

Лекция 2. Методы генетических манипуляций и создания организмов с новыми свойствами. Векторные системы в генной инженерии. Ферменты генной инженерии. Конструирование рекомбинантных ДНК.

На различных этапах генно-инженерных исследований применяются определенные инструменты и методы, включающие в себя:

- получение изолированных генов, несущих требуемый признак;
- включение гена в вектор для переноса в клетку-реципиент;
- перенос вектора, содержащего требуемый ген, в модифицируемый организм;
- отбор генетически модифицированных клеток с требуемым признаком.

Схема создания генетически модифицированного организма представлена на рисунке 5.



Рисунок 5 – Этапы проведения генно-инженерного исследования

2.1 Получение изолированных генов

Важнейшим методом генетической инженерии является извлечение необходимых генов из молекулы ДНК для дальнейшего конструирования рекомбинантной ДНК. Для этих целей используются **ферменты рестрикции**, которые *способны* разрезать молекулу ДНК в строго определенных нуклеотидных последовательностях.

Первые рестриктазы были получены в 50-70-е года двадцатого века, когда было замечено явление, при котором в среде чужеродная ДНК разрушалась специфическими ферментами бактерий, при этом собственная ДНК оставалась неизменной. Позднее ферменты, обладающие такой способностью, были названы *рестрикционными нуклеазами или рестриктазами*.

В 1978 году **Вернеру Арберу, Дэну Натансу и Гамильтону Смит** была присуждена Нобелевская премия за получение первых рестриктаз, изучения их свойств и практического применения для картирования хромосом.

Рестриктазы разрезают молекулу ДНК в середине, в строго определенных участках, длиной от четырех до семи пар нуклеотидов, при этом они расщепляют участок узнавания внутри или вне его. Собственные ДНК бактерий защищены от рестриктаз посредством модификации (метиличивания) азотистых оснований аденина и цитозина.

В зависимости от специфики сайтов узнавания рестриктазы разделены на три класса:

- Рестриктазы первого класса способны узнавать определенную последовательность нуклеотидов и разрезать молекулу ДНК в произвольном месте, недалеко от сайта рестрикции;
- Рестриктазы второго класса способны узнавать определенную последовательность нуклеотидов и разрезать молекулу ДНК в определенном месте, внутри сайта рестрикции; рестриктазы данного класса узнают *полидромные* последовательности нуклеотидов, которые одинаково считываются в обоих направлениях;
- Рестриктазы третьего класса способны узнавать определенную последовательность нуклеотидов и разрезать молекулу ДНК, отступив несколько нуклеотидов от сайта узнавания. При это могут образовываться фрагменты ДНК с «тупыми» (ровными) или «липкими» (выступающими) концами. Ферменты этого класса могут узнавать несимметричные сайты (рисунок 6).

В настоящее время известно более 3000 ферментов рестрикции (рисунок 7) и более 600 коммерческих препаратов на их основе.

Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

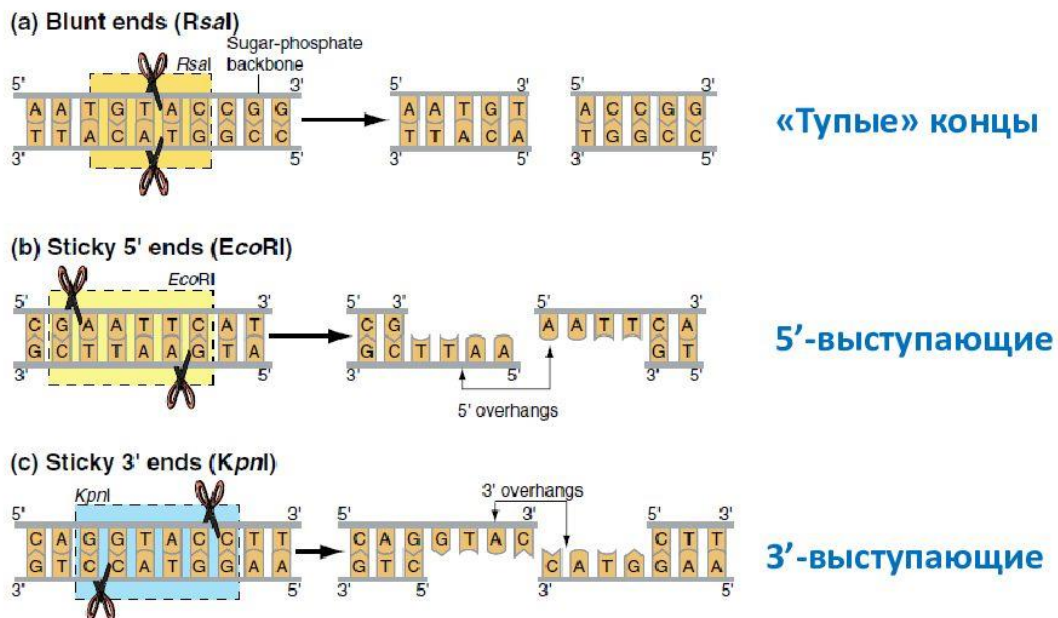


Рисунок 6 – Действие рестриктаз в различных сайтах узнаваний

Рестриктазы в генной инженерии

<i>EcoRI</i> (<i>E. coli</i> RY13)	5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5'
<i>NdeI</i> (<i>Neisseria denitrificans</i>)	5'...CATATG...3' 3'...GTATAC...5'
<i>BamHI</i> (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H)	5'...GGATCC...3' 3'...CCTAGG...5'
<i>BglII</i> (<i>Bacillus globigii</i>)	5'...AGATCT...3' 3'...TCTAGA...5'
<i>PmeI</i> (<i>Pseudomonas mendocina</i>)	5'...GTTTAAAC...3' 3'...CAAATTTG...5'

Рисунок 7 – Представители рестриктаз и сайты рестрикции

Исследования в данной области по-прежнему продолжают, так как рестриктазы являются одним из важнейших инструментов генетической инженерии.

Для того чтобы получить новую молекулу ДНК, необходимо осуществить сшивание новых фрагментов ДНК в единую цепь. Для этих целей используется другой класс ферментов – **ДНК-лигазы**. Лигазы образуют фосфодиэфирные связи между фосфорильной и гидроксильной группами 5'- и 3'- концами молекулы ДНК. Так как ДНК имеет одинаковое строение у всех организмов, поэтому можно сшивать молекулы ДНК, полученных из самых разных клеток.

При разрезании молекулы ДНК для выделения из нее определенного фрагмента получаются фрагменты различной длины. Для того, чтобы разделить фрагменты нуклеотидов друг от друга и идентифицировать необходимый участок, применяются различные методы.

2.2 Разделение и идентификация ДНК

Разделение фрагментов молекулы ДНК осуществляют при помощи **электрофореза** в *агарозном или поликриламидном геле*. Образец с фрагментами ДНК разной длины вносят в лунки электрофорезной камеры и помещают в электрическое поле.

Молекулы ДНК имеют отрицательный заряд и будут двигаться к аноду, соответственно, скорость их движения будет зависеть от длины молекулы. Чем длиннее молекула, тем меньше ее скорость передвижения в геле (рисунок 8).

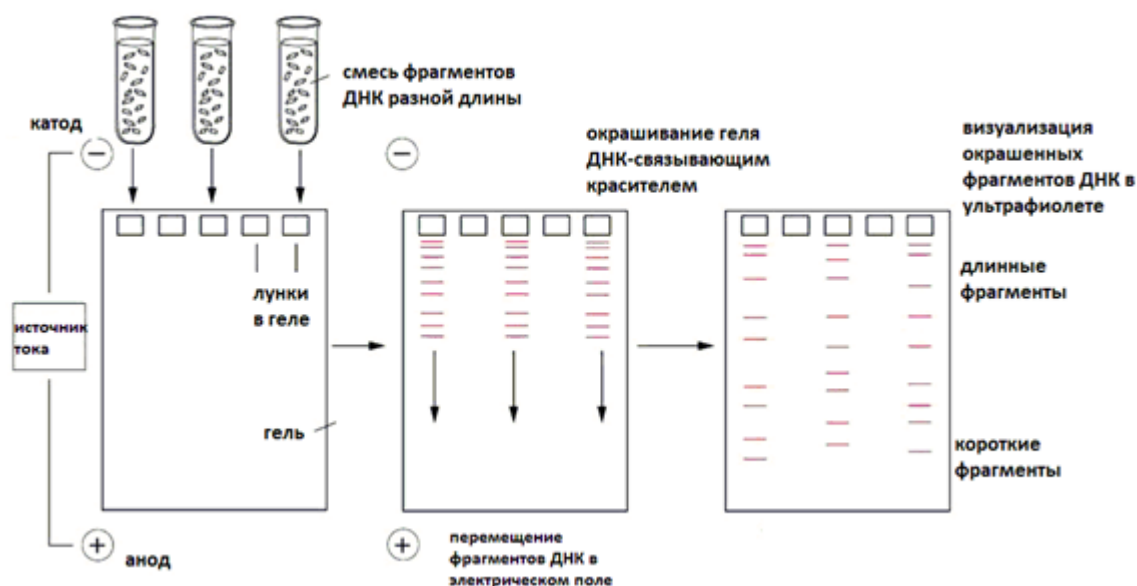


Рисунок 8 – Электрофоретическое разделение ДНК

По окончании процесса образуются полосы, соответствующие определенной длине молекулы, и с помощью соответствующих маркеров с известной длиной можно идентифицировать молекулы ДНК соответствующего размера (рисунок 9).

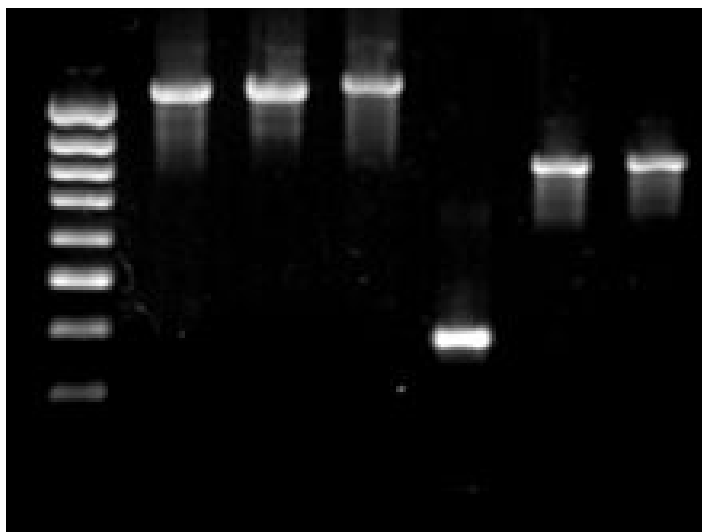


Рисунок 9 – Разделение ДНК в агарозном геле: левая дорожка – маркеры с известной длиной ДНК

Для визуализации результатов электрофореза применяют флуоресцирующие красители, которые взаимодействуют с ДНК. В качестве такого красителя применяют *бромистый этидий*, который флуоресцирует в ультрафиолетовых лучах (рисунок 10).

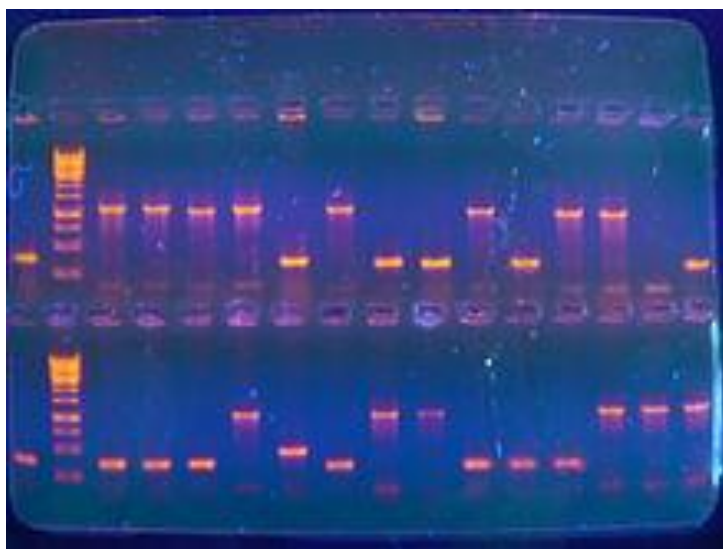


Рисунок 10 – Электрофоретическое разделение ДНК с бромистым этидием

Идентификацию последовательностей нуклеотидов осуществляют путем **гибридизации ДНК**, основанной на образовании водородных связей между комплементарными основаниями одноцепочечных молекул. Для этих целей синтезируют **ДНК-зонд**, который будет комплементарен искомой нуклеотидной последовательности.

ДНК-зонд представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК со встроенной флуоресцирующей меткой или радиоизотопом для визуализации идентифицируемой последовательности. Этот метод получил название **Саузерн-блоттинга** или **перенос по Саузерну**, названного по фамилии английского биолога **Эдвина Саузерна** (рисунок 11).

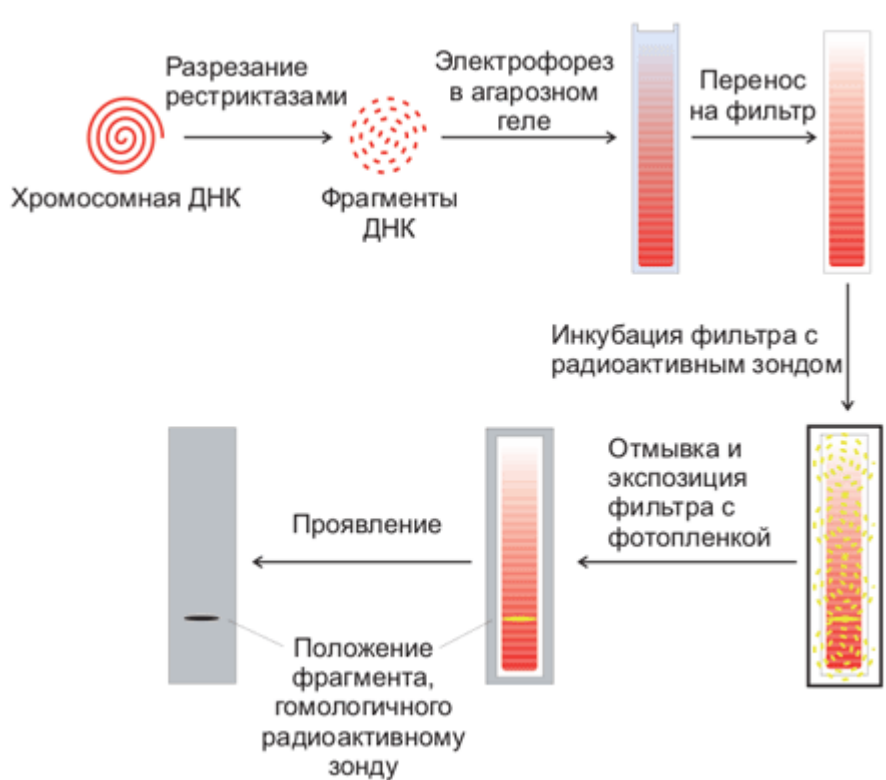


Рисунок 11 – Идентификация ДНК методом Саузерн-блоттинга

Сущность метода заключается в следующем.

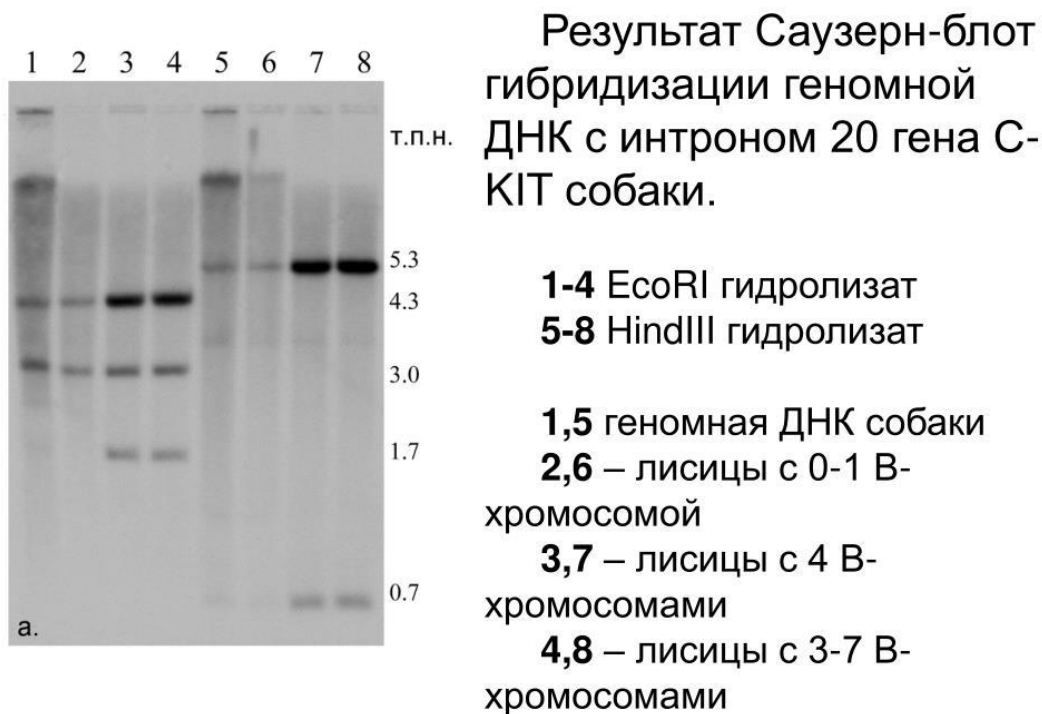
После разделения фрагментов ДНК методом электрофореза на агарозный гель кладут пластины нитроцеллюлозы или нейлона. Необходимо добиться плотного контакта между нитроцеллюлозой и гелем.

Под действием капиллярных сил осуществляется перенос фрагментов ДНК из геля на мембрану с нитроцеллюлозой. В результате ионообменных взаимодействий ДНК связывается с положительно заряженными молекулами нитроцеллюлозы.

Для более прочного закрепления ДНК на мембране с нитроцеллюлозой проводят ее нагревание при температуре 80°C в течение двух часов, в случае с нейлоновыми мембранами проводят ультрафиолетовую обработку. После этого нитроцеллюлозу снимают с геля и обрабатывают радиоактивным зондом, обладающим специфичностью к необходимой нуклеотидной последовательности.

Гибридизацию проводят в течение 24 часов при температуре 65°C. По окончании гибридизации мембрану тщательно отмывают от остатков зонда и несвязанных фрагментов ДНК.

Визуализацию осуществляют в зависимости от используемого зонда. Либо путем радиоавтографии при использовании радиоактивного ДНК-зонда, либо проводят оценку окраски мембраны в соответствии с цветом красителя (рисунок 12).



10

Рисунок 12 – Визуализация результатов Саузерн-блоттинга

Выделенные из ДНК гены содержат информацию о необходимом белке. Для реализации этой информации в новом организме необходимо встроить изолированный участок в состав вектора и получить *рекомбинантную ДНК* для ее переноса в клетку-реципиент.

2.3 Конструирование рекомбинантных ДНК

Одним из самых распространённых методов конструирования ДНК является *рестриктазно-лигазный метод*. Специфические эндонуклеазы класса II разрезают цепи ДНК в молекуле, из которой необходимо выделить соответствующий фрагмент, и в молекуле, куда этот фрагмент будет встраиваться на симметричные участки, образуя ступеньки («липкие концы»). Образовавшиеся фрагменты ДНК являются комплементарными друг другу и способны к ассоциации между соответствующими парами азотистых оснований. Для прочного сшивания молекулы в местах фосфодиэфирных связей используются фермент ДНК-лигаза (рисунок 13).

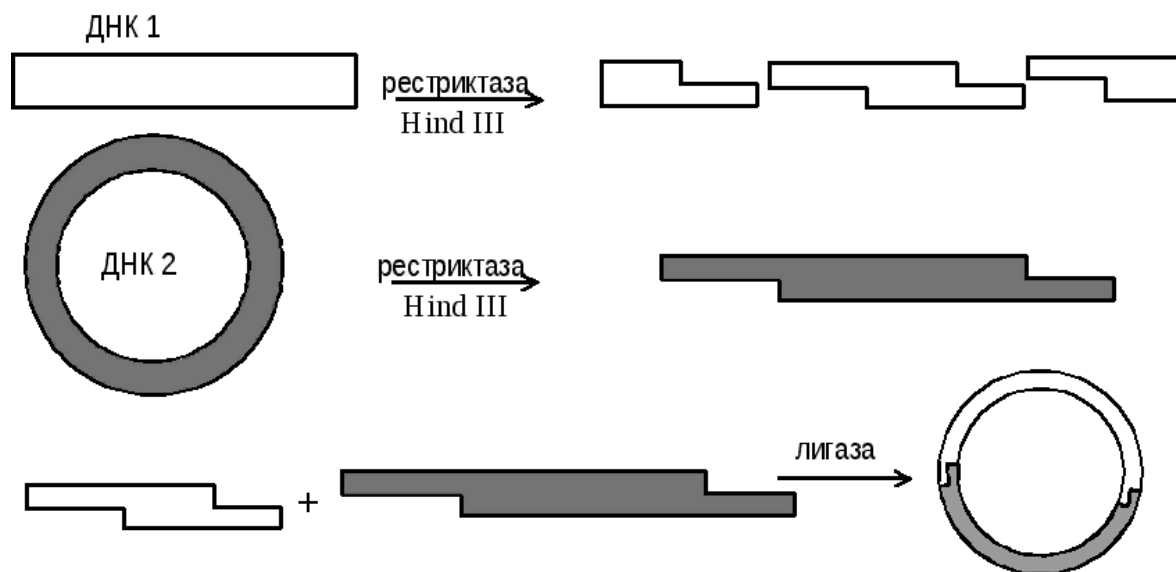


Рисунок 13 – Сшивка ДНК по «липким концам»

В том случае, когда требуемые фрагменты ДНК находятся на значительном расстоянии от сайта узнавания, для эндонуклеаз используют *линкерные молекулы*, которые представляют собой искусственно синтезированные фрагменты молекулы ДНК, содержащие соответствующие нуклеотиды для узнавания рестриктазами.

Модифицированный рестриктазно-лигазный метод с использованием линкерных молекул заключается в следующем:

- к тупым или липким фрагментам ДНК пришиваются короткие синтетические участки, содержащие необходимые для распознавания рестриктазами места;

- после присоединения линкерной молекулы цепь ДНК обрабатывается той рестриктазой, которая чувствительна к присоединенным олигонуклеотидам и образуются «липкие концы»;

- в дальнейшем происходит смешивание фрагментов двух молекул ДНК, и липкие концы комплементарно связываются, образуя рекомбинантную ДНК (рисунок 14).

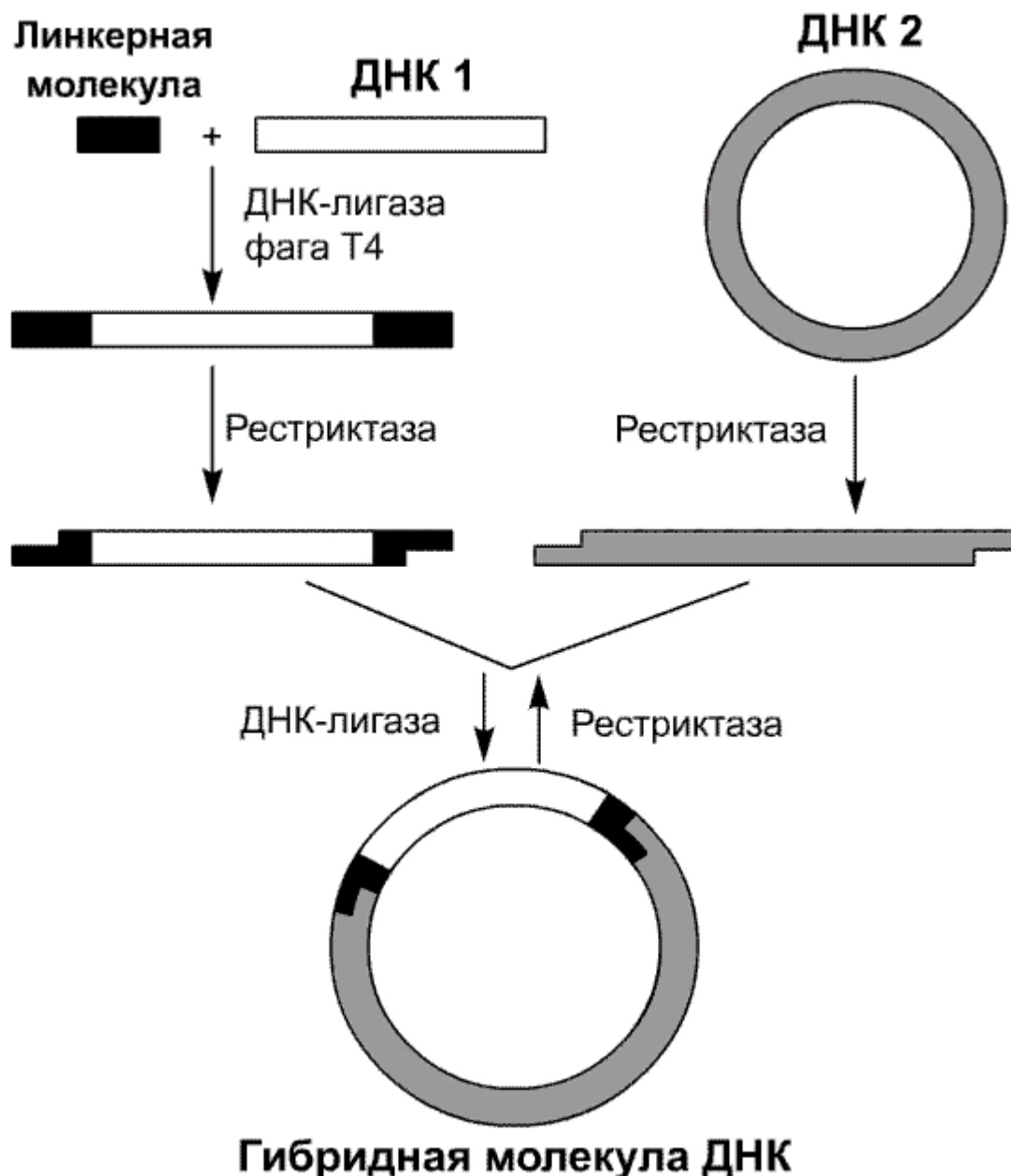


Рисунок 14 – Применение линкерных молекул для получения рекомбинантной ДНК

2.4 Векторы генетической инженерии

Векторы – это молекулы ДНК, способные к самостоятельной репликации, предназначенные для переноса чужеродной ДНК в клетку реципиента. Векторы применяют для создания рекомбинантных ДНК *in vitro* для последующего переноса их в клетки и клонирования новых генов.

Основные требования, предъявляемые к векторам:

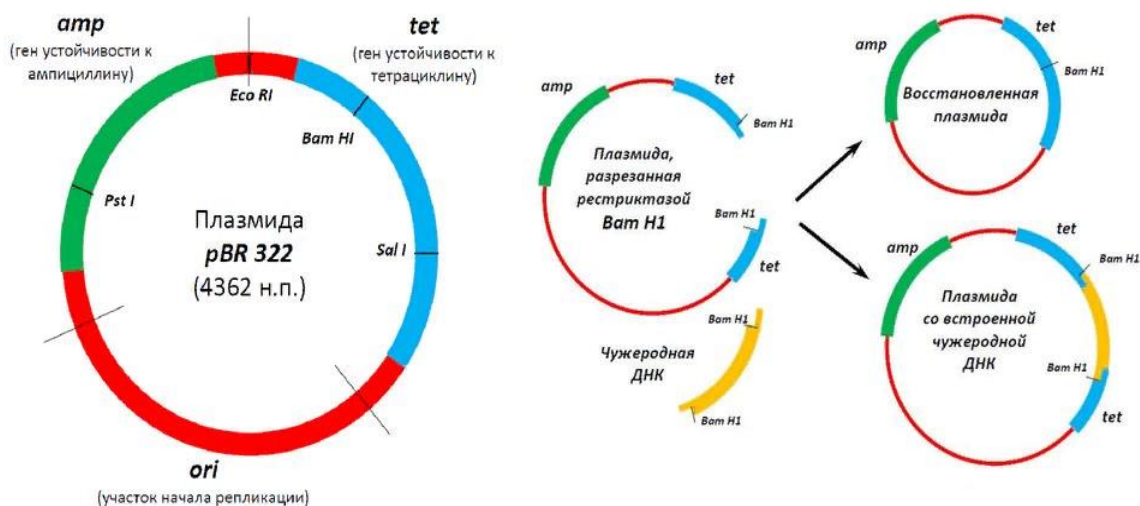
- быть репликоном;
- содержать селективный маркер (наиболее часто таким маркером является устойчивость к антибиотикам);
- иметь минимальное количество сайтов узнавания для ферментов рестрикции.

Основные типы векторов, используемых в генетической инженерии

Плазмиды. В бактериальных клетках содержится большое количество небольших по размеру органелл, представляющих собой кольцевые молекулы ДНК длиной несколько тысяч пар оснований, которые называются *плазмидами* (рисунок 15). В плазмидах содержатся гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, гены, контролирующие метаболизм некоторых органических соединений. Плазмиды обладают многокопийностью.

Генная инженерия

Вектор (плазмида). Общие сведения



9

Рисунок 15 – Вектор на основе плазмиды

Фазмиды (от греч. φάγος — пожирающий и англ. plasmid, от греч. πλάσμα — нечто образованное, сформированное) — векторы, представляющие собой искусственные гибриды между фагом и плазмидой. Образованные фазмиды в зависимости от условий могут развиваться либо как фаги, либо как плазмиды (рисунок 16).



Рисунок 16 – Строение фазмиды

Фазмида представляют собой *плазмиду*, которая содержит *точку начала репликации* f1 из фага f1. Она может быть использована для *клонирования* вектора в комбинации с *нитевидным бактериофагом M13*.

Фазмида может реплицироваться как плазида, а также может быть упакована в виде одноцепочечной ДНК в вирусные частицы. Фазмиды содержат начало репликации (Ori) для двухцепочечной репликации, а также f1 Ori для включения одноцепочечной репликации и упаковки в фаговые частицы. Многие часто используемые плазмиды содержат f1 Ori и, таким образом являются фазмидами. Подобно плазмидам, их используют для клонирования фрагментов ДНК при помощи таких методов, как трансформация и электропорация.

Инфекция бактериальной клетки-хозяина, содержащей фазмиду осуществляется фагом-помощником, например VCSM13 или M13K07, который обеспечивает синтез необходимых вирусных компонентов для того, чтобы одноцепочечная ДНК (оцДНК) реплицировалась и упаковывалась в фаговые частицы.

Фаг-помощник инфицирует бактерию, сначала прикрепляясь к её пилиам, а затем, после присоединения, транспортирует свой геном в цитоплазму клетки-хозяина. Внутри клетки геном фага инициирует выработку фазмидной одноцепочечной ДНК в цитоплазме. Эта фазмидная ДНК затем упаковывается в фаговые частицы.

Фаговые частицы, содержащие оцДНК, высвобождаются из бактериальной клетки во внеклеточную среду. Нитевидные фаги тормозят рост бактерий, но, в отличие от фага λ и фага T7, обычно не вызывают лизис. Фаги-помощники, как правило, разработаны таким образом, что упаковка ДНК в них идёт менее эффективно (за счёт дефектного сайта начала репликации), чем упаковка фазмид, так, чтобы полученные фаговые частицы содержали преимущественно фазмидную ДНК. Инфекция нитевидного фага F1 требует наличие пилей, таким образом, для получения фаговых частиц могут быть использованы только бактериальные хозяева, содержащие F-плазмиду или её производные.

Для клеток высших эукариот эффективные векторы созданы на основе хромосомной ДНК ретровирусов, вирусов SV40, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вируса осповакцины, вируса герпеса и др. Ретровирусные векторы используются особенно часто для переноса генов в клетки животных (рисунок 17).

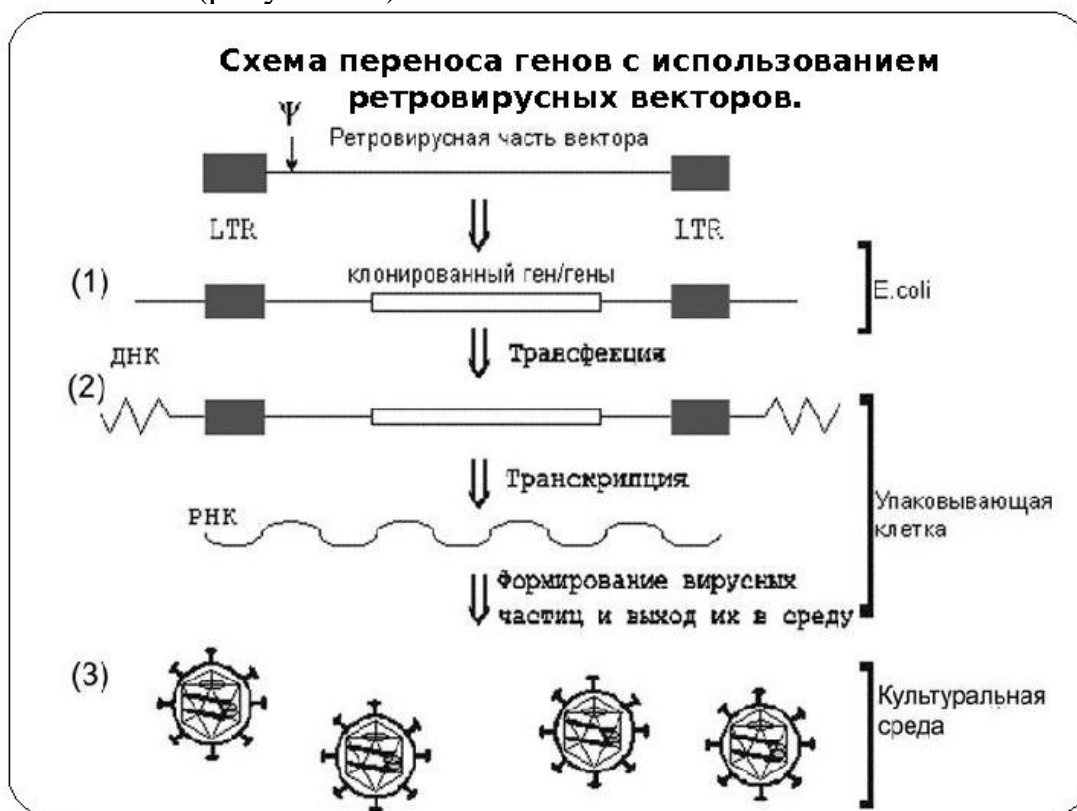


Рисунок 17 – Использование ретровирусных векторов для переноса генетической информации

Необходимо отметить, что при использовании вирусов в качестве векторов для животных клеток никогда не сохраняется нативный вирус – используются лишь некоторые регуляторные последовательности вируса для конструирования вектора.

2.5 Введение векторов в бактериальные клетки

Трансформация – поглощение рекомбинантной ДНК бактериальной клеткой, бактерии при этом приобретают новый признак, а при размножении получают многочисленное потомство - клоны (рисунок 18).

Для того, чтобы рекомбинантная ДНК смогла проникнуть в клетку, она должна стать проницаемой. Этого можно достигнуть в результате *электропорации*, в результате воздействия напряжения или под действием химических веществ, разрушающих клеточную мембрану, таких как хлорид кальция и других солей двухвалентных металлов.

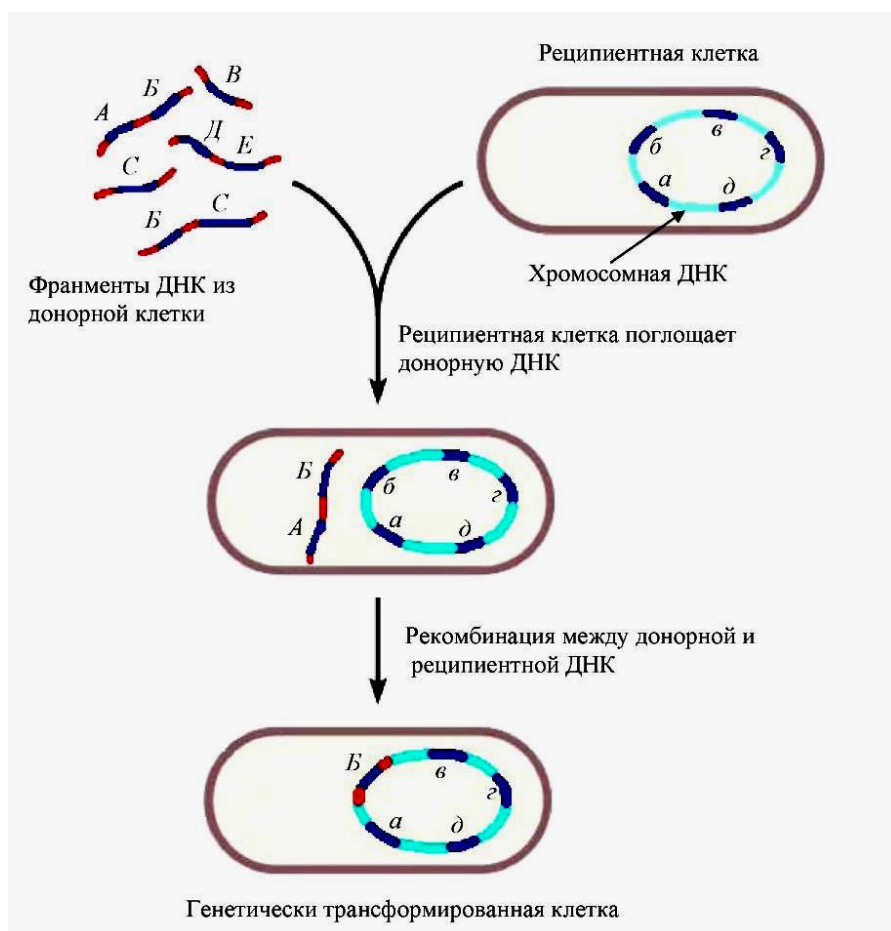


Рисунок 18 – Перенос генетической информации в процессе трансформации

2.6 Отбор трансформированных клеток

Результаты генетического эксперимента оцениваются количественно. Для этого определяют *частоту и эффективность трансформации*.

Частота трансформации – количество клеток в популяции, содержащих чужеродную ДНК к общему количеству клеток.

Эффективность трансформации - количество трансформированных клеток в пересчете на 1 мкг ДНК, используемой для трансформации.

Для идентификации трансформированных клеток подбирают селективные питательные среды, в зависимости от того какой маркер использован в векторе.

При клонировании рекомбинантных ДНК при помощи плазмидного вектора pBR322 для скрининга мутантов бактериальные культуры после трансформации пересевают на питательную среду, содержащую антибиотик тетрациклин (способность к синтезу антибиотика ампициллина была утрачена вследствие действия соответствующей рестриктазы на векторную молекулу) (рисунок 19).

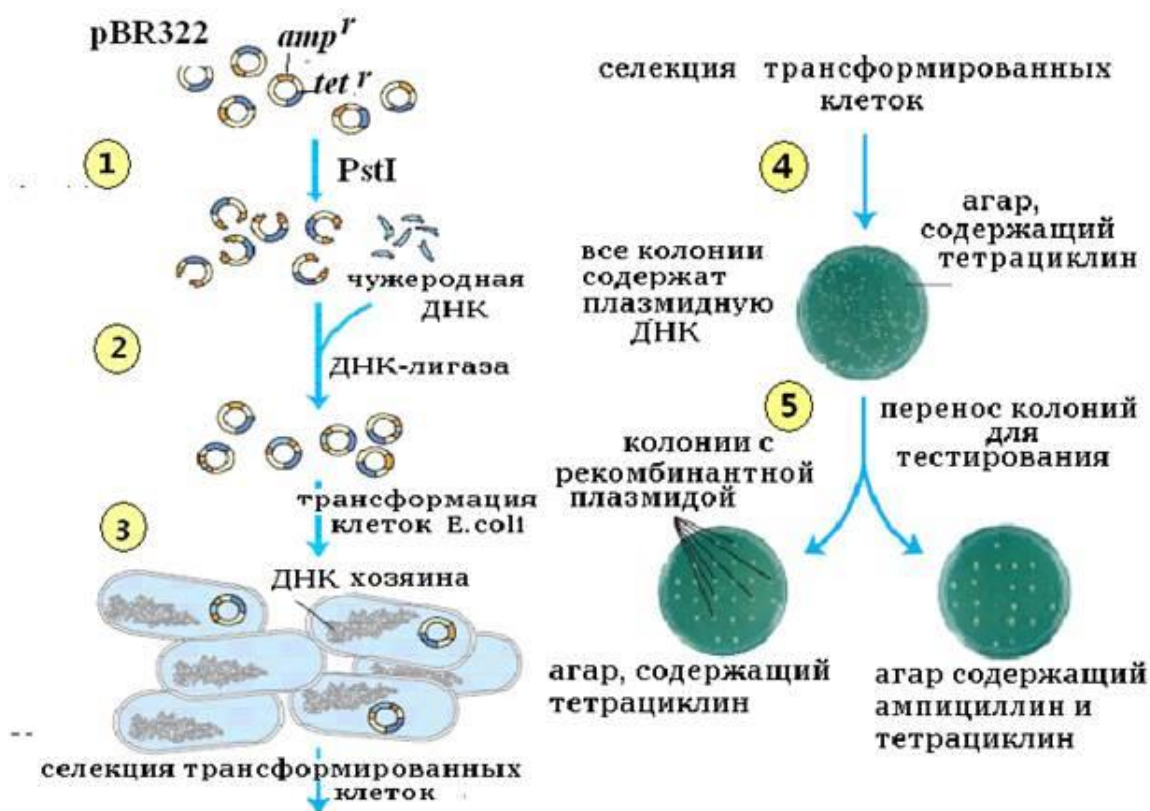


Рисунок 19 – Трансформация и идентификация *E. coli* с использованием вектора pBR322

На данном этапе на среде вырастут все клетки, в которых есть рекомбинантная ДНК, и ДНК вектора, в которую фрагмент донорской ДНК не вошел.

На следующем этапе выросшие на питательной колонии пересевают на питательную среду с тетрациклином и на среду с ампициллином. Клетки, содержащие рекомбинантную ДНК, будут расти только на среде с тетрациклином, так как в результате генетической трансформации устойчивость к ампициллину у них была утрачена. Соответственно, клетки, где рекомбинантная ДНК отсутствует, а содержится ДНК вектора, растут на обоих вариантах сред.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте основные стадии проведения генноинженерного исследования.
2. Какие ферменты используются для генетических манипуляций, их назначение, строение и функции?
3. Каким образом осуществляется перенос рекомбинантных ДНК в клетку-реципиента и как осуществляется скрининг клеток с новыми свойствами?

Список литературных источников для самостоятельного изучения

1. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. Том1: Генная и белковая инженерия. - М.: Наука, 2004. - 530 с.
2. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2010. — 496 с.