Генная инженерия

Лекция2. Стратегия молекулярного клонирования

(бакалавры)

Составитель: проф. М.Р. ШАРИПОВА

- **Стратегия молекулярного клонирования заключается в том, чтобы изолировать индивидуальный ген или гены из большого и сложного генома и «переселить» его (их) в маленький и очень простой геном**

Общая стратегия молекулярного клонирования

Выделяют и фрагментируют ДНК из организма донора

↓

Фрагменты лигируют с плазмидной ДНК

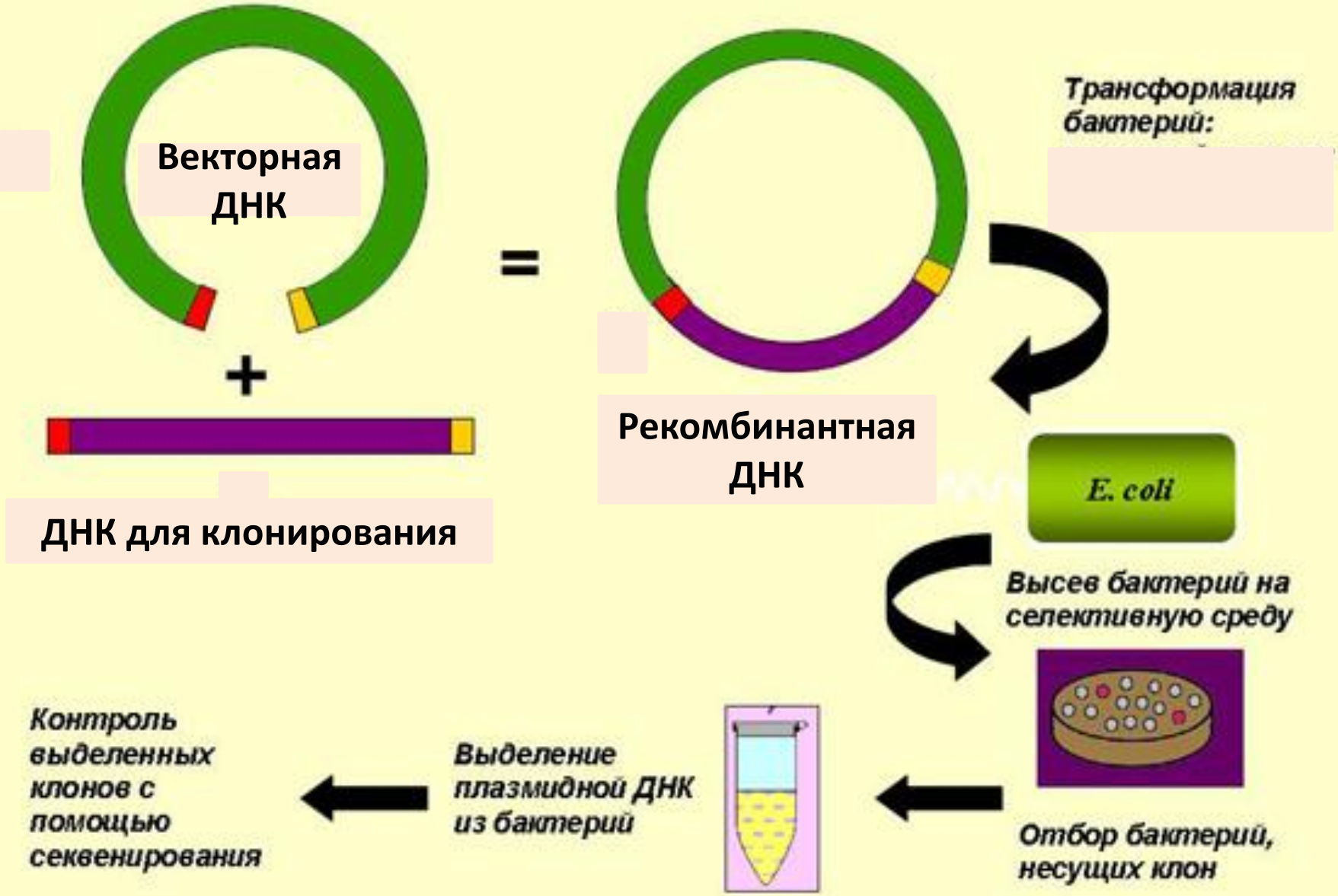
↓

Рекомбинантные плазмиды трансформируют в клетки-реципиенты

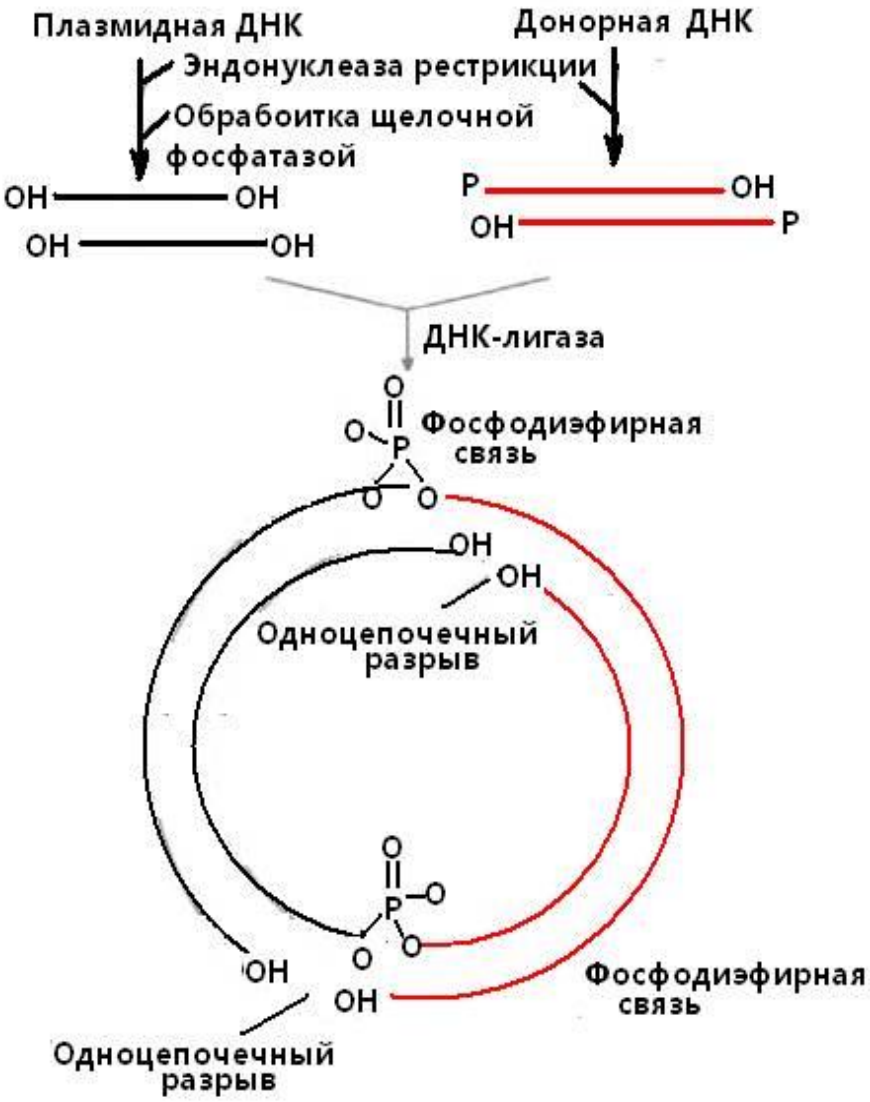
↓

Рекомбинантные клетки отбирают на селективных средах

Схема молекулярного клонирования:



Получение рекомбинантной ДНК



1. Рестрикция

Векторную и донорную ДНК расщепляют одинаковой рестриктазой

2. Обработка ЩФ плДНК

чтобы избежать закольцовывания и димеризации вектора

3. Отжиг липких концов

Смешивание векторной и донорной ДНК приводит к комплементарному взаимодействию липких концов

4. Лигирование

восстановление фосфодиэфирных связей в полинуклеотидных цепях ДНК ферментом ДНК-лигазой

- липкие концы
- тупые концы

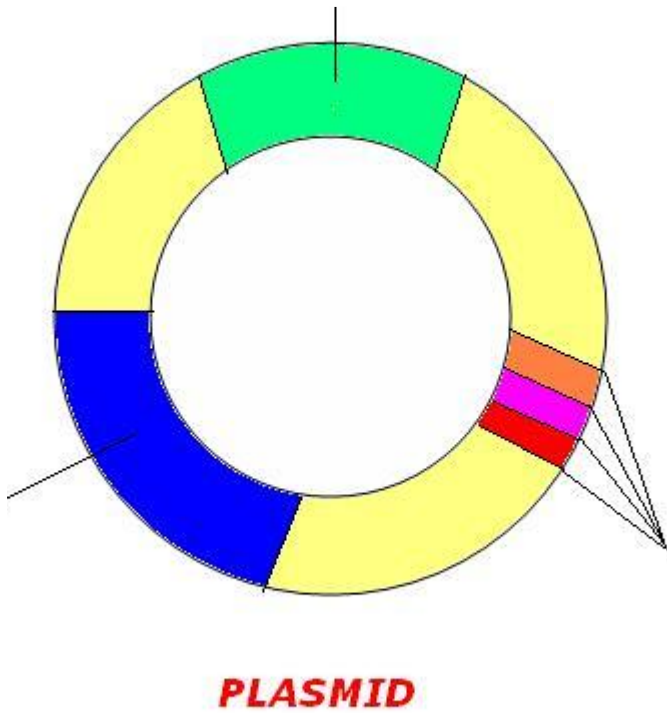
Выбор вектора

Вектор для клонирования – это ДНК, способные интегрировать чужеродную ДНК, обеспечить ее репликацию, экспрессию и перенос в другой организм (плазмиды, вирусы и искусственные хромосомы)

- **1) Вектор содержит сайт начала репликации (ori-сайт) для автономной репликации**
- **2) Вектор содержит последовательность маркерного гена для отбора клеток, несущих векторную конструкцию**
- **3) Вектор содержит уникальные сайты рестрикции для встраивания чужеродной ДНК**
- **4) Вектор имеет небольшой размер и обладает емкостью, чтобы встроенный фрагмент ДНК не элиминировал**
- **5) Определяющим в выборе вектора для молекулярного клонирования является поставленная цель и характеристики организма-хозяина**

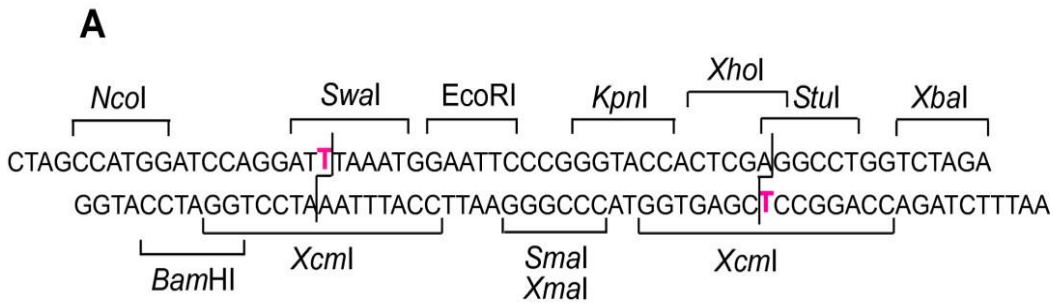
Рабочие модули плазмиды

Ori-сайт



M

МКС



Структура полилинкера – набор сайтов рестрикции (12)

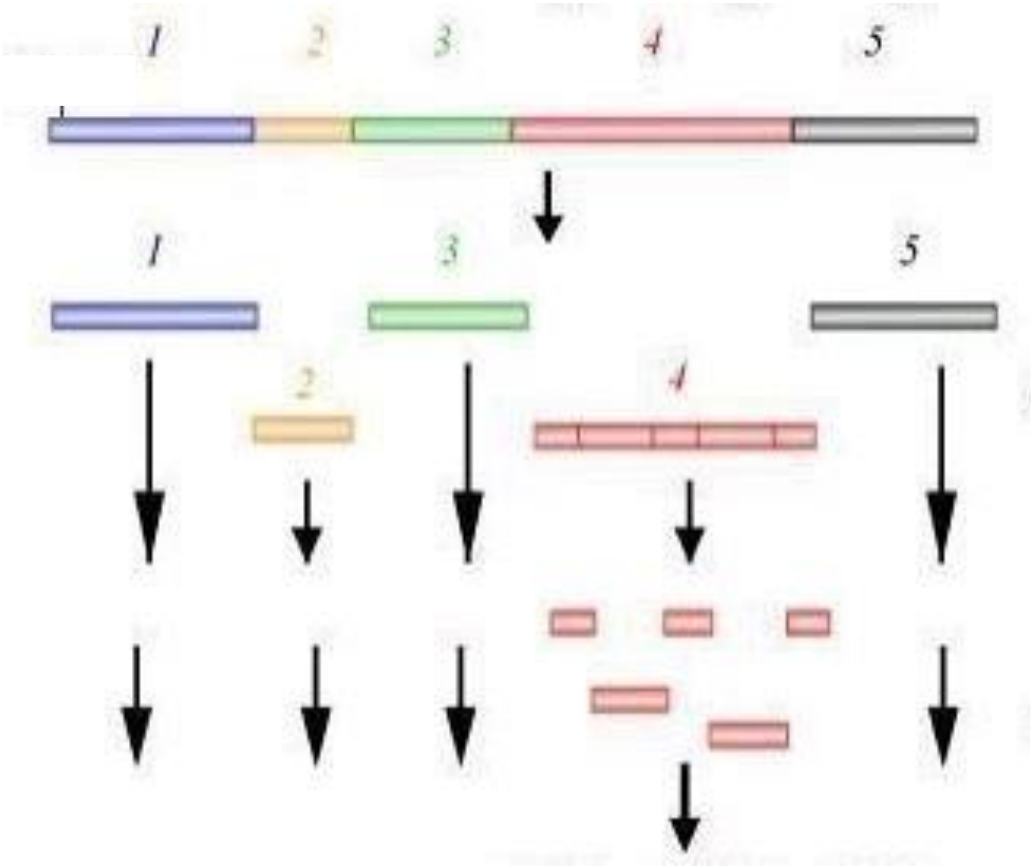
1) ori-сайт
2) Маркерный ген
3) Мультиклонирующий сайт, МКС - Полилинкер, Pl

Источники ДНК для клонирования

- Амплифицированная ДНК - ее синтезируют путем полимеразной цепной реакции (ПЦР)
- кДНК (комплементарнаяДНК) ее синтезируют на матрице РНК с помощью фермента обратной транскриптазы
- Синтетическая ДНК – ее получают путем химического синтеза на ДНК-синтезаторах
- Тотальная хромосомная ДНК

→ ДНК обрабатывают той же рестриктазой, которая использовалась для расщепления вектора

Shotgun-клонирование при использовании геномной ДНК



Shotgun-клонирование - метод клонирования путем расщепления геномной ДНК рестриктазами с последующим встраиванием продуктов рестрикции (рестриктов) в вектора клонирования

ТРАНСФОРМАЦИЯ

ТРАНСФЕКЦИЯ

КОНЪЮГАЦИЯ

ТРАНСДУКЦИЯ

Трансфекция – введение рекомбинантных ДНК в клетки организма хозяина

ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформация – способность бактериальной клетки поглощать молекулы ДНК из раствора.

Выход трансформантов - 10^{-5} - 10^{-7}, зависит от штамма, размера ДНК и условий эксперимента

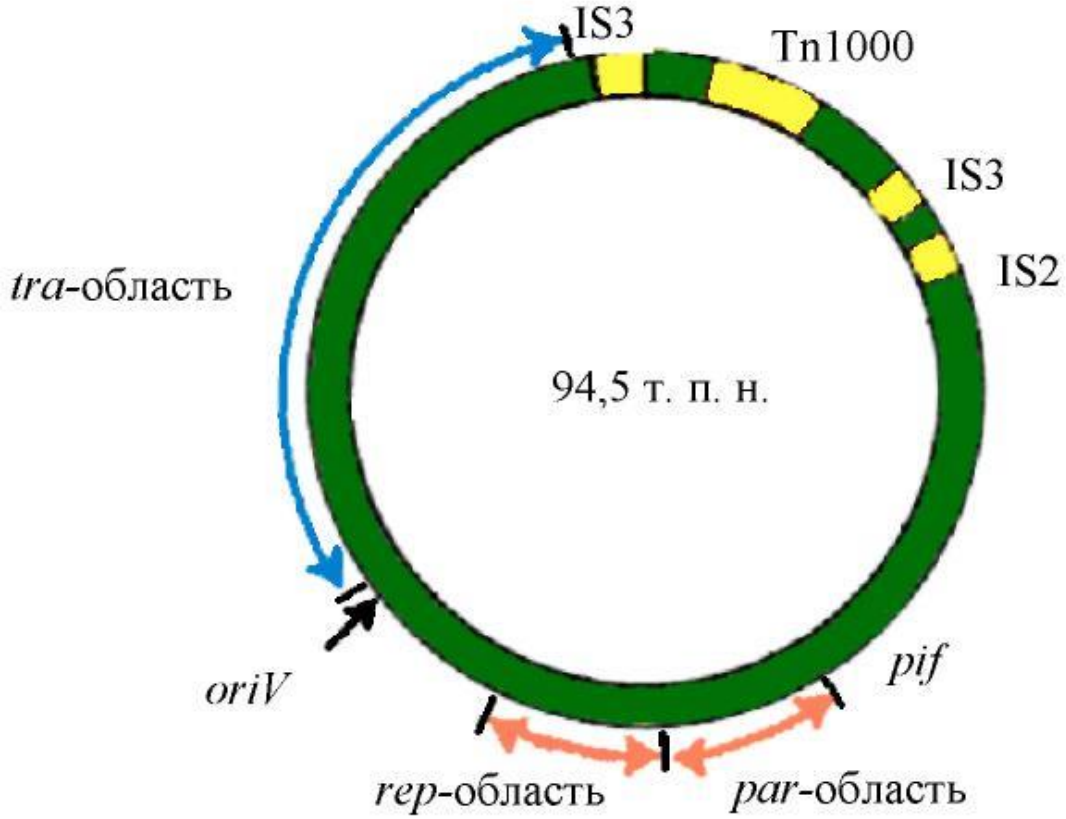
Увеличение эффективности трансформации:

1) обработка клеток раствором $CaCl_2$
2) использование для трансформации протопластов или сферопластов
3) обработка клеток полиэтиленгликолем
4) Электропорация – смесь клеток и ДНК подвергают электрическому разряду

Коньюгация

- **Коньюгация** - перенос ДНК из клеток-доноров в клетки-реципиенты, пример F-плазмида
- Большинство плазмид, которые используют в работе с рекомбинантными ДНК, не конъюгативные и не способны самостоятельно переходить в клетки путем конъюгации.
- Их вводят в клетки вместе с конъюгативными плазмидами, предназначенными для переноса по механизму мобилизации

Структура конъюгативной F-плазмиды



transfer – гены конъюгативного переноса

ori – сайт инициации репликации

Конъюгативные плазмиды способны переносить другие неконъюгативные плазмиды путем мобилизации

Трансдукция

- **Трансдукция** – инъекция ДНК бактериофага в бактериальную клетку
- В процессе инфекции бактериофаги адсорбируются на поверхности клетки и проникают в нее с частотой близкой 100% в отличие от низкоэффективной трансформации
- Если *in vitro* упаковать рекомбинантную ДНК в головки фага, то можно получить ее эффективный перенос в клетку хозяина

Отбор и хранение

- **Отбор** - для отбора используют устойчивость штамма к антибиотику, которая кодируется маркерным геном на рекомбинантной плазмиде
- **Отбор** проводят на среде с антибиотиком, на которой выживают рекомбинантные штаммы, погибают дикие

- **Хранение**:

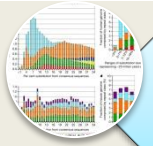
1) в виде рекомбинантных клонов

2) в виде рекомбинантной плазмидной ДНК

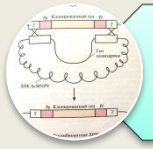
Итоги клонирования

- Клонированную ДНК секвенируют и проводят поиск открытой рамки считывания **(ORF)**
- Последовательность нуклеотидов конвертируют в белковый продукт
- Сайт-специфический мутагенез и изучение продуктов экспрессии
- Если секвенирование показало, что клон содержит неполную рамку считывания, то процедуру клонирования повторяют, применяя другую рестриктазу для расщепления ДНК

НАЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕКТОРОВ

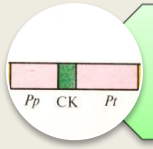


ВЕКТОРЫ-АМПЛИФИКАТОРЫ

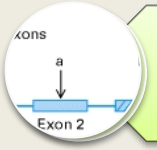


ВЕКТОРЫ ЭКСПРЕССИИ

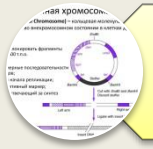
ГИБРИДНЫЕ ВЕКТОРЫ



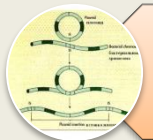
ЧЕЛНОЧНЫЕ ВЕКТОРЫ



ИНТЕГРАТИВНЫЕ ВЕКТОРЫ



ВЕКТОРЫ СЕКРЕЦИИ



ВЕКТОРЫ ОТБОРА

ВЕКТОРЫ С НАРУШЕННОЙ КОПИЙНОСТЬЮ

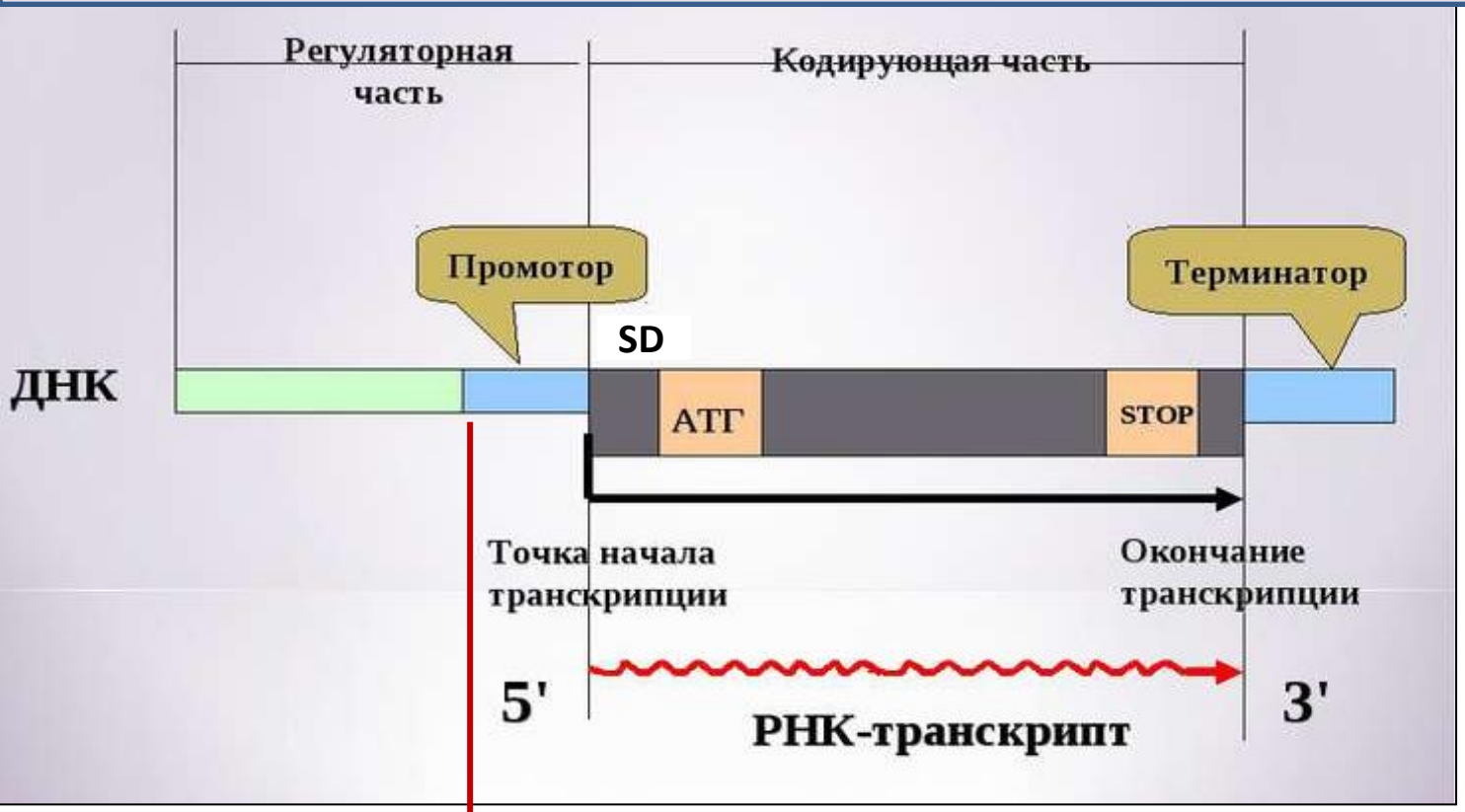
- **Векторы-амплификаторы** способны амплифицировать до 1-3 тыс копий на клетку при обработке клеток бактерий хлорамфениколом
- Антибиотик хлорамфеникол ингибирует синтез белка: в этих условиях репликация плазмид под ослабленным контролем продолжается, а репликация хромосомной ДНК и плазмид, находящихся под строгим контролем, прекращается
- Плазмиды, способные амплифицировать при глобальной блокаде синтеза белка, не обнаружены у бацилл

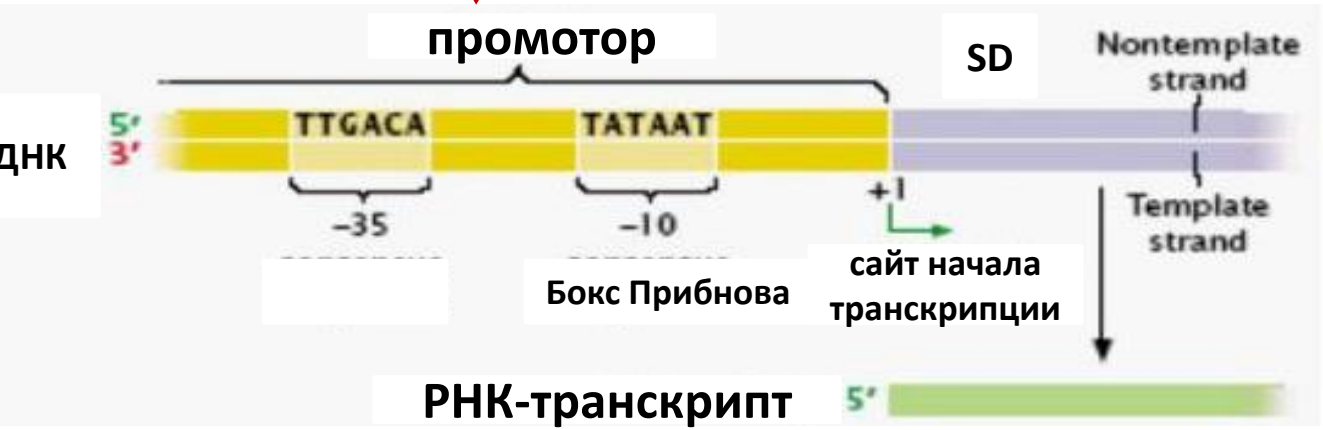
Векторы экспрессии

Важные характеристики систем экспрессии:

- **1) тип промотора и терминатора транскрипции**
- **2) прочность связывания мРНК с рибосомой**
- **3) число копий клонированного гена и его локализация (в плазмиде или в хромосоме хозяйской клетки)**
- **4) конечная локализация синтезируемого продукта**
- **5) эффективность трансляции и сборка продукта в организме хозяина**
- **6) стабильность продукта в хозяйской клетке**

Эффективность транскрипции зависит от промоторов





Структура гена и промотора

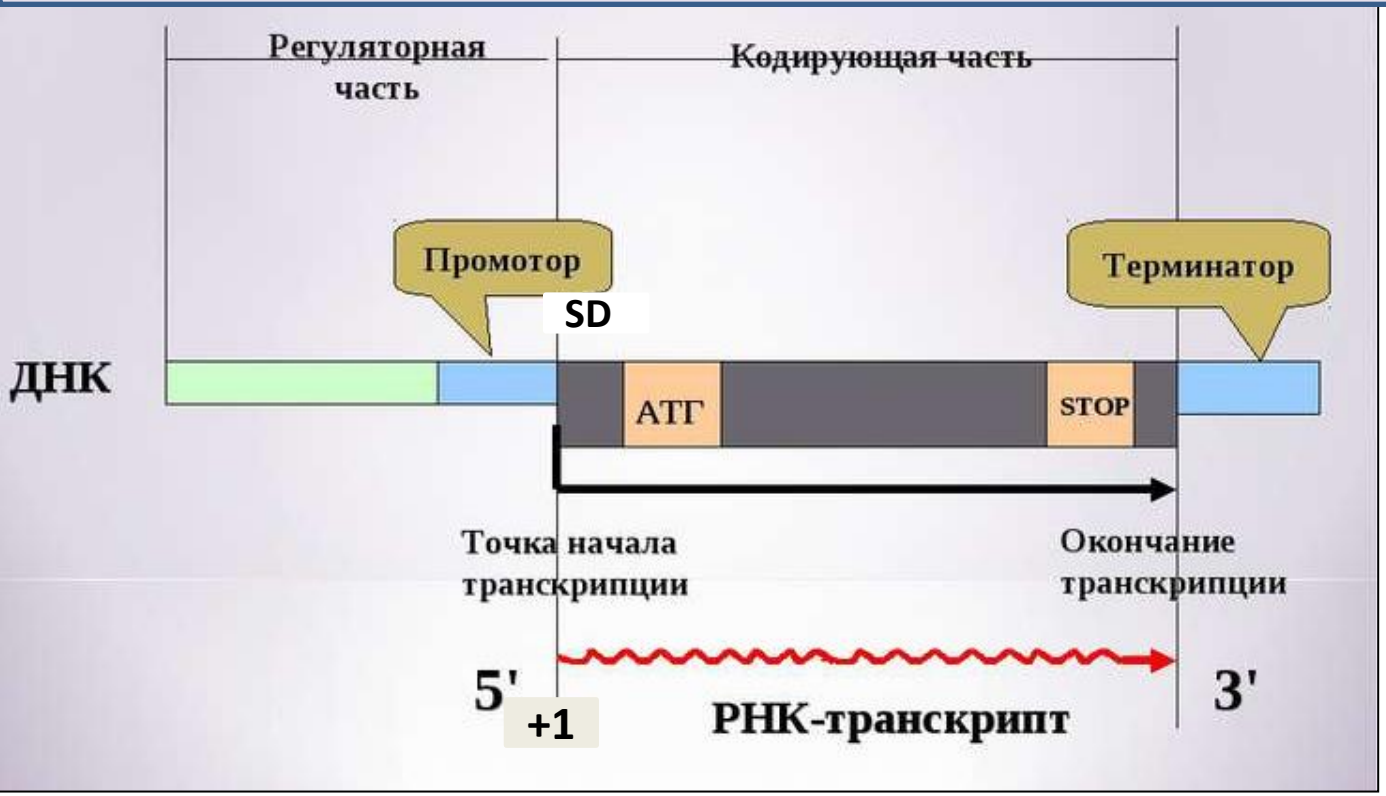
Векторы экспрессии

Для эффективной транскрипции нужны сильные промоторы:

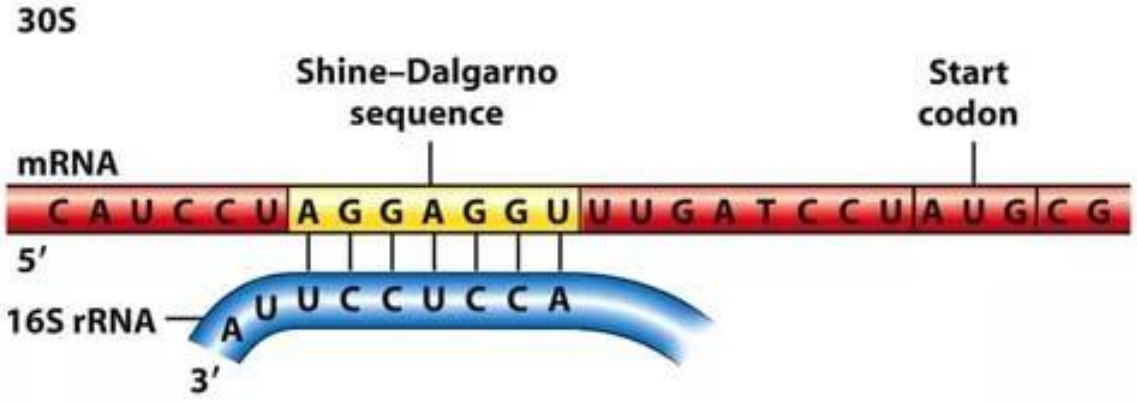
- **lac-промотор (Plac)** - промотор lac-оперона;
- **trp- промотор (Ptrp)** - промотор триптофанового оперона;
- **tac-промотор (Ptac)** - синтетический промотор у которого –10 область от Plac, и –35 от Ptrp

  (индуктор **Ptac –** ИПТГ, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид)
- **Сильные промоторы обнаружены у фагов**:
  - **промотор фага лямбда (Pλ)**
  - **промотор фага T7** узнает T7РНК-полимераза бактериофага, поэтому вектор экспрессии должен содержать ген T7РНК-полимеразы под индуцируемым промотором **(Ptac)**

Эффективность трансляции зависит от SD-сайта



SD-сайт располагается между +1 и АТГ-кодоном



Эффективная трансляция

- Последовательность Шайна-Дальгарно (SD) – это сайт связывания мРНК с рибосомой для эффективной трансляции
- SD состоит из 5-8 нуклеотидов, преимущественно пуринов (A и G), располагается вблизи (~ 10 п.о.) старт-кодона AUG
- Последовательность SD комплементарна сегменту на 3’-конце 16S рРНК, чтобы мРНК могла эффективно связаться с 30S субъединицей рибосомы
- Сайт SD отсутствует в генах эукариот, чтобы эукариотический ген экспрессировался в бактериях вектор экспрессии должен содержать SD-сайт на 5’-конце клонированной ДНК

Кодон-оптимизация

- Частота встречаемости кодонов-синонимов в кодирующих областях различается у разных организмов (концепция предпочтения кодонов)
- Для повышения эффективности трансляции мРНК проводят **оптимизацию кодонов** клонируемого гена
- Изменяется последовательность нуклеотидов, но аминокислотная последовательность, кодируемая этим геном, не изменяется

Таблица кодонов

Аминокислоты			Кодоны					
Аланин	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Цистеин	Cys	C	UGC	UGU				
Аспарагиновая кислота	Asp	D	GAC	GAU				
Глутаминовая кислота	Glu	E	GAA	GAG				
Фенилаланин	Phe	F	UUC	UUU				
Глицин	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Гистидин	His	H	CAC	CAU				
Изолейцин	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Лизин	Lys	K	AAA	AAG				
Лейцин	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Метионин	Met	M	AUG					
Аспарагин	Asn	N	AAC	AAU				
Пролин	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Глутамин	Gln	Q	CAA	CAG				
Аргинин	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Серин	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Треонин	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Валин	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Триптофан	Trp	W	UGG					
Тирозин	Tyr	Y	UAC	UAU				

Редкие кодоны в составе чужеродного гена, приводят к снижению скорости его трансляции

Для каждого типа организмов существует своя частота использования кодонов-синонимов (codon usage) и свой набор изоакцепторных транспортных тРНК.

Проблему решают синтезом целевого гена с соответствующей организму-рецепиенту частотой использования кодонов (оптимизация гена).

ЭФФЕКТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ

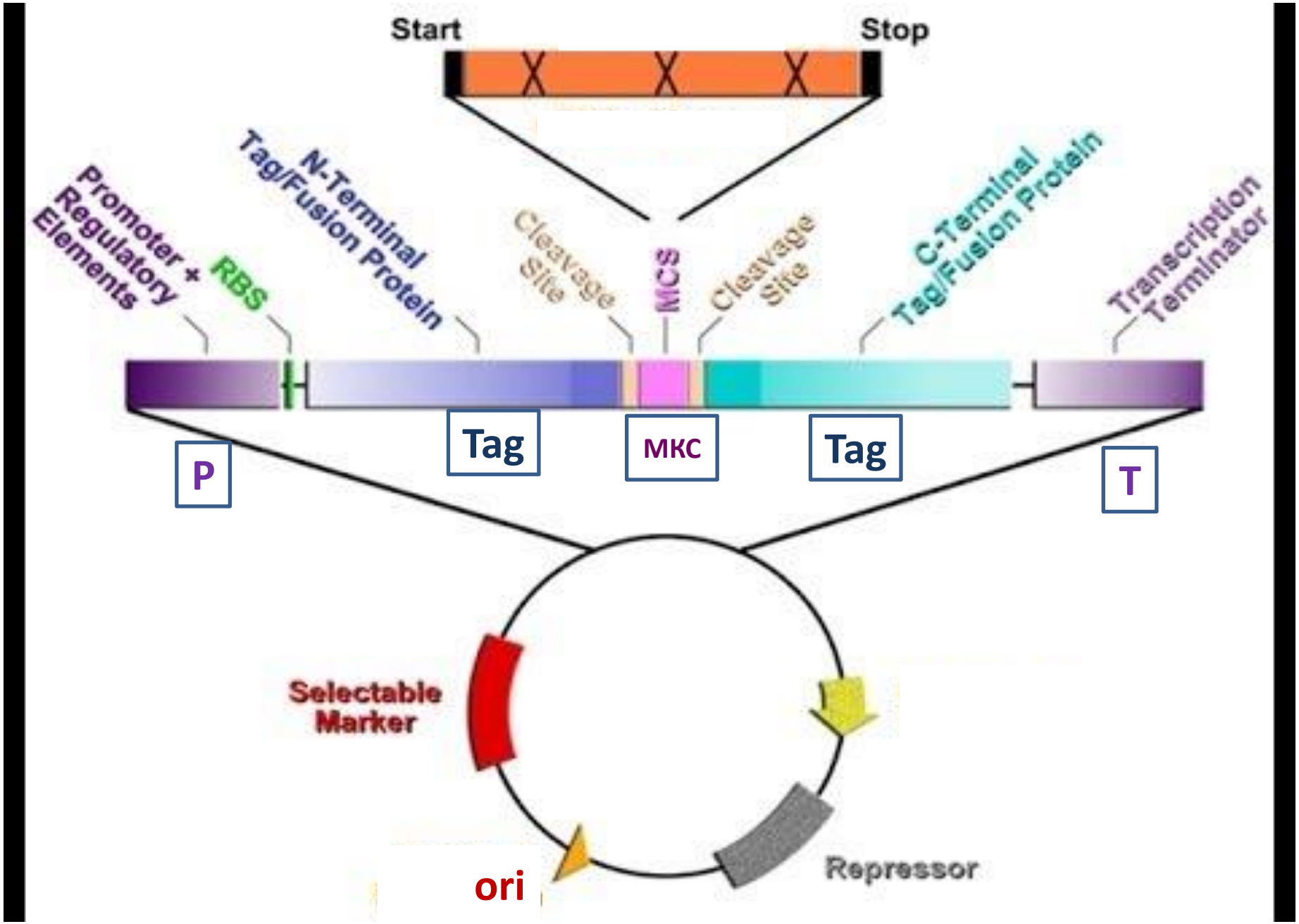
Эффективная экспрессия – комплексный процесс, важно учитывать многие факторы, включая выбор организма-хозяина

Для эффективной экспрессии особое внимание уделяют манипуляциям с генетическими элементами, контролирующими процессы транскрипции и трансляции

Гибридные векторы (Фьюжин-векторы)

- **Гибридные векторы объединяют фрагменты различных генов: промоторы, кодирующие области, целевые эпитопы**
- Слияние проводят путем лигирования участков разных генов
- При объединении двух кодирующих ДНК не должна нарушаться рамка считывания
- При совпадении рамок трансляции исходного и встроенного гена синтезируется химерный белок, который обладает свойствами целевого белка

Гибридный (фьюжин) вектор



Гибридные векторы

Различные эпитопы вводят с целью:

- повысить уровня экспрессии целевого белка
- повысить стабильность экспрессии
- улучшить растворимость и фолдинг белка
- провести очистку химерного белка с помощью аффинной хроматографии
- для разделения химерных белков на заключительном этапе проводят расщепление по сайту для протеаз, расположенному между белками

Используемые эпитопы

- **His-tag -** последовательность из 6 - 10 гистидиновых остатков для аффинной хроматографии с иммобилизованными на твердом носителе ионами металлов (Co^{2+}, Ni^{2+})
- **Strep-tag -** пептид, обладающий сродством к стрептавидину
- **MBP** — мальтозосвязывающий белок
- **GST**— глутатионS-трансфераза (используют для очистки на смоле, содержащей глутатион)
- **Flag**— пептид, узнаваемый энтерокиназой

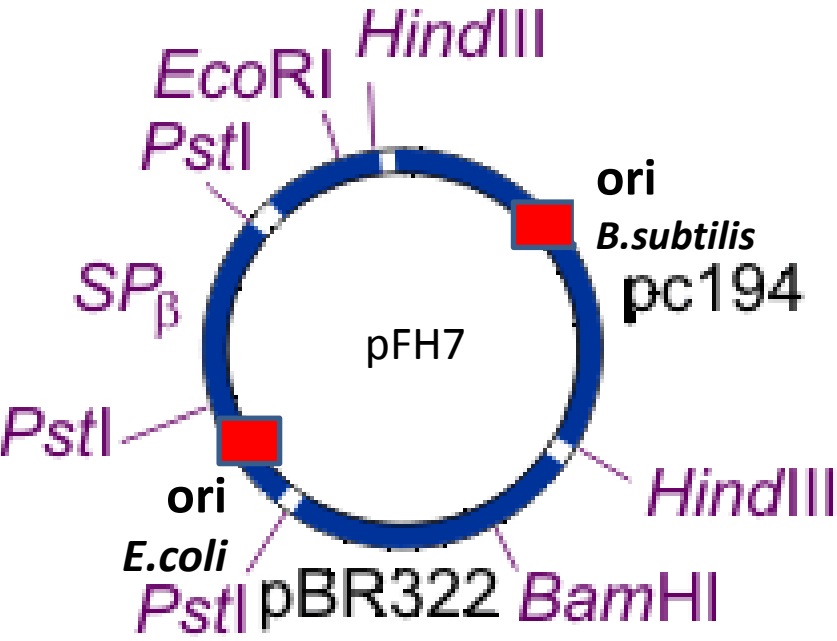
Бинарные (челночные) векторы

- **Бинарные векторы –** это плазмиды, способные реплицироваться в клетках разных организмов, например, в клетках *B. subtilis* и *E. coli*.
- Чужеродные гены клонируют в методически более простой системе *E. coli*, для которой детально разработаны приемы генной инженерии.
- В этой системе проводят все модификации генно-инженерных конструкций, а затем модифицированные плазмиды переносят в клетки *B. subtilis*.
- Векторы, содержащие *ori*-сайты различных организмов, способны реплицироваться в клетках бактерий и дрожжей, бактерий и эукариот

Основной принцип конструирования бинарных векторов : они включают репликоны генетических систем, в которых будет происходить репликация

- При этом используются области начала репликации – природные ***ori*-сайты**
- Бинарные векторные системы разработаны для эукариотических клеток (клетки животных и растений):
  - Эта методика в основе создания трансгенных животных и растений, которые экспрессируют гетерологичные гены
  - На этом методе основаны методы генотерапии

Бинарные плазмиды



Генно-инженерные манипуляции удобнее проводить в бактериальных клетках

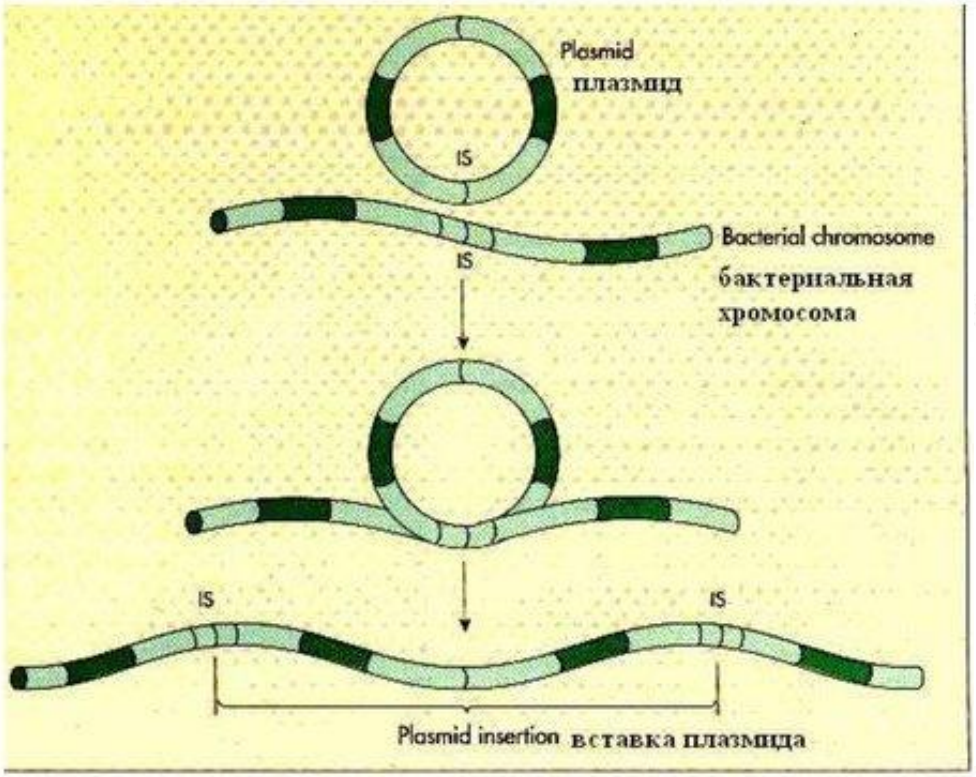
Плазмида **pFH7** получена объединением двух репликонов: плазмиды pC194 *B. subtilis* и плазмиды pBR322 *E. coli* , что обеспечивает челночному вектору стабильную репликацию в обеих клетках, *E. coli u B. subtilis*

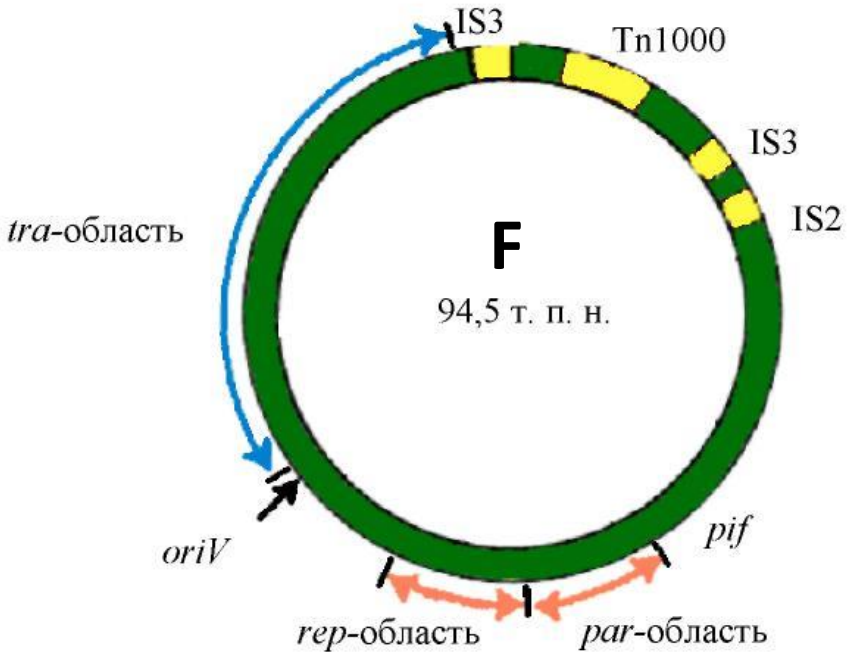
Векторы, способные реплицироваться в клетках разных биологических видов, называют бинарными или челночными

Интегративные векторы

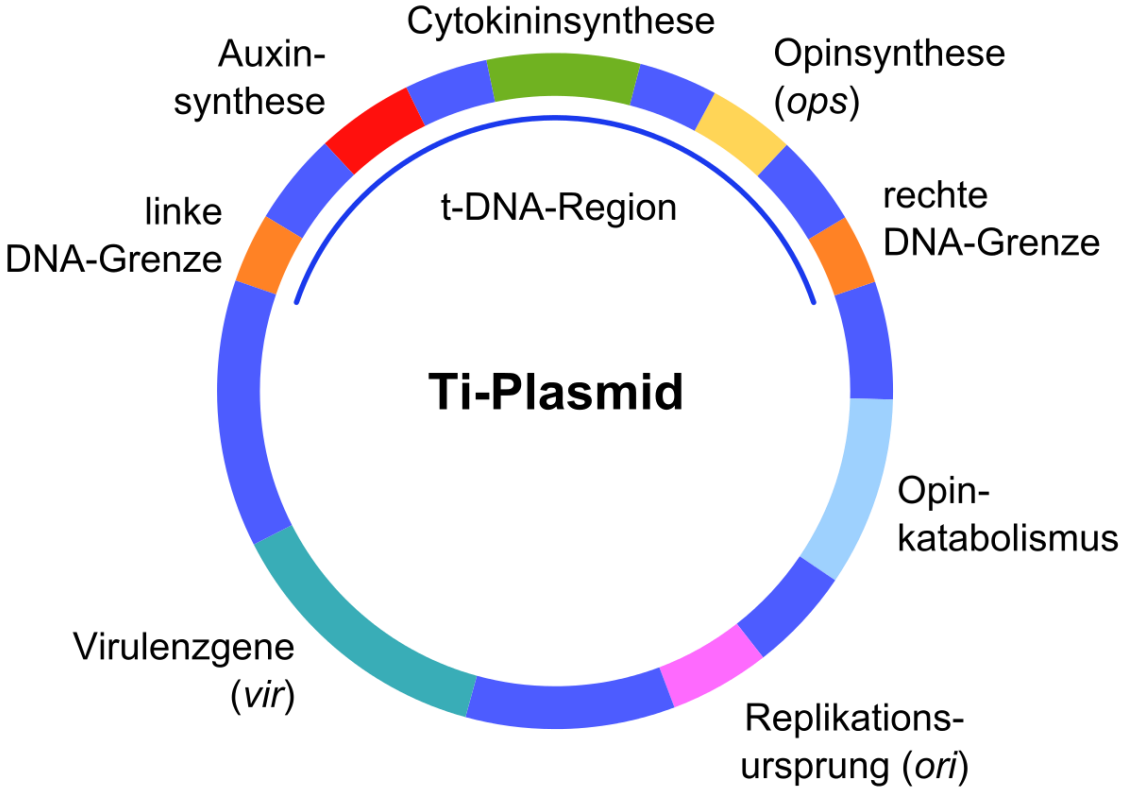
- Главным свойством **интегративных векторов** является их способность встраиваться в хромосомную ДНК клетки-хозяина
- Встраивание происходит благодаря наличию в составе вектора последовательностей нуклеотидов, гомологичных последовательностям хромосомной ДНК
- Объединение хромосомной и плазмидной ДНК происходит за счет ферментов клеточной системы рекомбинации, что приводит к стабильному включению плазмиды в хромосому
- В процессе интеграции плазмид может происходить их тандемная дупликация с увеличением выхода целевого продукта

Интегративные плазмиды





Интегративные плазмиды



Плазмида агробактерий:

t-регион способен включаться в ядерную ДНК реципиентной клетки двудольных растений, что приводит к образованию специфических опухолей

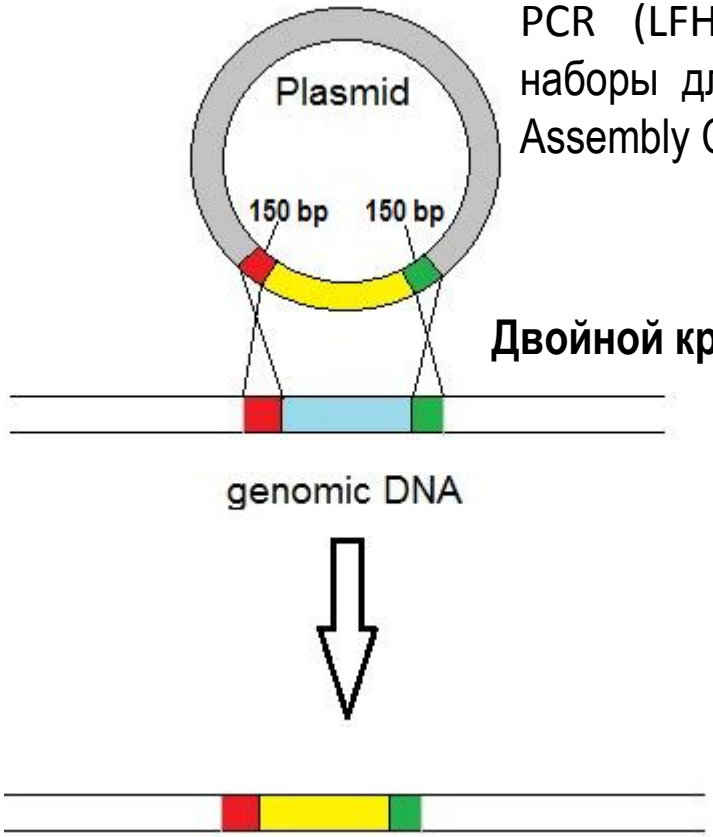
Интегративные векторы для направленной инактивации генов

- Метод направленной инактивации генов применяют для изучения функций неизвестных генов
- Для инактивации генов в хромосомах используют интегративные векторы
- Для этого фрагмент целевого гена клонируют в интегративной плазмиде и плазмиду трансформируют в целевые клетки
- В результате интеграции ген в хромосоме инактивируется и происходит экспрессия гена-репортёра в составе интегративного вектора
- Наблюдая за фенотипом после инактивации делают вывод о функции гена

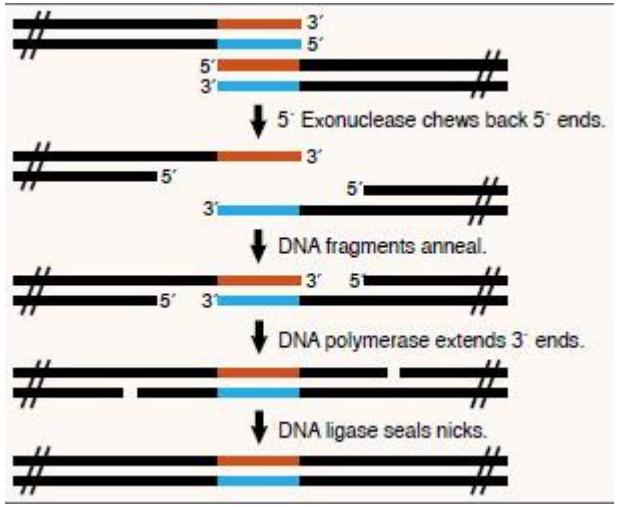
Методы генетического конструирования штаммов

Получение рекомбинантных штаммов с использованием гомологичной рекомбинации и маркеров для селекции (RecA-зависимая система).

ПЦР, рестрикция плазмидной ДНК, OE-ПЦР/long-flanking homology PCR (LFH PCR), коммерческие наборы для клонирования (Gibson Assembly Cloning Kit)



Двойной кроссинговер



www.neb.com

Векторы секреции

- **Векторы секреции** – векторы бацилл, содержат сигнальные пептиды
- Конструируют векторы секреции путем клонирования генов эффективно секретируемых белков и удалением их кодирующей последовательности
- **---Pr---SD---SP---MCS---T---**
- Секреция зависит также от других факторов, обеспечивающих транслокацию через клеточную стенку и фолдинг секретируемого белка

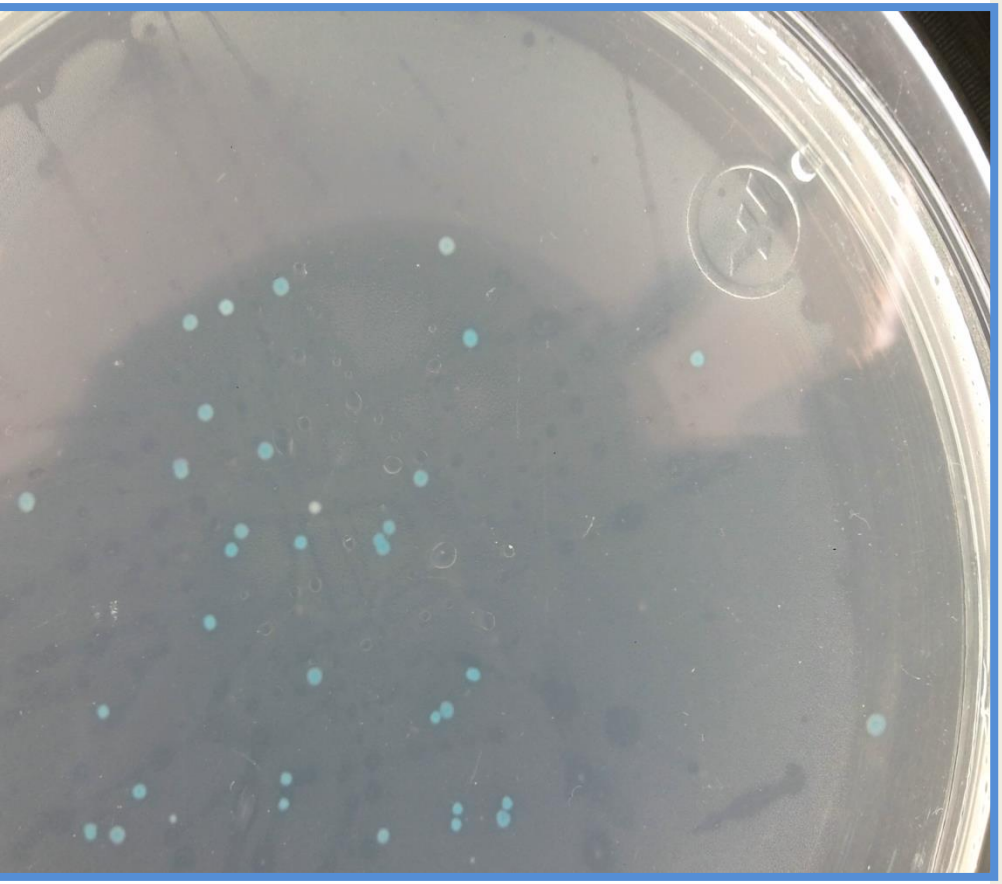
Репортерные гены

Репортёрные гены используют для оценки экспрессии

Это гены ферментов, антибиотиков, флюоресцентных и люминесцентных белков:

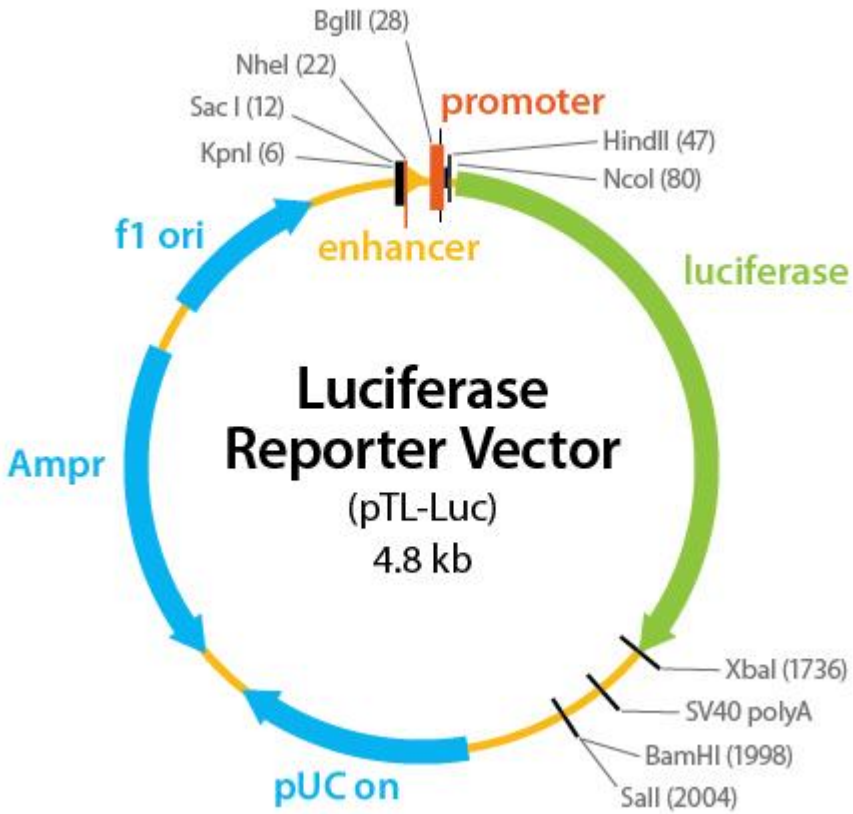
- ***lacZ –*** ген фермента бета-галактозидазы, экспрессия которого приводит к появлению синей окраски колоний на среде с X-gal
- ***cat*** **-** ген устойчивости к антибиотику хлорамфениколу
- ***gfp*** **-** ген кодирует зеленый флуоресцентный белок, зелёное свечение появляется при освещении синим светом
- ***luc*** **-** ген фермента люциферазы, которая катализирует реакцию с люциферином и вызывает свечение
- ***dsRed*** **-** ген красного флуоресцентного белка

LacZ – β-галактозидаза



- Субстрат **X-gal** используют для идентификации β-галактозидазы, продукта маркерного гена *lacZ*
- β-галактозидаза расщепляет **X-gal** с образованием соединения 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-индиго, окрашивающего колонию в синий цвет
- **X-gal** позволяет визуально определить трансформантов
- Синее окрашивание теряется у клеток, содержащих нарушения в гене *lacZ* в результате генетической вставки

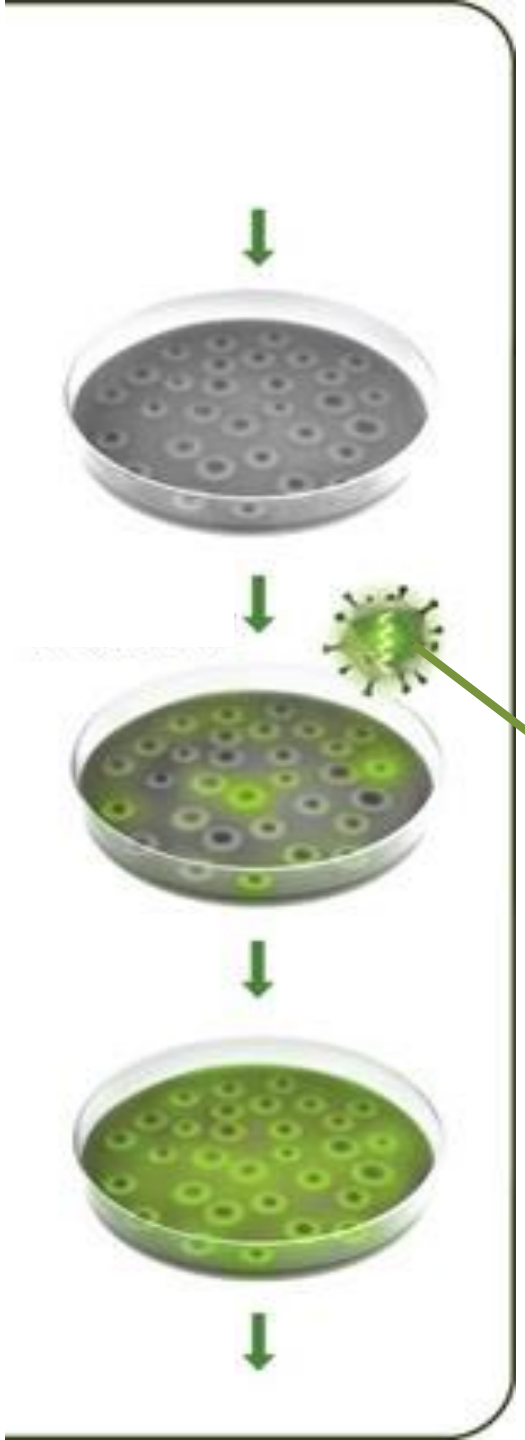
Вектор с репортерным белком **Luc**

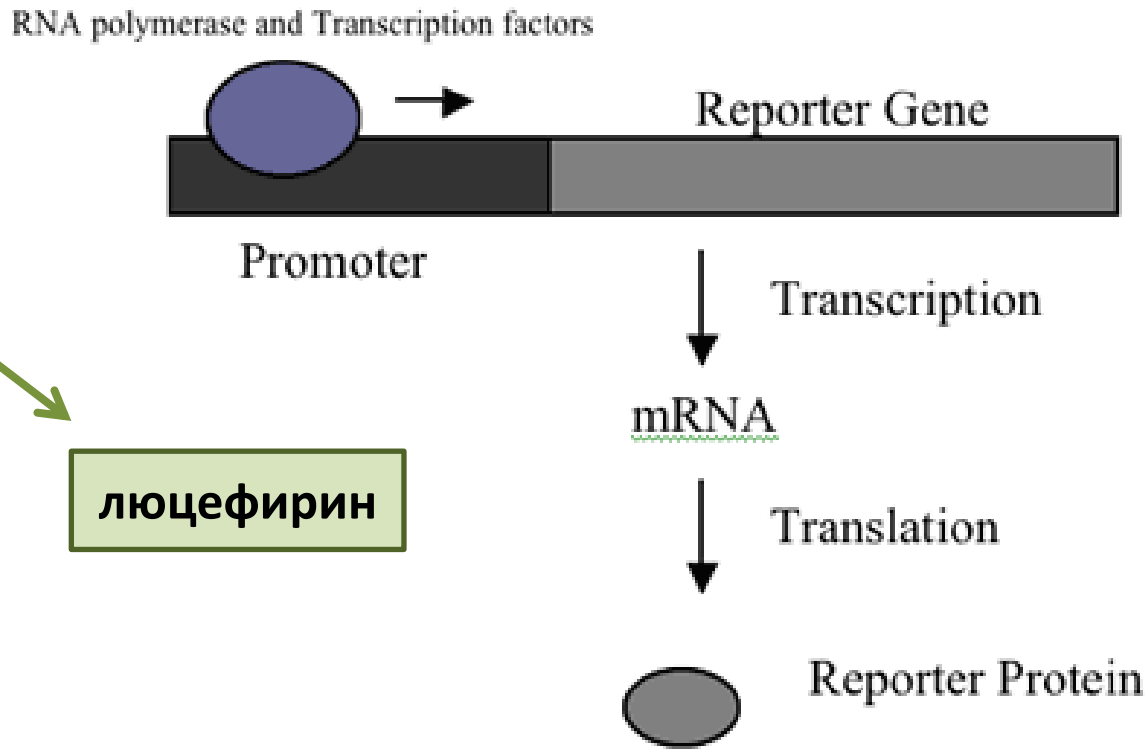


1) В среду добавляют люциферин-светоизлучающий пигмент, это небольшие молекулы, служащие субстратом для ферментов люцифераз

2) В присутствии люциферазы происходит окисление люциферинов с образованием оксилюциферина , излучающего энергию в виде света.

Экспрессия гена-репортера





люцефирин

Векторы отбора

- На основе репортерных генов разработаны векторы отбора для селекции на уровне фенотипа

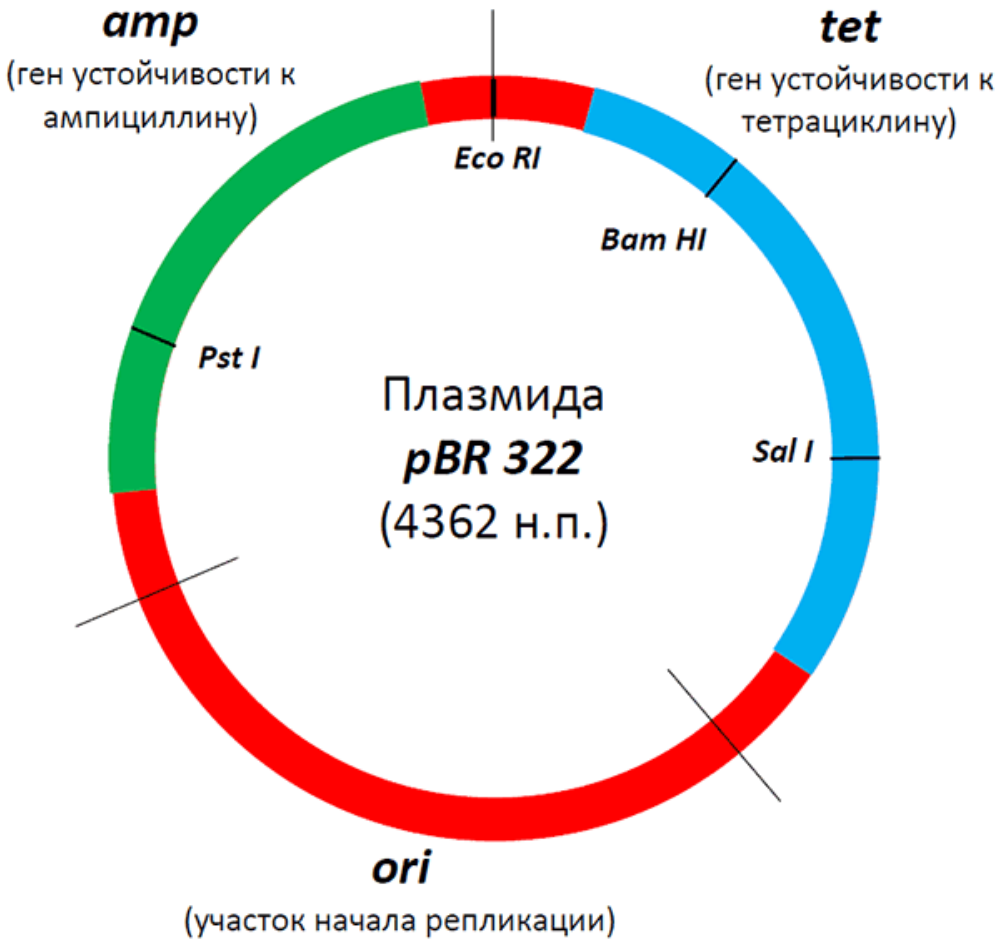
  Суть: Если вставку клонируют по сайтам рестрикции внутри репортерного гена, то нарушается его рамка считывания и ген-репортер инактивируется

- **Первые векторы отбора: pBR322 и pUC19**

Плазмида pBR322

- **pBR322 -** кольцевая ДНК длиной 4363 п.о. (4 кб), последовательность секвенирована, описаны уникальные сайты рестрикции
- **pBR322** несет 2 маркерных гена: устойчивость к тетрациклину (Тс) и ампициллину (Ар)
- **pBR322** реплицируется в *E.coli* в количестве 30 копий и м.б. амлифицирована до 3000 копий
- В **pBR322** можно клонировать чужеродную ДНК размером до 10 кб
- **pBR322** легко изолировать и трансформировать

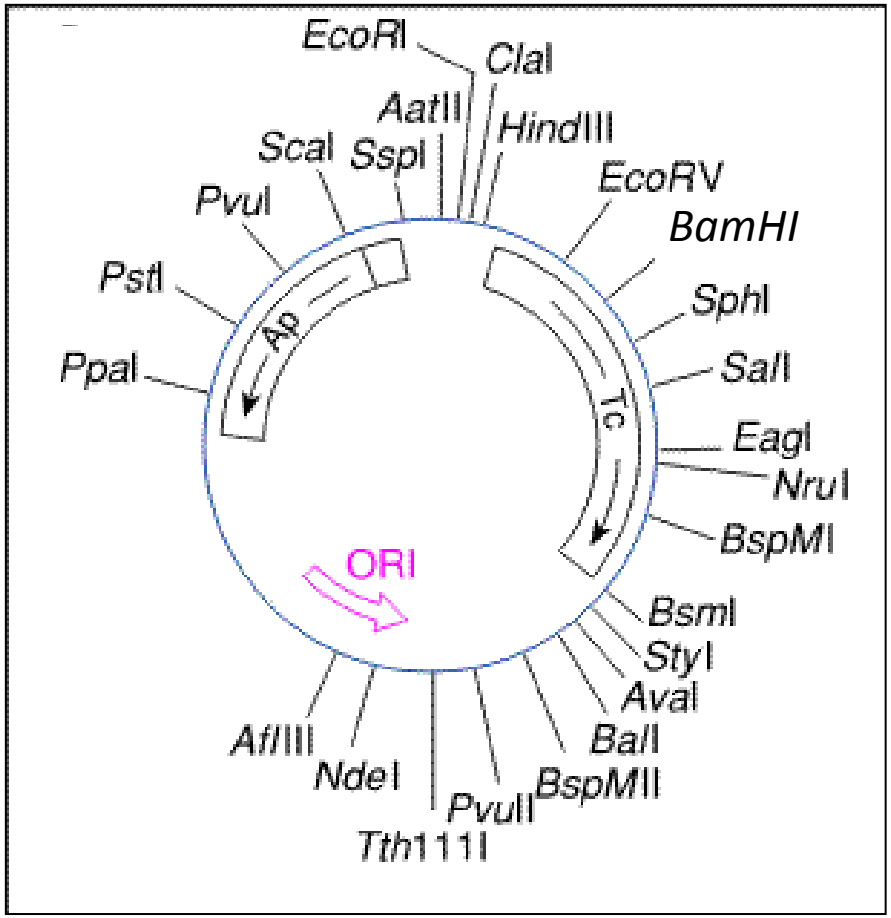
Вектор pBR322



Вектор содержит генетические маркеры - гены устойчивости к тетрациклину (*tet*) и ампициллину (*amp*).

Оба гена - позволяют проводить отбор рекомбинантных клеток с плазмидой pBR322 по способности к росту на питательных средах в присутствии тетрациклина и ампициллина.

Генетическая карта вектора серии pBR322



Плазмида содержит уникальные сайты рестрикции в генах устойчивости к антибиотикам.

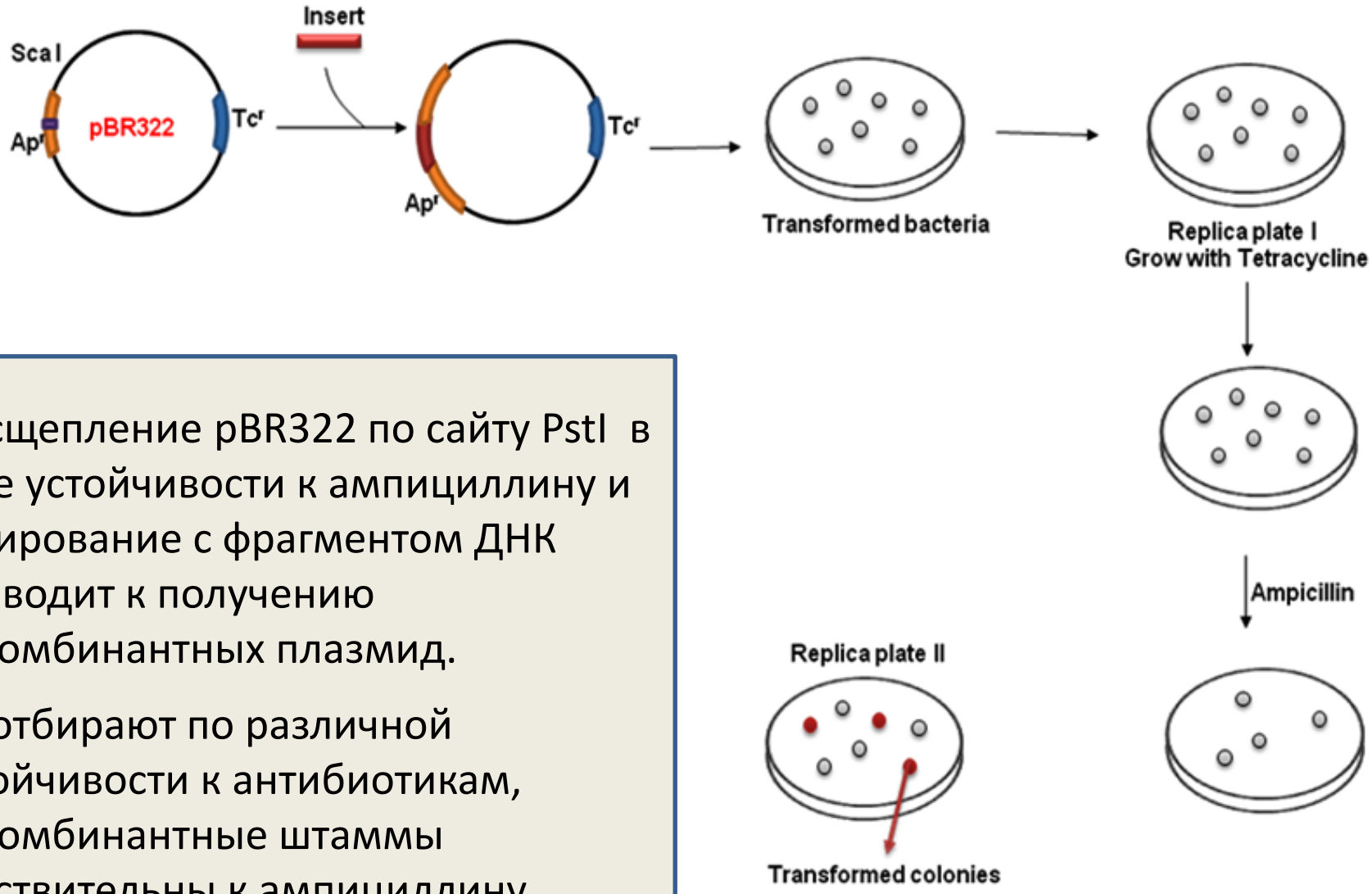
Встраивание чужеродных фрагментов ДНК по сайтам рестрикции приведет к потере устойчивости.

По такому признаку легко различить бактериальные клетки без плазмиды: они **не растут** в присутствии ампициллина и тетрациклина.

Клетки с плазмидой, не содержащей вставки **растут** в присутствии обоих антибиотиков.

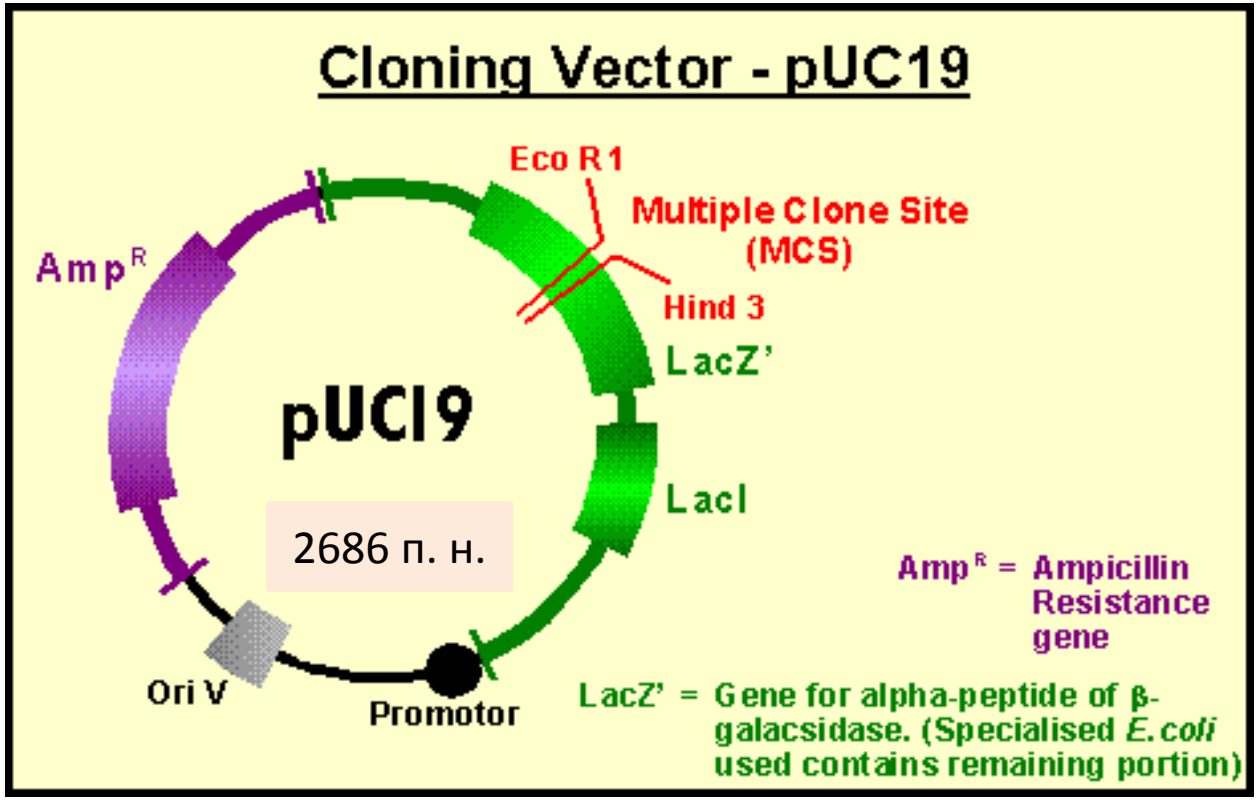
Клетки с рекомбинантными плазмидами в зависимости от локализации вставки растут на среде с одним из антибиотиков.

Использование плазмиды pBR322 для отбора рекомбинантных клеток

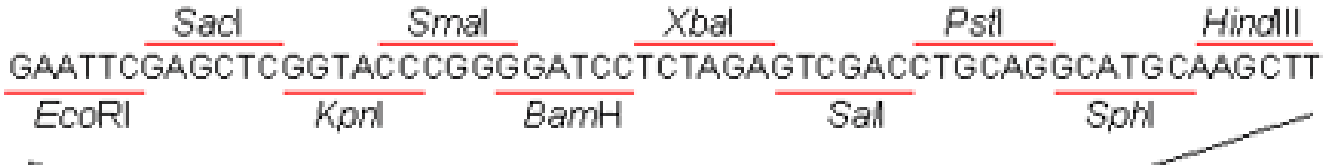


- Расщепление pBR322 по сайту PstI в гене устойчивости к ампициллину и лигирование с фрагментом ДНК приводит к получению рекомбинантных плазмид.
- Их отбирают по различной устойчивости к антибиотикам, рекомбинантные штаммы чувствительны к ампициллину.

Плазмида pUC19 – вектор отбора

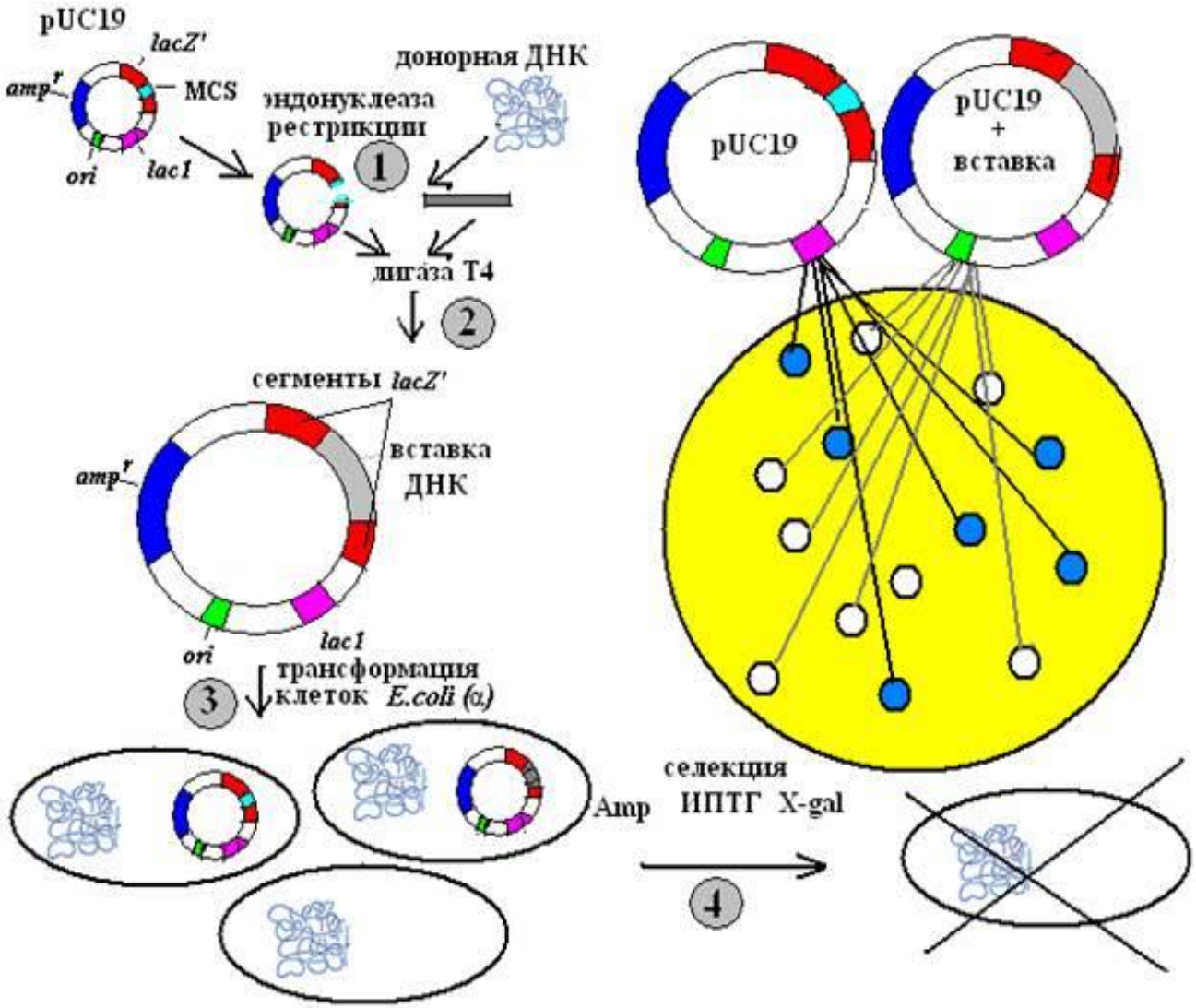


- Плазмида pUC19 содержит ген устойчивости к ампициллину и ген β-галактозидазы (lacZ) под индуцируемым tac-промотором.
- Полилинкер встроен в ген lacZ так, что не влияет на трансляцию β-галактозидазы.
- Если клетки с плазмидой pUC19 выращивать на среде с индуктором, то субстрат для фермента X-Gal в среде будет гидролизоваться и окрашивать колонии в синий цвет



МКС

Отбор с помощью плазмиды pUC19

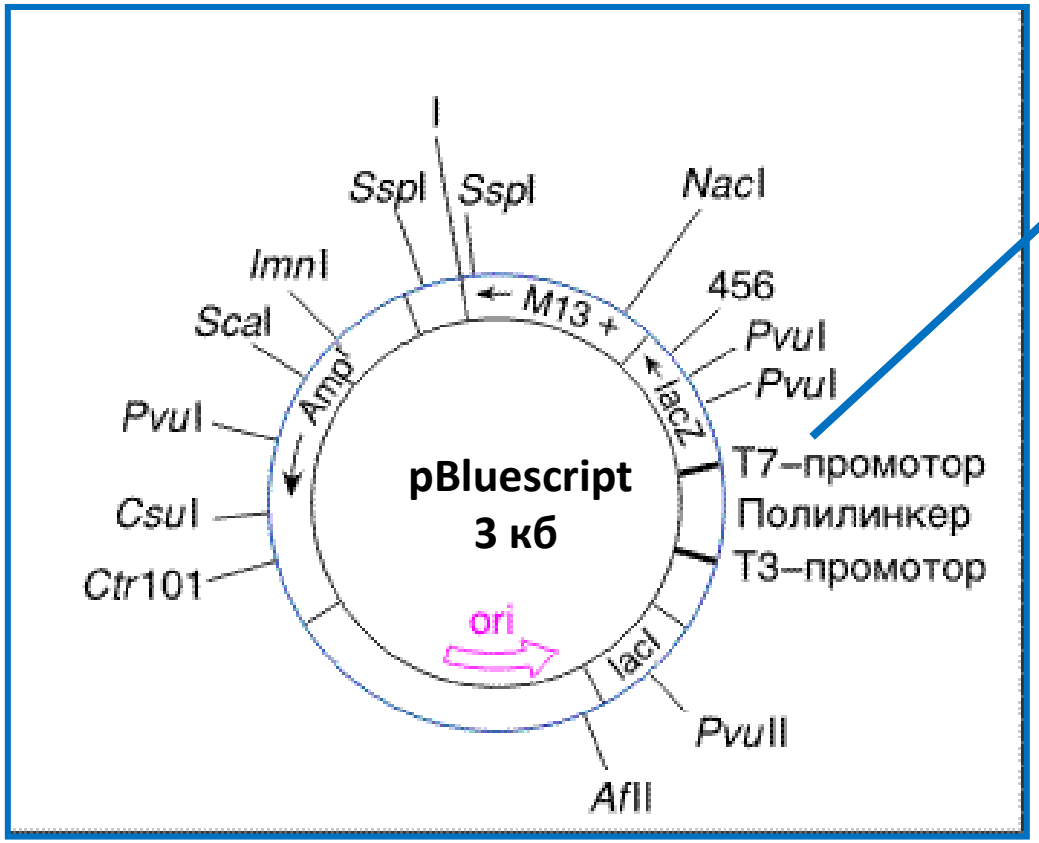


Нетрансформированные клетки не растут в присутствии ампициллина в среде.

Клетки, несущие интактную плазмиду, образуют на среде с ампициллином колонии синего цвета.

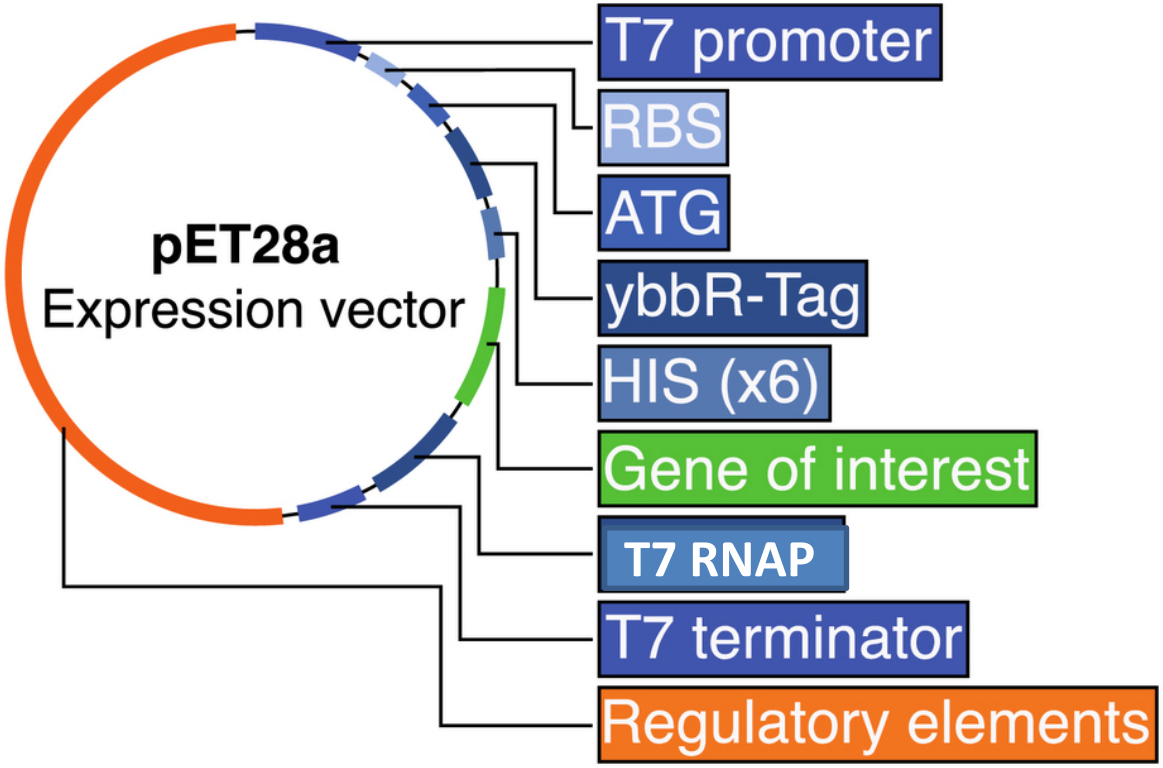
Клетки, несущие гибридную плазмиду, образуют на среде с X-Gal белые колонии, поскольку при встраивании в полилинкер чужеродной ДНК нарушается рамка считывания гена lacZ

Многофункциональная векторная плазмида Bluescript



1) Встроенный в полилинкер фрагмент ДНК контролируется промотором фага T7
2) Вектор содержит ген T7РНК-полимеразы для транскрипции с промотора T7 под *tac*-промотором
3) Вектор обладает межгенной областью (IG) фага f1, родственного фагу M13 и может работать как фагмида.

PET-векторы



- В pET векторах сильный промотор фага T7 запускает экспрессию рекомбинантного гена
- Плазмида кодирует N-концевые участки расщепления His-tag
- Экспрессия рекомбинантного белка индуцируется добавлением изопропил-тио-галактозида (IPTG) в культуральную среду

Специализированное назначение молекулярных векторов

Векторы-амплификаторы	До 3000 копий на клетку
Векторы экспрессии	Высокий выход продукта
Фьюжин-векторы (гибридные плазмиды)	Для оптимизации получения продуктов
Интегративные векторы	Для интеграции в геном
Векторы для направленной инактивации генов	Для целевой инактивации генов
Векторы секреции	Высокий выход продукта
Векторы отбора	Эффективность процедуры отбора
Челночные векторы	Для репликации в нескольких хозяевах
Многофункциональная векторная система	Различные функции