

# БИОИНЖЕНЕРИЯ.

## №2



Клонирование – это из 10 мл, взятой из вены крови – 3 мл выпиваются, 7 мл переводятся в пепельную структуру в печах при температуре 600 0С, и принимают во внутрь в капсулах.

При клонировании идет пересоздание элементов – это тот же элемент, но уже «качественней». Был изначально Na, после клонирования стал Na-полиэстер, т.е. Na с другой энергией, т.е. при клонировании идет процесс, способный давать «великое из простого». В центре Na тот, что был изначально. В клоне он имеет более высокую энергию «Na'». «Na'» – это натрий полученный за счет насыщения энергий изначально Na, являющегося основой.

Na' обладает более мощным взаимодействием с солнечной энергией. Чем сильнее в очищении Na, тем он мощнее в приеме солнечной энергии.

Взаимодействие Na-основы и Na', будет давать Na". Т.е. система объединений энергий – это очищение. Изначальный Na уже не существует, он провзаимодействовал с Na' и все его действия при этом закончились. Был Na-изначальный, добавили Na-жженный = Na' – клон №1. К Na' добавили Наж' = Na". Следующий клон – Na" сжигается, получается Na" + Na"жженный = патрица.

Na-патрица + Na-патрица(жженный) = Na-матрица

Патрица – это клон в действии. Т.е. первоосновной Na не дает Матрицу и Патрицу, их дает процесс последовательного клонирования.

**Леонтьева А.И., «Здоровье человека – это состав его крови». Журнал «Успехи современного естествознания», 2010, №12, стр. 85-88.**

# Молекулярное клонирование

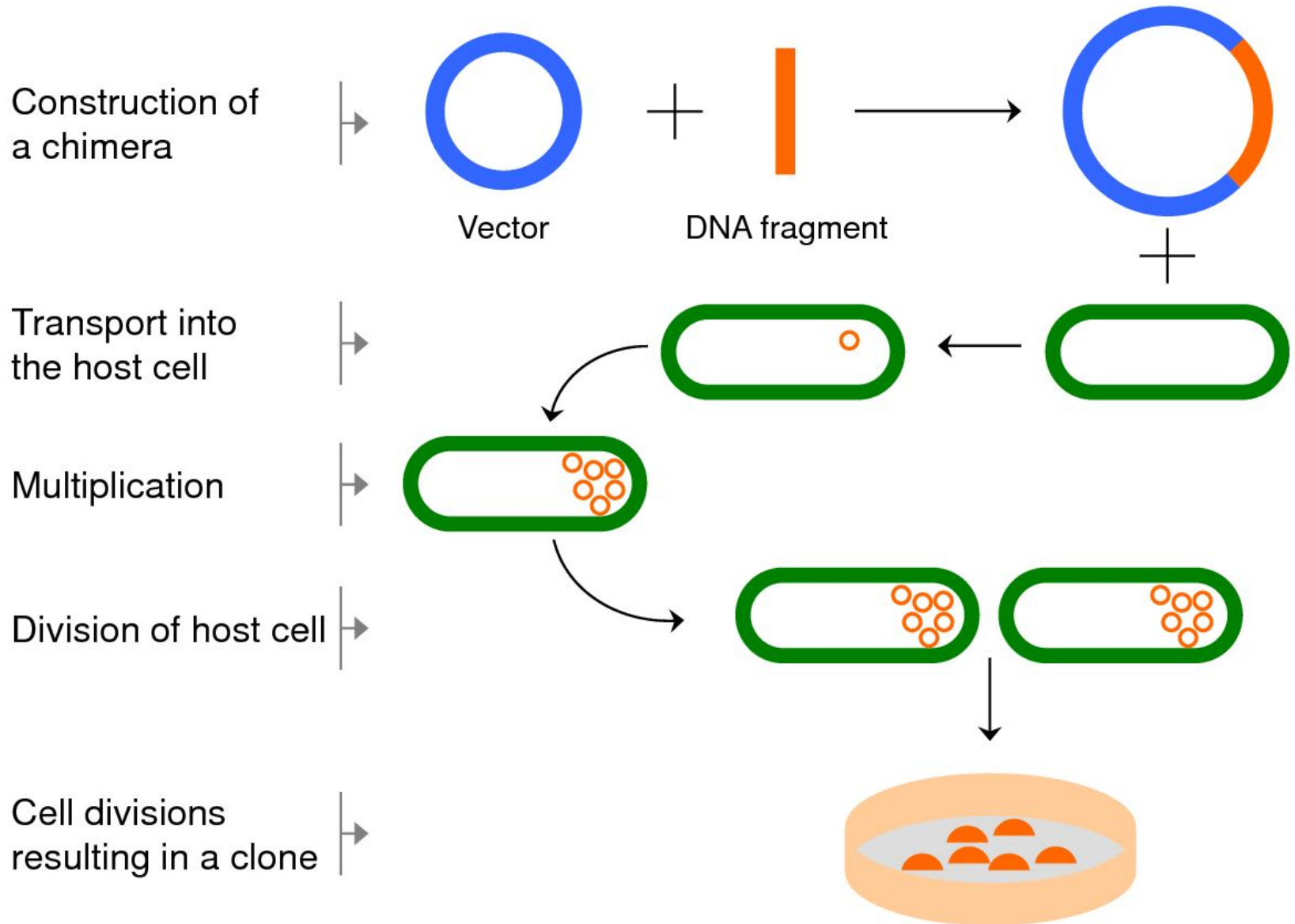
Получение идентичной копии молекулы ДНК (чаще всего в больших количествах).

## **Основа молекулярной биологии и биоинженерии!**

Ключевые составляющие технологии:

- эндонуклеазы рестрикции,
- плазмидные ДНК бактерий – кольцевые молекулы, способные к саморепликации в бактериальных клетках,
- ДНК-лигаза,
- процесс трансформации – попадание экзогенной ДНК в бактериальную клетку.

# Общая схема молекулярного клонирования



# Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)

Ферменты, относящиеся к гидролазам, катализирующие реакцию гидролиза нуклеиновых кислот.

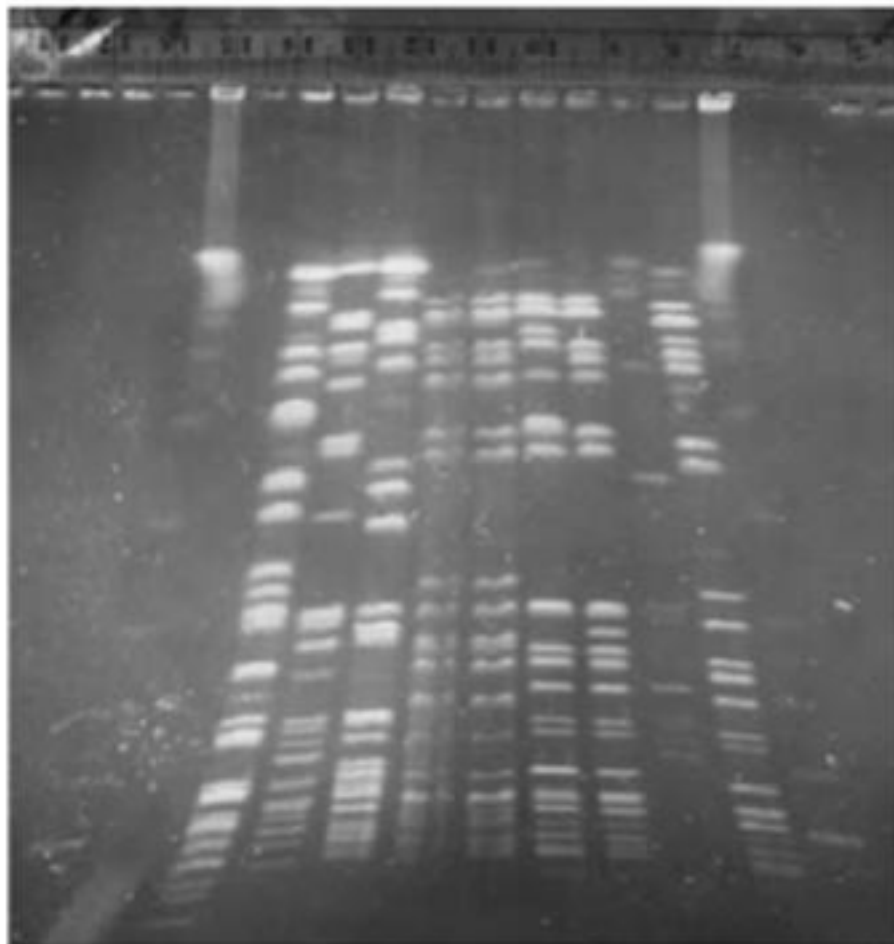
Три типа рестриктаз:

1. Тип 1 - узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двуцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке; само место разреза не строго специфично.
2. Тип 2 - узнают определённую последовательность и разрезают двуцепочную молекулу ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности.
3. Тип 3 - узнают нужную последовательность и разрезают двуцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания).

В молекулярном клонировании чаще всего используются **рестриктазы второго типа.**

Enzyme	Source	Recognition site	Average cleaved size (kb)
<i>A</i> lul	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG↓CT TC↑GA	0.3
<i>B</i> amHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	G↓GATC C C CTAG↑G	7.0
<i>E</i> coRI	<i>Escherichia coli R factor</i>	G↓AATT C C TTAAT↑G	3.1
<i>H</i> aellI	<i>Hemophilus aegyptus</i>	GG↓CC CC↑GG	0.6
<i>H</i> indIII	<i>Hemophilus influenzae Rd</i>	A↓AGCT T T TCGAT↑A	3.1
<i>N</i> otI	<i>Norcadia otitidis-caviarum</i>	GC↓GGCC GC CG CCGG↑CG	< 9700
<i>P</i> stI	<i>Providencia stuartii</i>	C TGCA↓G G↑ACGT C	7.0
<i>T</i> aqI	<i>Thermus aquaticus</i>	T↓CG A A GC↑T	1.4

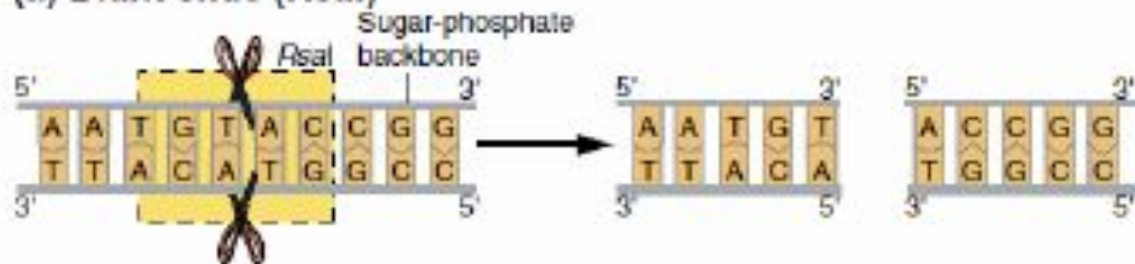
При выделении геномной ДНК и ее обработке рестриктазой получается набор фрагментов разной длины



Рестрикция хромосом разных штаммов *E.coli*

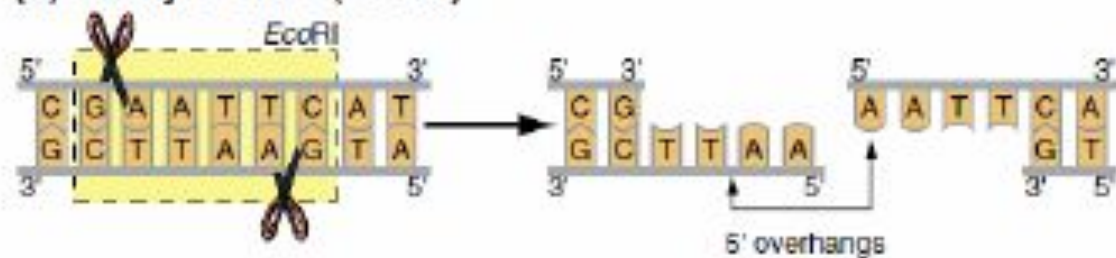
# При действии рестриктаз на ДНК образуются концы разных типов

(a) Blunt ends (*RsaI*)



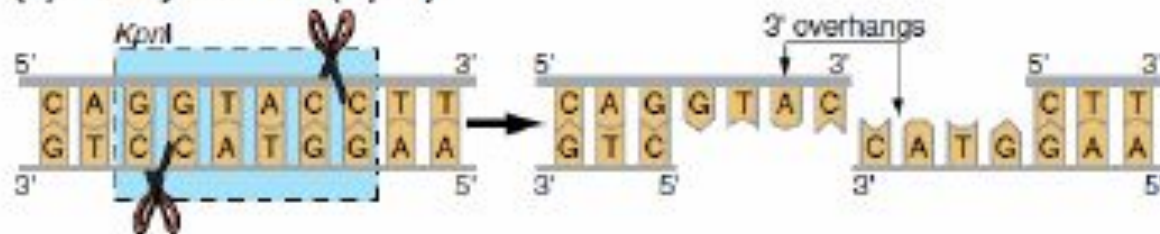
«Тупые» концы

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



5'-выступающие  
«липкие» концы

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



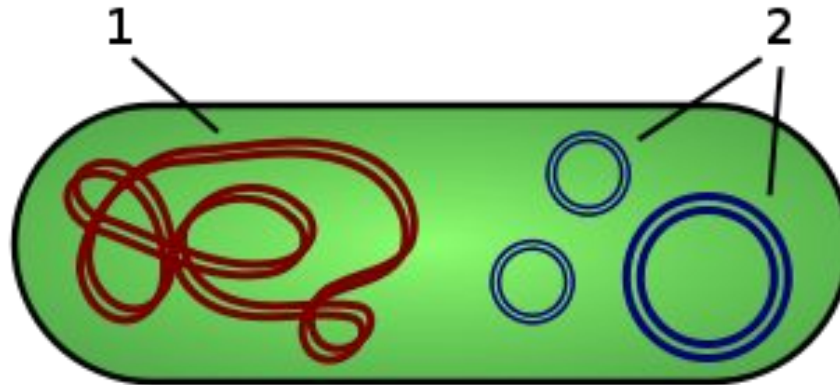
3'-выступающие  
«липкие» концы

**Вектор** – рекомбинантная самореплицирующаяся молекула ДНК, в которую встраивается фрагмент чужеродной (клонированной) ДНК.

- 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



# Плазмиды – внехромосомные кольцевые молекулы ДНК

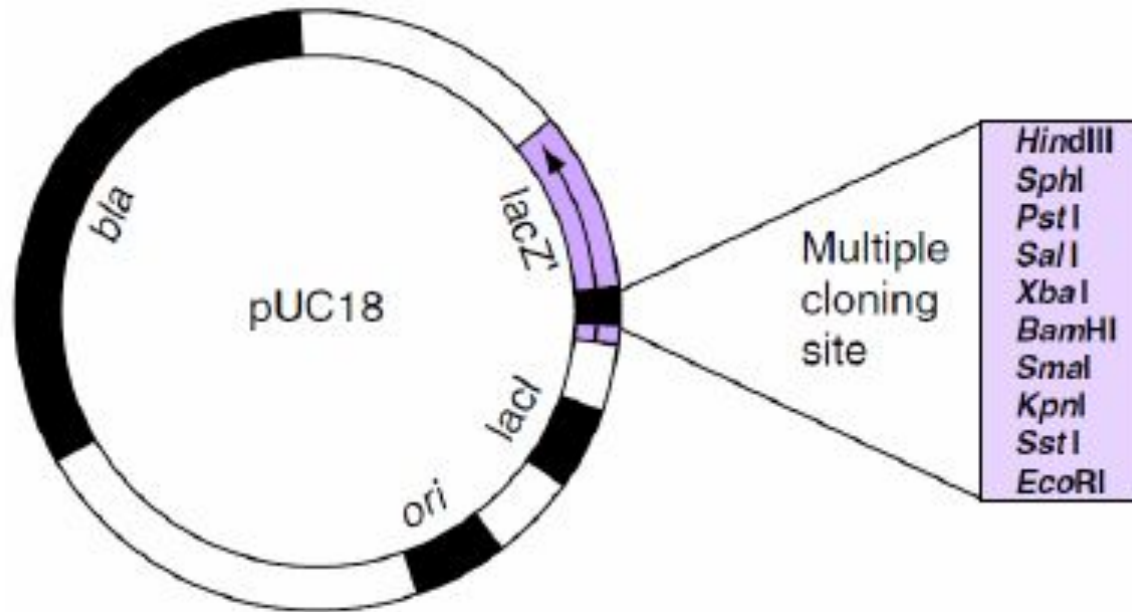


- Чаще всего – кольцевые двуцепочечные молекулы
- Встречаются у бактерий, архей, редко – у эукариот
- Кодировать факторы адаптации к неблагоприятным условиям (белки устойчивости к антибиотикам)
- Переходят из клетки в клетку путем конъюгации, служат средством горизонтального переноса генов

# Бактериальные плазмиды – идеальные векторы для молекулярного клонирования

- Способны к автономной репликации
- В зависимости от ориджина репликации, в клетке может содержаться различное число копий плазмиды
  - Низкокопийные (1-2 копии на клетку)
  - Высококопийные (10-100 копий на клетку)
- Относительно небольшие размеры
- Одна клетка может содержать несколько разных плазмид
- Можно встроить гены-репортеры (например, гены устойчивости к антибиотикам)
- Легко выделять из клетки, манипулировать и направленно транспортировать в клетку

# Плазмидный вектор pUC118



*bla* – Ген  $\beta$ -лактамазы, селектируемый маркер (устойчивость ампициллину)

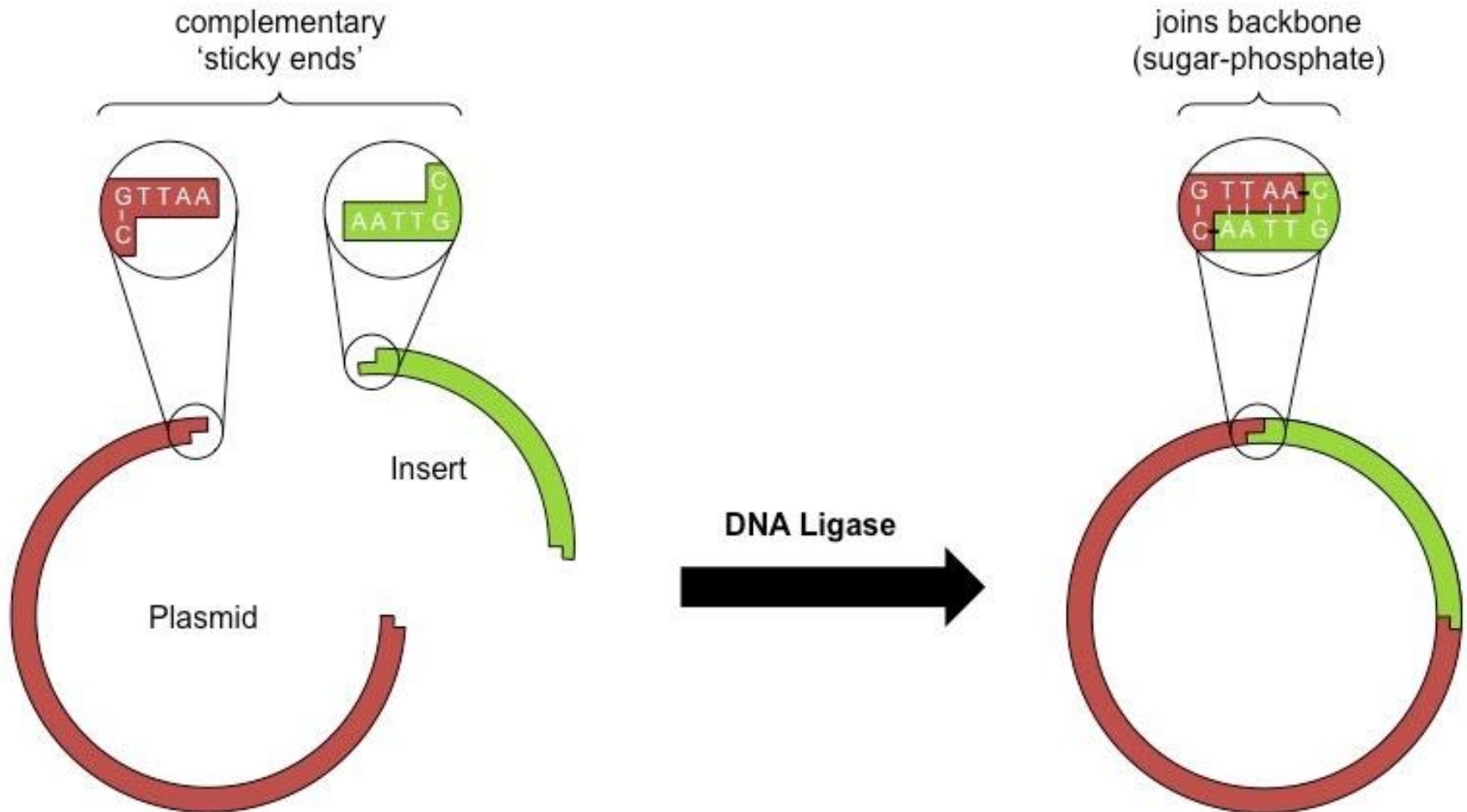
*ori* – Ориджин репликации

*lacZ'* и *lacI* – гены, необходимые для бело-голубой селекции (об этом ниже)

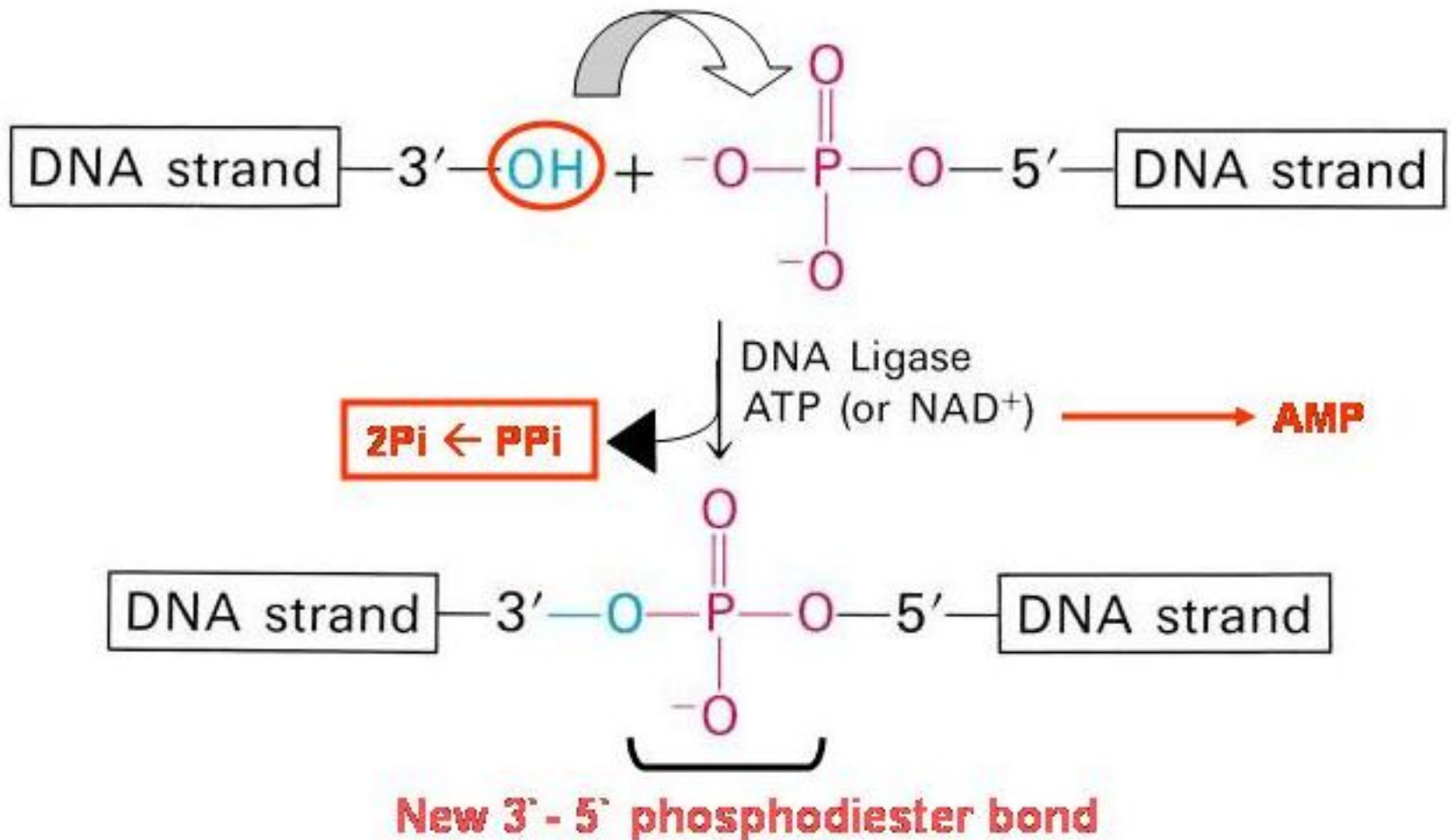
**Самое интересное – это полилинкер!**

(он же multiple cloning site)

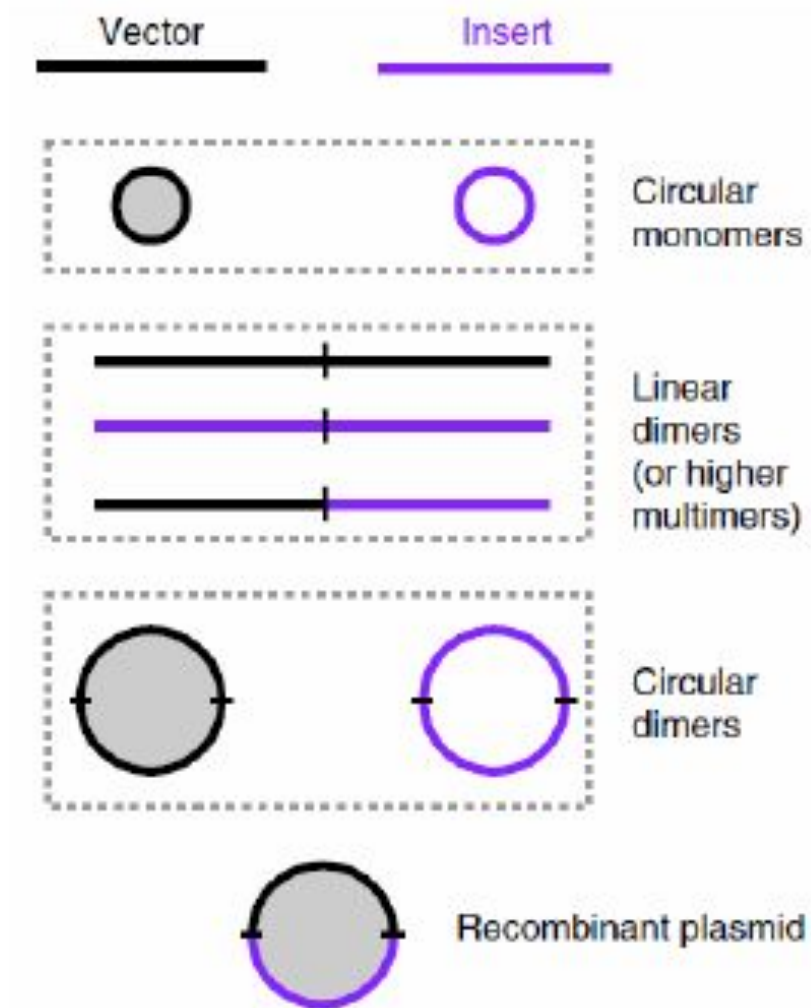
Наличие на концах плазмиды и вставки одинаковых липких или тупых концов позволяет получить молекулу рекомбинантной ДНК, в которой вставка будет ковалентно соединена с плазмидой.



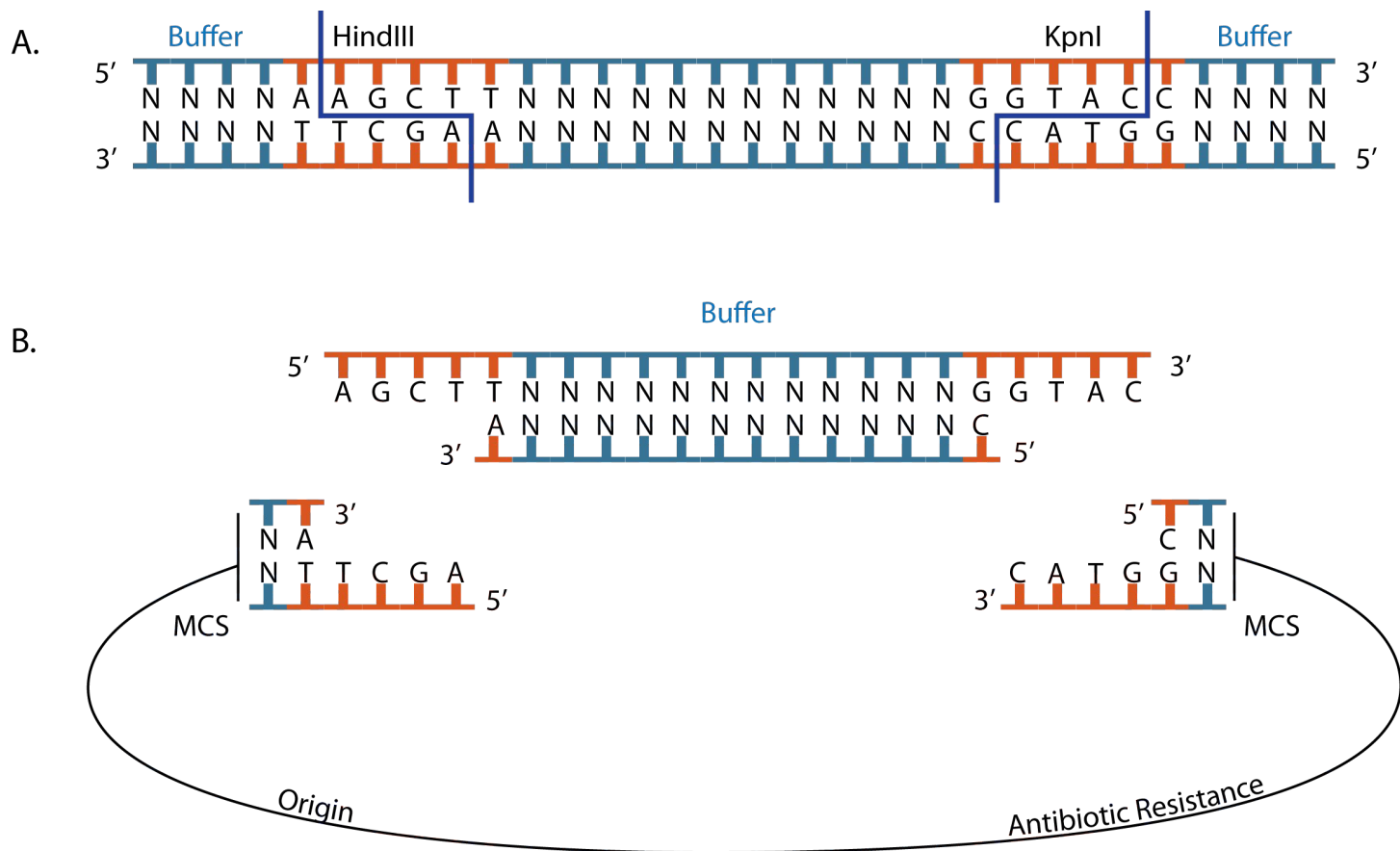
**ДНК-лигаза:** фермент, ковалентно соединяющий друг с другом два фрагмента ДНК



# Продукты лигирования вектора и вставки

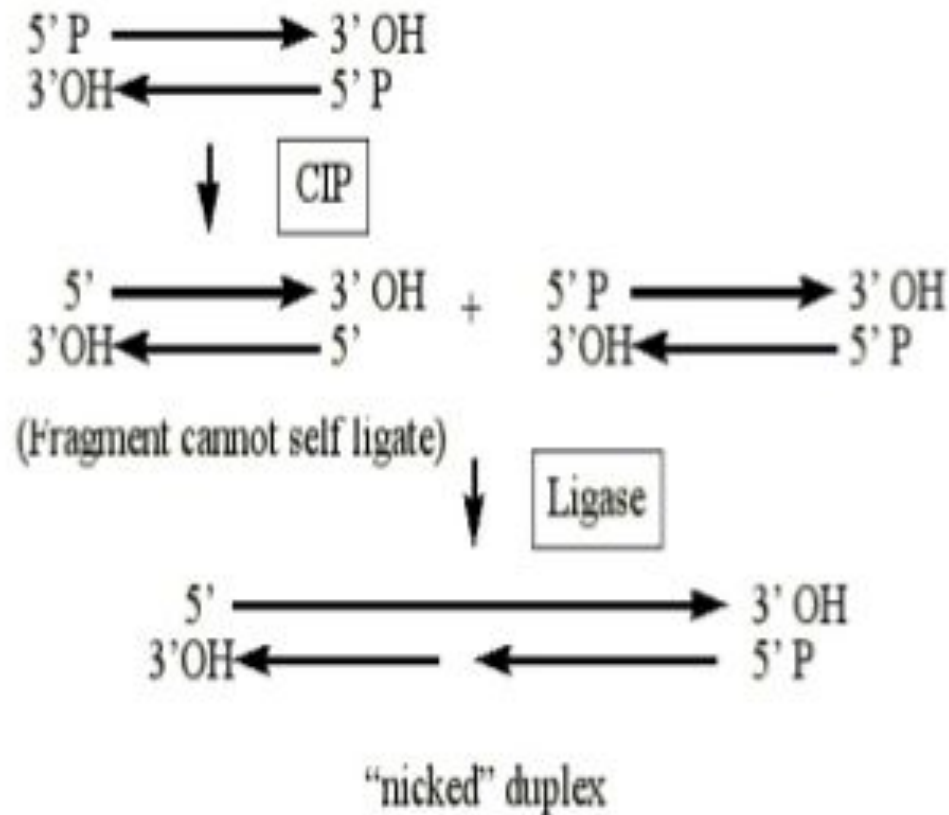


# Преимущество двух разных липких концов при лигировании



Использование при клонировании двух разных рестриктаз с липкими концами приводит к тому, что вставка встраивается в вектор в однозначной ориентации.

# Щелочная фосфатаза – маленький помощник биоинженера!



Фермент удаляет фосфатные группы с 5'-концов линейризованного вектора, и он не может самолигироваться. При добавлении вставки и ДНК-лигазы происходит лигирование одной цепи, а во второй цепи остается разрыв («nick»), который впоследствии залечивается репарационными системами бактерий.



# Трансформация



Бактерия до попадания внутрь рекомбинантной плазмиды



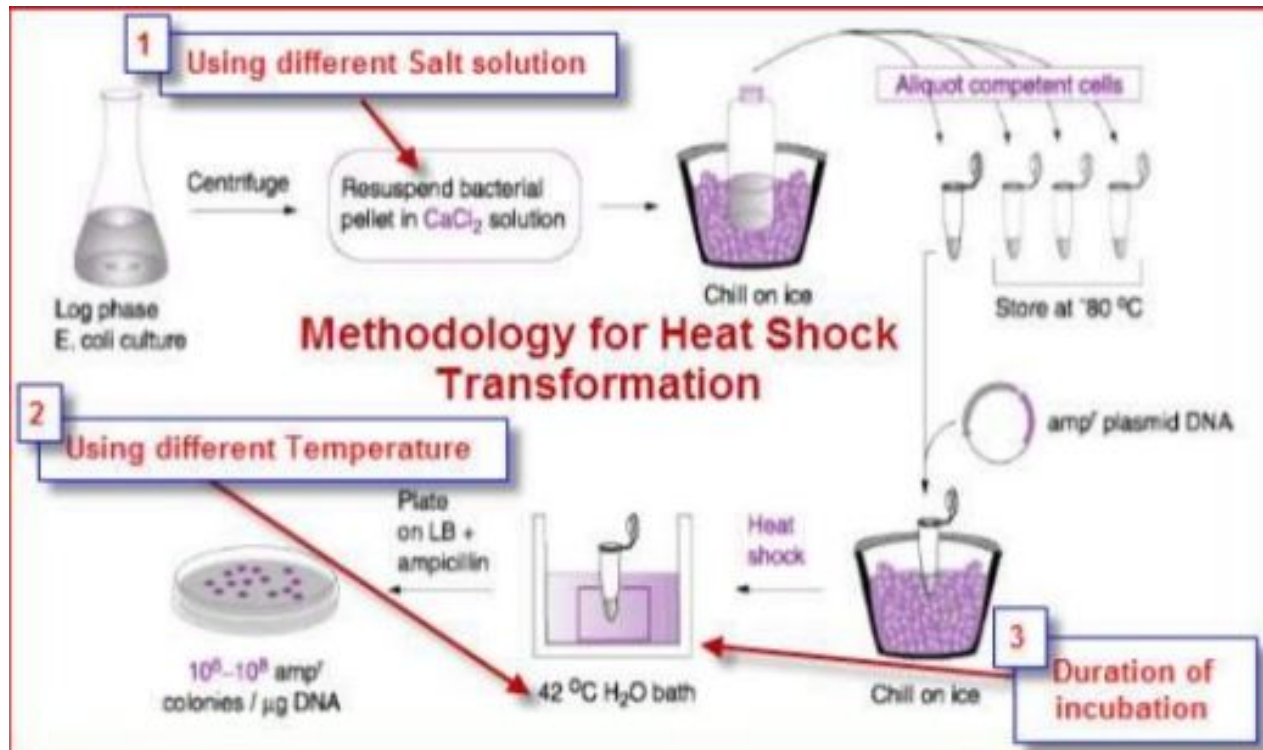
Бактерия после попадания внутрь рекомбинантной плазмиды

В терминах биоинженерии трансформация – это направленное внесение в бактериальную клетку рекомбинантного вектора.

# Солевая трансформация

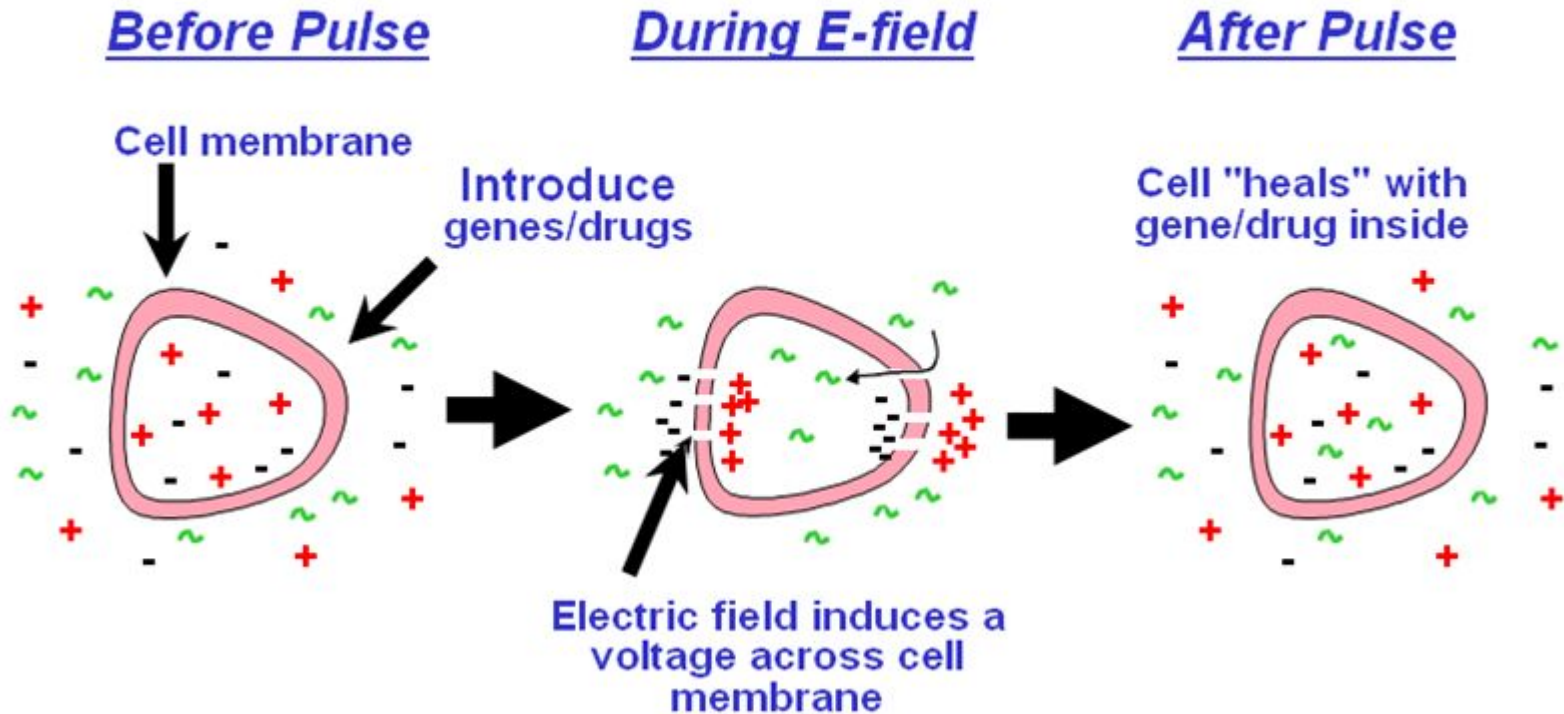
Ионы кальция (+) связываются и с ДНК (-), и с липополисахаридами клеточной стенки *E.coli* (-), «соединяя» тем самым одно с другим.

Тепловой шок приводит к образованию пор в клеточной оболочке, и ДНК устремляется туда. Поры затем зарастают. Bingo!



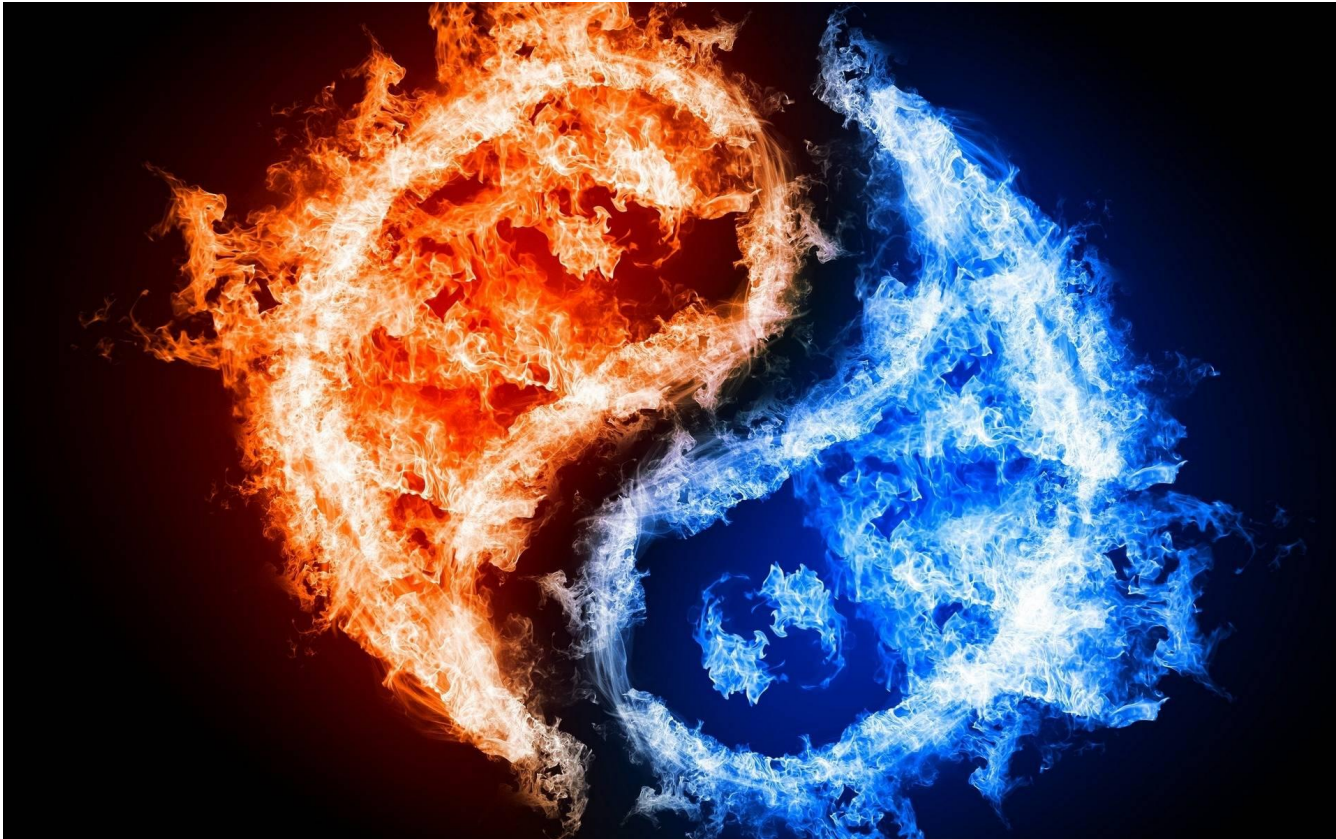
# Электропорация

Короткий электрический разряд создает в бактериальных оболочках поры, куда и устремляется ДНК. Процессу помогает появившееся электрическое поле. Поры затем зарастают. Bingo!



Основной смысл трансформации как этапа молекулярного клонирования:

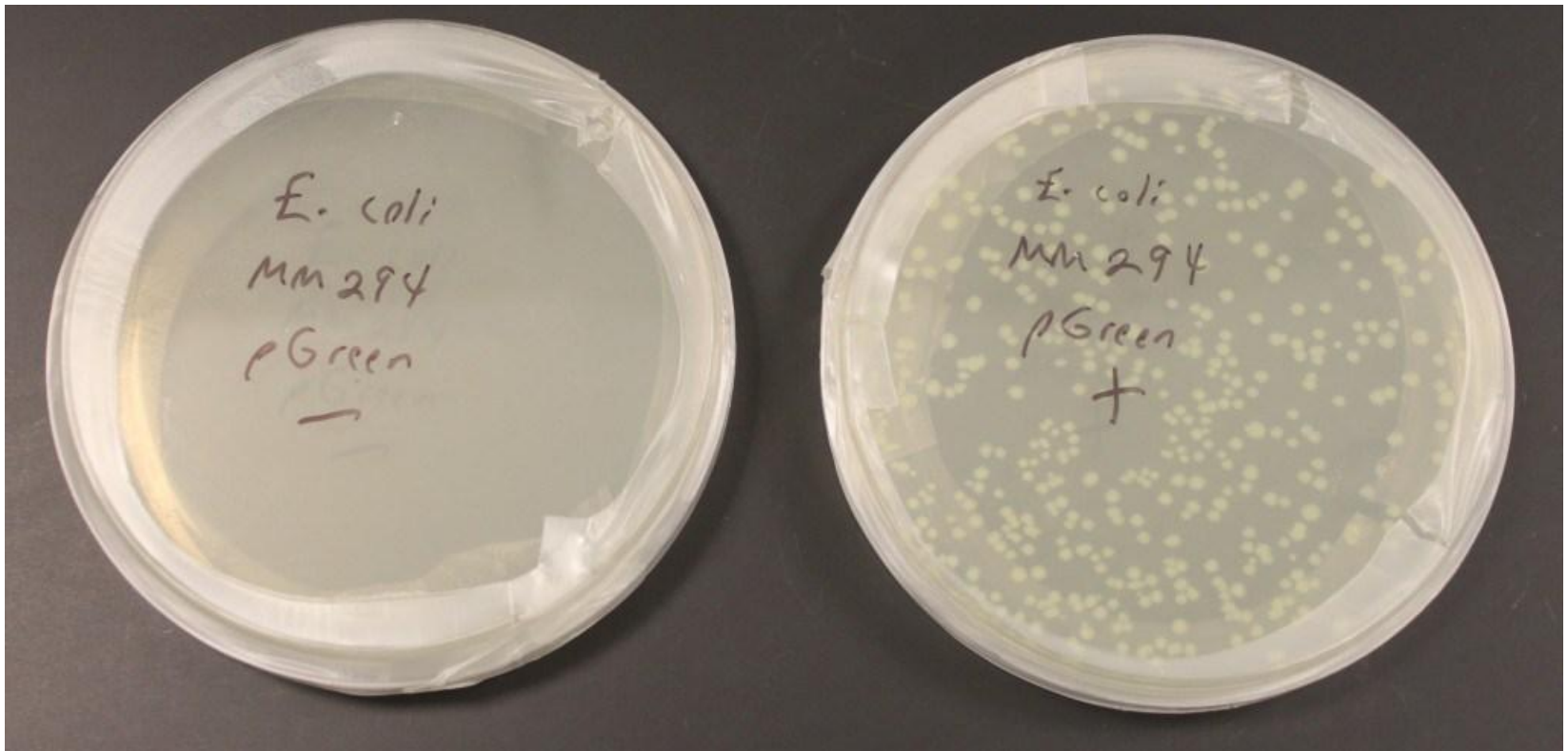
**В большинстве случаев в одну бактериальную клетку попадает одна молекула ДНК!**



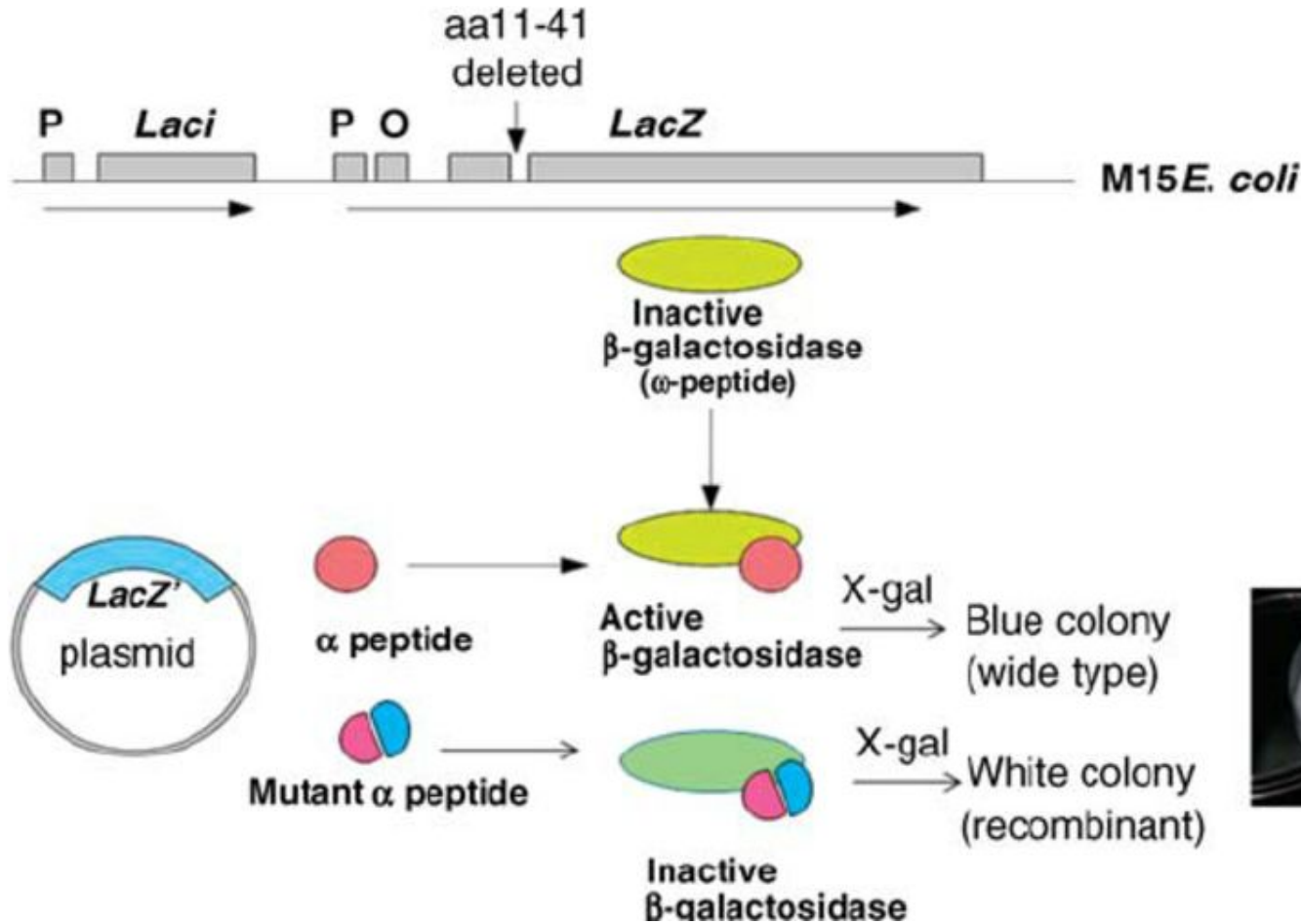


## После трансформации:

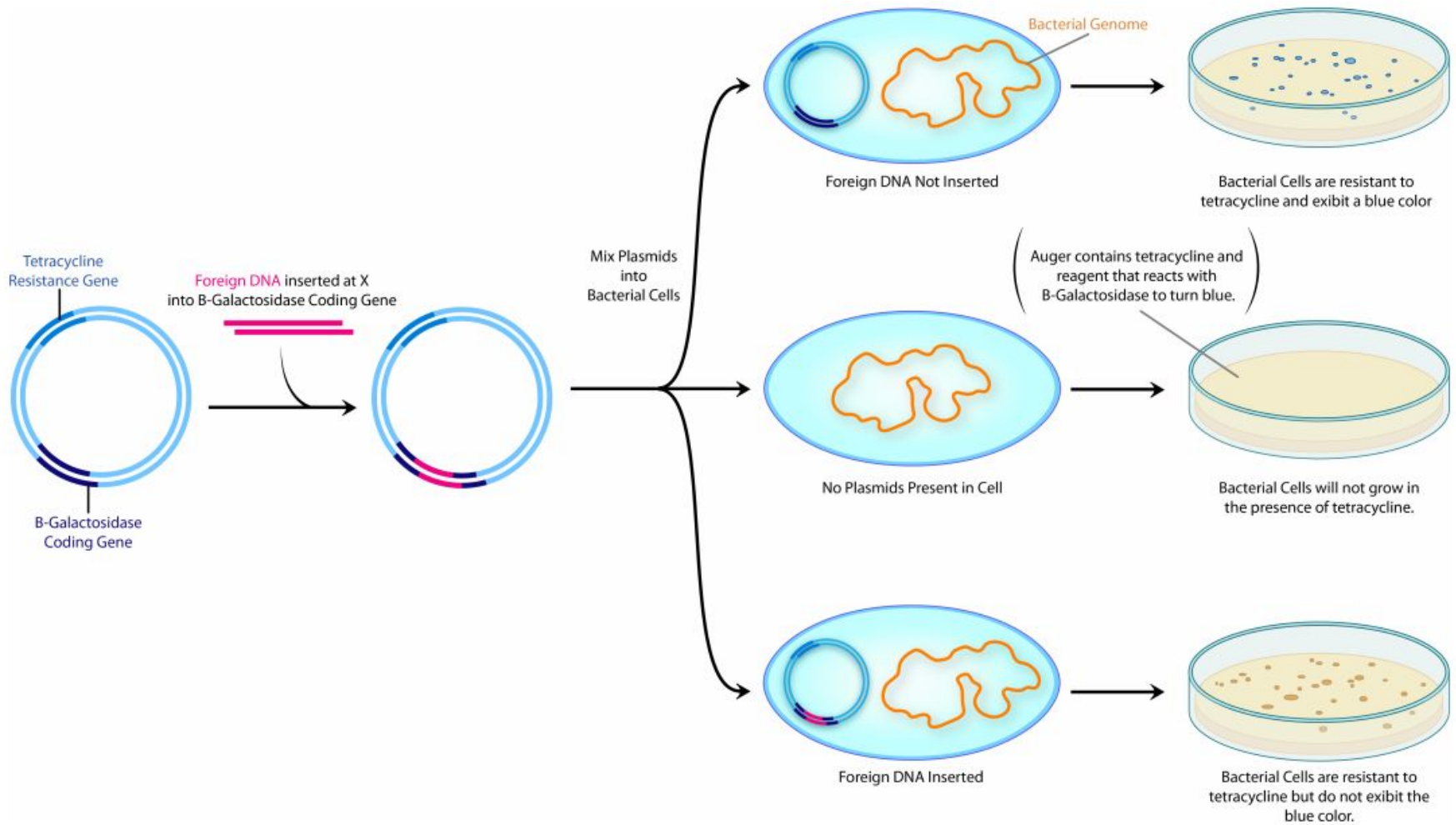
- Высеваете суспензию клеток на чашку Петри (с антибиотиком)
- Если вы все правильно рассчитали, на чашке вырастают индивидуальные колонии, каждая из которых есть потомство одной клетки
- В большинстве случаев плазмидная ДНК, выделенная из одного клона, является гомогенным препаратом плазмиды
- Если вам очень повезло, то эта плаزمида еще и содержит нужную вам вставку!



# Бело-голубая селекция



Геном бактерий, используемых в клонировании, содержит одну субъединицу  $\beta$ -галактозидазы. Плазмида кодирует вторую. Они соединяются в активный фермент, который превращает субстрат X-Gal в продукт синего цвета. Для этого также нужен IPTG, индуктор синтеза второй субъединицы.



А встраивание-то в плазмиду происходит в аккурат в середину гена второй субъединицы! И если оно случилось, никакой нормальной субъединицы не синтезируется, и никакого синего цвета у вас не будет!

На синие колонии можете даже внимания не обращать.  
Дальше работаем только с белыми!

