

Генная инженерия

Лекция1. Плазмиды и ферменты как основа клонирования (бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. ШАРИПОВА

ЛИТЕРАТУРА

- **Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / М.: Мир, 2002. - 590 с.**
- Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / Новосибирск: Сибирское университетское издание, 2004. - 496 с.
- Жимулев И.А. Общая и молекулярная генетика / Новосибирск: Сибирское университетское издание, 2004. - 480 с.
- Й.Ленглер, Г.Древс, Г.Шлегель / Современная микробиология. Прокариоты. (В двух томах) // М.: Мир, 2009. -653 с.(1 том), 493 с.(2 том)
- **М.Р.Шарипова. Курс лекций по генетической инженерии. Учебное пособие/ Казань, 2015, 114 с.**

Генная инженерия

**это конструирование *in vitro*
функционально-активных генетических
структур - рекомбинантных ДНК, или
создание искусственных генетических
программ**

Цель генной инженерии:

**выяснение механизмов
функционирования генетического
аппарата**

Задачи:

- **1) Создание генно-инженерных штаммов бактерий для получения лекарственных средств, диагностикумов, вакцин**
- **2) Создание трансгенных растений, высокоурожайных, устойчивых к экстремальным воздействиям, инфекциям и насекомым**
- **3) Создание трансгенных животных для практических целей**
- **4) Разработка методов генной терапии человека**

Молекулярная Биология

Микробиология

Энзимология н.к.

Биохимия

Молекулярная генетика

Клеточная биология

Генетическая инженерия

Растения

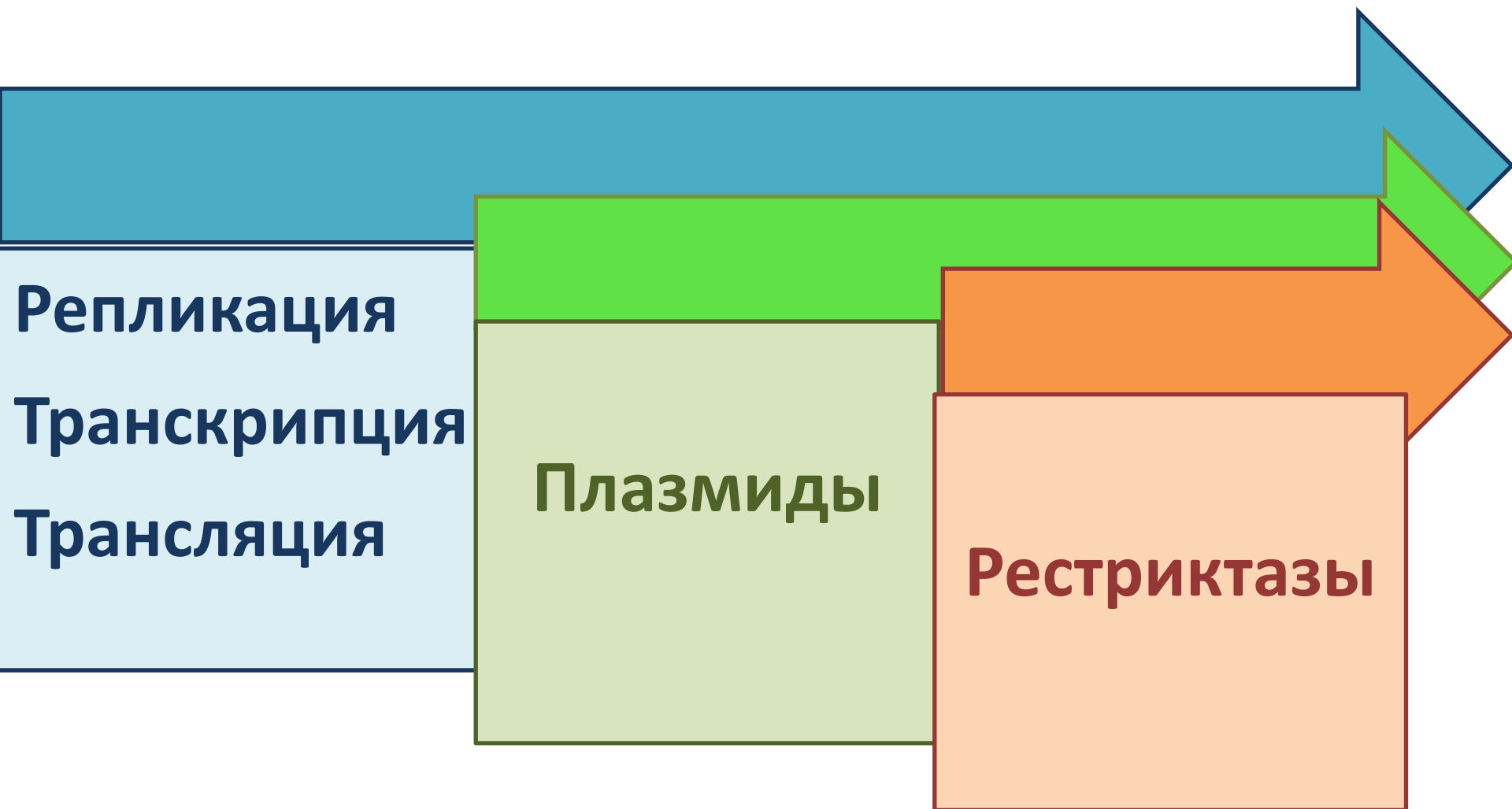
Лекарства

Вакцины

Диагностикумы

Животные

Теоретические предпосылки для генной инженерии



История клонирования

- **1972** – в лаборатории Пола Берга получена первая рекомбинантная ДНК (SV40/ λ)
- **1973** – в лаборатории Стенли Коэна получена первая рекомбинантная плаزمида (гибридная плазмида)
- **1977** – разработаны методы секвенирования ДНК и РНК
- **1980** – получены первые трансгенные мыши (Гордон, США)
- **1983** – применение плазмид для трансформации растений
- **1988** – создан метод ПЦР
- **1990** – стартовал проект «Геном человека», эксперименты по генной терапии



Paul Berg, Ph. D.

Пол Берг
американский
биохимик,
почётный
профессор
Стэнфордского
университета,
лауреат
Нобелевской
премии по химии

Чем генная инженерия принципиально отличается от классической селекции?

Генная инженерия

Приемы генной инженерии позволяют проводить рекомбинацию ДНК *in vitro* и только затем вводить целевую конструкцию в клетку, где происходит **экспрессия гена**

Селекция

- 1) нельзя скрещивать неродственные виды
- 2) нельзя извне управлять процессом рекомбинации в организме
- 3) нельзя предугадать, какое получится потомство

- Технология рекомбинантной ДНК позволила впервые в практике научных исследований выделить из организма индивидуальный ген
- Это стало точкой отсчета для развития науки **генной инженерии**
- **Ген – это минимальная единица наследственности, участок ДНК, который кодирует функционально активный белок или функционально активную молекулу РНК**

Изоляция гена

```
graph TD; A[Изоляция гена] --> B[Полная последовательность нуклеотидов]; B --> C[Внутреннее устройство гена]; C --> D[Сравнение по базам]; D --> E[Структура белка]; E --> F[Заключение о функции гена]; F --> G[Молекулярное клонирование]; G --> H[Модификация гена];
```

Полная последовательность нуклеотидов

Внутреннее устройство гена

Сравнение по базам

Структура белка

Заключение о функции гена

Молекулярное клонирование

Модификация гена

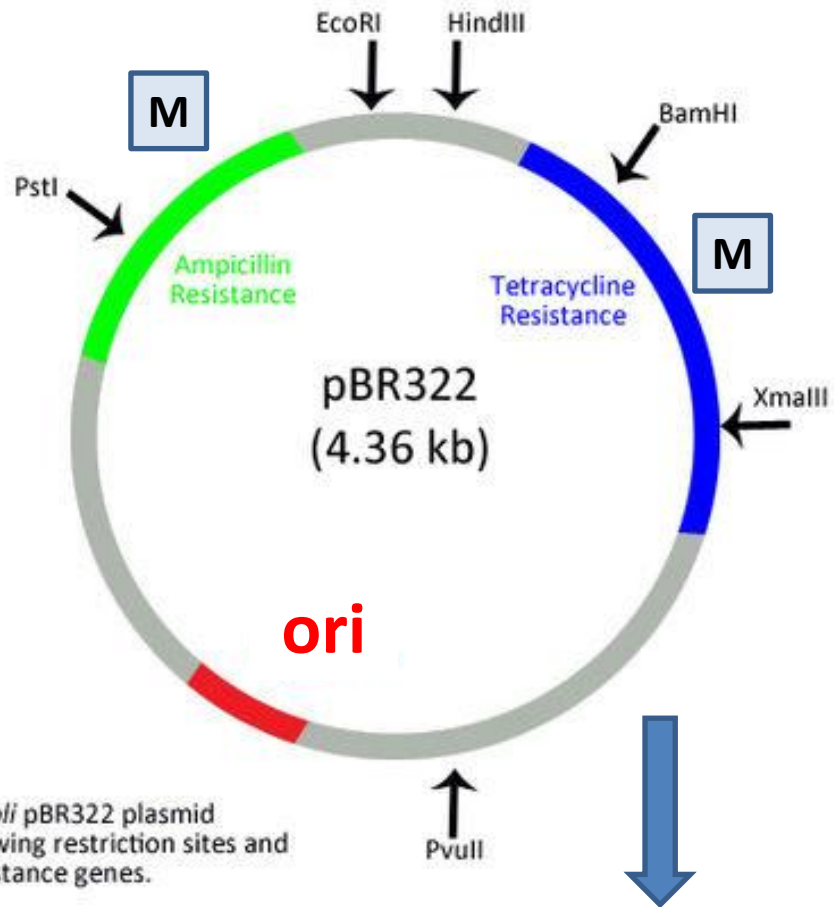
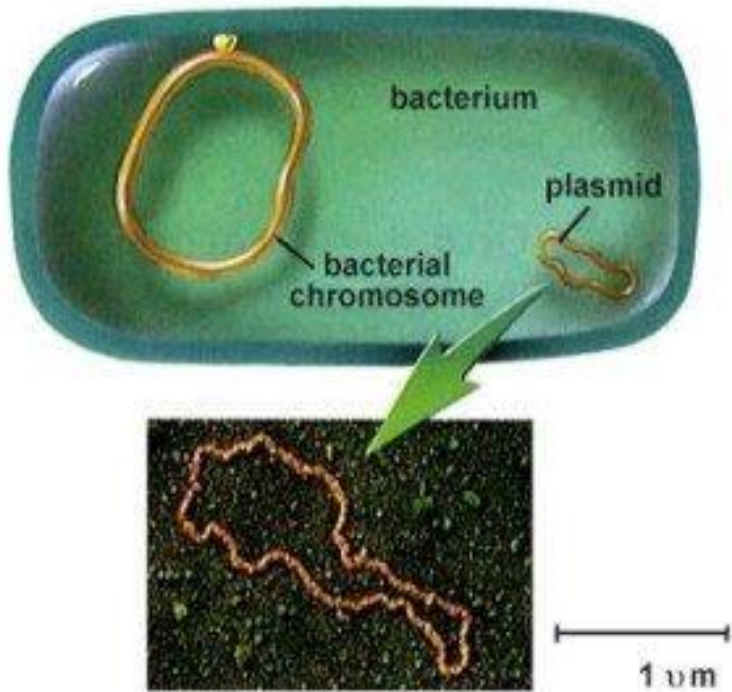
Плазмиды

- **Плазмиды** – это внехромосомные автономно реплицирующиеся молекулы ДНК, которые не способны самостоятельно существовать вне клетки
- При наименовании штамма плазмиду указывают в скобках:

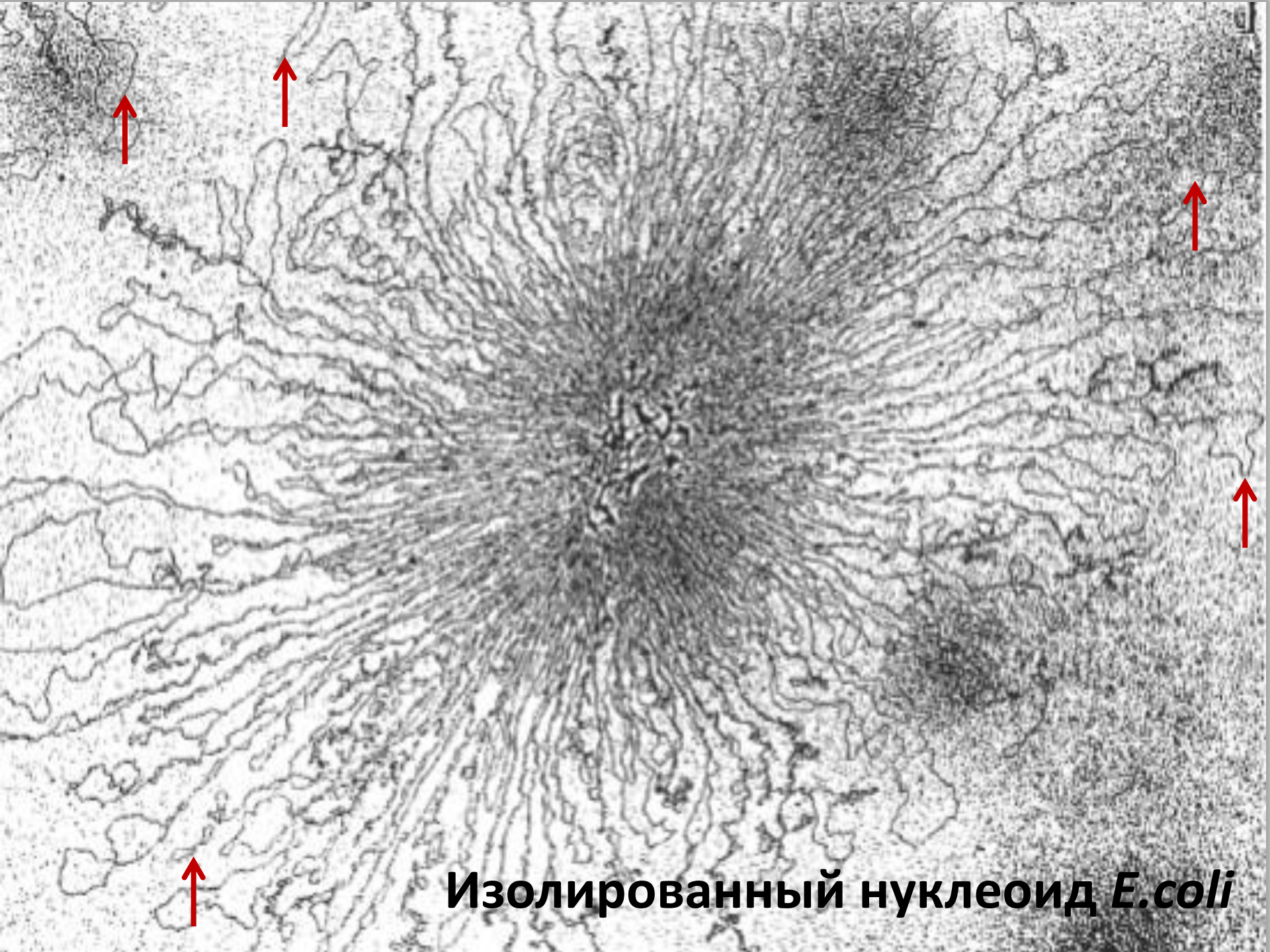
***E. coli* HB101(pBR322)**

***B. licheniformis* 31 (pMB 105)**

***E. coli* HB(Col E1)**



- 1) ori-сайт
- 2) M – маркер
- 3) Уникальные сайты рестрикции



Изолированный нуклеоид *E.coli*

Происхождение плазмид

Две основные концепции о происхождении плазмид:

- 1) Плазмиды – это делетированные бактериофаги, которые утратили гены литических ферментов и гены белков-капсидов
- 2) Плазмиды – это результат транспозиции геномной ДНК, которые произошли в результате выщепления фрагмента геномной ДНК в процессе транспозиции
- Если плаزمида несет ген устойчивости, тогда клетки-носители будут иметь селективное преимущество при выживании

Характеристика плазмидной ДНК

1. **Плазида** – это кольцевая ковалентно-замкнутая двуцепочечная молекула ДНК размером 20 кб
2. **Размер плазмид**: мелкие, средние и крупные в диапазоне 1 – 100 - 200 кб
3. **Копийность**: высококопийные (до 100 и более копий) и низкокопийные (1 -2 мегаплазмиды)
4. **Типы плазмид**: в клетке могут находиться до 10 типов плазмид из разных групп
5. **Специфичность**: плазмиды с узким (присутствуют в клетках одного вида бактерий) и широким (в клетках разных видов бактерий) спектром хозяев
6. **Способ передачи**: трансмиссивные плазмиды (конъюгативные) / нетрансмиссивные (неконъюгативные)

Методы выделения плазмид

В основе методов выделения плазмидной ДНК – различие в ее размерах от хромосомной ДНК:

- 1) Плазмидная ДНК гораздо меньше хромосомной ДНК
- 2) Щелочной гидролиз ДНК приводит к тому, что огромные линейные фрагменты геномной ДНК после денатурации не способны ренатурировать, а небольшие цепочки кольцевых ДНК эффективно ренатурируют при нейтральных рН
- 3) Способы выделения плазмидной ДНК: осаждение, центрифугирование и электрофорез

Выделение плазмидной ДНК

Метод щелочного лизиса

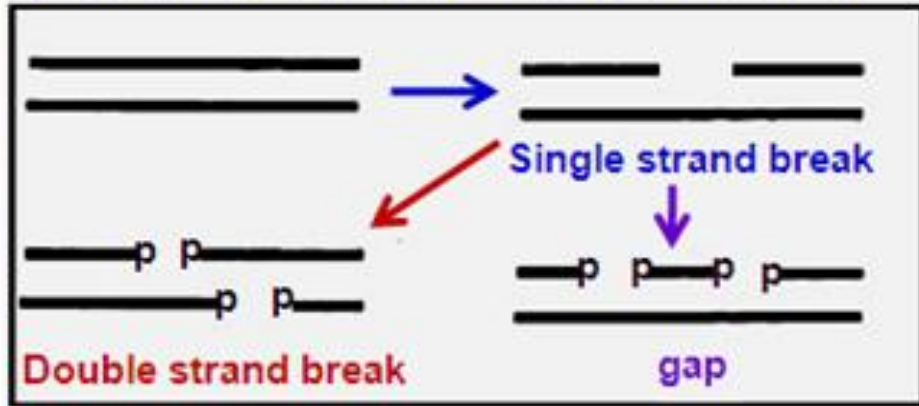
- Лизоцим → разрушение клеточной стенки
- SDS → разрушение мембраны
- pH 12 → денатурация хромосомной ДНК
- pH 5 → ренатурация плазмидной ДНК
- центрифугирование



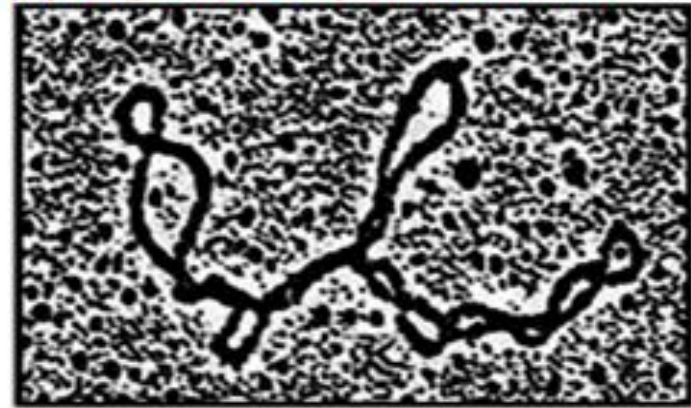
Осаждение спиртом

Различные формы плазмидной ДНК

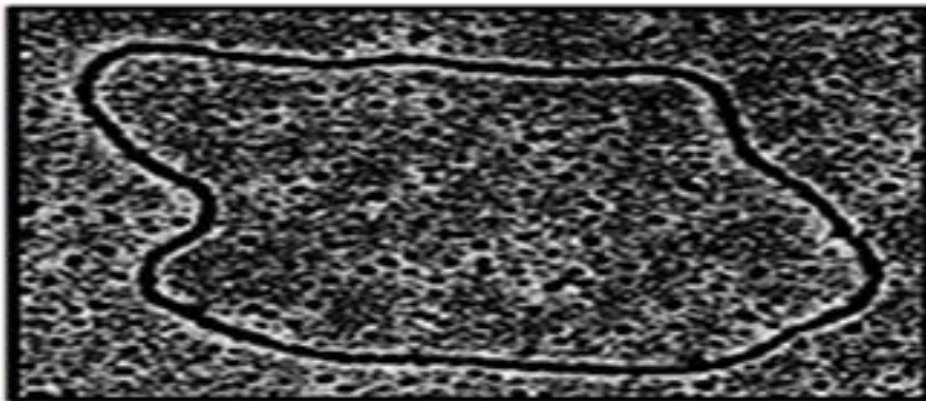
(a) Single- and double-strand cuts in DNA



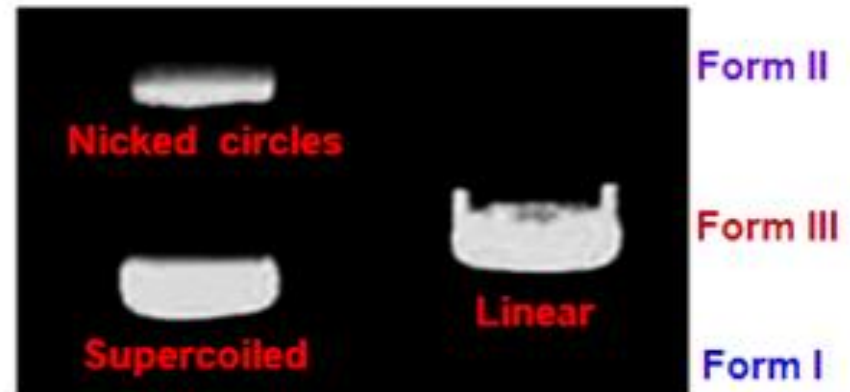
(b) Supercoiled plasmid DNA



(c) Relaxed plasmid DNA



(d) Gel electrophoresis pattern of various forms of plasmid DNA



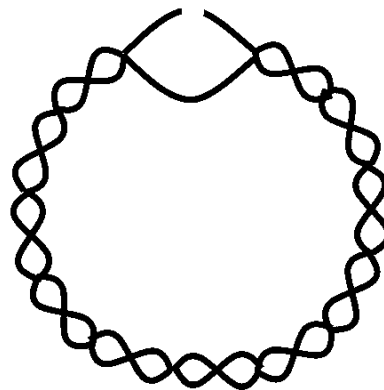
Относительная позиция различных форм плазмидной ДНК после проведения электрофореза в агарозном геле

Plasmid DNA:

Form II

Form III

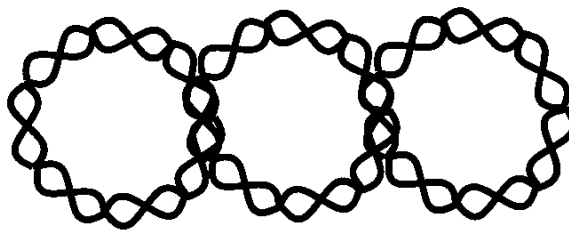
Form I



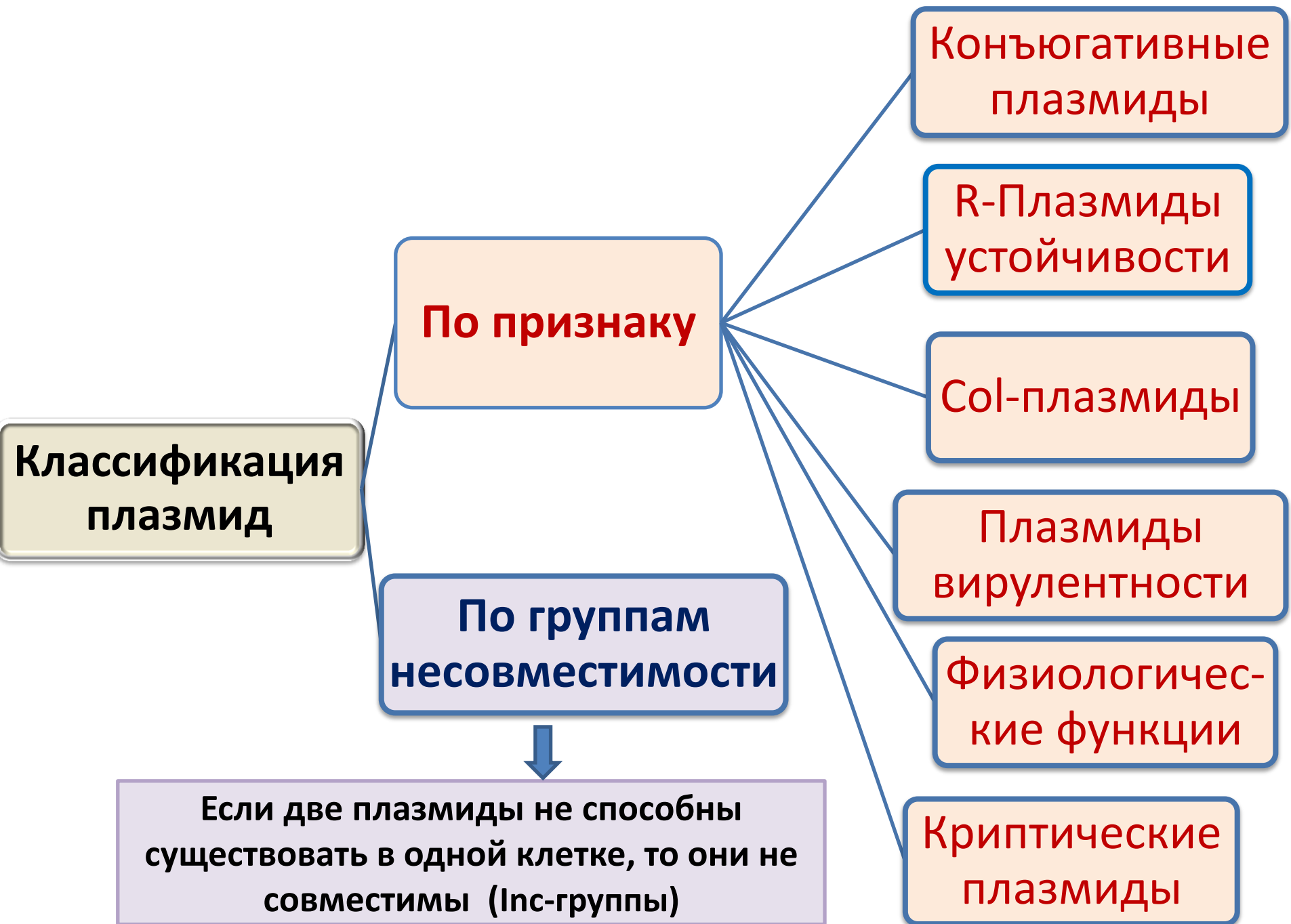
Nicked



Linear



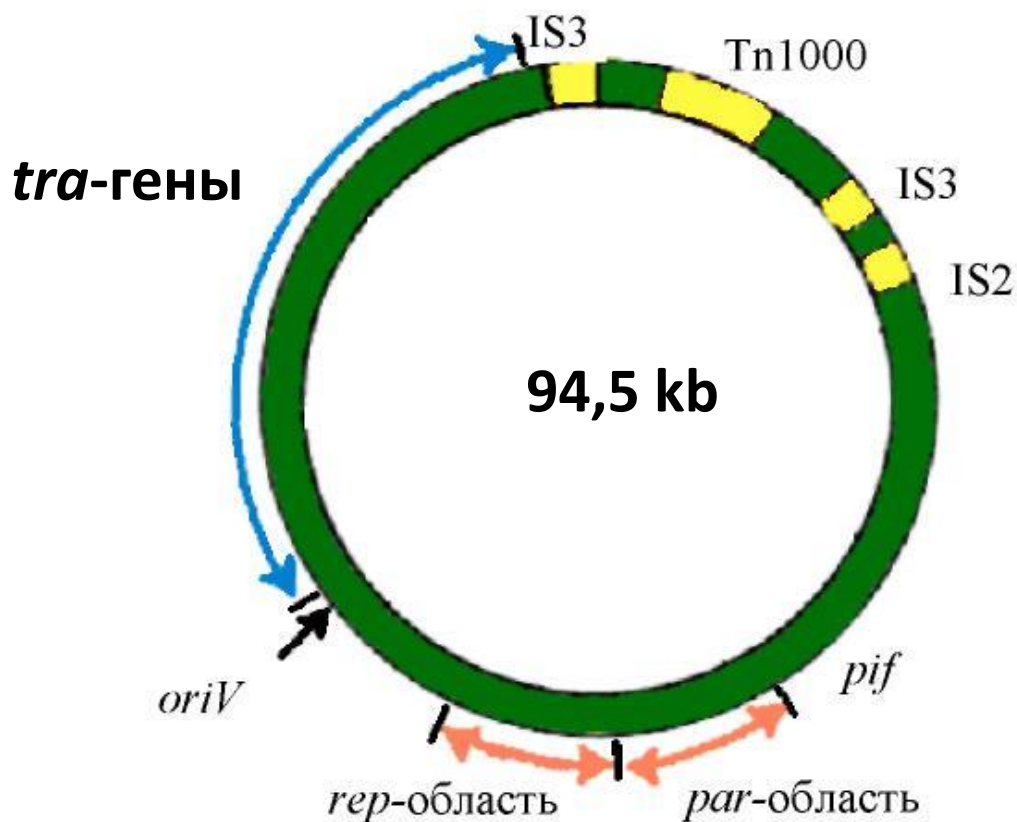
Supercoiled



Конъюгативные плазмиды

- **Конъюгация** – перенос ДНК от клеток-доноров к клеткам-реципиентам, по этому признаку плазмиды делят на трансмиссивные и нетрансмиссивные
- **F-плазида** (100 кб): за конъюгацию отвечают *transfer*-гены (*tra*-гены): 33 кб, 3 оперона, 24 гена
- **Состояние F-плазмиды:**
 - Интегрированное в хромосому – **Hfr** (высокая частота рекомбинаций)
 - Автономное – **F и F'**

F-плазмида



tra – гены
конъюгативного
переноса
ori – сайт
инициации
репликации

Конъюгативные плазмиды рассматривают как один из способов горизонтального переноса генов между далеко отстоящими друг от друга видами

R-плазмиды

В состав r-оперона входят:

- Гены ферментов, инактивирующих антибиотик
- Гены белков, которые снижают проницаемость клеточной стенки к антибиотику и он не проникает в клетку, гены белков для модификации мишени, на которую направлен антибиотик
- Гены устойчивости к другим антибактериальным агентам
- R- плазмиды изначально существовали в почвенных бактериях, определяя устойчивость к почвенным бактериям, продуцирующим антибиотики
- За счет горизонтального переноса R- плазмиды передавались патогенам против которых применяли антибиотикотерапию

R-плазмида

R-плазмиды могут находиться в двух формах:

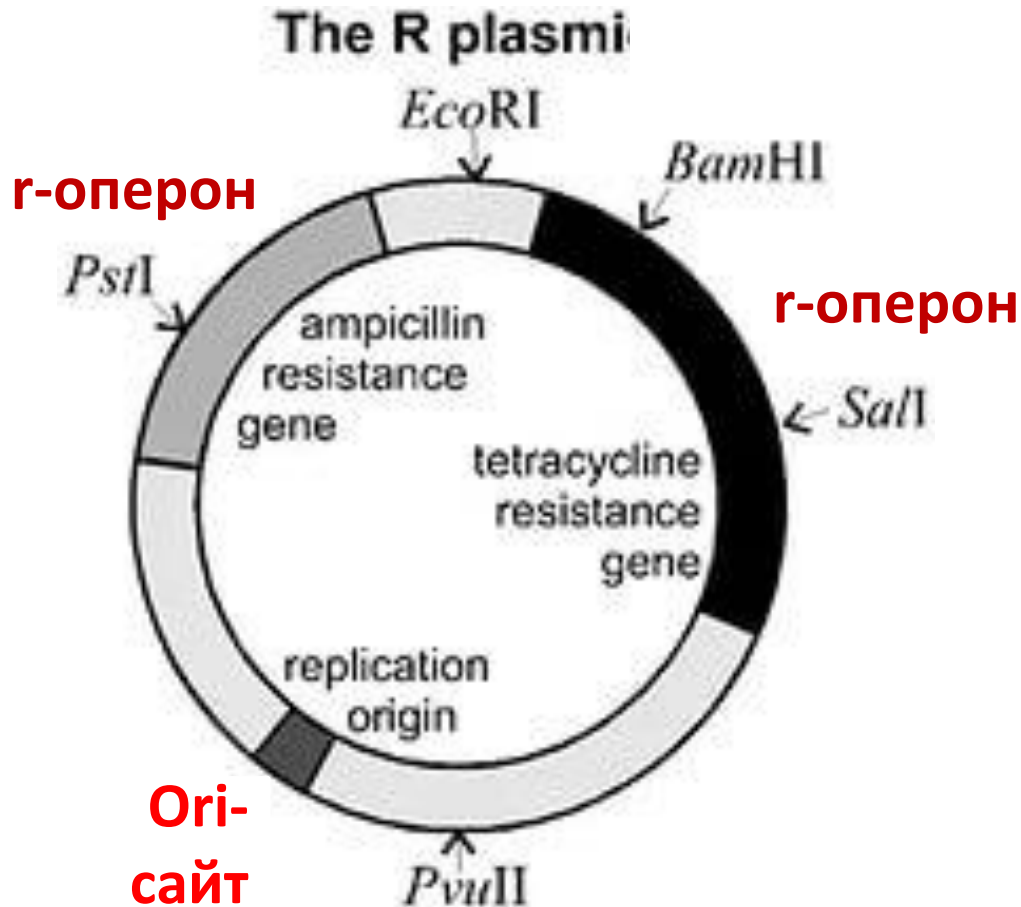
1) Конъюгативная, когда в состав R-плазмиды входят кроме генов устойчивости дополнительно гены *tra*-оперона

2) Неконъюгативная форма R-плазмиды включает только кассеты генов устойчивости

- У грамположительных бактерий R-плазмида чаще всего передается посредством трансдукции
- У грамотрицательных бактерий R-плазмида чаще всего передается посредством конъюгации

R-плазмида

Идентифицированы штаммы бактерий, обладающие резистентностью сразу к нескольким антибиотикам одновременно. Такие штаммы выявляются в больницах. Распространение множественной лекарственной устойчивости обусловлено широким применением антибиотиков на практике в здравоохранении и животноводстве



Плазмиды вирулентности

Вирулентность – способность вызывать патогенные изменения

Плазмиды патогенных энтеробактерий кодируют токсины:

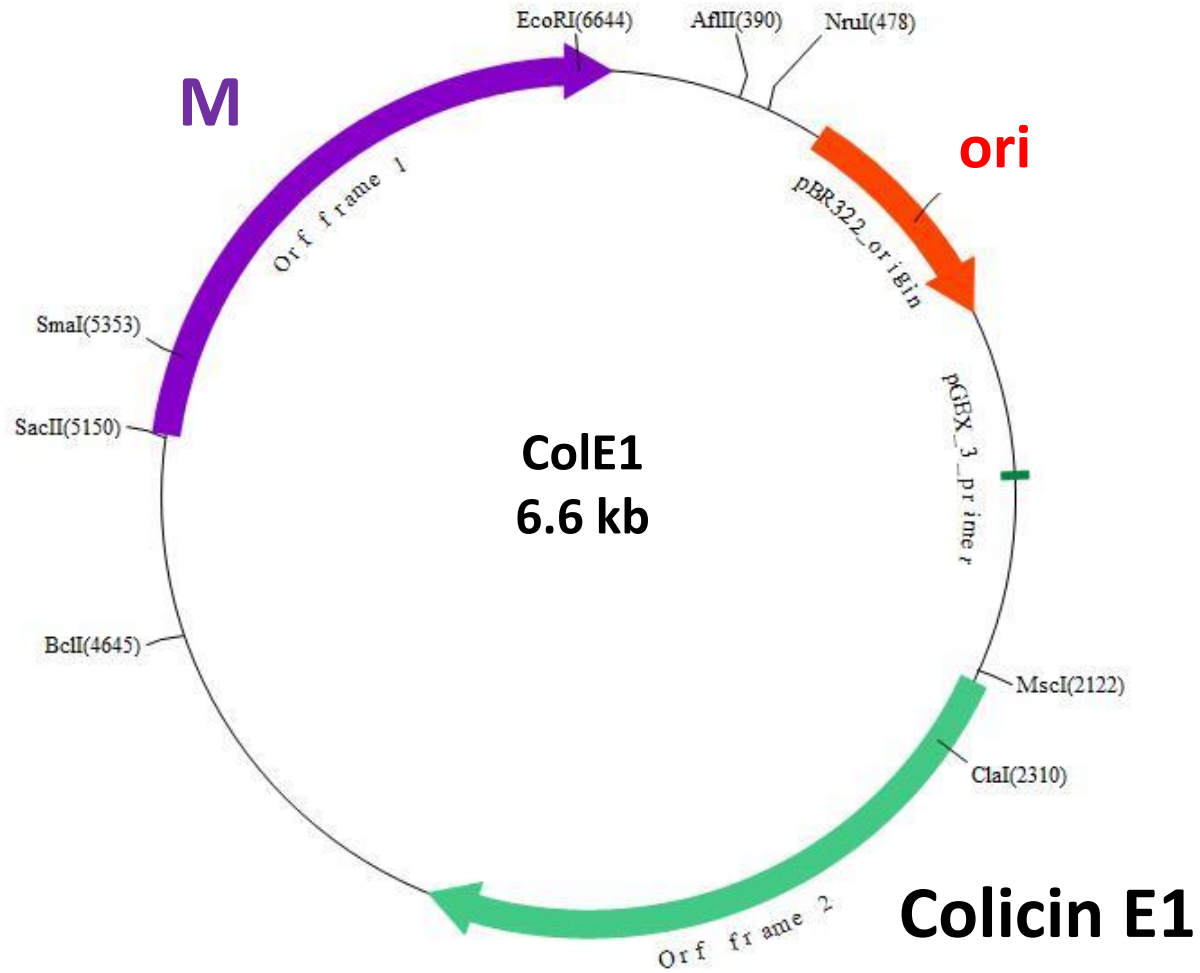
- Ген гемолизина – вызывает лизис эритроцитов
- Ген энтеротоксина – способствует выходу из организма воды и солей, приводя к обезвоживанию
- Внеклеточные белки и ферменты стафилококков – коагулаза, фибринолизин, гемолизин и др. вовлечены в вирулентность
- Желтый пигмент *S. aureus* вовлечен в стабилизацию состояния патогенности

Плазмиды, несущие гены бактериоцинов

Бактериоцины - это пептиды или низкомолекулярные белки, которые убивают близкородственные виды или штаммы того же вида:

- **Колицины** кодируют Col-плазмиды *E.coli*
- **Субтилины** продуцируют *B.subtilis*
- **Бактериоцины** формируют каналы в клеточной мембране, которые способствуют выходу ионов Ca и протонов и приводят к нарушению энергетического баланса
- **Колицин E2** – ДНКаза, разрушающая ДНК клетки
- **Колицин E3** – нуклеаза, расщепляющая 16S РНК

Col-плазмида



Свойста Col-плазмид

- Описаны более 20 различных типов колицинов, характеризующихся сложными механизмами синтеза и разными механизмами действия
- Одна бактериальная клетка может нести несколько разных Col - плазмид
- Среди Col - плазмид встречаются как конъюгативные (ColIb, ColV и др.), так и неконъюгативные (ColEI, ColE2 и др.) плазмиды
- Для секреции колицина ColV необходим специальный экспортер, включающий плазмидные белки CsaA, CsaB и TolC. Идентифицировали плазмидные гены, ответственные за выход колицинов из клетки в среду.

Плазмиды биодеградаци

- Обеспечивают микроорганизмам способность усваивать углеводороды, кодируют ферменты для расщепления этих соединений, включая ксенобиотики
- Плазмиды биодеградаци (D-плазмиды) распространены у грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas*)
- Одна плазида содержит гены ферментов одного катаболического пути
- Были попытки создать бактерии, способные к деградации нескольких соединений путем объединения плазмид из разных штаммов *Pseudomonas* в одном хозяине
- Кроме того, путем изменения генов одного пути расщепления пытаются расширить спектр чувствительных субстратов

Плазмиды бацилл

- Плазмиды бацилл открыты в 1973 г., первая успешная трансформация в 1976 г.
- Плазмиды бацилл не трансформируются в клетки *E. coli*
- Это низкокопийные плазмиды до 10 копий на клетку
- Сложно выделять и трудно трансформировать
- Большинство плазмид являются крипточескими
- У некоторых мелких крипточеских плазмид бацилл обнаружен ***sip-ген***, который может принимать участие в секреции белков (сигнальная пептидаза)
- Плазмидные ***rap-гены*** обеспечивают контроль экспрессии ряда генов и увеличивают способность адаптации клетки в меняющихся условиях

Ферменты – основа клонирования

- **Молекулярное клонирование** осуществляется с помощью арсенала ферментов, прежде всего это ферменты рестрикции
- **Рестриктазы** узнают и расщепляют специфические короткие последовательности в молекуле ДНК
- **Первая рестриктаза** выделена в начале 70-х из лизатов бактерий *Haemophilus influenzae*
- **Все рестриктазы подразделяют на 3 класса**. В основе классификации - различия в механизме действия и молекулярной структуре

Общую номенклатуру рестриктаз предложили Смит и Натанс в 1973 году

1) Название рестриктазы является бинарным производным родо-видового названия микроорганизма-хозяина:

E*scherichia* c*oli* = **Eco**

2) Далее следует обозначение штамма или серотипа:

H*aemophilus* i*nfluenzae* d = **Hind**

3) Если ген локализован на плазмиде или ДНК фага используют букву R или P:

Eco **R**1(плазмида R) и Eco **P**1 (фаг)

4) В клетках м.б. несколько систем рестрикции:

Hind I, Hind II, Hind III

Рестриктазы I класса

- **Рестриктазы I класса** узнают специфические последовательности ДНК, но расщепляют ДНК в произвольных точках через 400 пн от сайта узнавания. Гидролиз неспецифичен
- **Рестриктазы I класса** - это класс гетеродимеров, т.е. мультиферментный комплекс из трех субъединиц с молекулярной массой до 300 кДа
- **Рестриктазы I класса** обладают 3 активностями: рестриктазной, метилазной и АТФазной активностями

Рестриктазы II класса

- **Рестриктазы II класса** узнают и расщепляют короткие последовательности в структуре ДНК
- **Рестриктазы II класса** не обладают АТФ-азной активностью
- **Рестриктазы II класса** подразделяются на две группы белков – рестриктазы и метилазы
- **Рестриктазы** – это димерные белки, **метилазы** – мономеры
- **Рестриктазы II класса** играют ключевую роль в молекулярном клонировании, разработаны технологии их выделения, все являются коммерческими препаратами

Рестриктазы III класса

- **Рестриктазы III класса** узнают и расщепляют ДНК по строго заданным сайтам, но сайты узнавания и расщепления удалены друг от друга
- **Рестриктазы III класса** - это белки-гетеродимеры, они обладают рестриктазной, метилазной и АТФ-азной активностями
- **Рестриктазы I и III классов** не нашли широкого применения

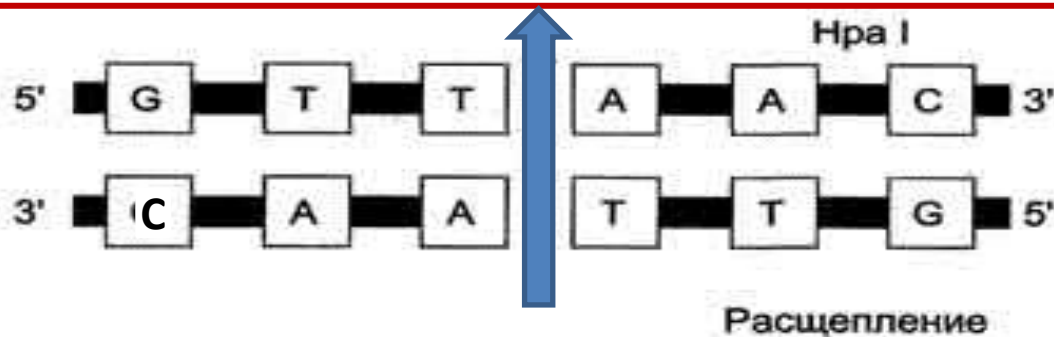
Характеристика рестриктаз II класса

- **Рестриктазы II класса** по молекулярной массе, рН оптимуму каталитической активности, стабильности значительно варьируют в зависимости от источника, расщепляют специфически обе цепи ДНК
- Для каждой **рестриктазы** при гидролизе образуется специфичный набор ДНК с идентичными липкими концами, что позволяет стыковать фрагменты ДНК из разных организмов
- Выделено более 4 тысяч эндонуклеаз рестрикции, более шестисот рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов

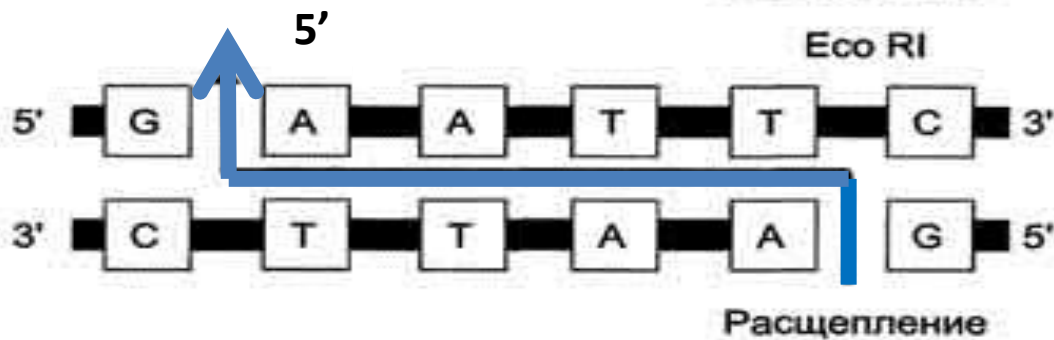
Сайты рестрикции

- Сайты рестрикции могут содержать 4, 5, 6 или 8 пар нуклеотидов
- В зависимости от длины можно рассчитать частоту встречаемости сайта рестрикции в геноме
- Чем длиннее сайт, тем меньше вероятность его встречаемости в ДНК
- Сайт для рестриктазы Not1 содержит 8 п. н.

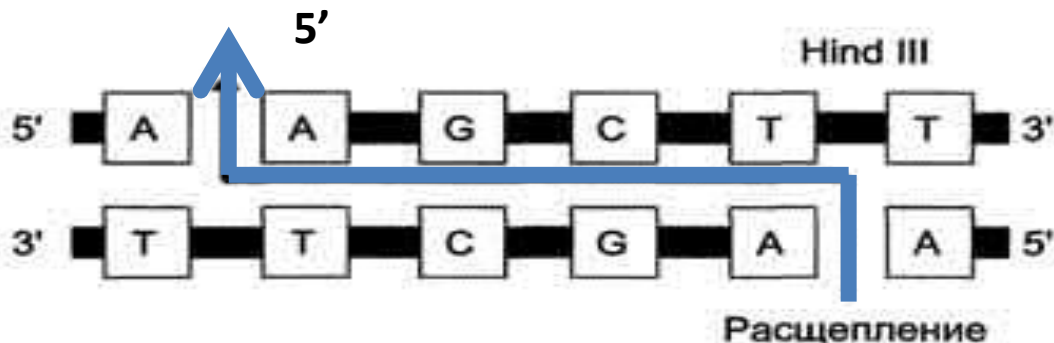
Сайты расщепления рестриктаз II класса одинаково читаются в направлении 5' → 3'



1



2



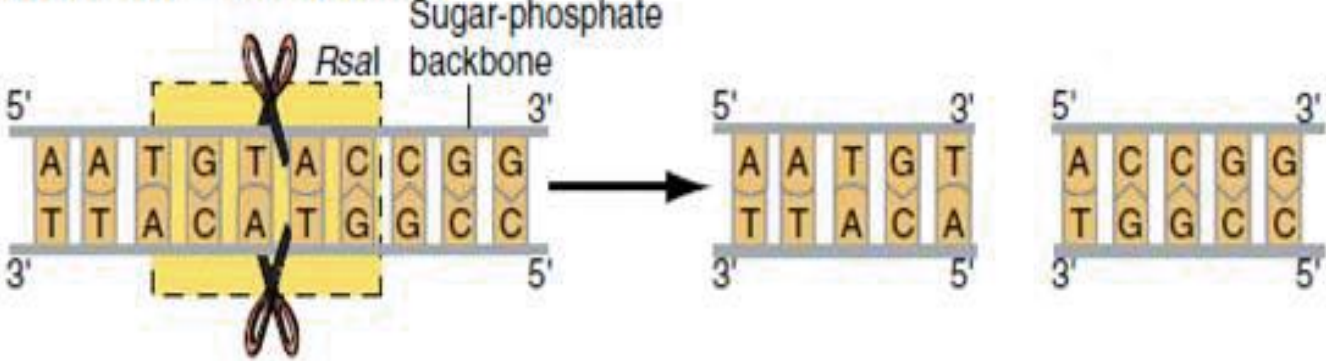
2

1. Расщепление сайта рестрикции идет по оси симметрии и образуются тупые концы

2. Расщепление идет не по оси симметрии и образуются липкие концы

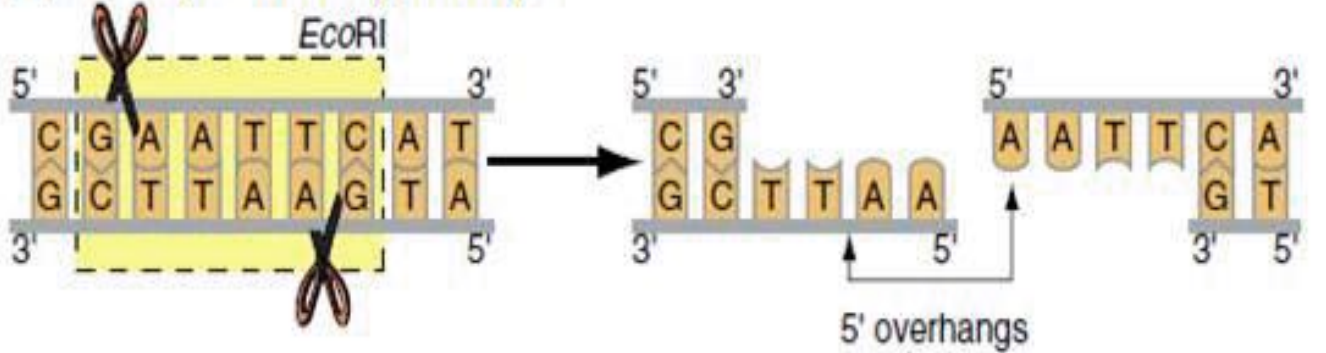
Ступенчатый гидролиз идет с образованием 5'-либо 3'-выступающих концов

(a) Blunt ends (*RsaI*)



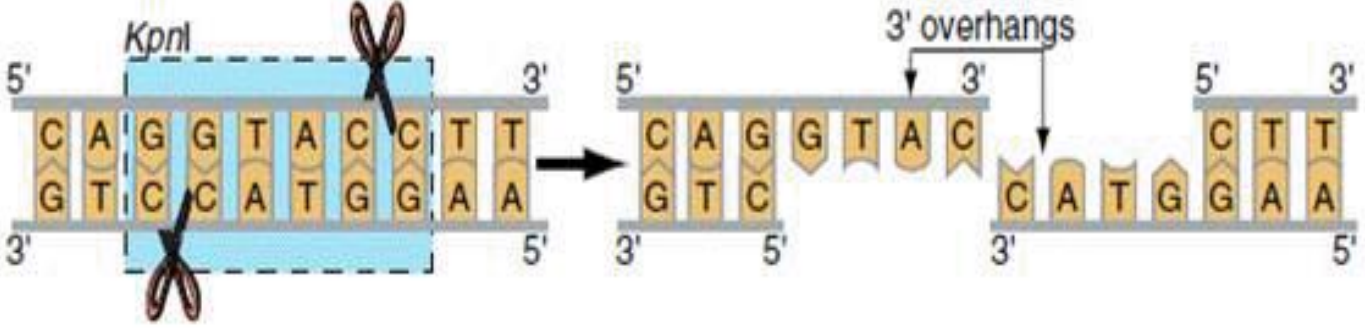
Тупые концы

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



5'-выступающие липкие концы (*EcoRI*)

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



3'-выступающие липкие концы

Системы метилирования

- **Метилазы, ДНК-метилтрансферазы**, узнают те же сайты ДНК, что и рестриктазы и метилируют цитозин в пределах сайта в одной из цепей
- **Метилирование** защищает геномы продуцентов рестриктаз от самодеградации, обычно каждую рестриктазу сопровождают метилазы
- **Метилирование** надежно блокирует рестрикцию, и наоборот, расщепленный рестриктазой сайт не может быть метилирован

Системы рестрикции-модификации (R/M)

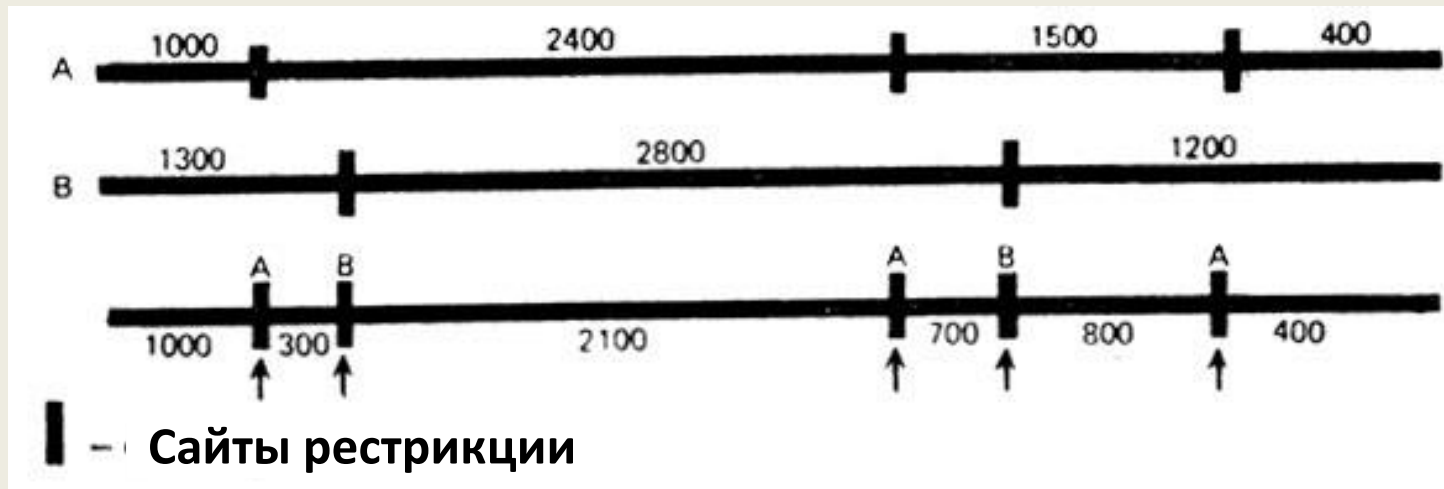
- Анализ геномов показал, что системы R/M широко распространены в геномах бактерий
- На присутствие систем R/M не влияет строение клеточной стенки
- Системы R/M имеются в аэробах и анаэробах, нет зависимости от потребления O₂,
- Нулевые штаммы без систем R/M жизнеспособны
- Аналогов систем R/M нет в ДНК эукариот, их наличие связано с одноклеточной организацией
- Системы R/M связаны с сохранением генофонда бактерий: бактерии проявляют постоянство морфологических, генетических и биохимических характеристик
- Системы R/M: *E.coli* -4, *Helicobacter pylori* 23 гена, *Neisseria* – 12, типично – 1-2-3 R/M на геном

Рестрикционные карты

- **Рестрикционная карта** – это диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания для различных рестриктаз
- **Рестрикционная карта является характеристикой ДНК:** расположение сайтов для каждой рестриктазы уникально и набор фрагментов (рестриктов) будет воспроизводиться
- **Для построения рестрикционной карты используют несколько рестриктаз:** по отдельности и в комбинации, размер фрагментов одиночного и комбинированного гидролиза определяют электрофорезом и строят карту

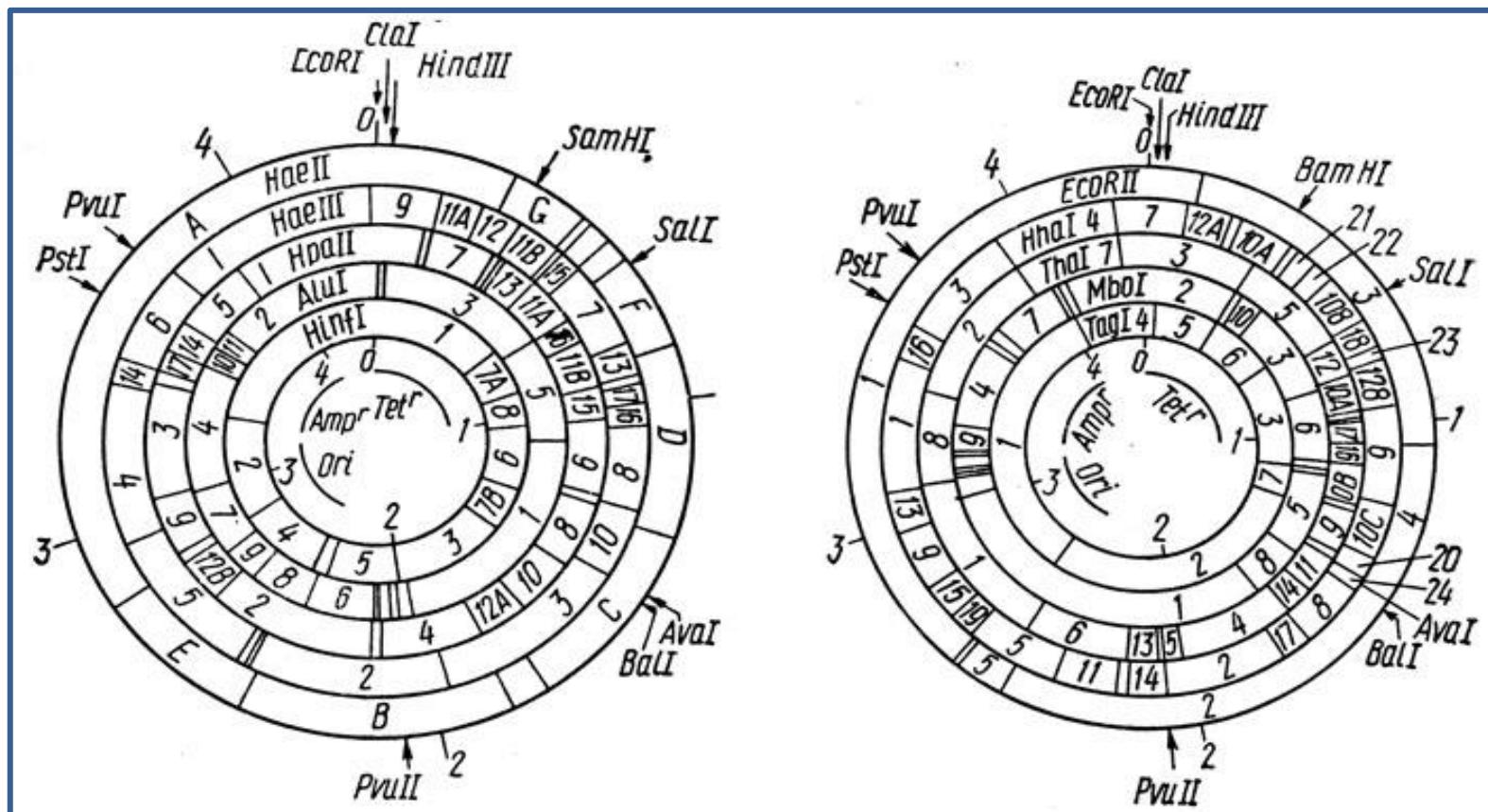
Для построения рестрикционной карты устанавливают порядок следования сайтов рестрикции вдоль молекулы ДНК:

- Чем больше рестриктаз, тем точнее карта
- Каждый фрагмент может быть клонирован и охарактеризован



Рестрикционная карта уникальна, воспроизводима и является характеристикой ДНК

Рестрикционные карты плазмиды pBR322



Схемы, изображающие взаимное расположение сайтов рестрикции для разных рестриктаз и расстояния между НИМИ

Фосфатазы

- Фосфатазы - это неспецифические 5'- и 3'-фосфомоноэстеразы, которые используют для отщепления концевых фосфатных групп в молекулах ДНК и РНК
- Фосфатазы используют для введения метки по 5'- и 3'-концам: отщепляют фосфатную группу и присоединяют меченую (радиоактивную)

Полинуклеотидкиназа

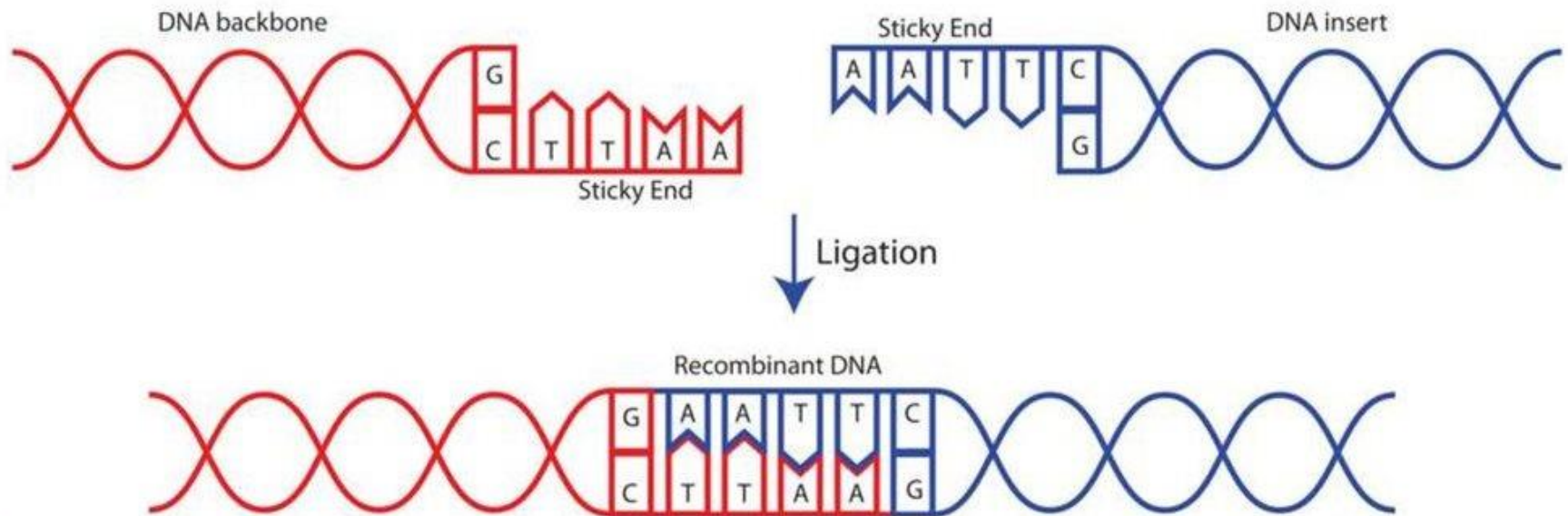
- **Полинуклеотидкиназа** специфически фосфорилирует 5'-концевые гидроксильные группы ДНК и РНК, 3'-концевые гидроксильные группы не фосфорилируются
- **Полинуклеотидкиназу** применяют для введения метки на 5'-конец
- Последовательное действие **фосфатазы** и **полинуклеотидкиназы** приводит к замещению немеченого 5'-конца на метку

ДНК-лигаза

- **ДНК-лигаза** – фермент, на котором основаны методы получения рекомбинантных молекул
- **ДНК-лигаза** катализирует образование фосфодиэфирной связи между прилегающими 5'-фосфатной группой и 3'-гидроксильной группой
- **ДНК-лигазу** используют для ковалентного сшивания липких концов, которые комплементарно взаимодействуют (отжигаются) за счет водородных связей
- **ДНК-лигазы** различают по потребности в кофакторах:
 - 1) лигаза *E.coli*
 - 2) лигаза фага Т4 (катализирует лигирование тупых концов), ему отдают предпочтение как более универсальному ферменту

ДНК-лигазы

- Совместно с рестриктазами всегда идут ферменты лигазы, ответственные за соединение двух молекул ДНК, то есть действуют обратно рестриктазам

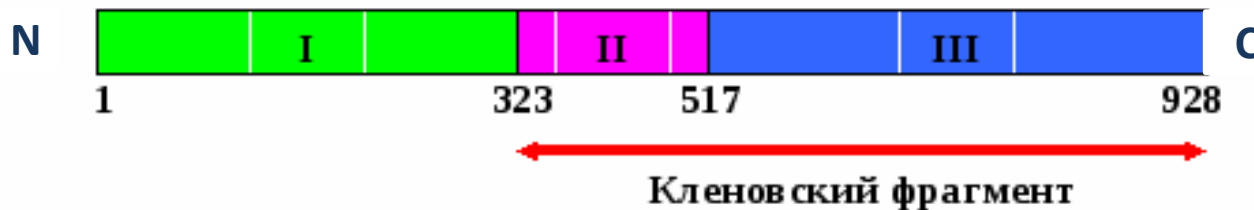


ДНК-лигаза катализирует синтез фосфодиэфирной связи между прилегающими 5'-фосфатной группой и 3'-гидроксильной группой

ДНК-полимераза

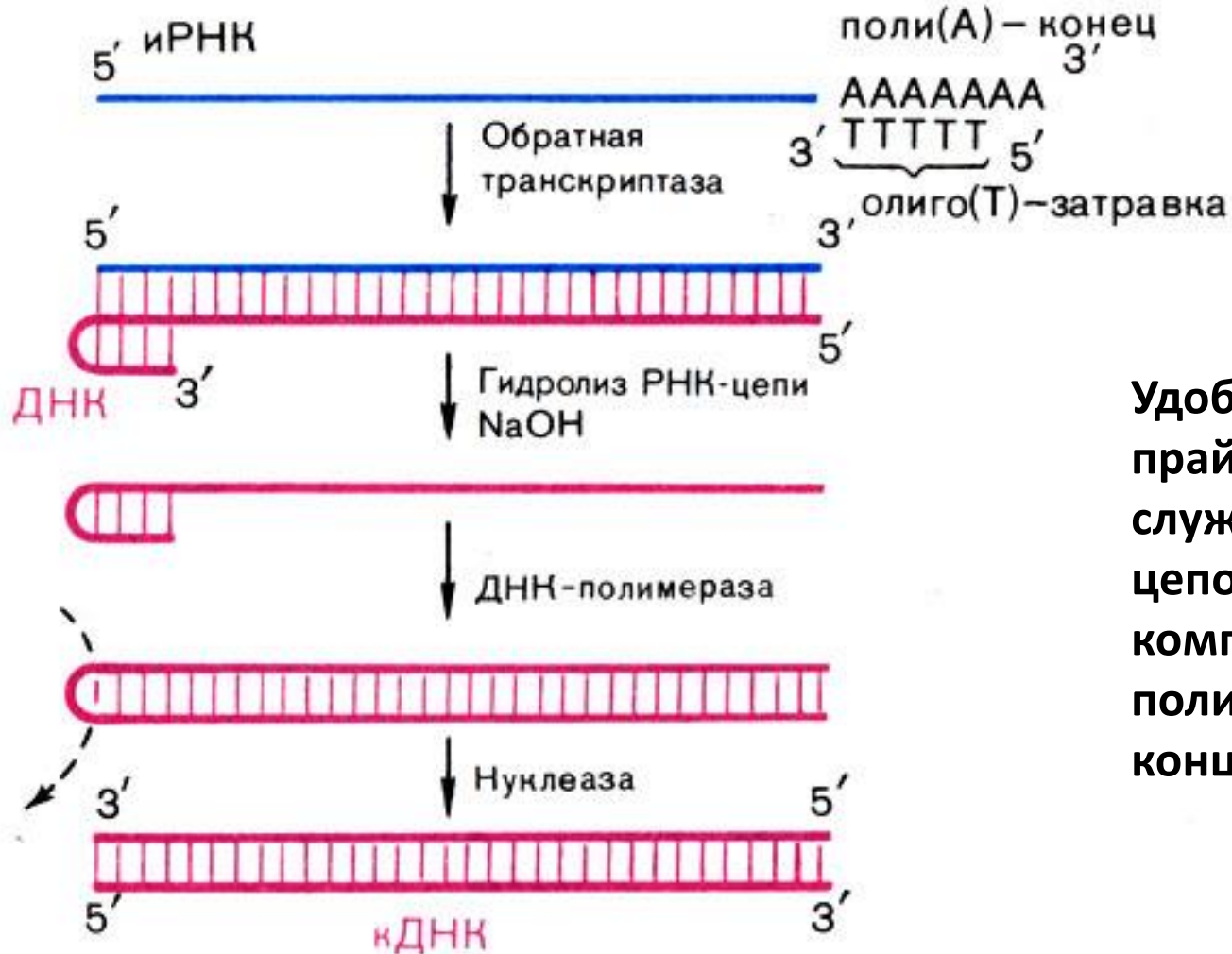
Фермент с мол. массой 103 кДа имеет трехдоменную структуру:

- I – $5' \rightarrow 3'$ - экзонуклеаза
- II – $3' \rightarrow 5'$ – экзонуклеаза
- III - $5' \rightarrow 3'$ - полимераза



Фермент используют в ПЦР, при секвенировании, для получения кДНК, при клонировании и др.

Обратная транскриптаза



Удобным праймером может служить короткая цепочка олиго(Т), комплементарная поли(А) на 3'-конце РНК

Обратная транскриптаза – РНК-зависимая ДНК-полимераза катализирует синтез ДНК на матрице РНК – служит для получения библиотеки кДНК

Терминальная трансфераза

- Дезокси-нуклеотидил-трансфераза катализирует синтез полинуклеотидов
- Не нуждается в матрице и не способна копировать
- Дезокси-нуклеотидил-трансфераза катализирует присоединение моонуклеотидов к 3'-ОН выступающему концу ДНК
- Продуктом является одноцепочечный полимер
- С помощью этого фермента к тупым концам можно присоединить липкие концы

Терминальная трансфераза

