

# Лекция 9. Клонирование генов

## Часть 1. Клонирование в бактериальных геномах

---

### Содержание:

1. Клонирование – стратегия генноинженерных манипуляций..... 
2. Векторы..... 
3. Клонирование с помощью плазмидного вектора..... 
4. Методы скрининга клонотек..... 

# 1

---

## Клонирование – стратегия генноинженерных манипуляций



Как найти нужный ген среди миллиардов пар нуклеотидов?



Хромосомы крупного рогатого скота

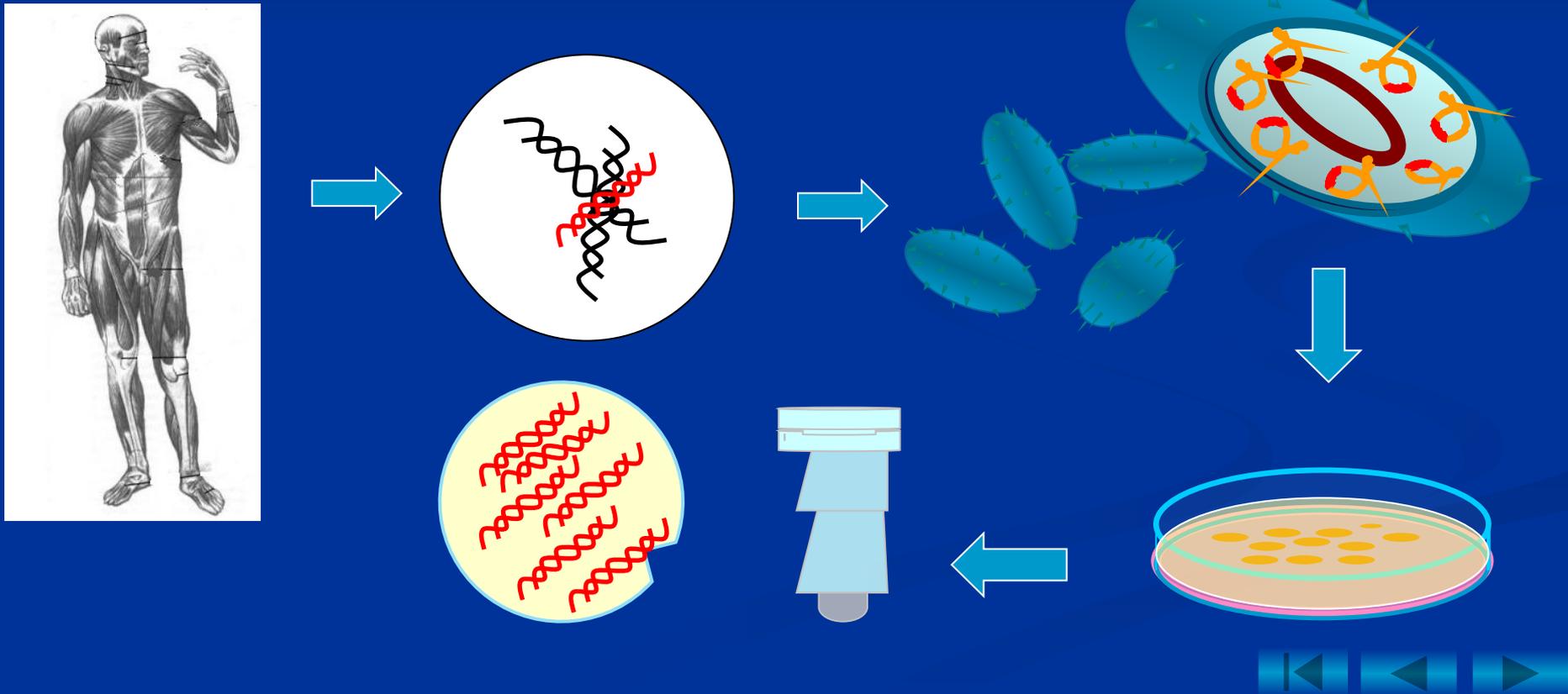


**Клонирование генов** - ключевой метод генетической инженерии, с помощью которого решается стратегическая задача выделения нужной последовательности ДНК (гена) и наработка её в препаративном количестве, достаточном для всестороннего изучения, а также переноса в другие живые организмы.

**Клонирование генов** - многократное увеличение числа копий генов .



Клонирование генов в бактериальных геномах – копирование ДНК, перенесенной в бактериальные клетки с помощью векторов, путем интенсивного размножения колоний бактерий и репликационной активности вектора.



# Технология клонирования в бактериальных геномах

Выделение образца ДНК из биообъекта

Фрагментация (рестрикция) ДНК

Конструирование вектора

Трансформация вектором бактериальных клеток

Отбор трансформированных клеток, создание клонок (библиотек генов)

Скрининг библиотек, клонирование нужного гена



2

---

# Векторы



**Вектор** – молекула ДНК, способная к автономной репликации и служащая для переноса чужеродной ДНК в клетку.

## **Основные принципы конструирования векторов:**

- наличие на векторной ДНК специального участка - *origin* для связывания ДНК-полимеразы, которая обеспечивает репликацию вектора и **клонирование** встроенного в него гена;
- наличие специальных **маркерных генов**, придающих трансформированным клеткам новые признаки;
- возможность **экспрессии** встроенного гена в виде белкового продукта: необходимы наряду с кодирующей частью гена регуляторные части – **промотор** и **терминатор**

# Типы векторов по функциональным возможностям:

- Клонировующий – обеспечивает клонирование ДНК-вставки.
- Интегративный – обеспечивает встраивание ДНК-вставки в геном клетки-хозяина.
- Экспрессирующий – обеспечивает экспрессию гена.
- Челночный – способен реплицироваться в клетках разных видов.

# Типы векторных систем по происхождению:

Векторы, реплицирующиеся  
в клетках прокариот

Плазмиды

- внехромосомные генетические

- вирусы,  
паразитирующие в  
клетках

млекопитающих

Векторы, реплицирующиеся  
в клетках эукариот

Вирус SV40  
Ретровирусы  
паразитирующие в  
одноцепочечную ДНК

Аденовирусы

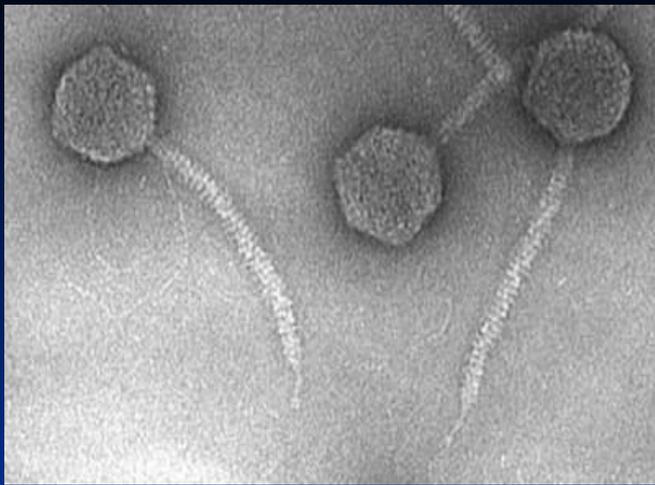
кду фагами и

Фагмиды - в плаزمидами

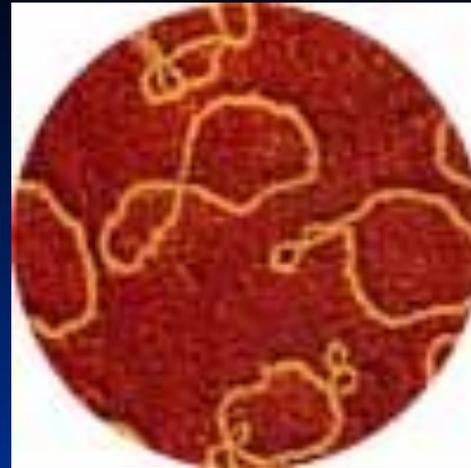
Бактериальные  
хромосомы (ВАС)

насеком - векторы большой емкости на  
основе хромосом дрожжей и  
Y-хромосомы

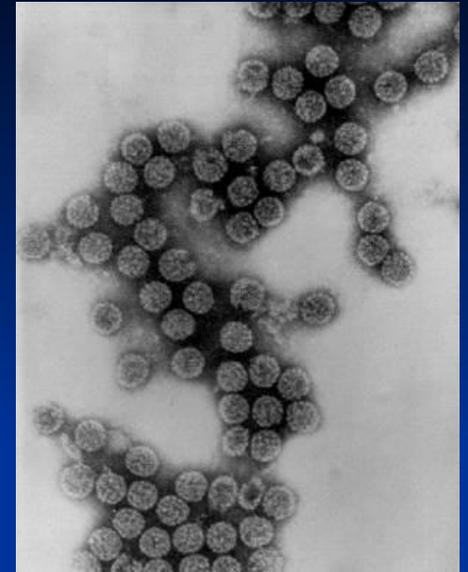




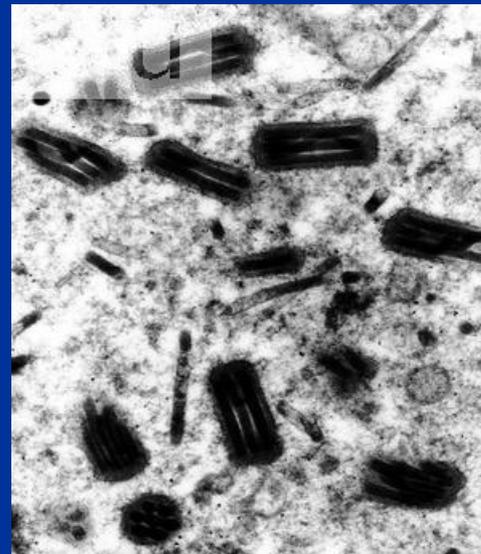
Бактериофаг  $\lambda$



Плазмида pBR322



SV40



Бакуловирусы



# Доставка векторной ДНК в клетки

**Трансформация** – перенос генетической информации в клетки бактерий посредством плазмид.

**Трансдукция** – перенос генетической информации в клетки бактерий посредством бактериофагов.

**Трансфекция** - процесс переноса очищенной ДНК в клетки.

Стабильная трансфекция – проникновение ДНК-вставки в ядро и интеграция в геном клетки хозяина

Временная трансфекция – проникновение только в цитоплазму клетки



**Компетентность** - состояние клетки, при котором она способна поглощать экзогенную ДНК из внешней среды.

**Природная компетентность** (восприимчивость к плазмидной, вирусной ДНК)

**Искусственная компетентность**

Способы достижения:

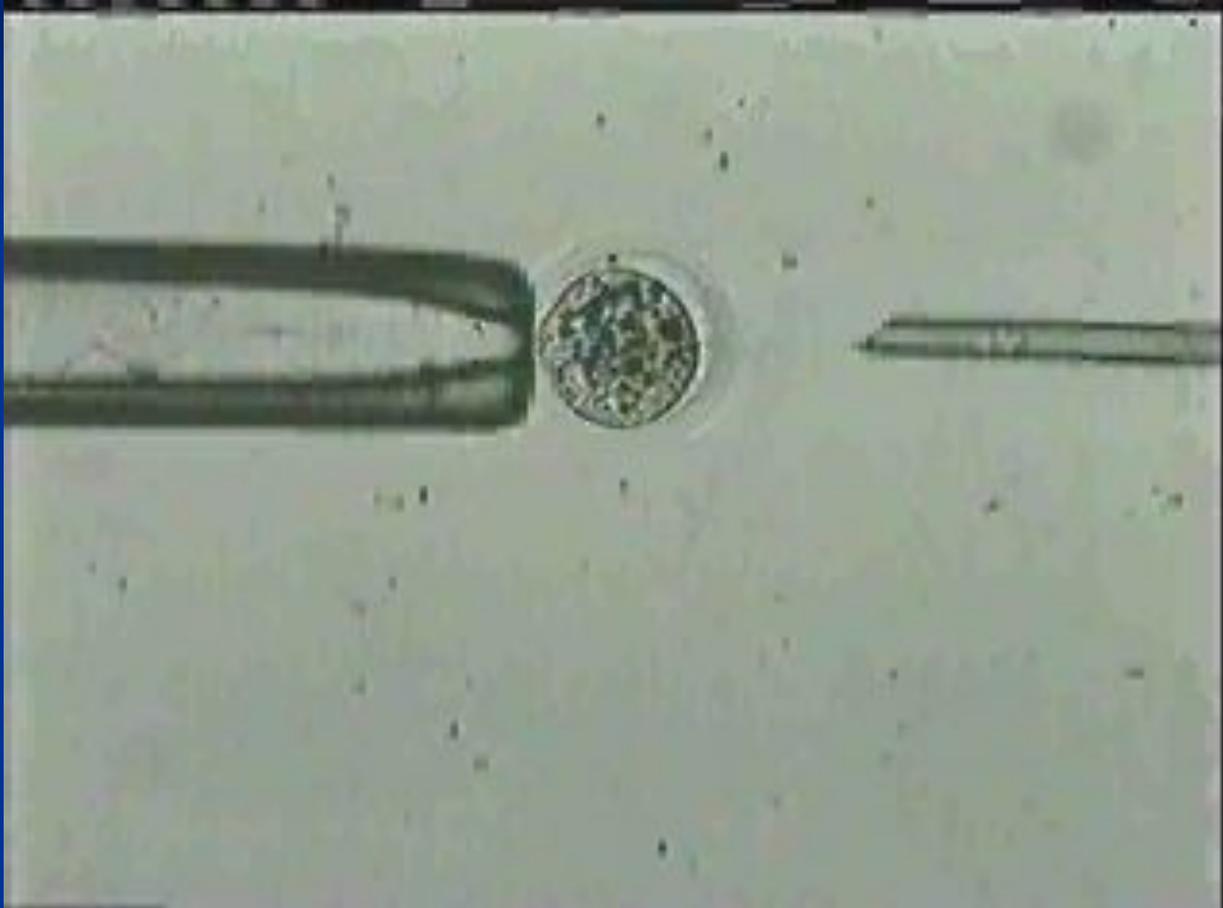
**Физические**

**Химические**

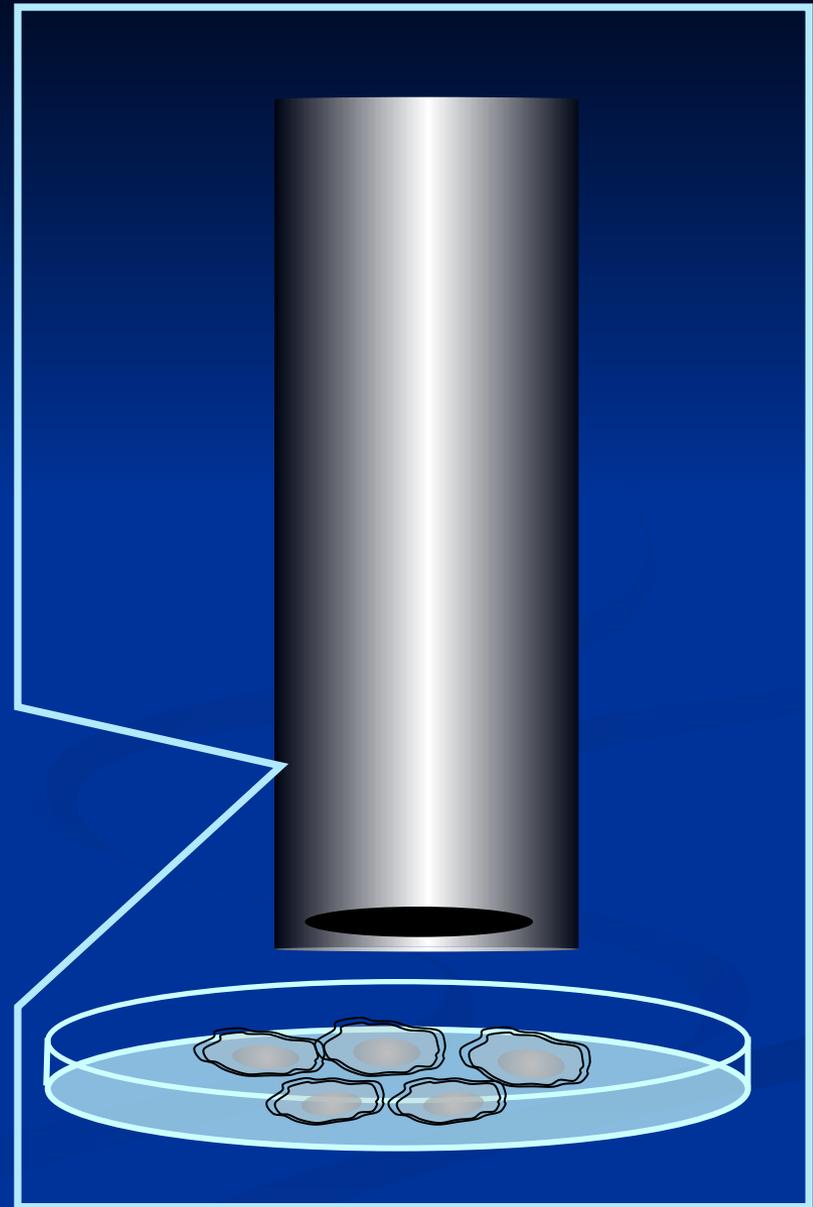
**Биологические**

# Способы достижения искусственной компетентности

## 1. Микроинъекция ДНК



## 2. Баллистическая инъекция ДНК – бомбардировка клеток микрочастицами золота с адсорбированными на них молекулами ДНК.



«Генная пушка»



3. Электропорация – воздействие на клетки электрическим полем высокой напряженности, в результате чего в клеточной стенке образуются поры.

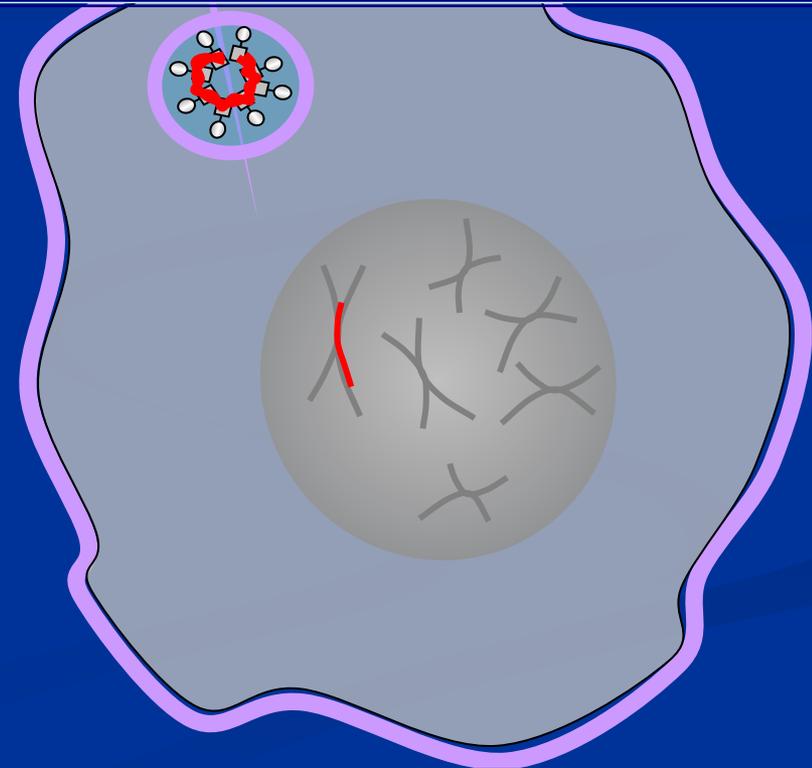
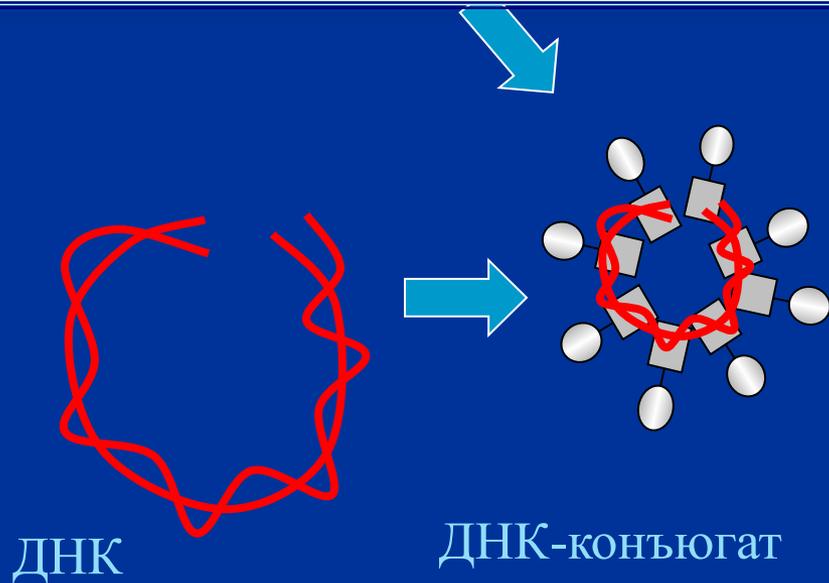
4. Кальций-фосфатный метод - обработка ДНК  $\text{CaCl}_2$  и фосфатным буфером приводит к осаждению ДНК на поверхности клеток и проникновению внутрь в ходе пиноцитоза.

5. Липосомный перенос – с помощью липидной оболочки вокруг генетической конструкции.



## 6. Система эндосомного клеточного транспорта

- осуществляется за счет поглощения клеткой комплекса лиганд-ДНК, узнаваемого специальными рецепторами на мембране.



# 3

---

## Клонирование с помощью плазмидного вектора



# Технология клонирования в бактериальных геномах

Выделение образца ДНК из биообъекта

Фрагментация (рестрикция) ДНК

Конструирование вектора

Трансформация вектором бактериальных клеток

Отбор трансформированных клеток, создание клонок (библиотек генов)

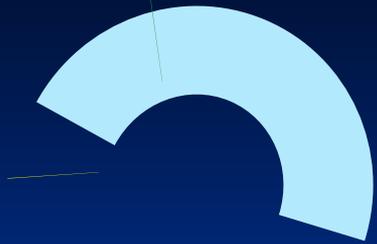
Скрининг библиотек, клонирование нужного гена



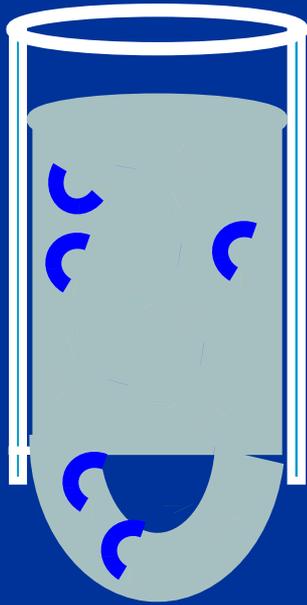
# Карта плазмиды pBR322 (4361 п.н)



# Конструирование векторной системы



Разрезание плазмиды  
по сайту *Bam*



Смесь векторных молекул

Получение рекомбинантной ДНК



# Плазмидный вектор

Вставка донорской ДНК происходит по месту гена устойчивости к тетрациклину, нарушая его структуру и функцию

$Ap^R$



sensitive

*Pst* (3609)



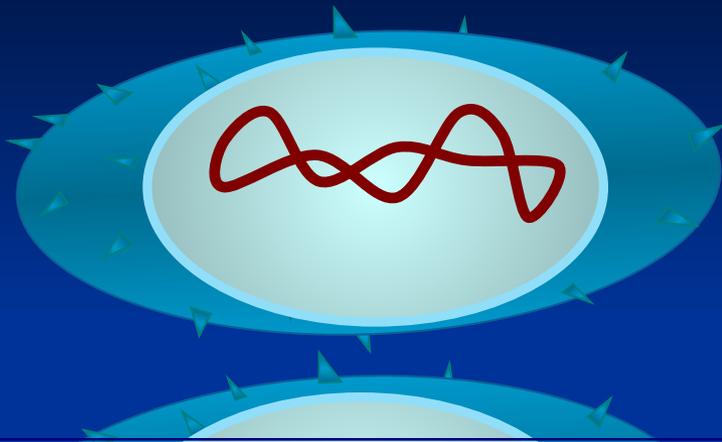
*ori*



$Tc^S$

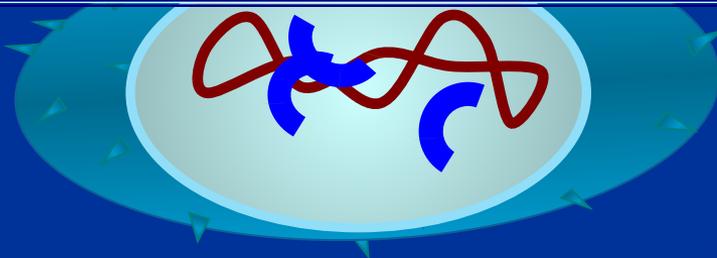


В ходе трансформация бактерий векторными частицами возможно получение трех типов клеток:



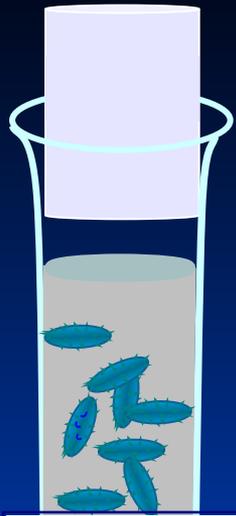
- Бактерии, в которых не произошла трансформация  
 $Ap^S Tc^S$

Для разделения смеси бактерий с разными фенотипическими свойствами используются специальные селективные среды



- Бактерии с плазмидой «дикого типа»  
 $Ap^R Tc^R$

# Разделение смеси бактерий



Перепечатка колоний на фильтр

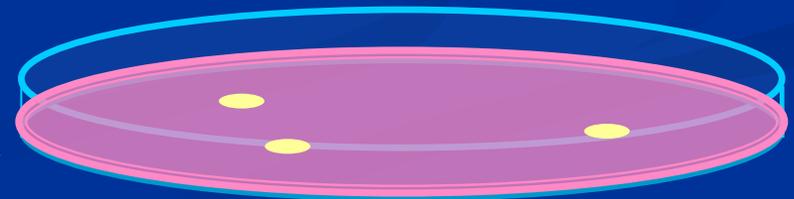


Колонии с ДНК-вставкой

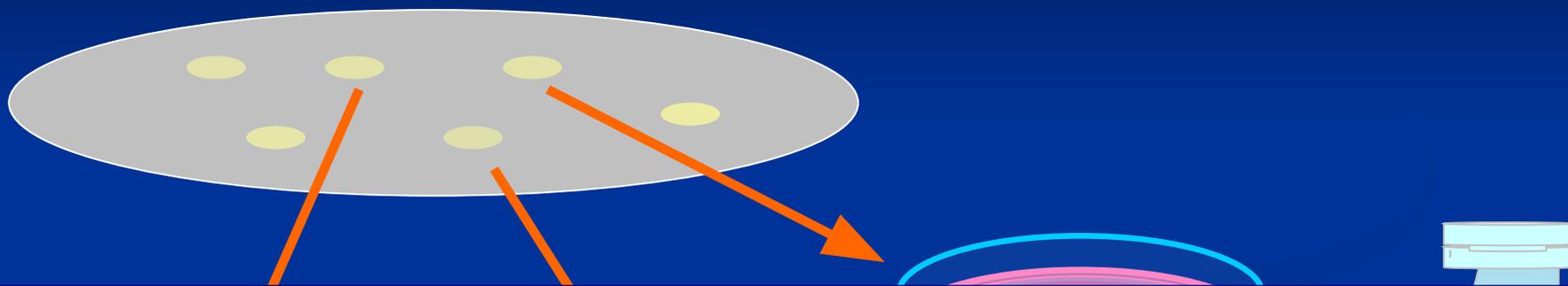
Бактерии, выросшие на среде с ампицилином ( $Ap^R$ ) и не выросшие на среде с тетрациклином ( $Tc^S$ ) несут в себе рекомбинантную плазмиду (вектор).

Перенос на среду с  $Ap^R$ : погибают  
нетрансформированные клетки

Перенос на среду с **Tc**: погибают  
колонии с ДНК-вставкой



Размножение трансформированных колоний -  
клонирование генов – создание клонок (библиотек генов).



Клонок хранятся в виде суспензии  
бактериальных клеток при минус  $70^{\circ}\text{C}$  в 30%  
растворе глицерина.

донора ДНК.

# Типы клонотек:

По источнику получения ДНК:

геномной ДНК

комплементарной ДНК

По соответствию фрагментов локусам на хромосоме:

случайные

упорядоченные (энциклопедии генов)

По полноте представленных фрагментов генома

репрезентативные

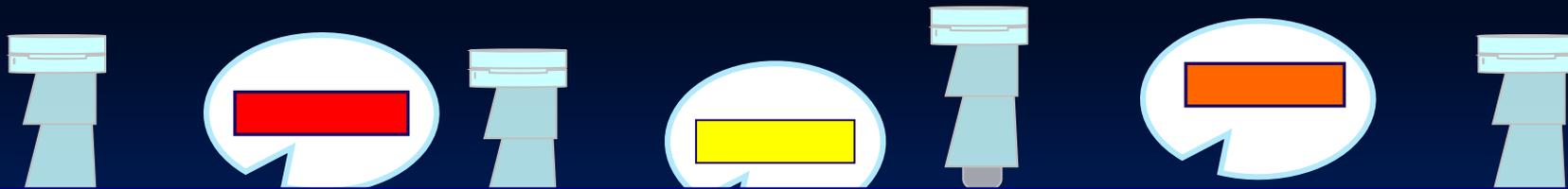
нерепрезентативные



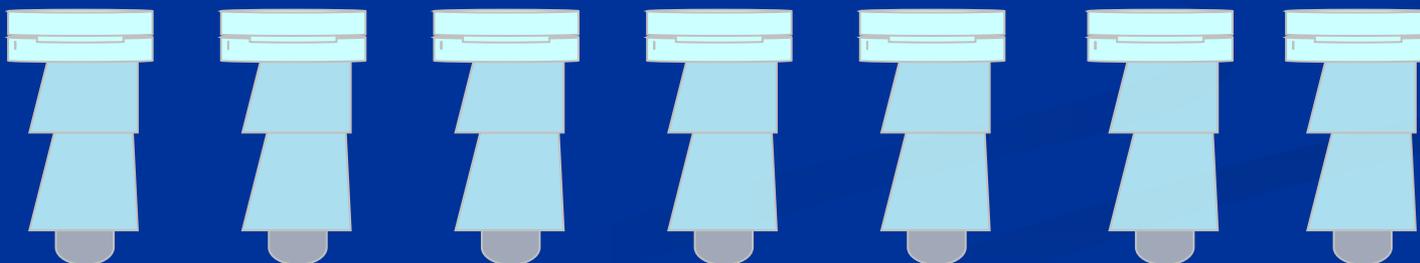
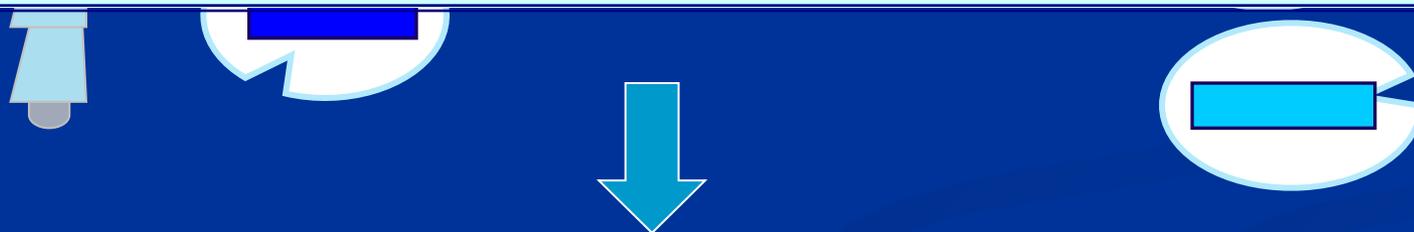
# Объем репрезентативных клонок генов разных видов при клонировании с помощью фага $\lambda$ и космиды

Вид	Размер генома, п.н.	Число клонов для вставки, тыс.п.н.	
		20 (фаг $\lambda$ )	45 (космида)
<i>Escherihia coli</i>	$4,6 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^3$	$4,7 \cdot 10^2$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,2 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,8 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
<i>Homo sapiens</i>	$3,0 \cdot 10^9$	$6,9 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$

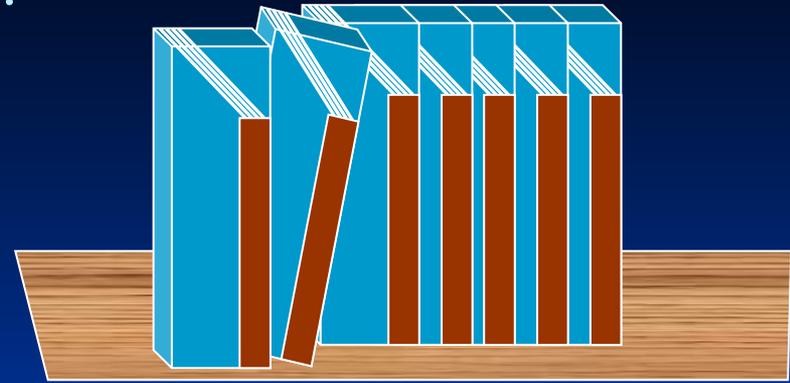
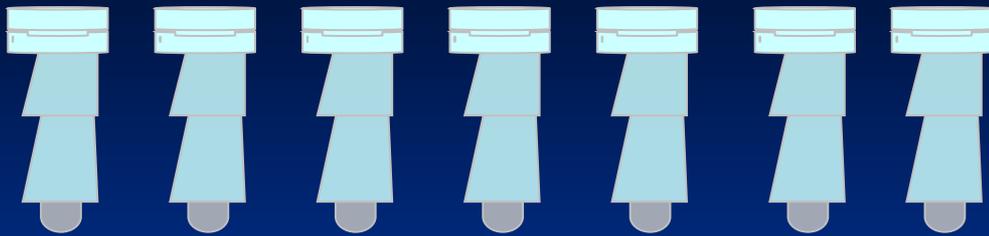




**Энциклопедия генов** - клонотека, в которой известен порядок локализации в хромосоме фрагментов ДНК, включенных в каждый клон.



В каком клоне нужный ген?



**Скрининг библиотек** – процедура выявления нужной последовательности ДНК (гена) в клонотеке путем последовательного перебора случайных клонов.



# 4

---

## Методы скрининга клонотек

**1. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* –** метод, основанный на выявлении нужной последовательности ДНК (гена) с помощью ДНК-зондов с радиоактивной меткой.

**ДНК-зонд** – короткая последовательность нуклеотидов, комплементарная участку искомой ДНК, поддающаяся детекции физико-химическими методами и служащая для поиска какого-либо гена в образце ДНК или клонотеке.



# Схема метода гибридизации *in situ*

## 1. Создание ДНК-зонда

Если известна аминокислотная последовательность белка, методом обратной трансляции можно синтезировать фрагмент ДНК, который будет служить зондом.



ДНК:

**ТАЦТТАЦА**

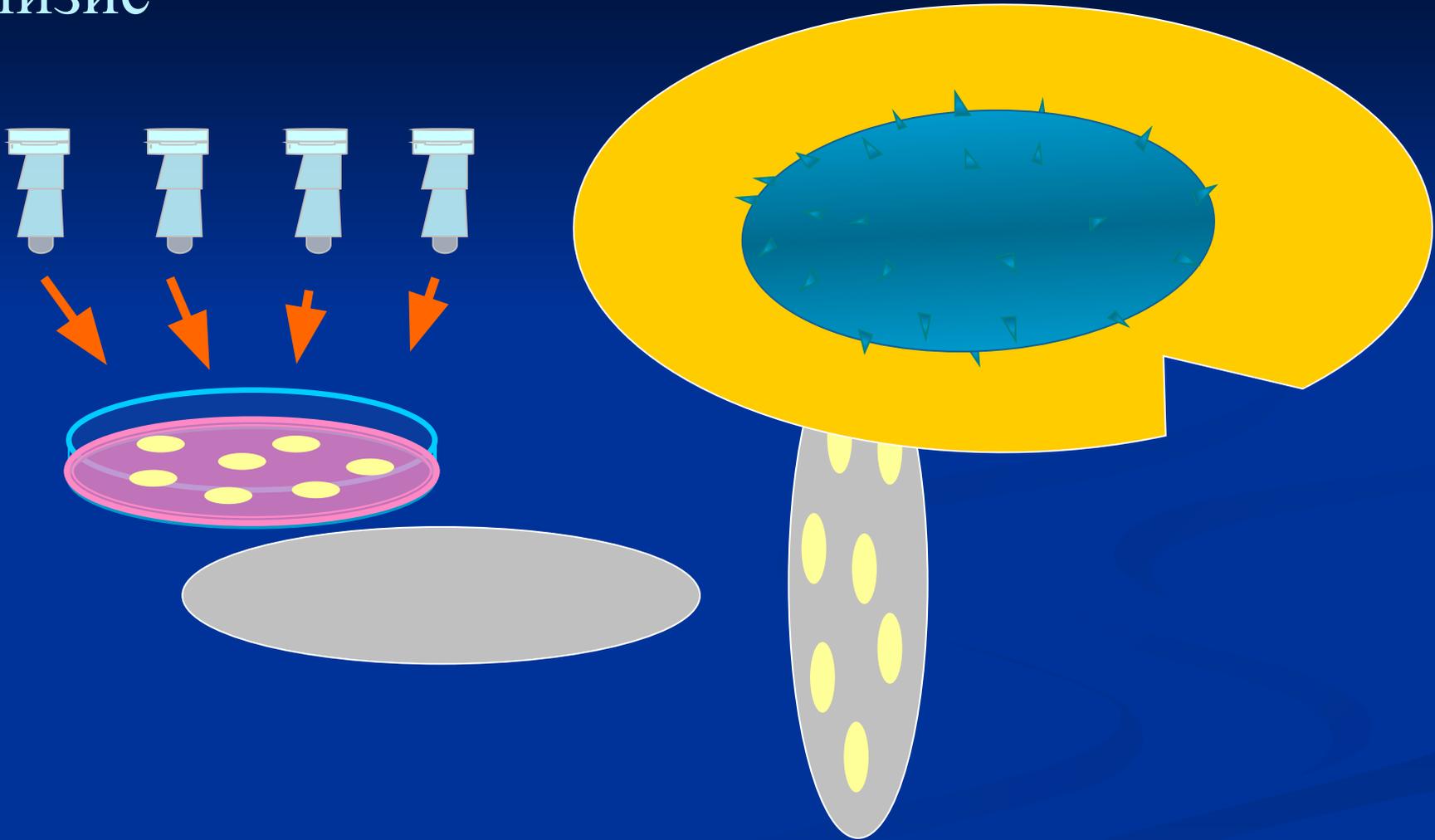
- радиоактивный ДНК-зонд

**АТГАААТГТ**

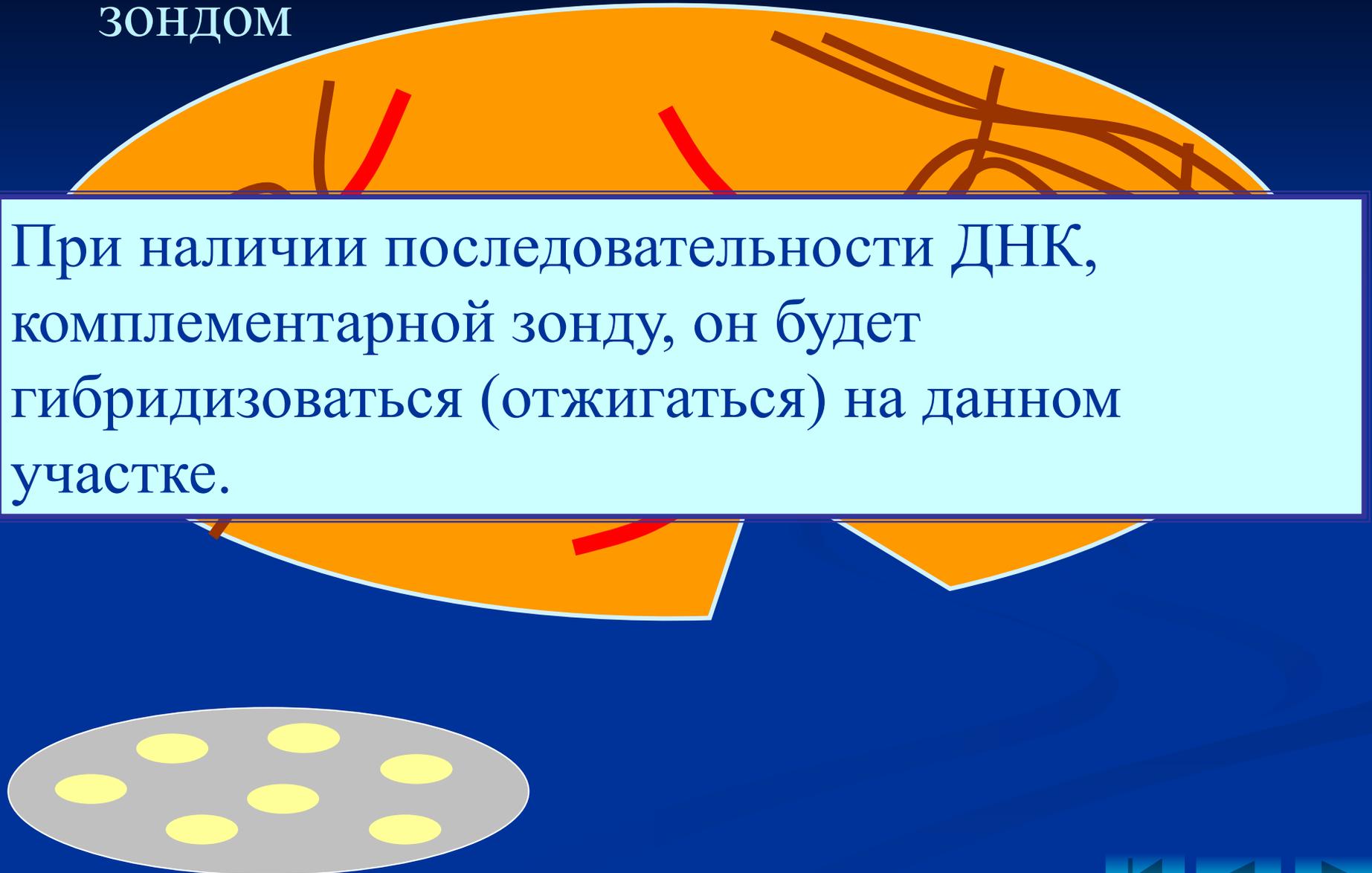
- образец ДНК



## 2. Перенос колоний бактерий на фильтр, их лизис

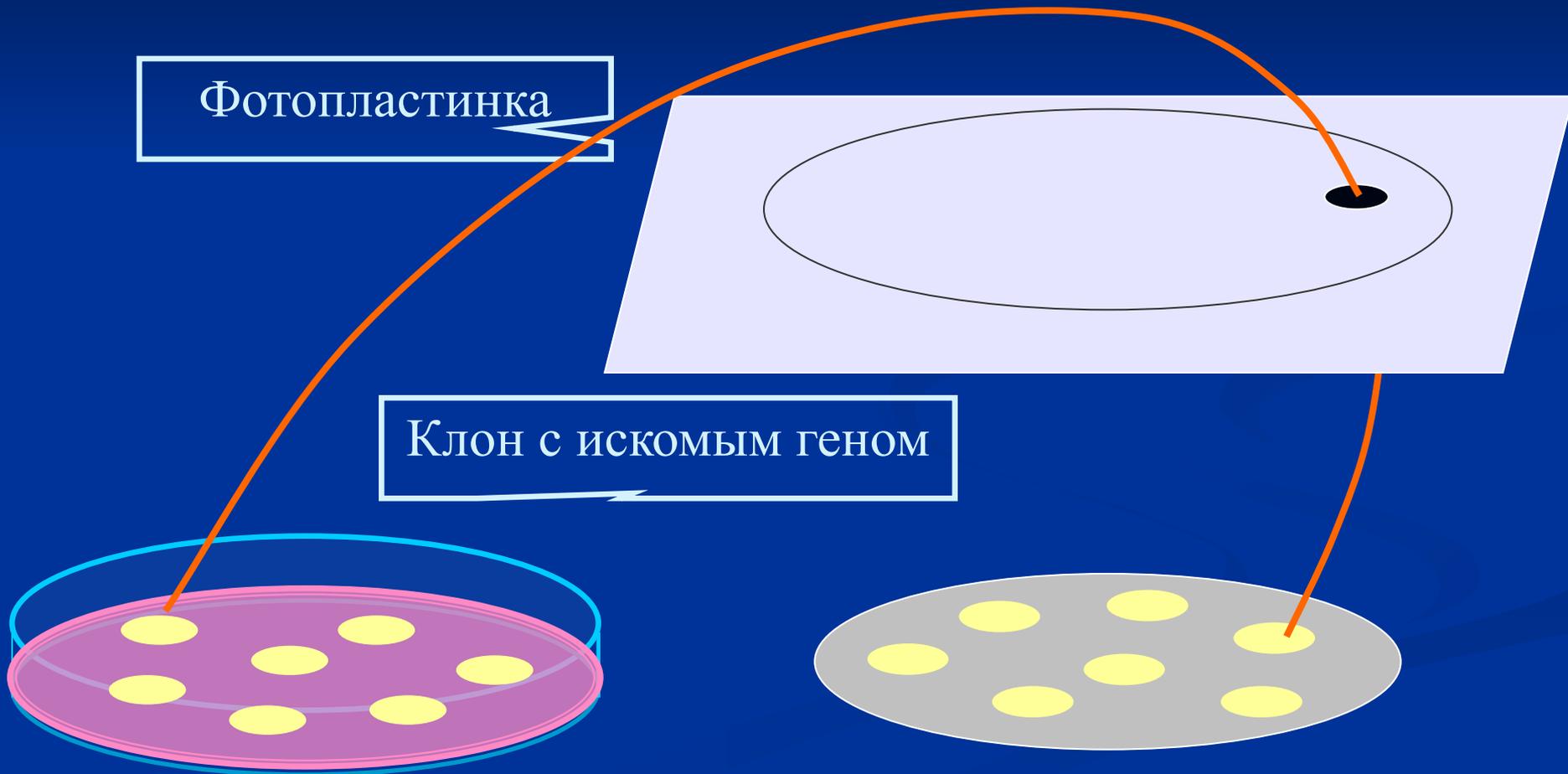


### 3. Денатурация ДНК на фильтре, обработка зондом



При наличии последовательности ДНК, комплементарной зонду, он будет гибридизоваться (отжигаться) на данном участке.

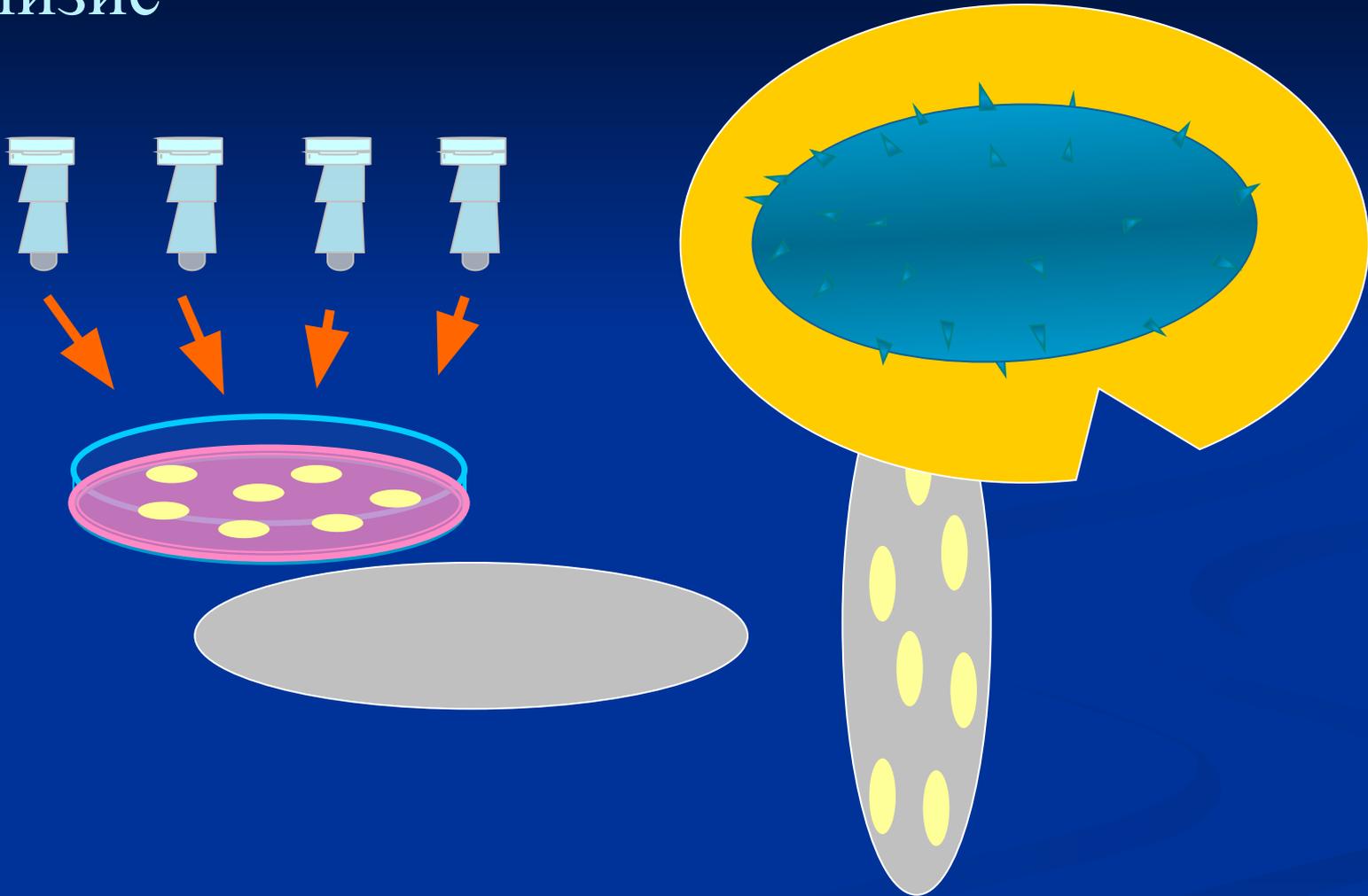
#### 4. Авторадиография – детекция места локализации радиоактивной метки с помощью фоточувствительного материала.



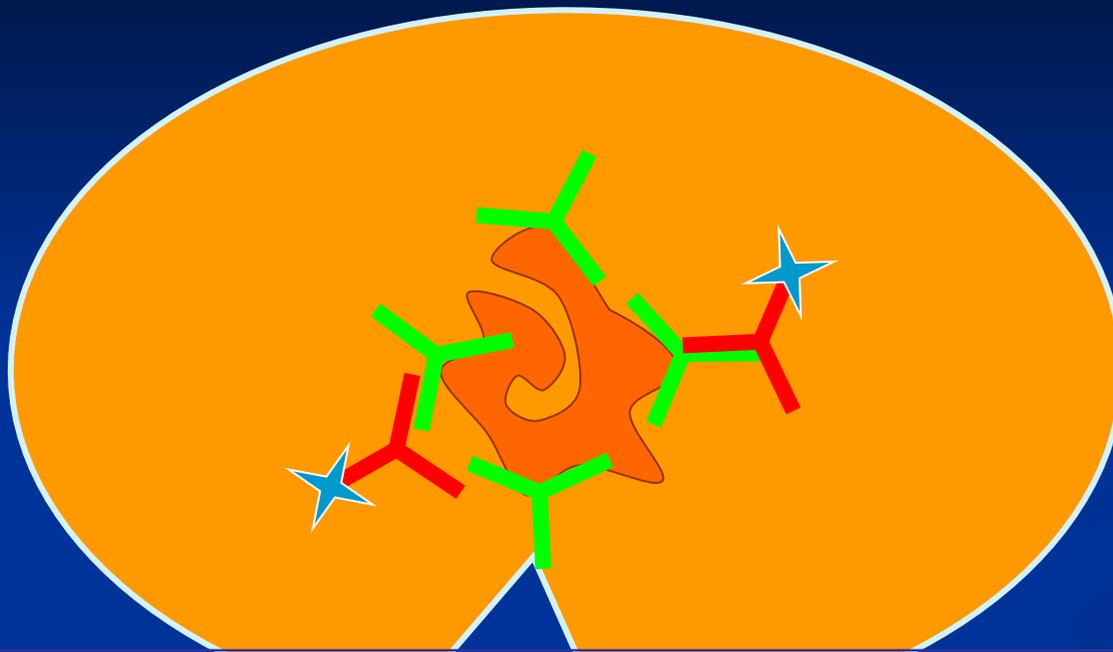
**2. Радиоиммуноанализ белков** - основан на использовании антител к белку, экспрессирующемуся в клетках-трансформантах при клонировании генов в экспрессирующем векторе.



# 1. Перенос колоний бактерий на фильтр, их лизис



2. Обработка фильтра антителами двух видов: 1) к антигену и 2) к антителам (с радиоактивной меткой)

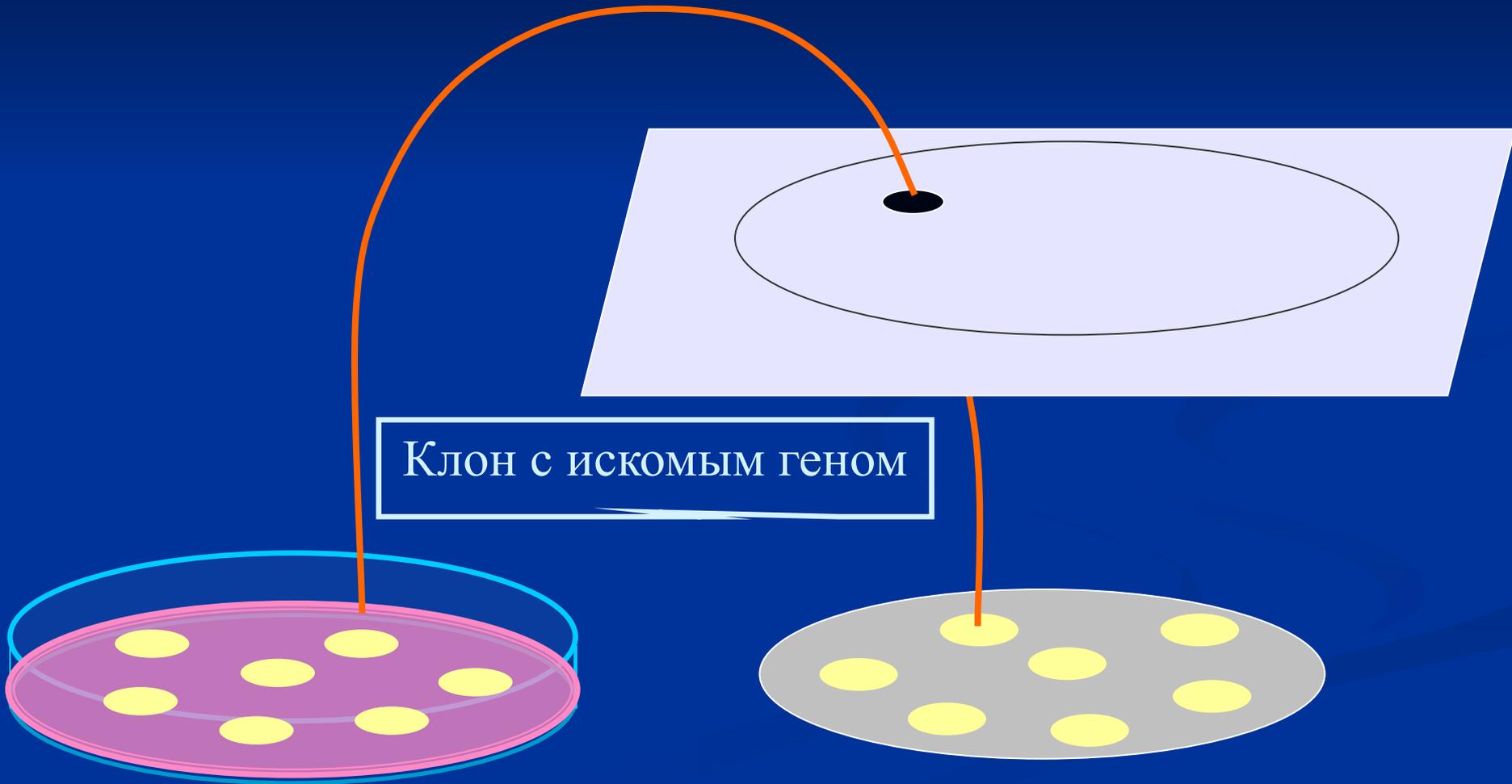


Происходит образование комплекса: белок-антитело1-антитело2.

# 3. Авторадиография

Фотопластинка

Клон с искомым геном



# Технология клонирования в бактериальных геномах

Выделение образца ДНК из биообъекта

Фрагментация (рестрикция) ДНК

Конструирование вектора

Трансформация вектором бактериальных клеток

Отбор трансформированных клеток, создание клонок (библиотек генов)

Скрининг библиотек, клонирование нужного гена



Конец

---

