

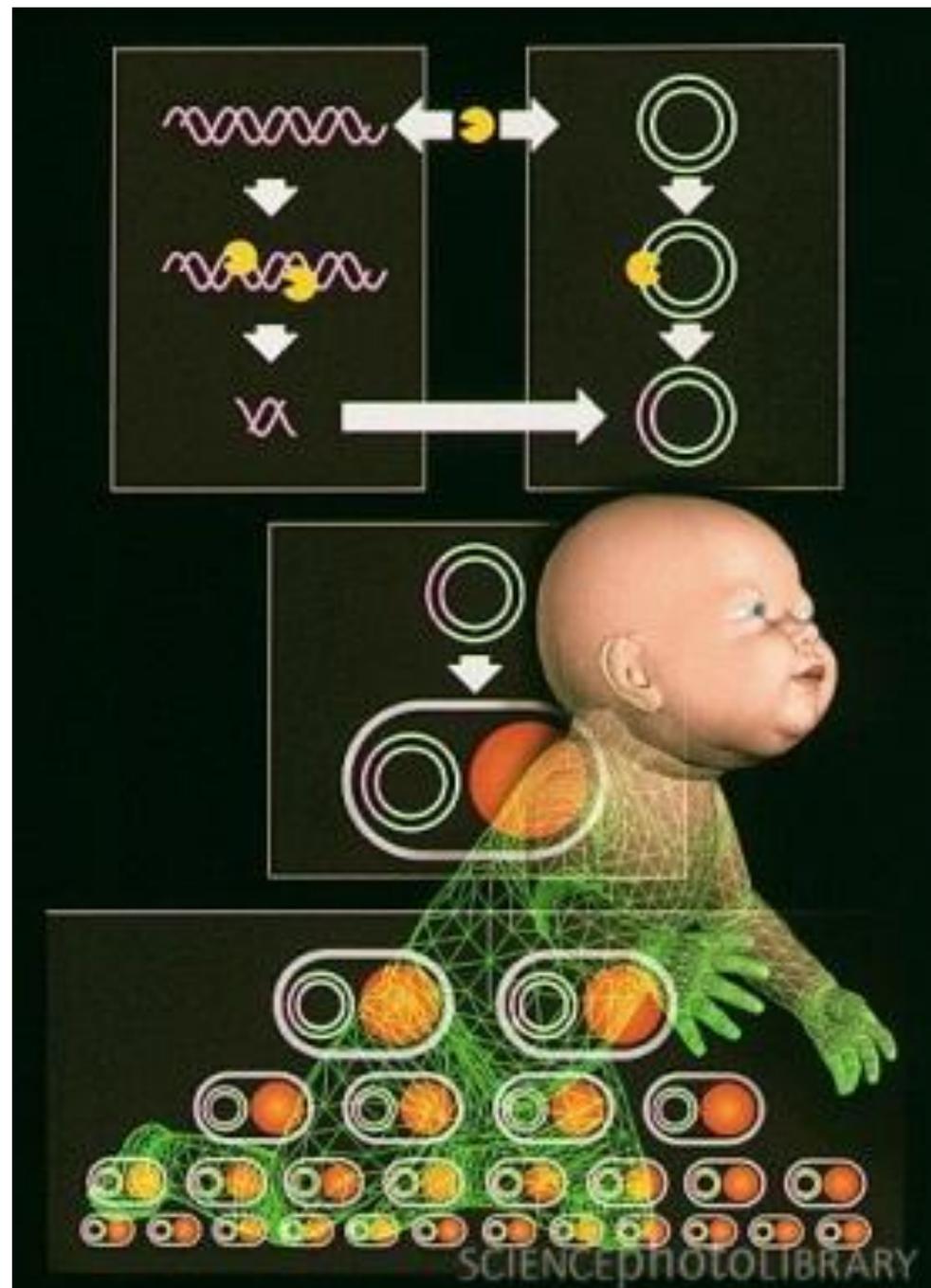
ОСНОВЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Лекция 1

Геном

Ген

Клонирование
генов

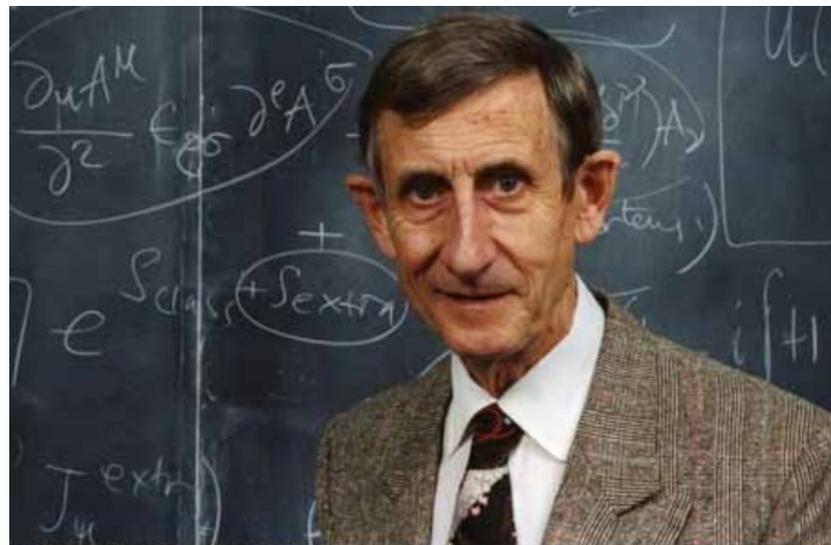


«Новые направления в науке гораздо чаще создаются с помощью новых методов, а не новых концепций.

Новые концепции объясняют известные явления по-новому.

Новые методы открывают новые явления, которые необходимо объяснить.»

Freeman J. Dyson



Что такое «генная инженерия»?

Раздел молекулярной генетики, занимающийся разработкой искусственных генетических систем с использованием манипуляций генами *на молекулярном уровне* путем конструирования *рекомбинантных ДНК и РНК*

Программа-максимум генной инженерии – создание жизнеспособного организма *de novo* по чертежам, разработанным в лаборатории - предмет усилий «*синтетической биологии*»

- ❖ В классической генетике и селекции – отбор среди потомства по определенным признакам ограничен репродуктивной изоляцией
- ❖ В генной инженерии при получении трансгенных организмов такие ограничения действуют слабее

Клонированная самка муфлона, родившаяся у овцы, использованной в качестве приемной матери



Перенос ядра
соматической
клетки погибшего
муфлона в
энуклеированную
яйцеклетку
овцы

Нормальные
роды после 155
дней



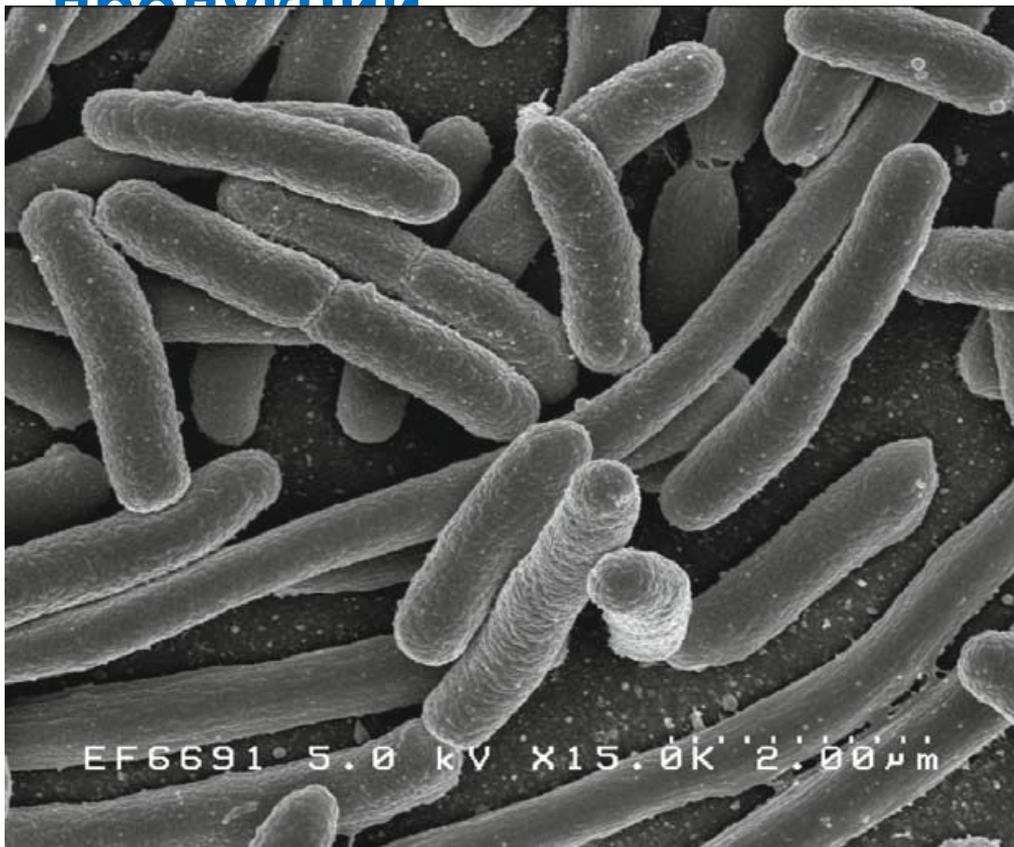
Самец
муфлона

Влияние генной инженерии на современную биологию

- ❖ Исследование структуры геномов и индивидуальных генов, выяснение их функций (функциональная геномика)
- ❖ Получение экспрессии рекомбинантных генов в новом генетическом окружении - трансгенез
- ❖ Направленный мутагенез и белковая инженерия
- ❖ Появление технологий, основанных на антисмысловых последовательностях
- ❖ Создание аптамеров, рибозимов и дезоксирибозимов

Биотехнология

Область прикладной биологии, занимающаяся использованием живых организмов и биопроцессов для получения необходимой продукции



1980 – Верховный суд США подтвердил патентоспособность микроорганизмов, изготовленных человеком

Клетки *E.coli* под сканирующим электронным микроскопом

Промышленная (белая) биотехнология



Производство
продуктов питания,
микроорганизмов,
белков и ферментов,
ферментативный
синтез
низкомолекулярных
соединений,
животные- и растения-
биореакторы, добыча
редких химических
элементов,
сохранение

Сельскохозяйственная (зеленая) биотехнология Green gene technology (GGT)



Теосинте (*Euchlaena mexicana*)
и початок GM-кукурузы

- Улучшение потребительских свойств растений
- Устойчивость к патогенам, гербицидам и пестицидам
- Одновременное созревание плодов
- Повышение их стабильности
- 100 млн. га засеяно генетически модифицированными (GM) растениями

Мочить генных инженеров!



Фармацевтическая (красная) биотехнология – Red Biotech

**Биотехнологическое производство препаратов
медицинского назначения (витамины, белки и
пептиды, ДНК-вакцины и т.п.)**

Водная (голубая) биотехнология – Blue Biotech

**Биотехнологическое производство веществ и
пищевых продуктов из морских и пресноводных
организмов, контроль их размножения**

Влияние генной инженерии на современную медицину

- ◆ **Терапевтические нуклеиновые кислоты:**
 - Генотерапия
 - Репарация генов
 - Антисмысловые РНК и олигонуклеотиды
 - Олигонуклеотидные аптамеры
 - ДНК-вакцины
- ◆ **Терапевтические белки (биофарминг):**
 - Инсулин, гормон роста человека, факторы свертывания крови
- ◆ **Терапевтические небольшие молекулы**
 - Антибиотики, хиральные метаболиты, витамины, аминокислоты (метаболическая инженерия)
- ◆ **Фармакогеномика**
 - Предсказание побочного действия лекарств (цитохром P450) и исследование механизма их действия на

Влияние генной инженерии на современную медицину

◆ ДНК-диагностика:

- Наследственные заболевания,
- Инфекционные заболевания,
- Приобретенные заболевания (в том числе рак),
- **Диагностические белки:**
- Маркеры заболеваний человека и животных

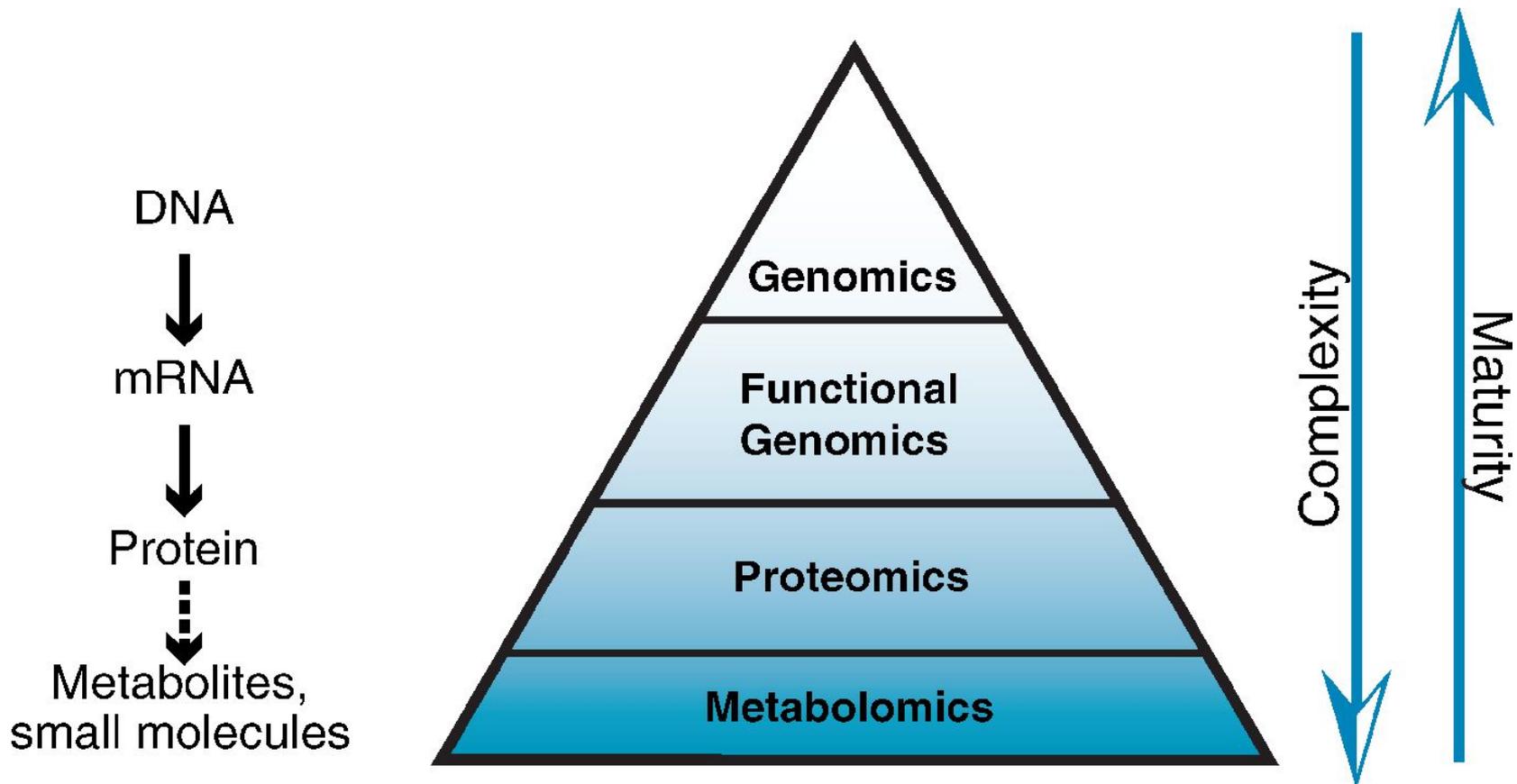
◆ Животные, моделирующие заболевания человека

- Рак, атеросклероз, ожирение, аутоиммунные заболевания и т.п.

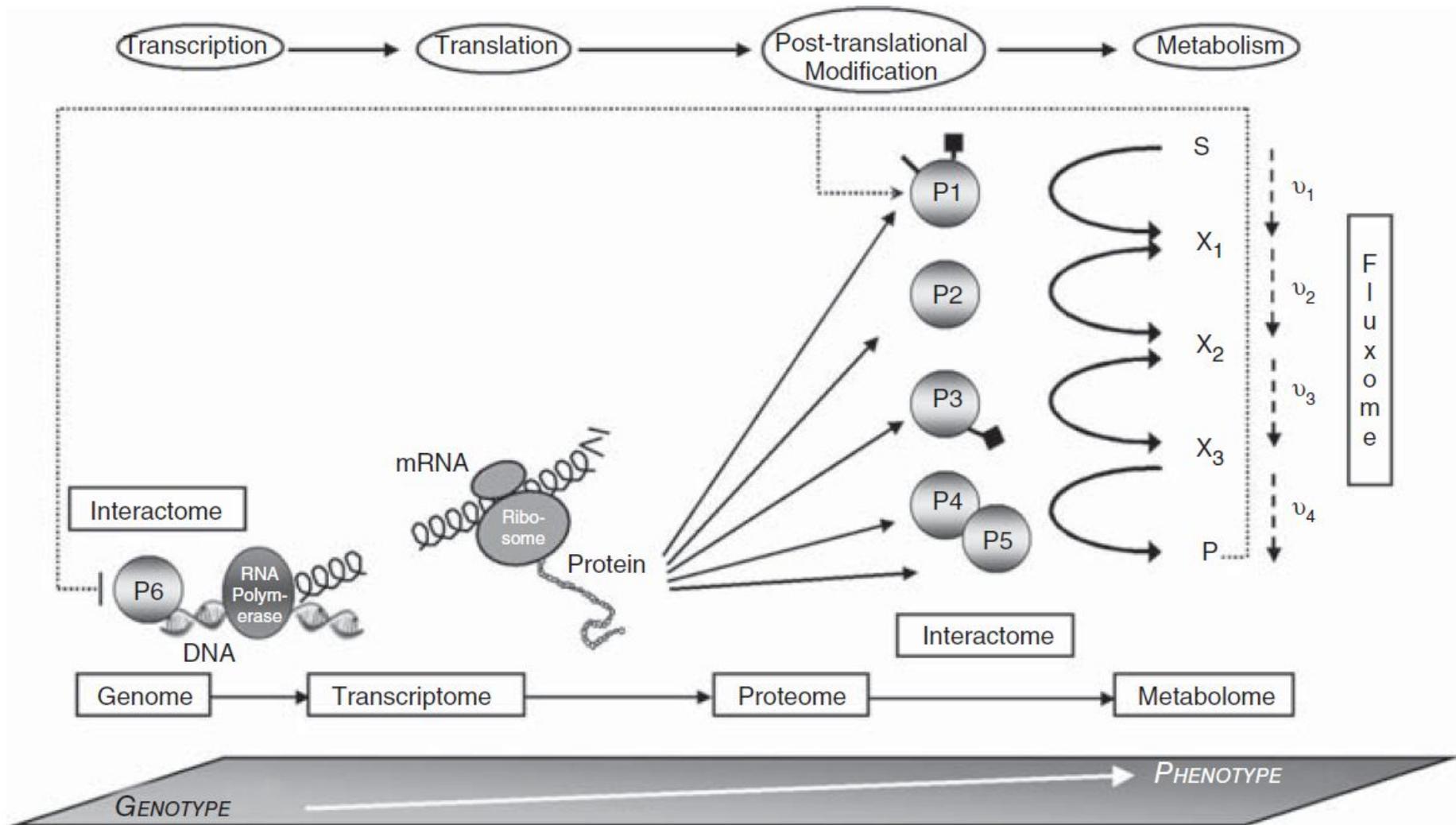
◆ Рекомбинантные вакцины, ДНК-вакцины

- Гепатит В – экспрессия антигена на поверхности клеток дрожжей

Системные подходы в молекулярной биологии и генетике



Центральная догма молекулярной биологии

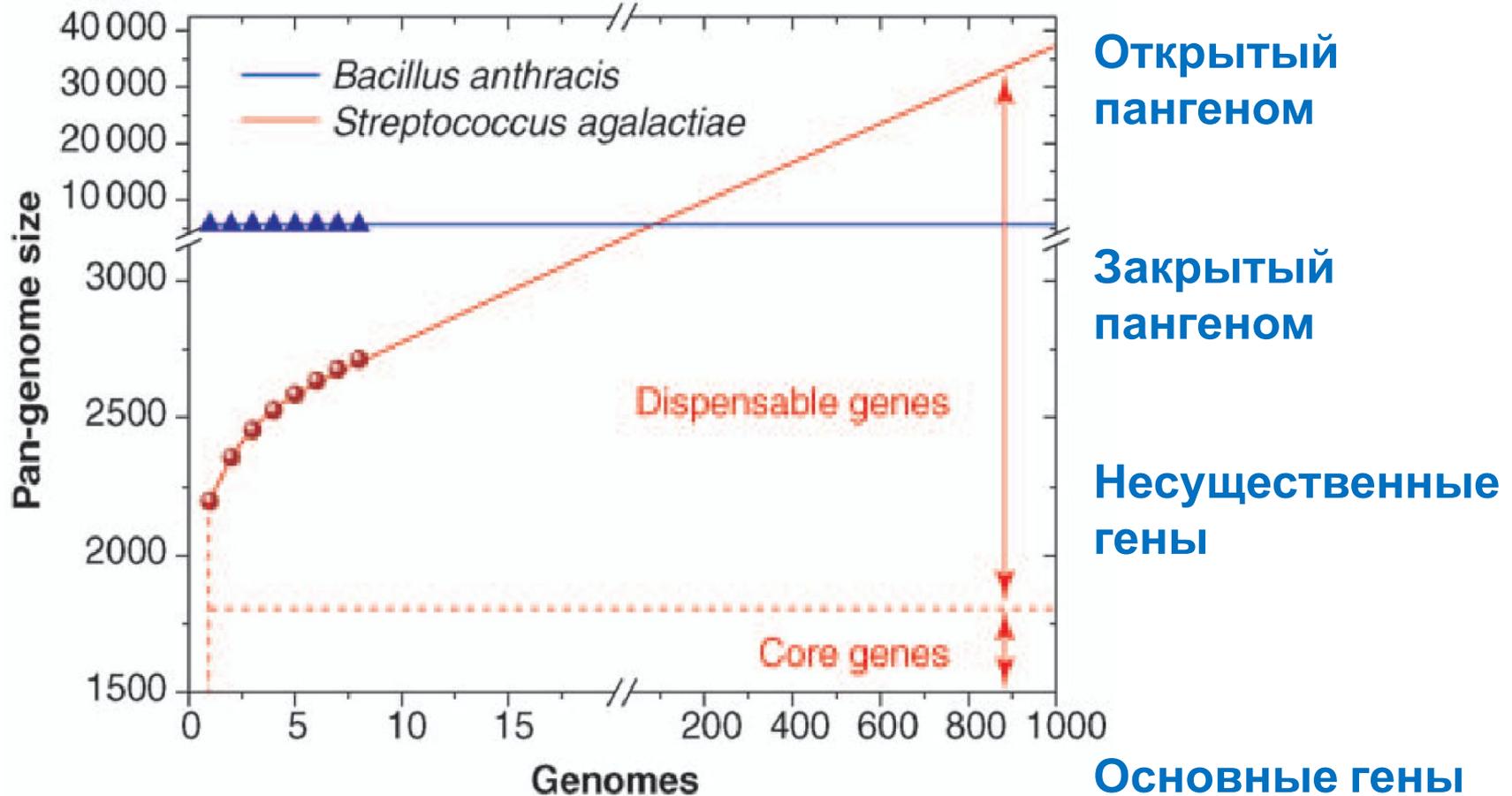


Формирование фенотипа под действием генотипа в соответствии с центральной догмой

Определение терминов: «Геном»

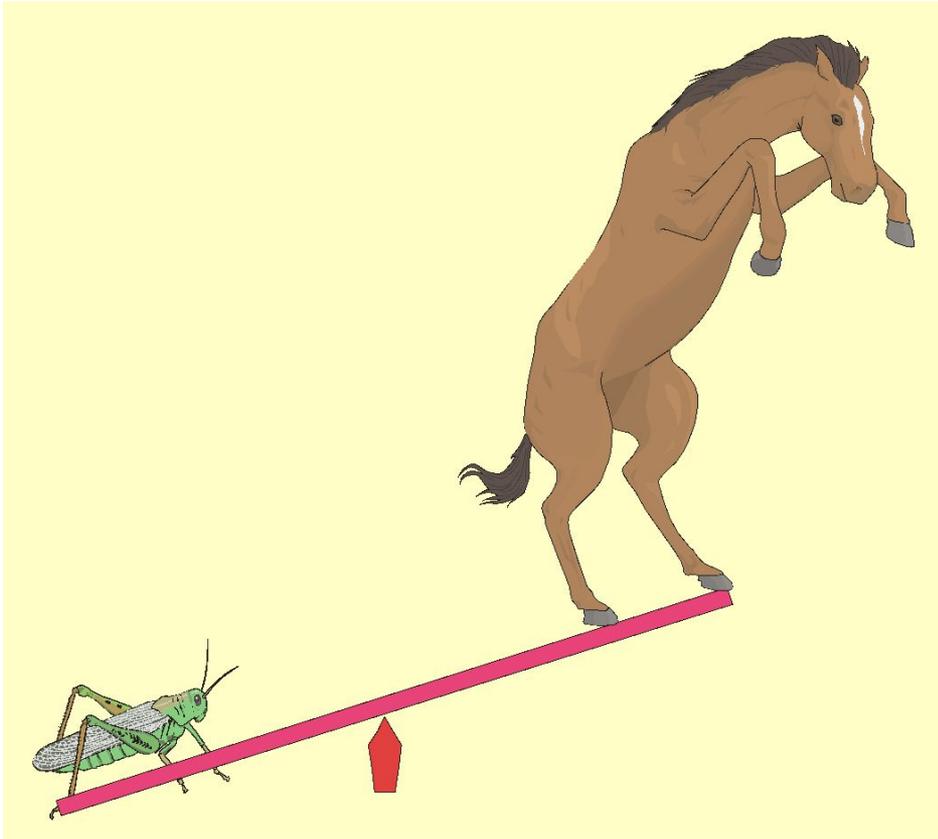
- ◆ Геном – совокупность всей ДНК гаплоидного набора хромосом, внехромосомных генетических элементов и органелл клетки зародышевой линии биологического вида
 - ◆ Введен Г. Винклером в 1922 г.
 - ◆ В отличие от термина «генотип» является биологической характеристикой вида в целом, а не отдельной особи
 - ◆ Из-за большого числа аллельных вариантов генов и некодирующих последовательностей можно говорить лишь об усредненном геноме биологического вида (у человека ~3,500,000 SNP)
 - ◆ Геном митохондрий и хлоропластов

Концепция бактериального пангенома (pan-genome)



Метагеном – совокупность генов, циркулирующих в биосфере
Метагеномика

Парадокс C (C-value paradox)



• *C.A. Thomas, 1971 г.*

Размеры генома:

Кузнечик – 17 pg

Лошадь – 3,2 pg

1 pg ДНК = 1000 млн.п.
Н.

Размер генома *не коррелирует с биологической сложностью видов (их положением в эволюционной иерархии)*

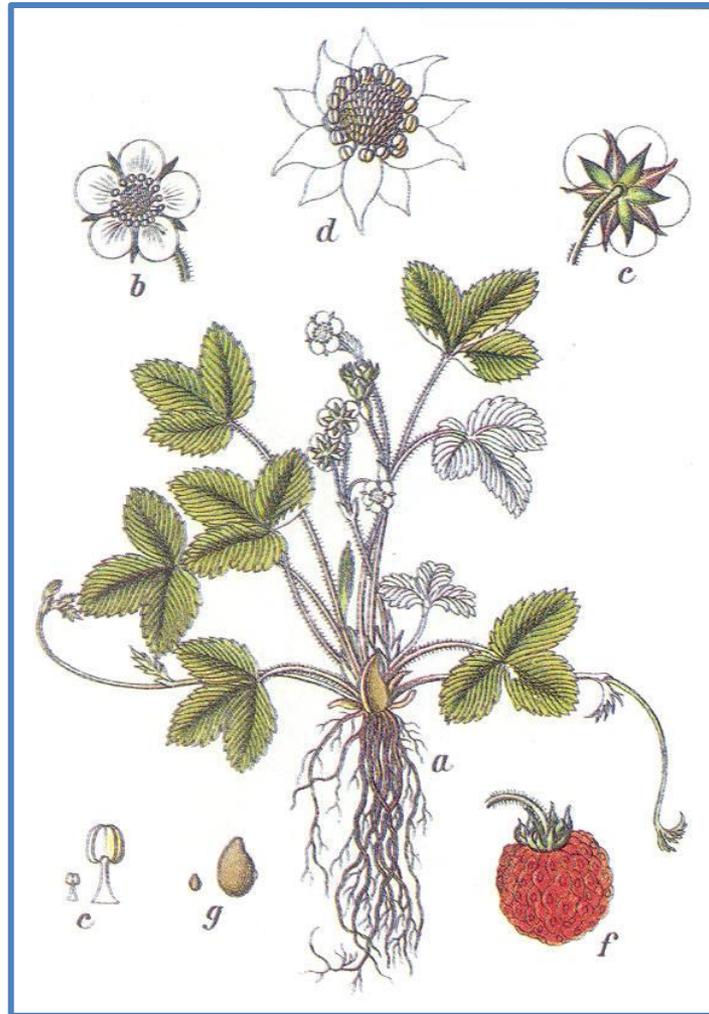
Южноамериканская двоякодышащая рыба

Lepidosiren paradoxa

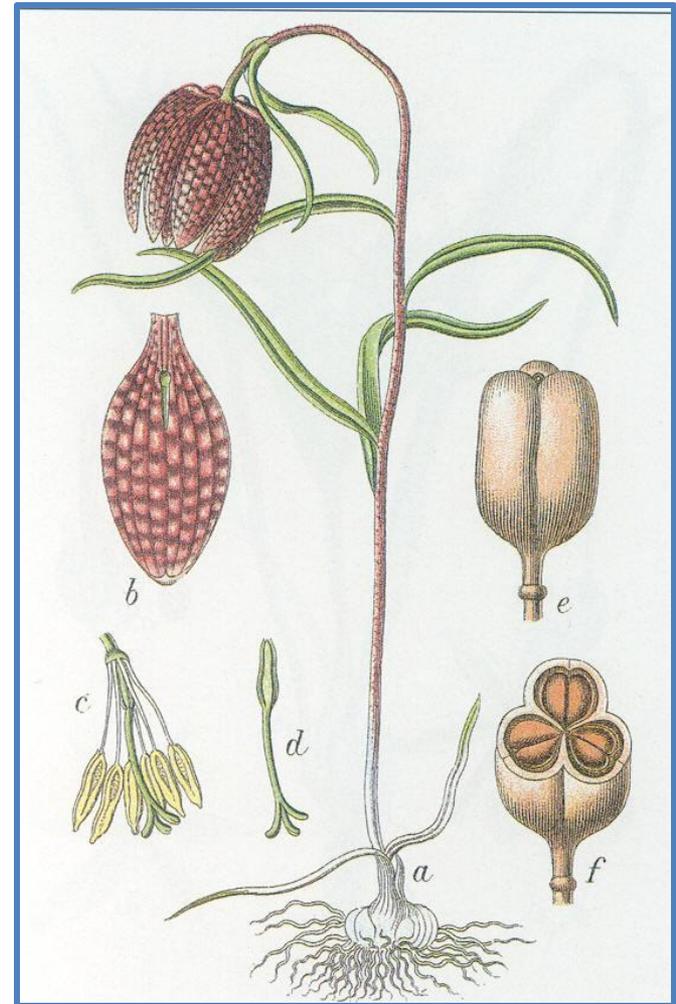


- ◆ Размер генома – 120 pg, число хромосом (2n) – 38
- ◆ 1 pg ДНК = 1000 млн.п.н.

Растения с экстремальными размерами генома



Земляника *Fragaria viridis* – 0,11 pg



Рябчик *Fritillaria assyriaca* – 127,4 pg

Животные–лидеры по размерам генома

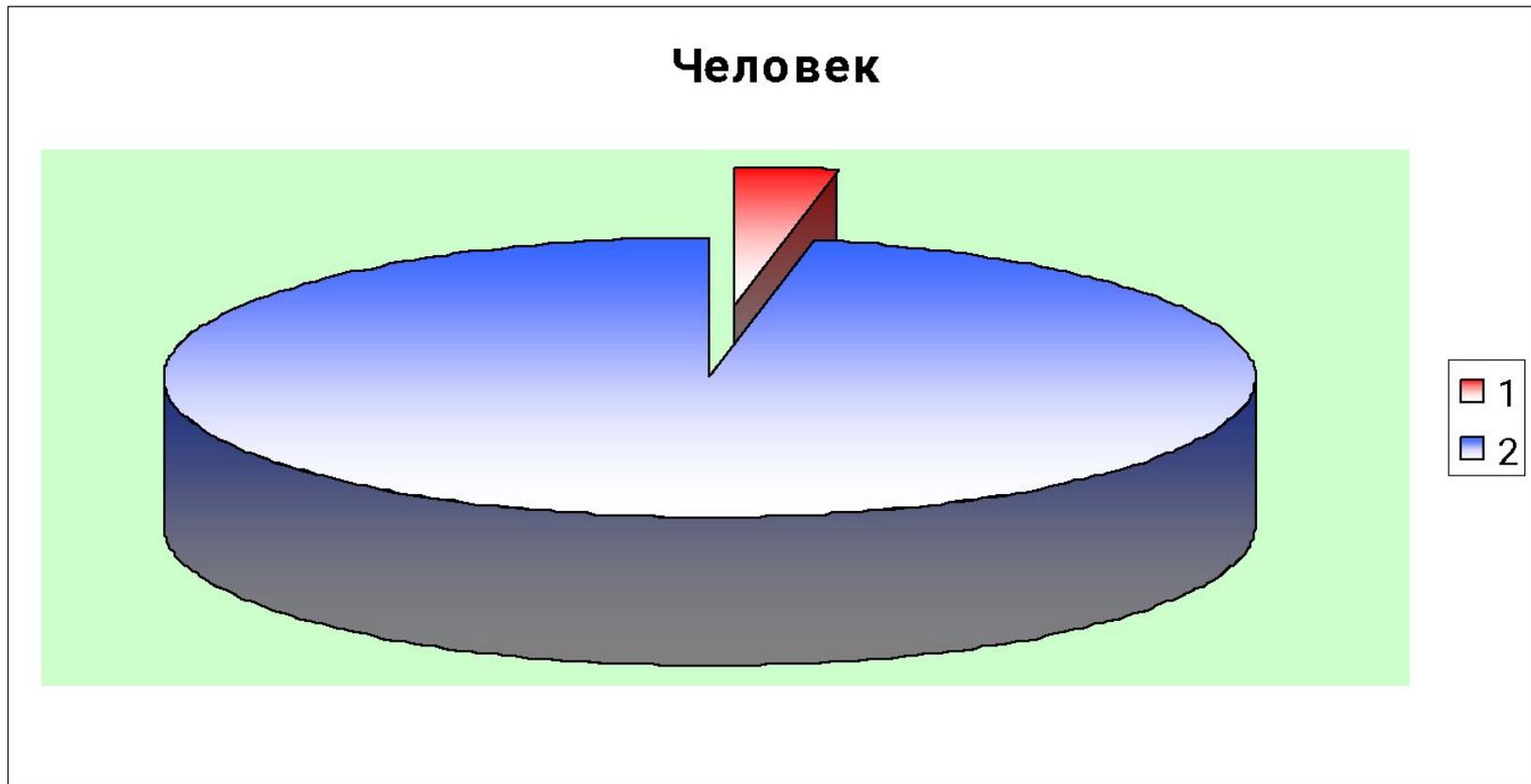
◆ Двоякодышащие рыбы	133 pg
◆ Хвостатые амфибии	
Саламандры (<i>Американский протей</i>)	121 pg
◆ Ракообразные	
(<i>Атлантическая глубоководная креветка</i>)	38 pg
◆ Плоские черви	
(<i>Otomesostoma auditivum</i>)	20 pg
◆ Насекомые	
Кузнечики (<i>Podisma pedestris</i>)	17 pg
◆ Млекопитающие	
Летучая мышь	1,7 pg
Человек	3,5 pg
Красная крыса (<i>Tupaia notomys barrerae</i>)	8,4 pg

1 pg ДНК = 1000 млн.п.

Н

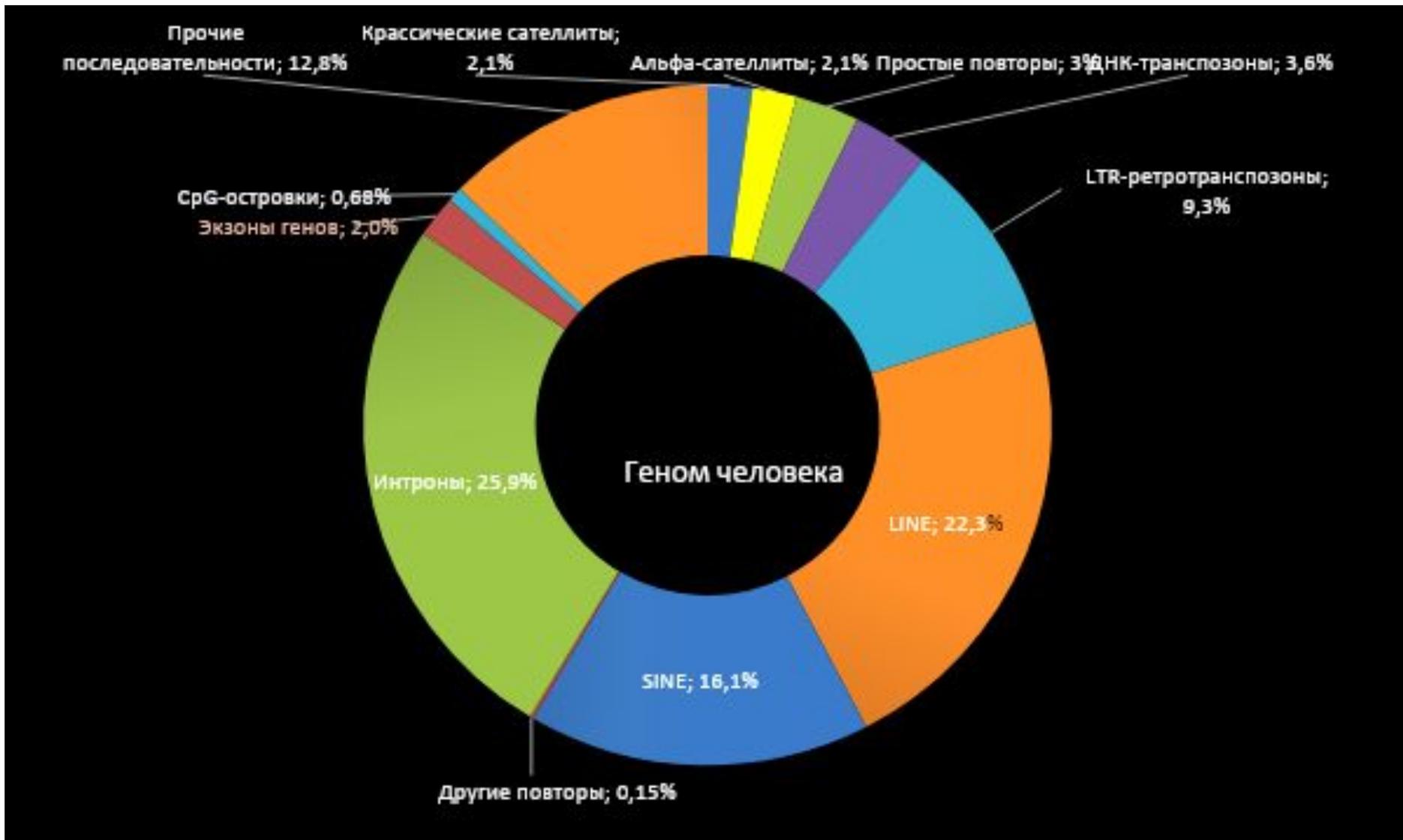
Парадокс исчезает, **загадка** остается

- ◆ Большие различия в размерах геномов определяются последовательностями, не кодирующими белки и нуклеиновые кислоты

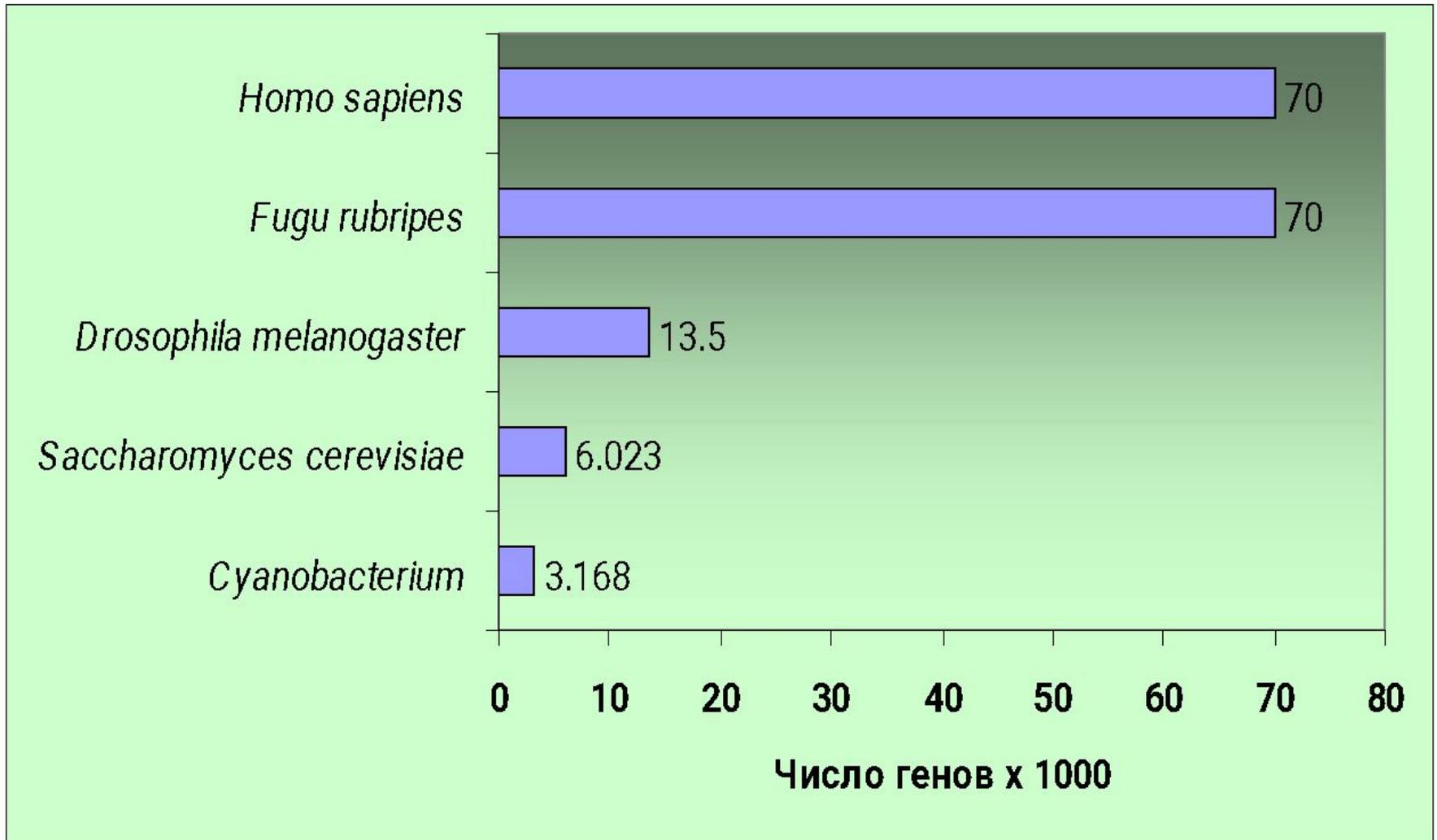


Кодирующие последовательности ~ 2%

Последовательности нуклеотидов генома человека



Количество генов у организмов разных таксономических групп



Резюме по геному

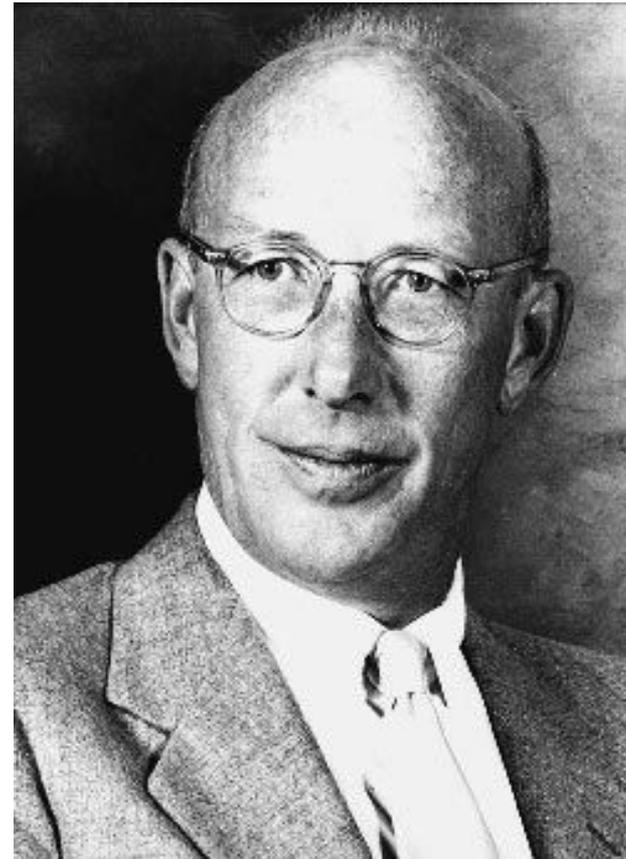
- ◆ **Генно-инженерная работа с генами высших эукариот – их выделение и изучение функций – сильно затруднена из-за большой структурной сложности геномов (и самих генов)**
- ◆ **Секвенирование целых геномов облегчает эту задачу**
- ◆ **Наступление «постгеномной эры».**

Определение терминов: *«Ген»*

Один ген – один фермент



George Beadle



E.L. Tatum

Работы с мутантами *Neurospora crassa* – добавление недостающих метаболитов

Концепция гена 1960-х годов

Ген – последовательность ДНК или РНК, которая

- ❖ **Непрерывна**
Интроны
- ❖ **Одна последовательность кодирует один белок (РНК)**
Могут использоваться все три ОРС, альтернативный сплайсинг
- ❖ **Колинеарна кодируемому белку**
Сплайсинг белков, редактирование РНК
- ❖ **Регуляторная часть предшествует структурной**
Энхансеры перед, внутри и за геном
- ❖ **Имеет четкие границы**
Альтернативные сайты инициации и терминации транскрипции и трансляции
- ❖ **Постоянную локализацию на хромосоме**
Мобильные генетические элементы
- ❖ **Перемещения и изменения происходят только вследствие случайных мутаций**
Запрограммированные перестройки генов Ig, соматический мутагенез, адаптивные мутации

Основные атрибуты гена остались незыблемыми

- ◆ Ген – фрагмент нуклеиновой кислоты, в последовательности которой закодирована информация о последовательностях других НК или белков
- ◆ Изменения фенотипа организма однозначно (?) связаны с мутационными изменениями его генотипа (т.е. изменениями последовательностей генов)
- ◆ Генотипические изменения являются наследуемыми

Хорошо забытое старое

Ген – это часть генома, оказывающая влияние на какой-либо фенотипический признак организма

Один ген – один признак

Нобелевская премия по физиологии и медицине 1978 г.



Вернер Арбер
Система
рестрикции и
модификации у
бактерий



Даниэл Натанс
Электрофорез
фрагментов ДНК,
первые
физические



Хамилтон Смит
Очистка и
использование
рестриктаз класса
II

карты вируса SV40

"for the discovery of restriction enzymes and their application to problems of molecular genetics"

Нобелевская премия по физиологии и медицине 1980 г.



Пол Берг
Рекомбинантные
ДНК, векторы на
основе хромосом



Уолтер Гилберт
Секвенирование
ДНК – метод
Максама-Гилберта



Фредерик Сэнгер
1. Структура инсулина
2. Метод
секвенирования ДНК

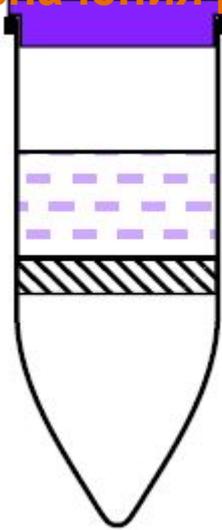
"for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids"

Выделение нуклеиновых КИСЛОТ

*Прежде чем клонировать
последовательность, необходимо
выделить содержащую ее суммарную
ДНК*

Фенольный метод выделения ДНК

Нейтральн
ые
значения pH

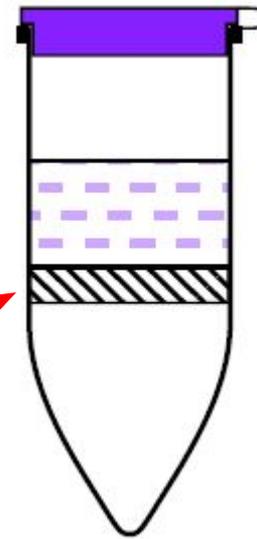


Водная фаза (ДНК и РНК)

Денатурированн
ые белки

Фенольная фаза

Кислые значения pH

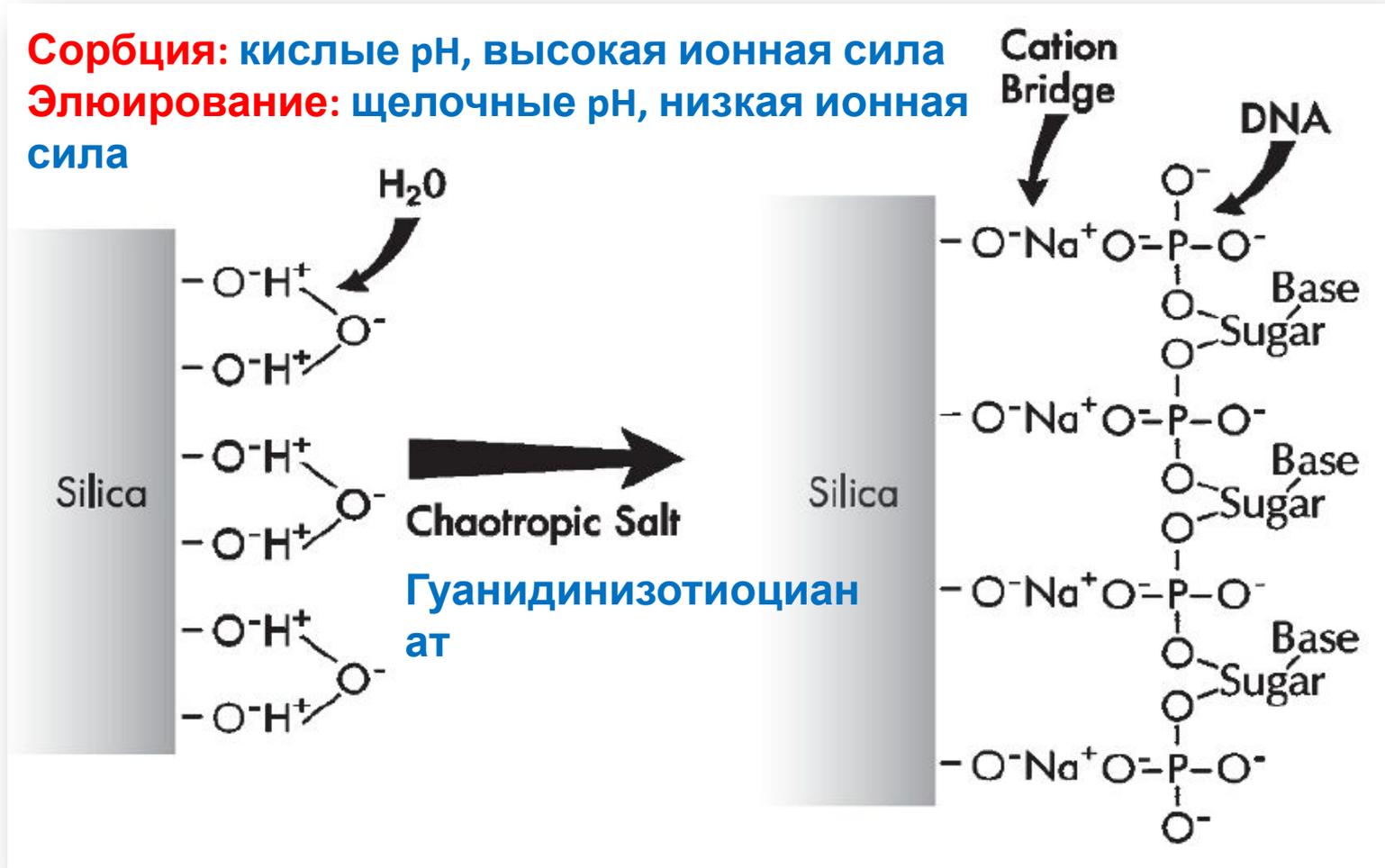


Водная фаза (РНК)

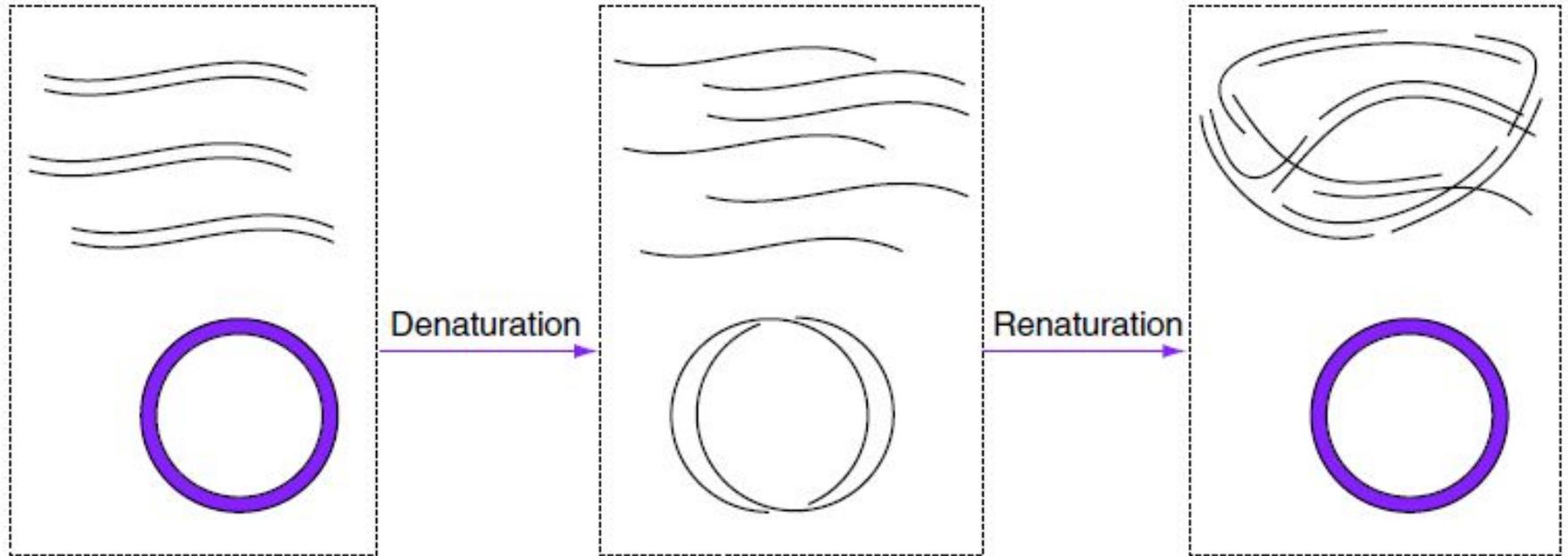
Фенольная фаза (ДНК)

Взаимодействие ДНК с поверхностью стекла

Сорбция: кислые pH, высокая ионная сила
Элюирование: щелочные pH, низкая ионная сила



Щелочной метод выделения бактериальных плазмид



pH 8,0

Фрагменты
линейной ДНК
и кольцевая
плазмидная
ДНК

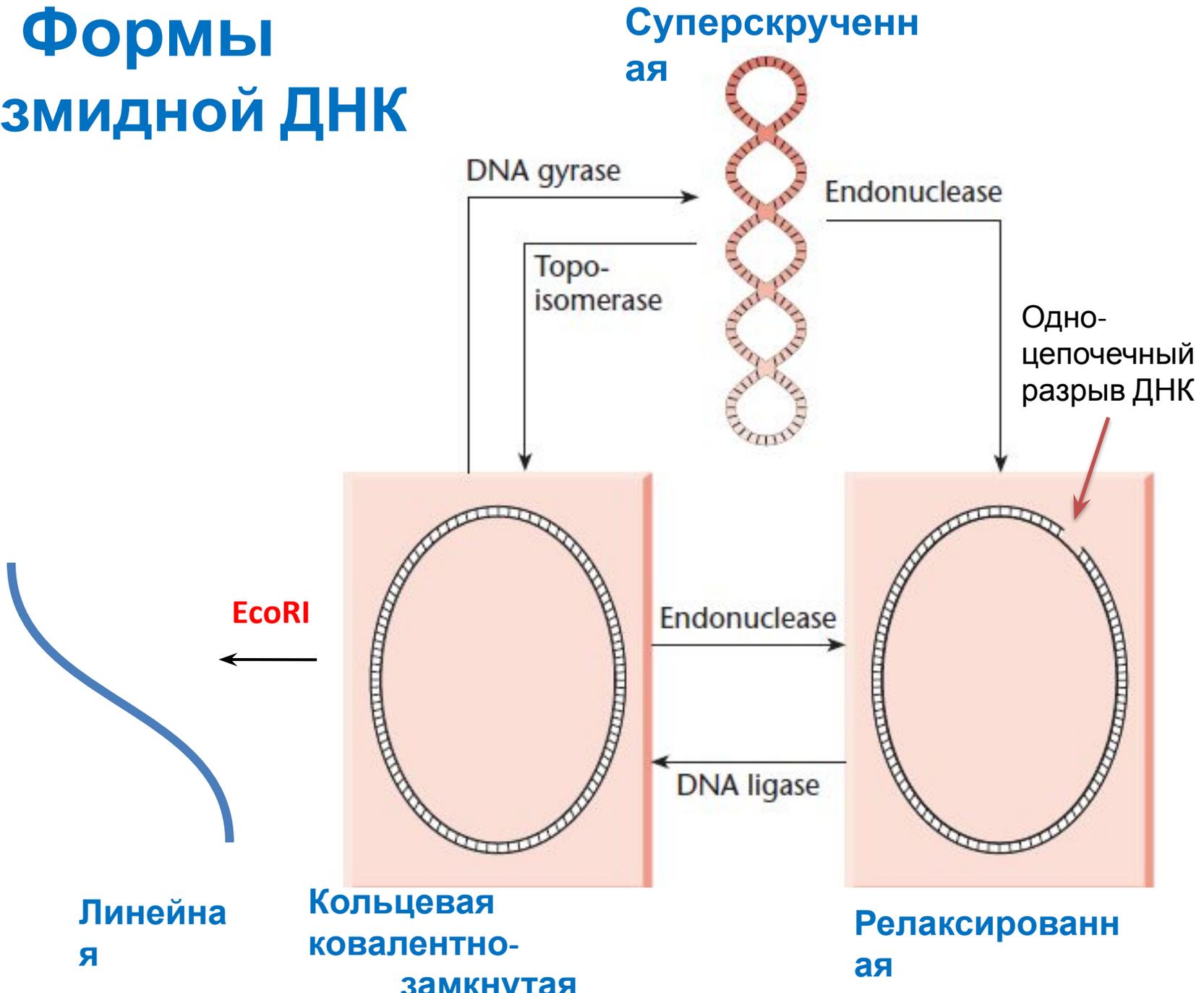
pH 12,0

Кольца
плазмидной ДНК
остаются
зацепленными
друг за друга

pH 8,0

Линейная ДНК
агрегирует,
кольцевая
восстанавливается

Формы плазмидной ДНК



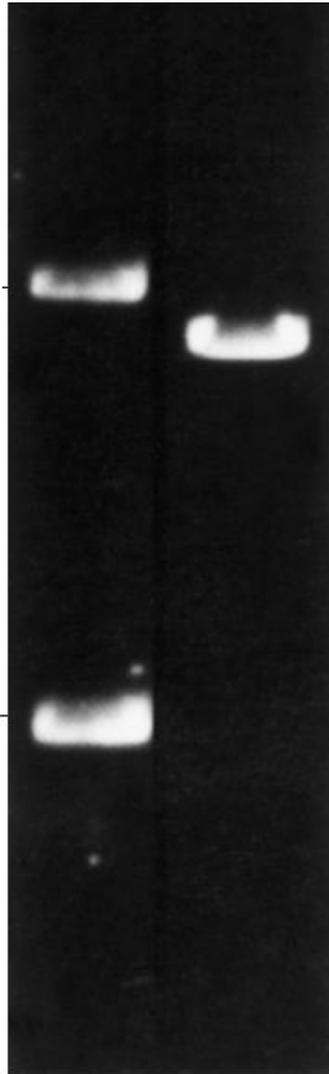
Электрофоретическая подвижность разных форм плазмиды в присутствии бромистого этидия

Direction of migration



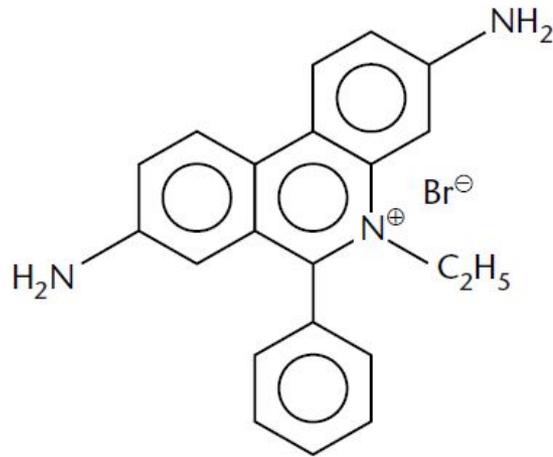
Релакс

Супер.



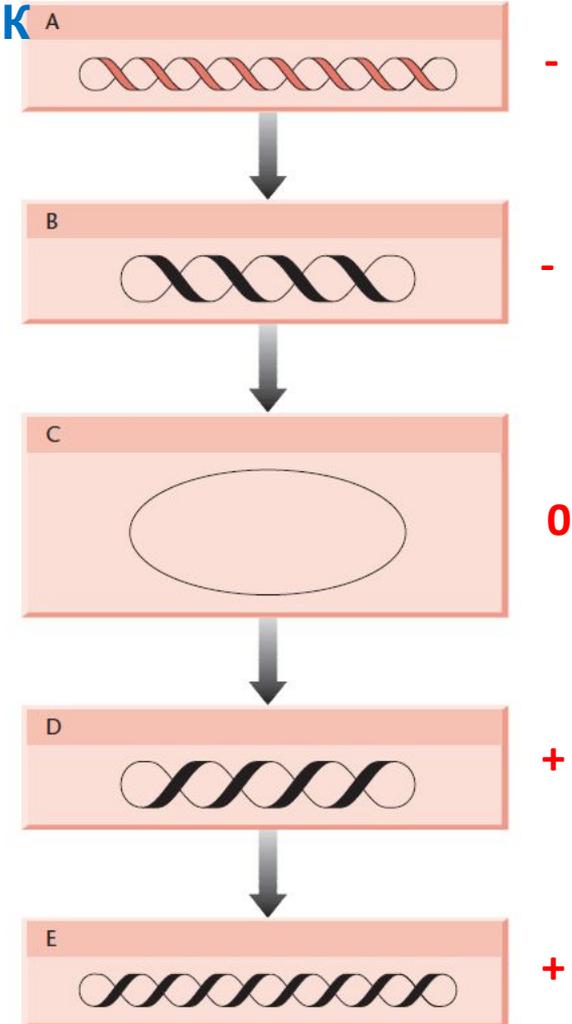
ЭТИДИЯ

Предел визуальной чувствительности
—
50 нг ДНК/полоса
—
Линейная

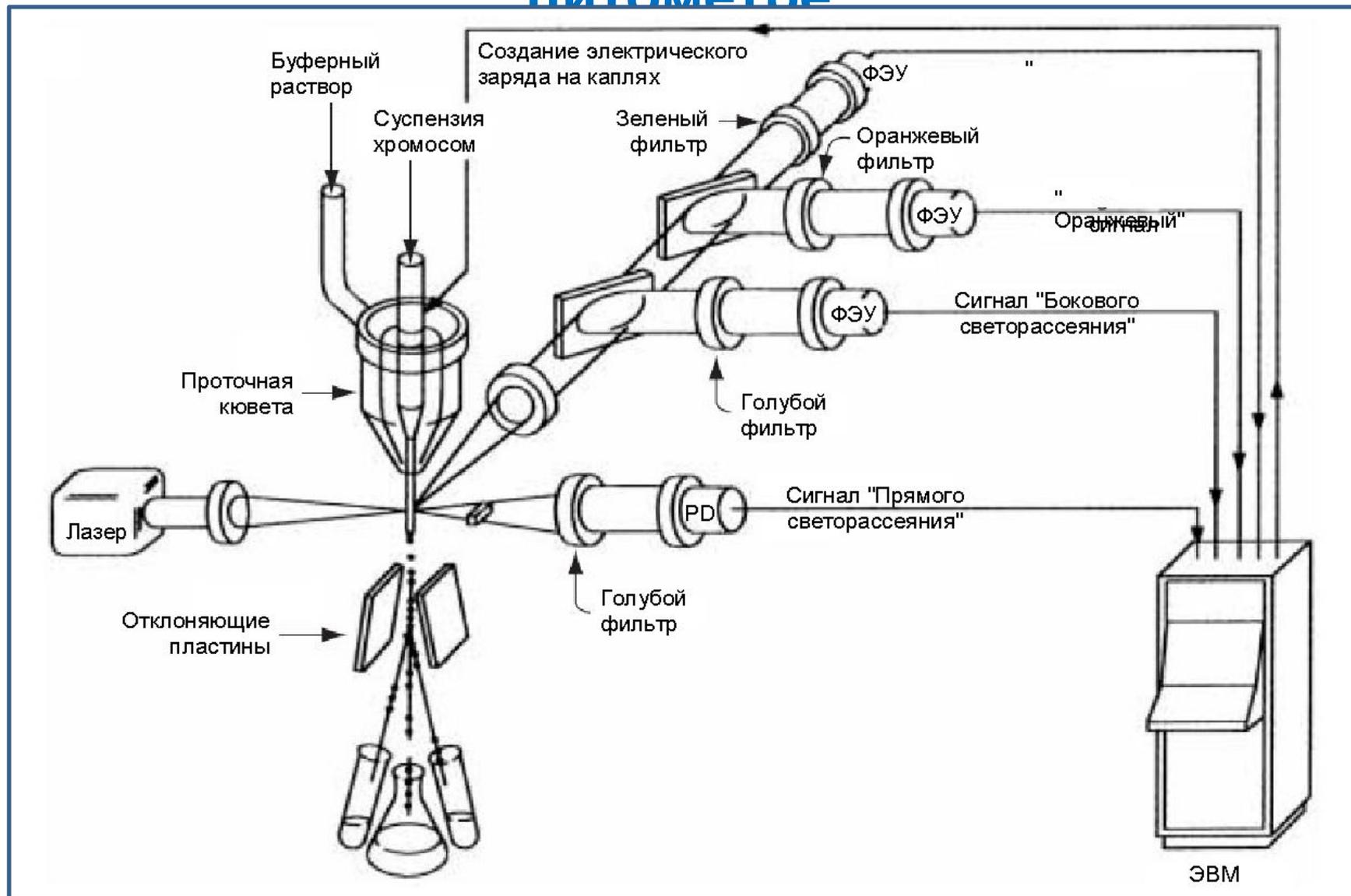


Бромистый этидий

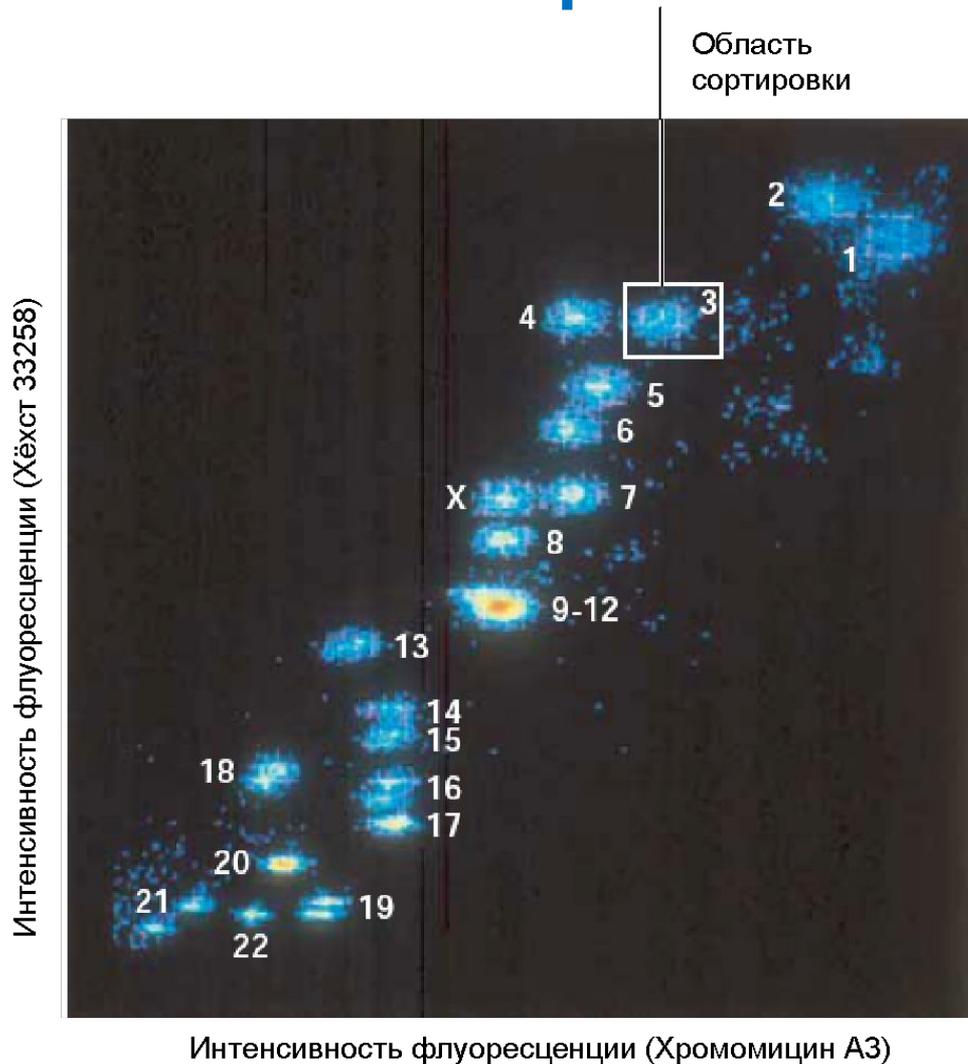
Увеличение отношения EtBr/ДНК



Сортировка микрочастиц в четырёхпараметрическом проточном цитометре



Пример разделения метафазных хромосом человека с помощью двухлазерного проточного цитометра



- ◆ FACS (fluorescence-activated cell (chromosome) sorting)
- ◆ до 10^5 частиц/мл суспензии
- ◆ рассеянный свет: форма, размер и состав (по преломлению света) т.е. метаболическое состояние клеток
- ◆ число фотодетекторов определяет кол-во измеряемых параметров (обычно 5-6)
- ◆ **Хёхст 33258 – АТ-пары**
хромомицин А3 – GC-пары
- ◆ разделение гомологичных хромосом 19 и 21 родителей
- ◆ обычно 10^3 частиц/сек или 40 хромосом/сек (1000/23)
- ◆ YAC – $6,4 \cdot 10^7$ хр. (21 день)

Первые два класса систем рестрикции-модификации

RMS Type	Subunit Arrangement	Examples	Substrate (^=cleavage)	Methyl Added
I		<i>EcoB</i>	TG <u>A</u> N ₈ TGCT (N6m <u>A</u>) A <u>G</u> CAN ₈ N <u>A</u> CGV	
		<i>EcoK</i>	AACN ₆ GTGC (N6m <u>A</u>) L <u>T</u> GCAN ₆ G <u>T</u>	
		<i>StySKI</i>	CGATN ₇ GTTA G <u>T</u> ACN ₇ A <u>T</u> CG	
II		<i>EcoRI</i>	G^A <u>A</u> TTC (N6m <u>A</u>)	
		<i>HhaI</i>	G <u>C</u> G^C (5m <u>C</u>)	
		<i>PvuII</i>	CAG^ <u>C</u> TG (N4m <u>C</u>)	
IIS		<i>FokI</i>	GGATGN ₉ ^ C <u>C</u> TCAN ₁₃ ^	(N6m <u>A</u>) (N6m <u>A</u>)
		<i>HphI</i>	GGTGAN ₈ ^ C <u>C</u> TCAN ₇ ^	(N6m <u>A</u>) (5m <u>C</u>)
		<i>MboII</i>	GAAGAN ₈ ^ C <u>C</u> TCAN ₇ ^	(N6m <u>A</u>) (N4m <u>C</u>)

Метил-трансфераза

Рестриктаза

Хеликаз

Специфичность взаимодействия с ДНК

Подчеркнуты метилируемые нуклеотиды

Эндонуклеазы рестрикции класса II (рестриктазы) – основной инструмент генной инженерии

❖ Узнают специфические
последовательности – сайты
рестрикции

❖ Активны в виде димеров в

присутствии ионов Mg^{2+}

В ДНК-ферментном комплексе до трех ионов Mg^{2+} , координированных двумя остатками Asp и одним атомом кислорода фосфатной группы ДНК вблизи точки разрыва фосфодиэфирной связи. Облегчает атаку молекулой воды атома фосфора

Номенклатура рестриктаз класса II

HaeI, *HaeII*, *HaeIII* – *Haemophilus aegypticus*,
открыты в указанной последовательности

Hinc и *Hind* – *Haemophilus influenzae*, штаммы *c* и *d*

Субстратная специфичность рестриктаз класса II

Палиндромные сайты



мелкощепящие: *Bgl*I (GGCC), крупнощепящие: *Eco*RI (GAATTC),
*Not*I (GCGGCCGC)

Частично вырожденные сайты

*Hinc*II (GT $\color{red}{Y}$ RAC, Y = p $\color{red}{Y}$ rimidine, R = pu $\color{red}{R}$ ine),

Разорванные сайты

*Bgl*I (GCC $\color{red}{N}_5$ GGC, N = a $\color{red}{N}$ y)

Квазисимметричные сайты

*Btr*I ($\color{red}{C}$ AC \downarrow GTC, класс IIQ)

Двойные сайты:

*Sfi*I ($\color{red}{GGCCN}_5$ $\color{red}{GGCC}$)

Разрезание со смещением - класс IIS

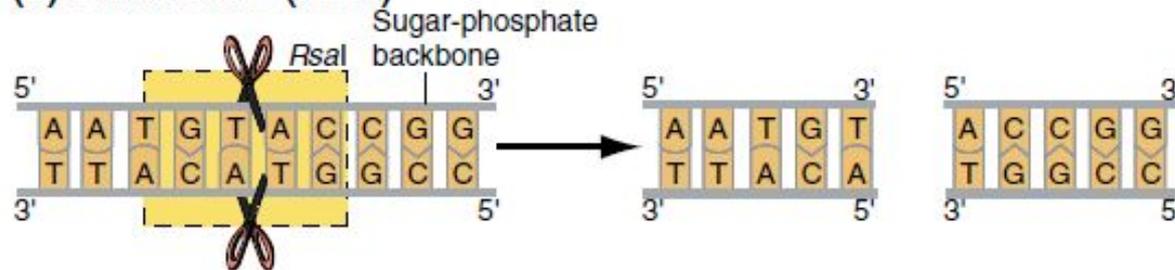
(*Foc*I GGATGN $_{9,13}$ $\color{red}{S}$ hifted cleavage) Последовательности липких концов уникальны

Изменение субстратной специфичности в неоптимальных условиях

*Eco*RI - GAATTC, *Eco*RI* - AATT (Mg $^{2+}$, органические растворители)

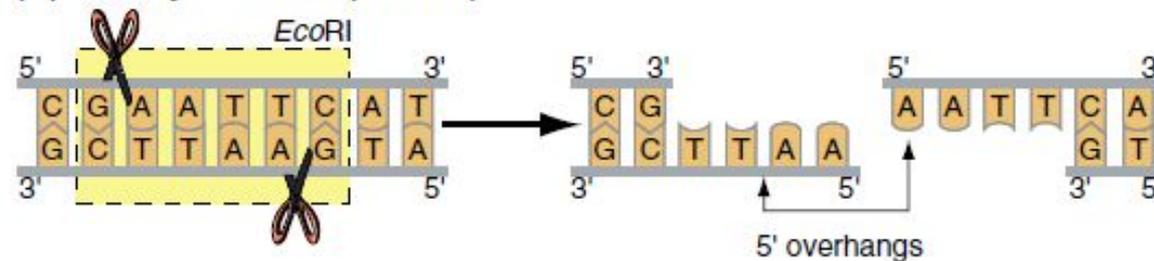
Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

(a) Blunt ends (*RsaI*)



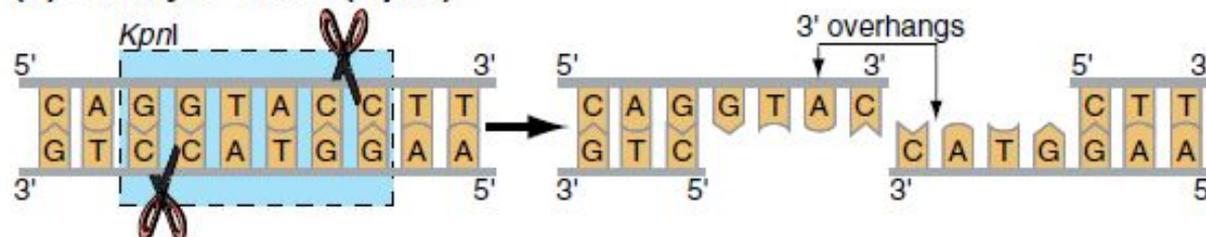
«Тупые»
концы

(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



5'-
выступающие

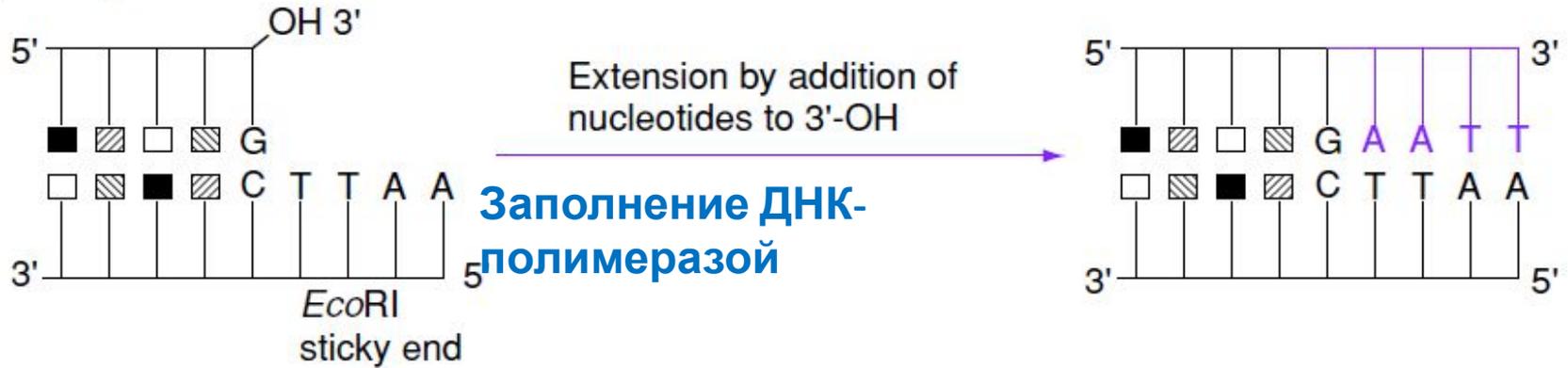
(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)



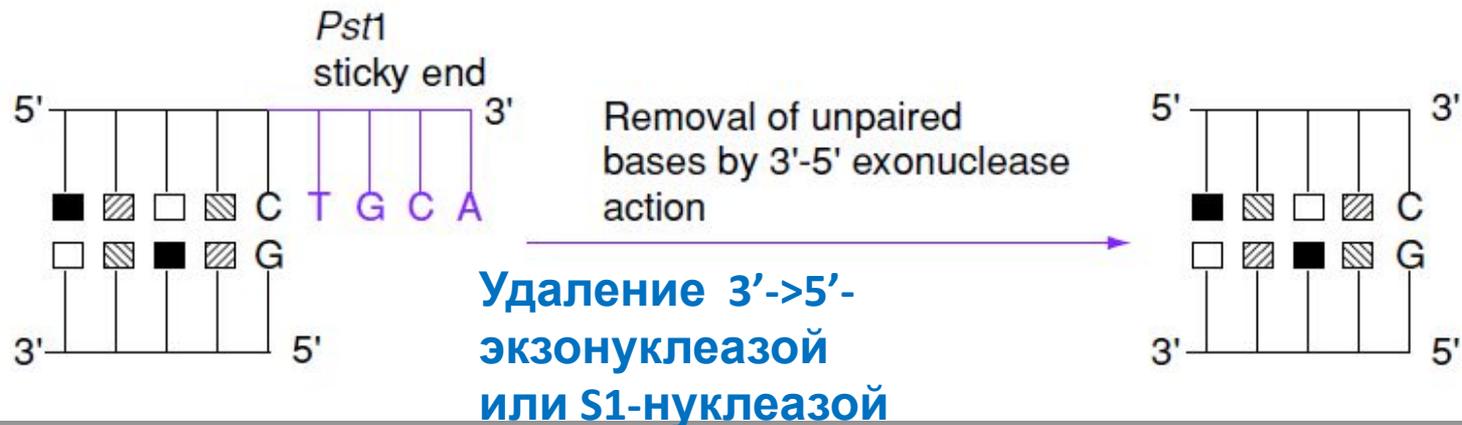
3'-
выступающие

Два способа «затупления» липких концов ДНК

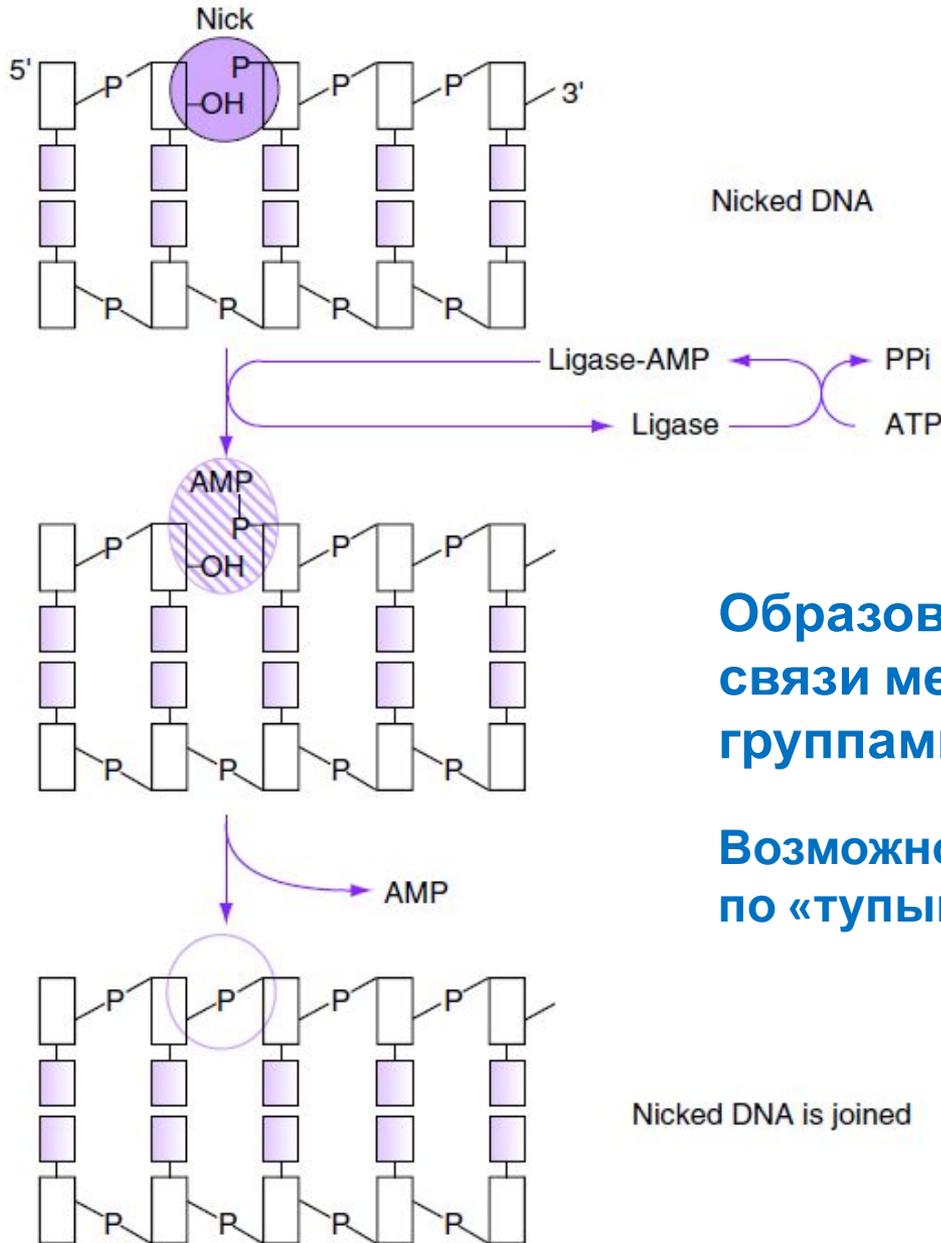
a) Filling in



b) Trimming back



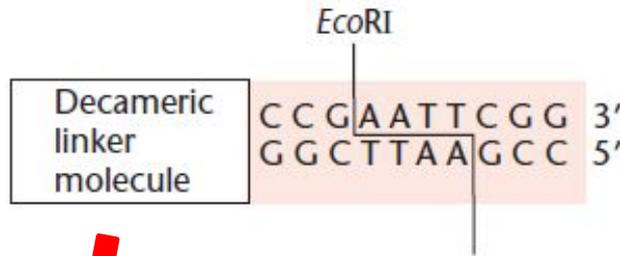
Механизм действия Т4-ДНК-лигазы



Образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН- и 5'-фосфатной группами цепей ДНК

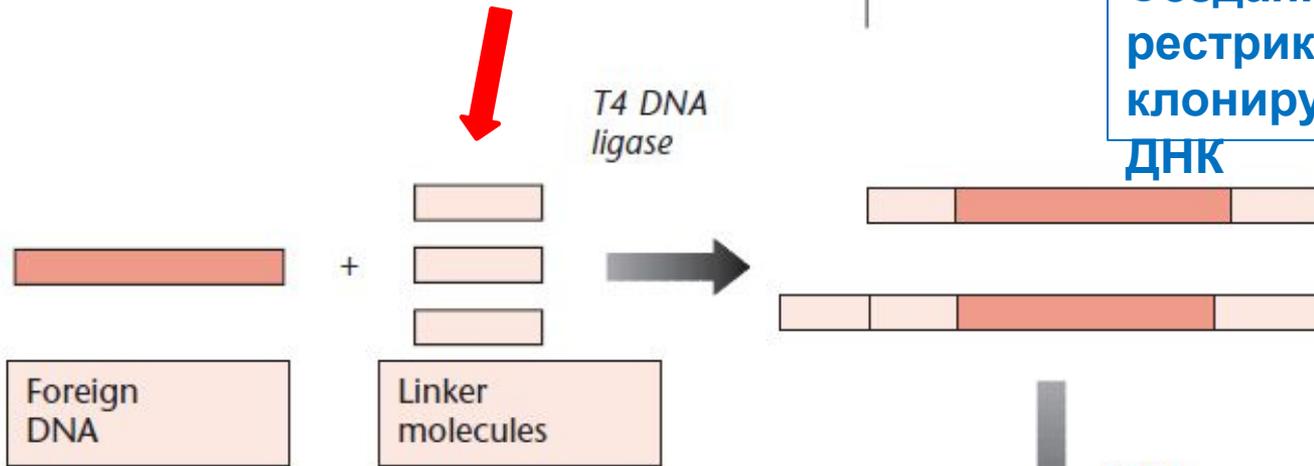
Возможно лигирование фрагментов ДНК по «тупым» концам

Линкеры

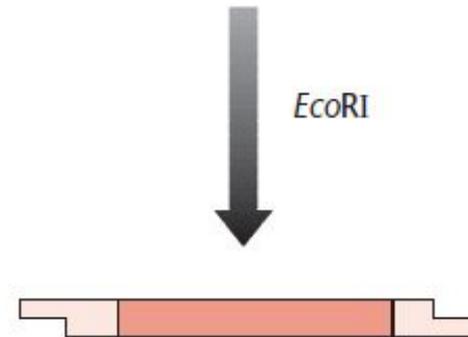
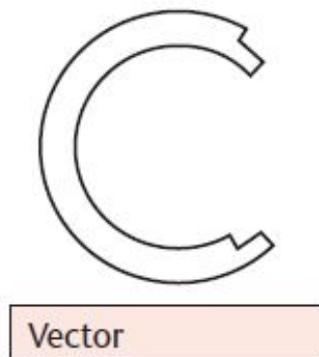


Создание новых сайтов рестрикции на концах клонируемых молекул ДНК

ДНК



Лигирование по «тупым» концам



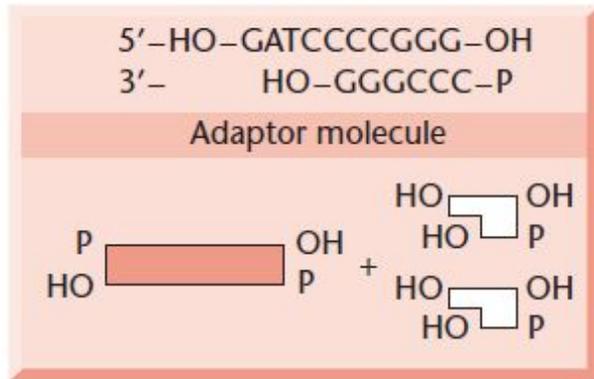
Расщепление EcoRI



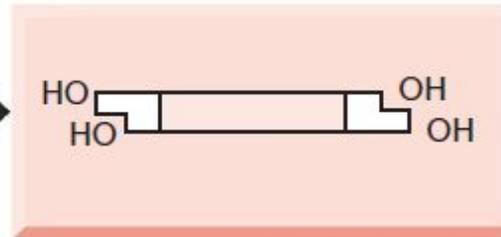
Лигирование по «липким» концам, клонирование

Адаптер

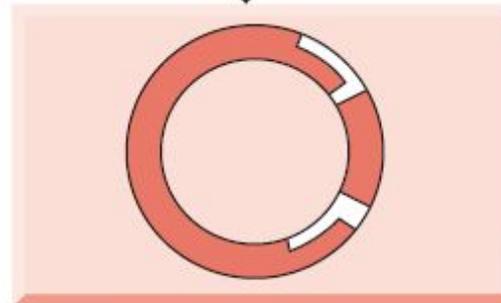
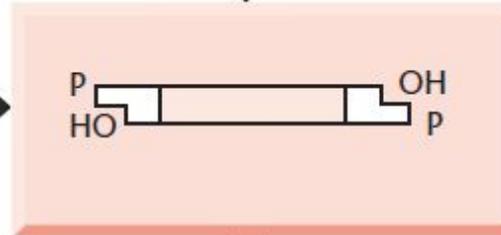
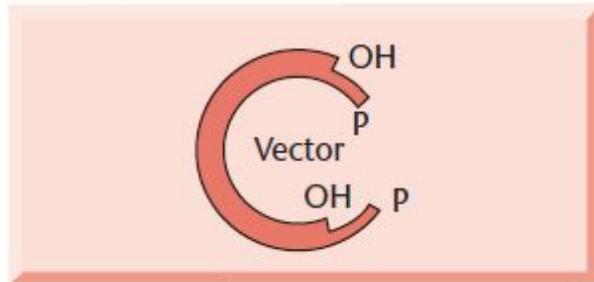
ы



T4 DNA
ligase,
ATP



Polynucleotide
kinase, ATP



Лигирование по
«тупым» концам
(димеризации
адаптеров
не происходит)

Фосфорилирова
ние
концов вставки

Лигирование по
«липким»
концам,
клонирование

Создание новых сайтов
рестрикции на концах
клонлируемых молекул ДНК
без использования
рестриктаз

Щелочная фосфатаза и полинуклеотидкиназа

Щелочная фосфатаза:

- ❖ Оптимальные значения pH - щелочные
- ❖ Удаление 5'-фосфатных групп (дефосфорилирование) из ДНК, РНК и нуклеотидов
- ❖ Фосфатаза кишечника телят (calf intestinal phosphatase - CIP). Термолабильна

Полинуклеотидкиназа бактериофага T4:

- ❖ Перенос γ -фосфатной группы АТФ на 5'-ОН-группу фрагментов ДНК (фосфорилирование). Введение радиоактивной метки, подготовка к лигированию

ДНК-зависимые ДНК-полимеразы

◆ ДНК-полимераза I (Pol I) (EC 2.7.7.7)

Мол. масса 109 кДа, Активности: 5'->3'-полимераза, 5'->3'- и 3'->5'- (корректирующая) –экзонуклеазы. Введение концевой метки в ДНК, ник-трансляция, синтез 2-й цепи кДНК.

Фрагмент Кленова: мол. масса 76 кДа (субтилизин), отсутствует 5'->3'-экзонуклеазная активность, введение метки, одноцепочечные зонды.

Термостабильные ДНК-полимеразы

◆ T4-ДНК-полимераза

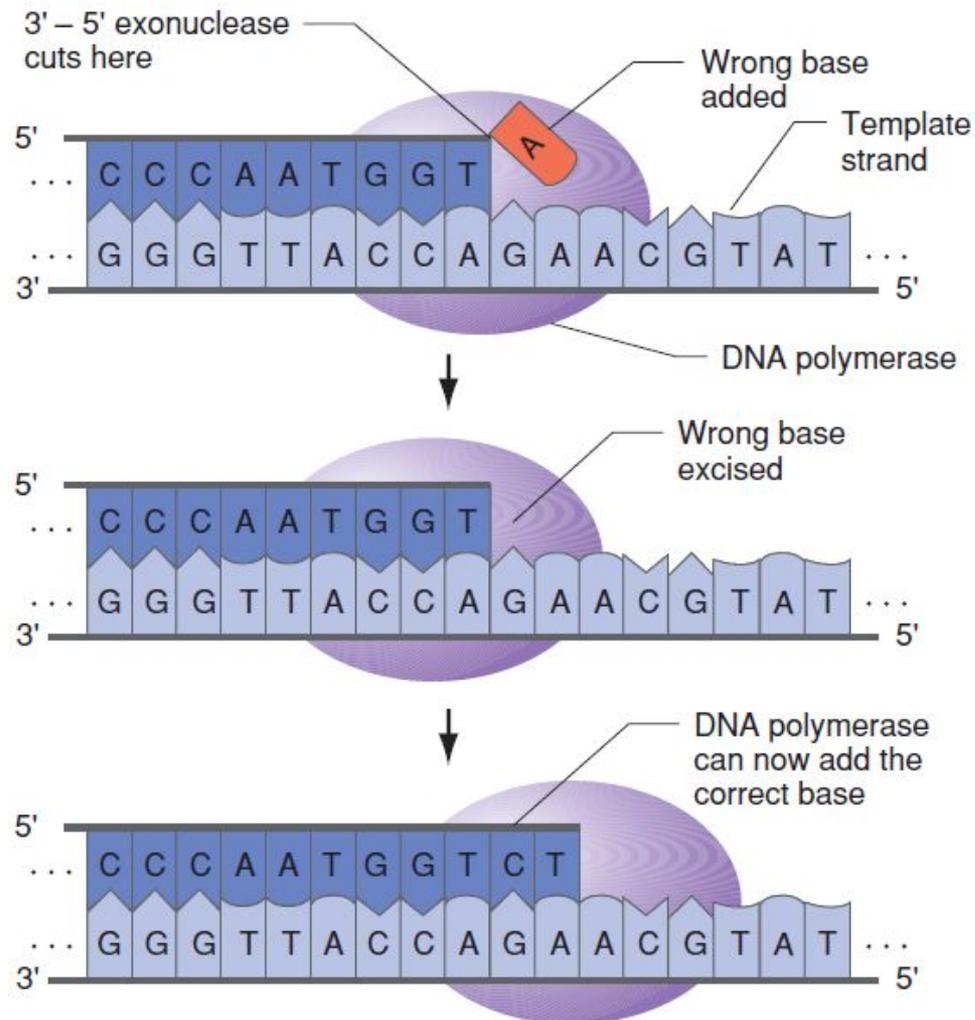
Мол. масса 114 кДа, отсутствует 5'->3'-экзонуклеаза, введение метки, «шлифовка» концов ДНК 3'->5'-экзонуклеазой.

◆ T7-ДНК-полимераза

«Секвеназа» - искусственно снижена 3'->5'-экзонуклеазная активность, повышены процессивность и скорость синтеза ДНК.

«Термосеквеназа» - получена из *Taq*-ДНК-полимеразы –
повышено сродство к ddNTPs

Коррекция неправильно включенного нуклеотида 3'→5'-экзонуклеазой ДНК-полимеразы



Обратные транскриптазы (ОТ)

- ❖ ОТ вируса миелобластоза птиц (AMV RT) – димер, хорошо транскрибирует сильно структурированные матрицы
- ❖ ОТ вируса мышиноного лейкоза Молони (M-MLV RT) – мономер, рекомбинантный фермент
- ❖ ОТ ВИЧ-1 – транскрибирует как РНК, так и ДНК

Нуждаются в ДНК-затравке (праймере)

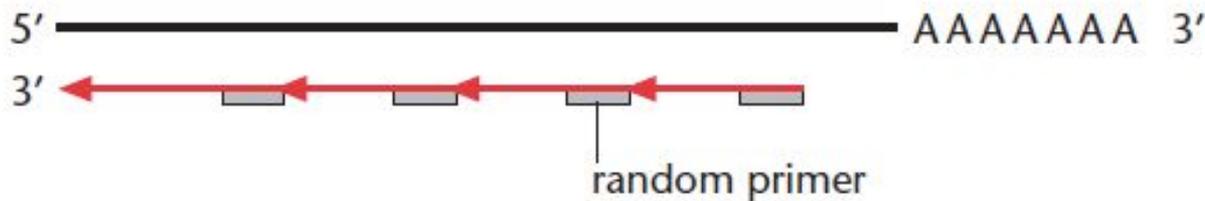
Обладают активностью РНКазы Н, деградирует РНК-матрицу в процессе синтеза первой цепи (M-MLV RT – слабо)

Мутанты рекомбинантной M-MLV RT без РНКазы Н более эффективны в синтезе первой цепи кДНК

Высокая частота ошибок – до 5×10^{-3} /нуклеотид

Три стратегии синтеза кДНК обратной транскриптазой

Random primer



Случайный
(короткий)
праймер

Oligo (dT) primer

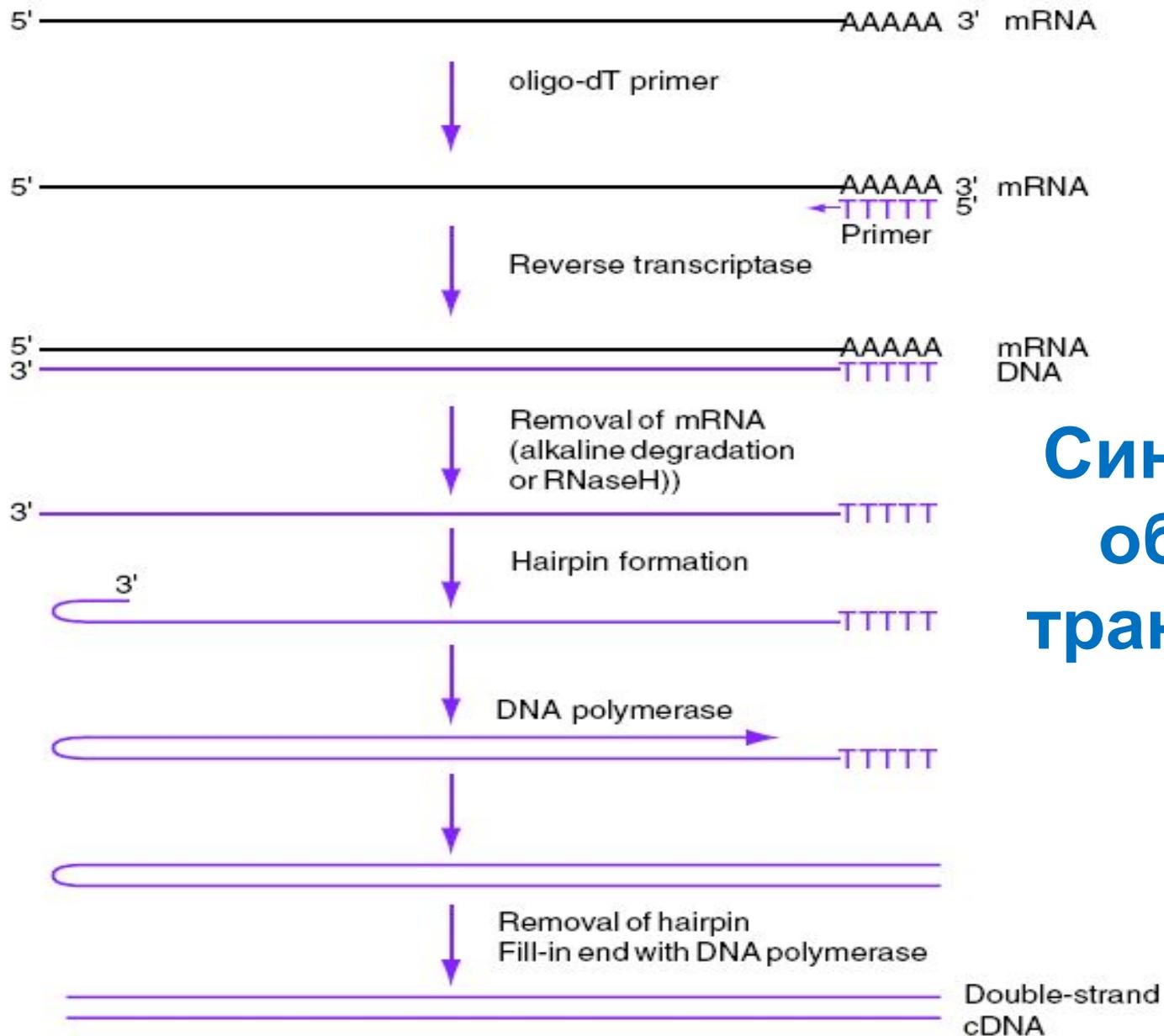


Олиго(dT)-
праймер

Sequence-specific primer

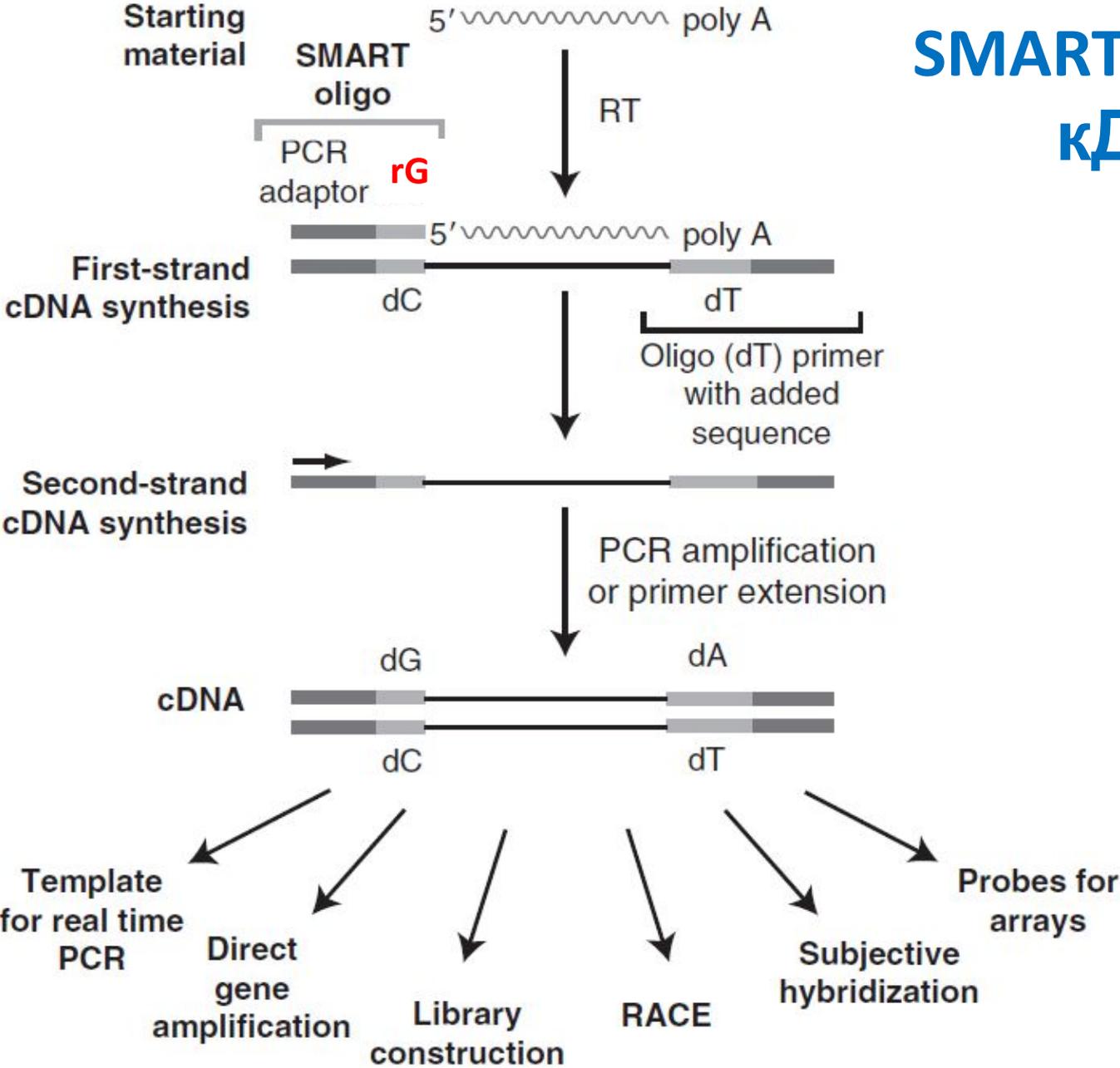


Специфический
праймер

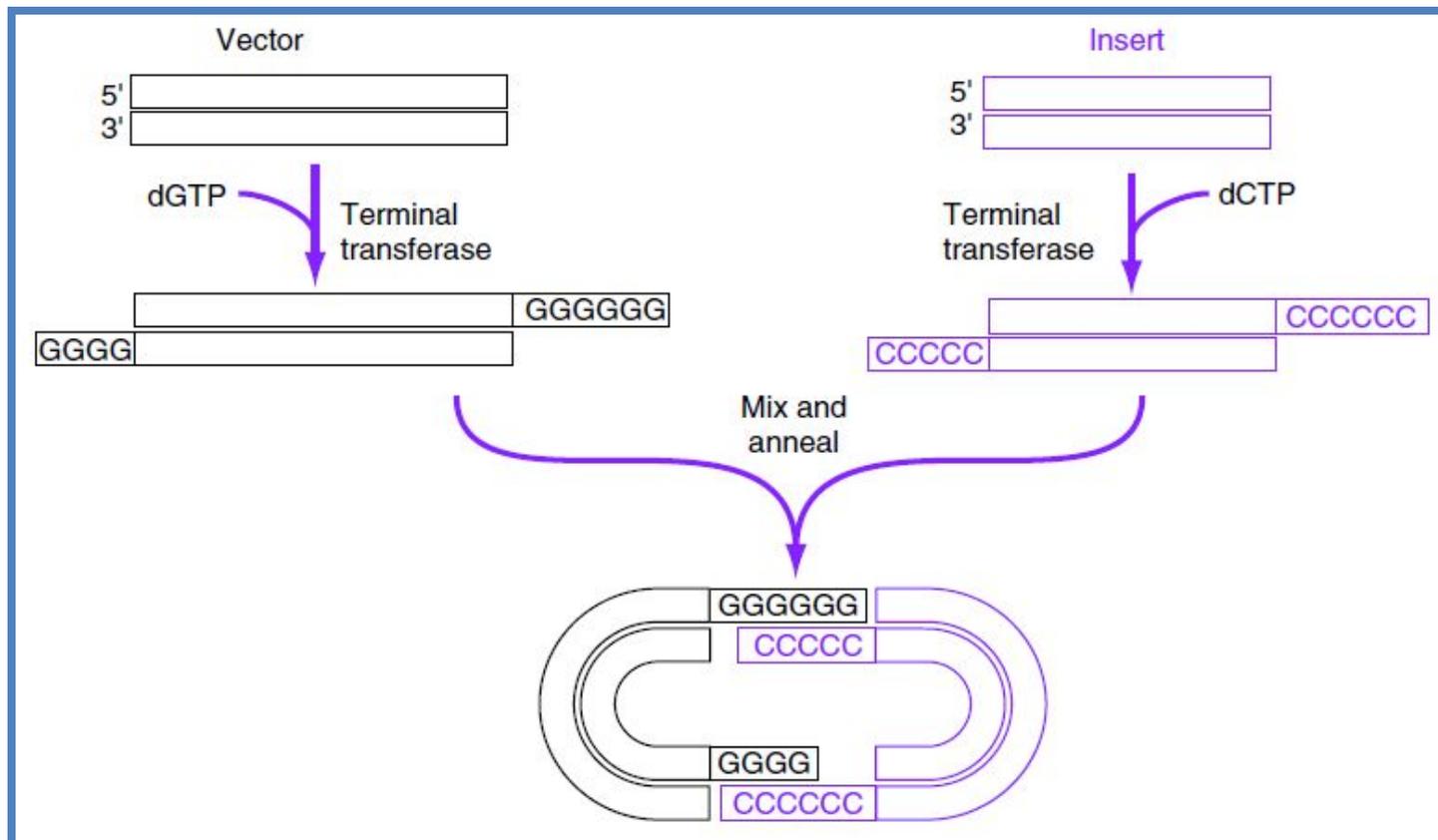
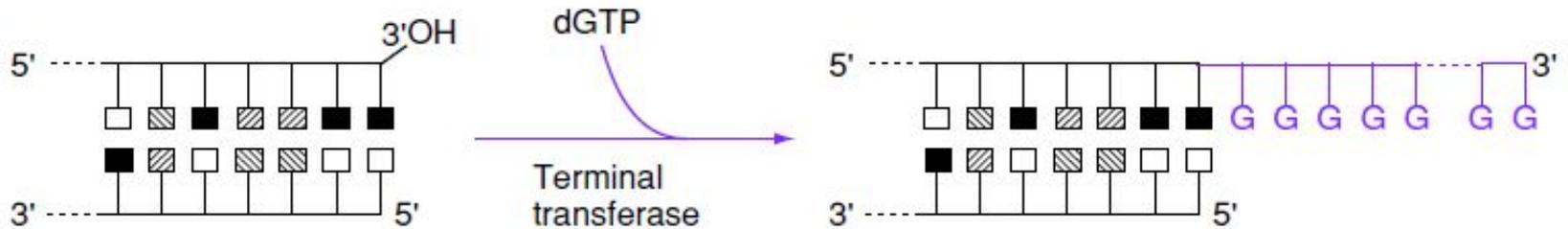


Синтез кДНК обратной транскриптазой

SMART-СИНТЕЗ кДНК



Терминальная трансфераза в синтезе гомополимеров и клонировании



Векторы

Молекулярно-генетические конструкции, предназначенные для переноса генетического материала в клетки живых организмов

- ◆ **Клонирование векторы (Cloning vectors)**
- ◆ **Экспрессирующие векторы (Expression vectors)**
- ◆ **Векторы для слияния генов (Gene fusion vectors)**
- ◆ **Бинарные (челночные) векторы (Shuttle vectors)**

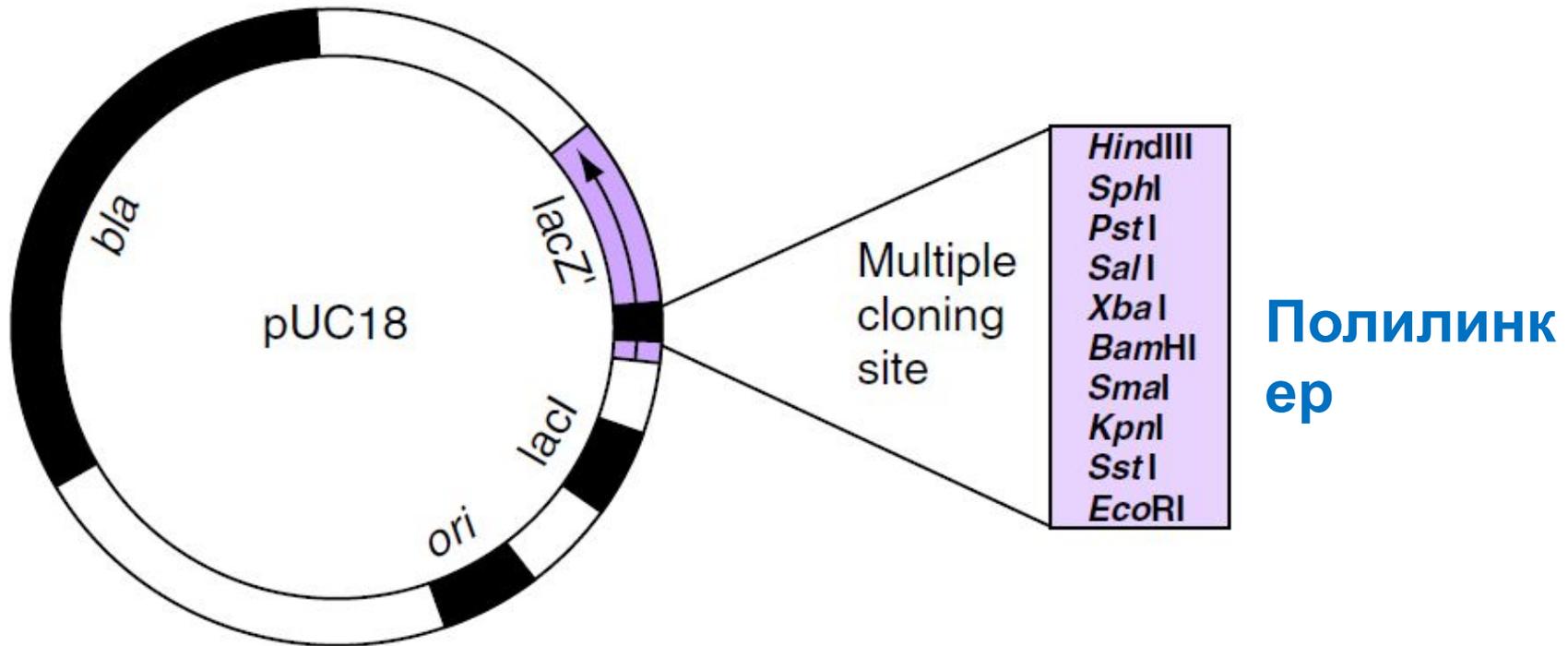
Емкости векторов разных классов

Вектор	Емкость (т.п.н.)	Применение
Плазмиды	15	Библиотеки кДНК
Бактериофаг лямбда	25	Геномные библиотеки Библиотеки кДНК
Космиды	30-45	Геномные библиотеки
РАС	70-90	То же
ВАС	100-500	То же
УАС	250-2000	То же
МАС	>2000	Генотерапия

Свойства, которыми должен обладать любой вектор

- ❖ **Способность к длительному существованию в клетках-хозяевах (репликация автономная или в составе хромосом)**
- ❖ **Наличие биохимических или генетических маркеров, которые позволяют обнаруживать его присутствие в клетках**
- ❖ **Должны допускать встраивание чужеродной ДНК без нарушения своей функциональной целостности**

Плазмидный вектор pUC18



bla – Ген β-лактамазы, селективируемый маркер (устойчивость ампициллину)

ori – Точка начала репликации (origin)

lacZ' – N-концевая часть гена β-галактозидазы (кодирует 146 из 1021 АК-остатков), селективируемый маркер (хромогенный субстрат X-Gal)

lacI – Ген Lac-репрессора (Индуктор – IPTG)

Предотвращение образования плазмидного вектора без вставки с помощью щелочной фосфатазы

