|--------------------------------|
| 1982 | Человеческий инсулин | Диабет |
| 1985 | Гормон роста человека | Карликовость |
| 1986 | Вакцина гепатита В | Профилактика гепатита В |
| 1989 | Эритропоэтин | Анемия |
| 1992 | Фактор VII | Гемофилия А |
| 1997 | Фактор IX | Гемофилия В |
| 1999 | Фактор VIIa | Гемофилия |

Бактериальные клетки имеют ряд недостатков:

- белки могут получаться в неактивной форме**
- белки могут включаться в нерастворимые тельца**
- получаемые белки часто токсичны для бактерий, что снижает выход белка**
- для работы эукариотических белков часто требуются особые модификации, которые не могут происходить в бактериях**
- белок может быть загрязнен пирогенами**

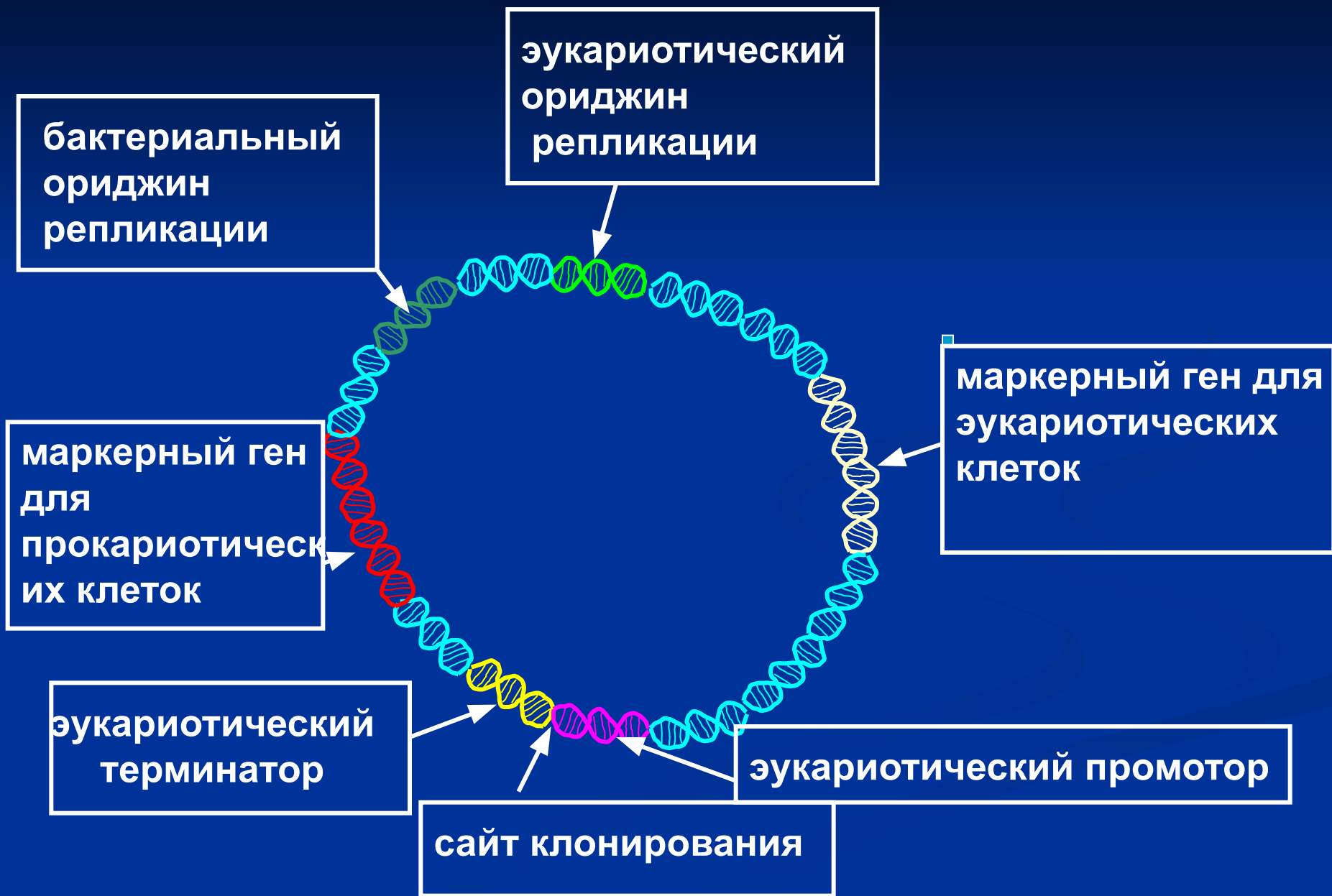
ДРОЖЖЕВЫЕ КЛЕТКИ

- это эукариотические организмы, которые могут расти так же быстро как бактерии
- могут осуществлять некоторые необходимые модификации
- генетика и физиология детально изучена
- дрожжи используются человеком давно и оно признаны безопасными



дрожжевые клетки

Эукариотический экспрессирующий вектор



Недостатки дрожжевых систем:

- присутствие активных ферментов, которые разрушают получаемый белок
- не гарантирует получение активного белка любого гена

Некоторые препараты, получаемые с помощью дрожжевых клеток:

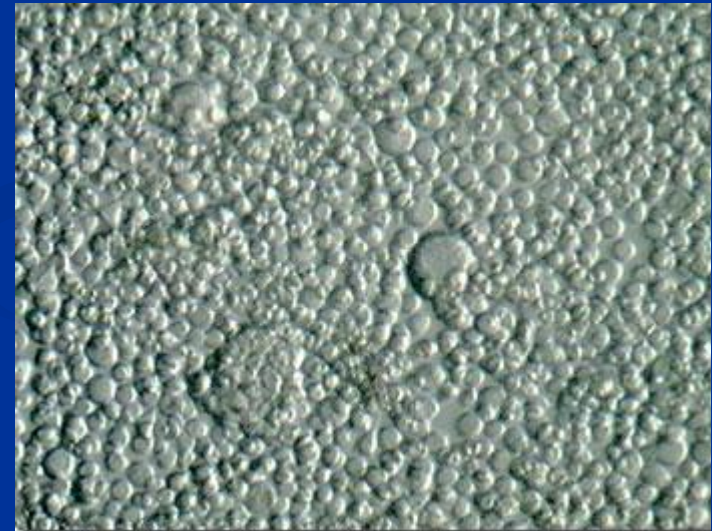
- Фактор роста эпидермиса
- Инсулин
- Тромбоцитарный фактор роста
- Фактор роста фибробластов
- Фактор XIIa системы свертывания крови
- α -антитрипсин
- вакцина против гепатита В

Клетки насекомых

Линии клеток, используемые для работы получают из гусениц *Spodoptera frugiperda* (линии Sf9, Sf21)

Векторы для экспрессии были разработаны на основе вирусов, инфицирующих насекомых - бакуловирусов

- высокий уровень синтеза белка
- осуществляется большинство необходимых модификаций
- получают активные формы белка



клетки насекомых

Некоторые рекомбинантные белки, синтезируемые в клетках насекомых:

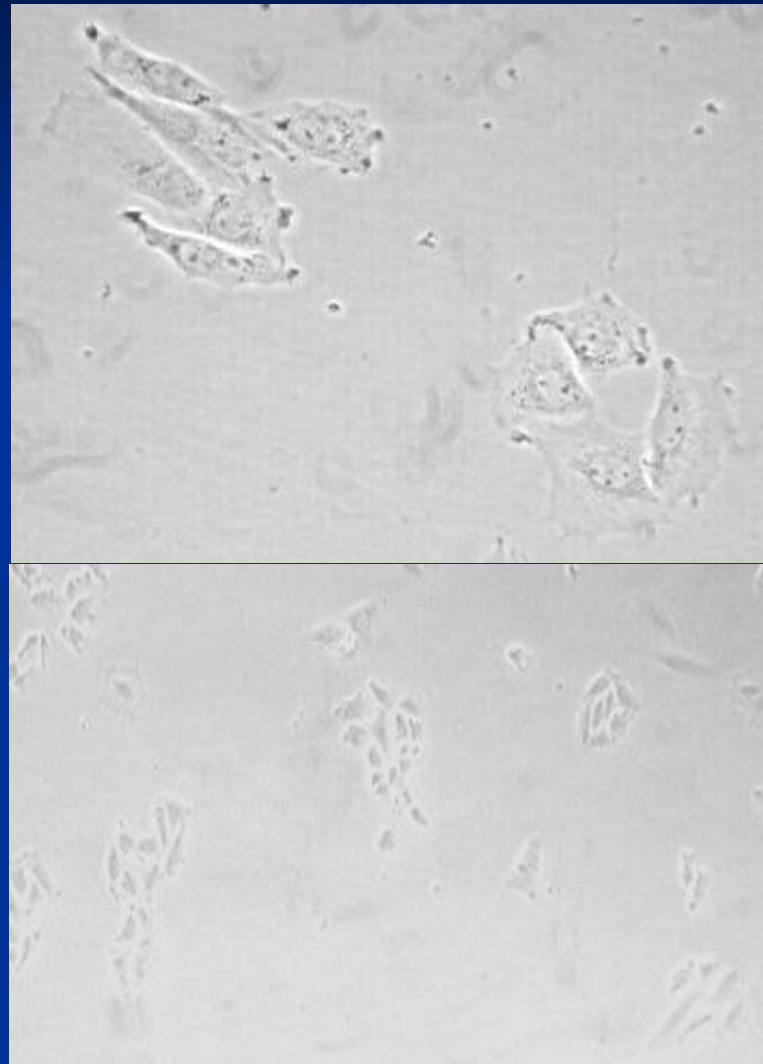
- α -интерферон
- эритропоэтин
- щелочная фосфатаза человека
- липаза поджелудочной железы человека
- интерлейкин-2
- активатор тканевого плазминогена
- регулятор проницаемости мембран, нарушения в котором приводят к муковисцидозу

Клетки млекопитающих

Созданы экспрессирующие векторы для культуры клеток млекопитающих

Промышленный синтез рекомбинантных белков с использованием модифицированных клеток млекопитающих обходится слишком дорого

Системы экспрессии на основе клеток млекопитающих используют для получения рекомбинантных белков, которые невозможно получить с помощью других систем получения



Получение определенных лечебных белков может быть достигнуто только с помощью культуры клеток млекопитающих, где белок соответствующим образом укладывается и модифицируется

Выработка этого белка в *трансгенных животных* может быть альтернативным методом

Секреция рекомбинантного белка может происходить в молоко. Таким способом можно получать экспрессию белка на уровне 35 г/л

Использование растений для получения рекомбинантных белков

Растения – возможная альтернатива, позволяющая отказаться от использования животных и культуры клеток млекопитающих при получении рекомбинантных белков.

- растения легко выращивать, и путь от лабораторных тестов к коммерческому использованию быстр и легок
- использование животных сопряжено с риском заражения эндогенными вирусами
- растения выполняют очень схожие с животными модификации белков

Растения рассматривают как дешевую, безопасную и эффективную систему для получения вакцин



Проверь себя!

1. Одна из важных областей применения технологий рекомбинантных ДНК – это получение белка. Как получить высокий уровень экспрессии вставленного гена ?
2. Большинство генов животных и человека содержат интроны. Бактерия не может вырезать интроны из ядерной иРНК. Как бактерии могут быть использованы для получения протеина животных или человека?
3. При каких условиях рестриктаза не подходит для клонирования фрагмента чужеродной ДНК?

4. Предположим случайное сочетание нуклеотидов в фрагменте ДНК, какова вероятность разрезания этого фрагмента рестриктазой с сайтом узнавания из 4 нуклеотидов? Из 6 нуклеотидов?
5. ДНК фрагмент 8 kb помечен P^{32} с 5' конца и разрезан рестриктазами *EcoRI* и *BglII* поотдельности и вместе. Меченные фрагменты обозначены звездочкой. Построить рестрикционную карту этого фрагмента.

