

# Основы генной инженерии

## Лекция 2

Ферменты (*продолжение*)

Векторы

# Изомеры рестриктаз

## ❖ *Изошизомеры*

Рестриктазы разных видов бактерий, узнающие одинаковые сайты рестрикции и одинаково их расщепляющие.

*Метилчувствительные рестриктазы:*

*HpaII* и *MspI* (CCGG) – первый не расщепляет ДНК, если хотя бы один из остатков C метилирован;

N-метилирование остатков A – *Sau3A* (и GATC и G<sup>Me</sup>ATC), *DpnI* (только G<sup>Me</sup>ATC), *MboI* (только GATC)

## ❖ *Гетерошизомеры*

Узнают одинаковые сайты рестрикции, но по-разному их расщепляют (*KpnI* - G↓GTACC, *Asp7181* - GGTA↓C)

## ❖ *Изокаудомеры*

Узнают разные сайты рестрикции, но создают одинаковые липкие концы. Лигирование с потерей сайта рестрикции

# 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

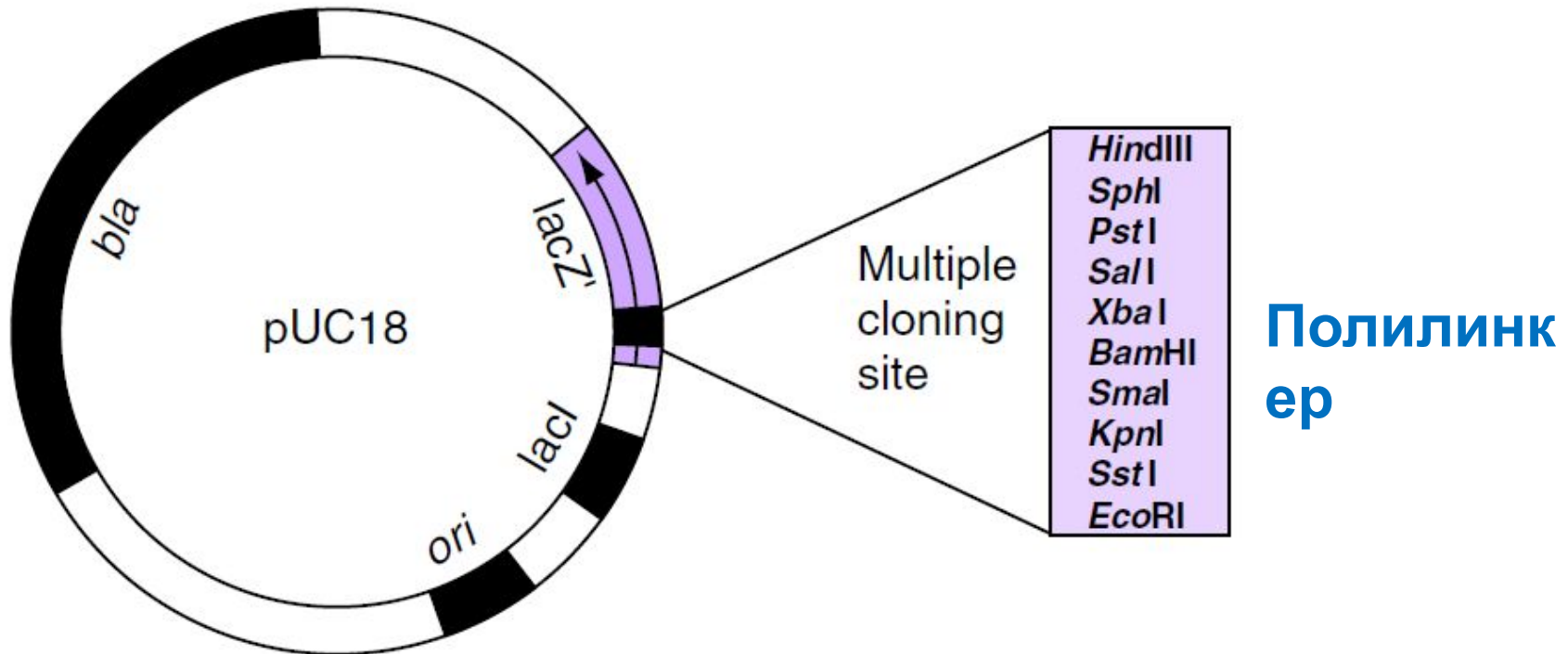
A microscopic image showing numerous circular, yellowish-orange plasmid DNA molecules against a dark blue background. The molecules vary in size and some appear to be intertwined. A central blue rectangular box contains the title text.

# Плазмидные векторы

# Биологические свойства бактериальных плазмид, используемые в векторах

- ◆ Молекулярные эндосимбионты – автономная репликация
- ◆ Негативный контроль числа копий
  - ◆ Низкокопийные (1-2 копии на клетку)
  - ◆ Высококопийные (10-100 копий на клетку)
- ◆ Консервативность размера
  - ◆ Минимальный размер определяется элементами внутриклеточной автономии
  - ◆ Ограничения на размер вставки чужеродной ДНК
- ◆ Совместимость разных плазмид в клетке
  - ◆ Группы несовместимости
  - ◆ Случайная сегрегация в дочерние клетки

# Плазмидный вектор pUC18



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

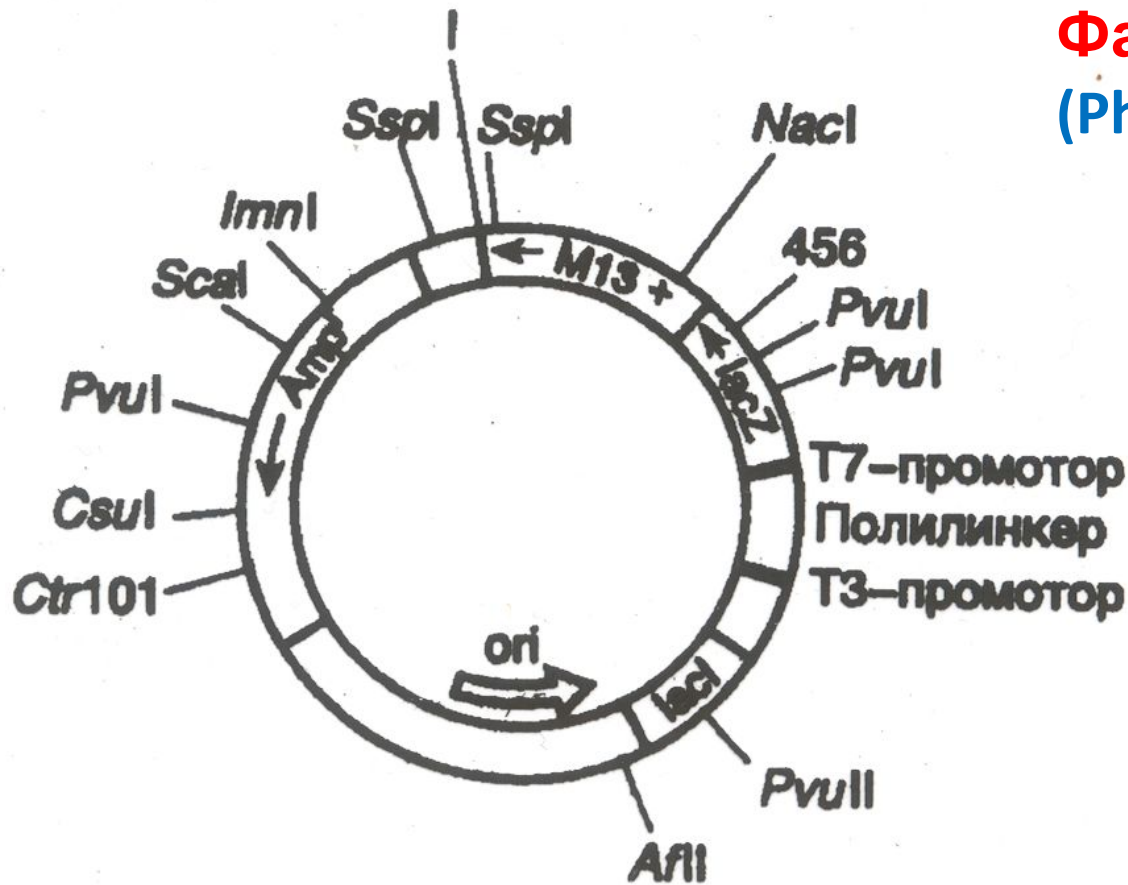
***ori*** – Точка начала репликации (origin)

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

***lacI*** – Ген Lac-репрессора (Индуктор – IPTG)

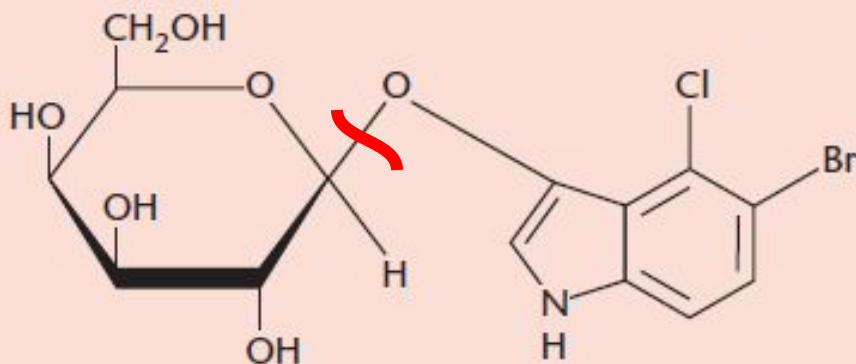


# Плазмидный вектор Bluescript

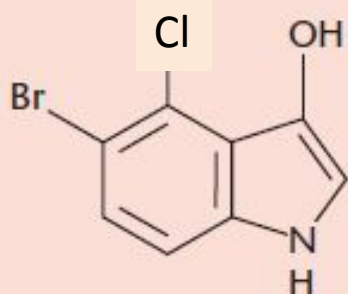
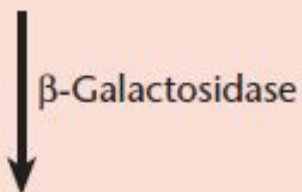


**Фагмида**  
(Phagemid)

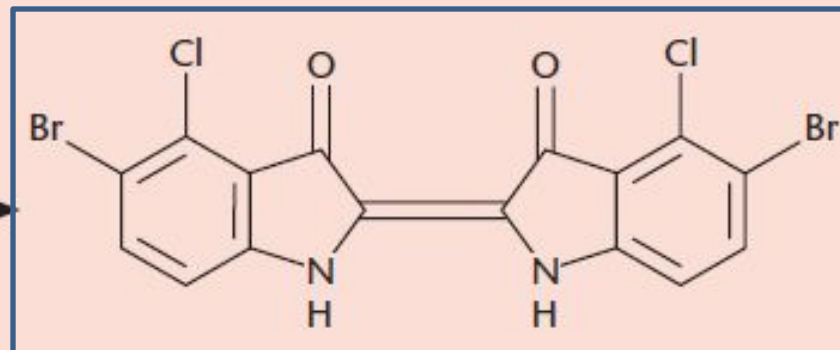
# Расщепление Xgal β-галактозидазой



5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (Xgal)



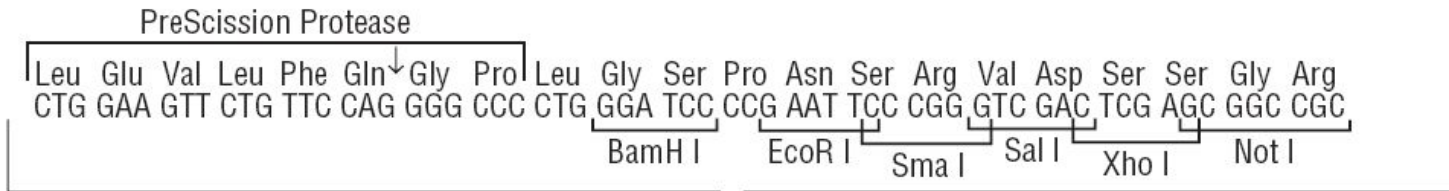
5-Bromo-4-chloroindoxyl



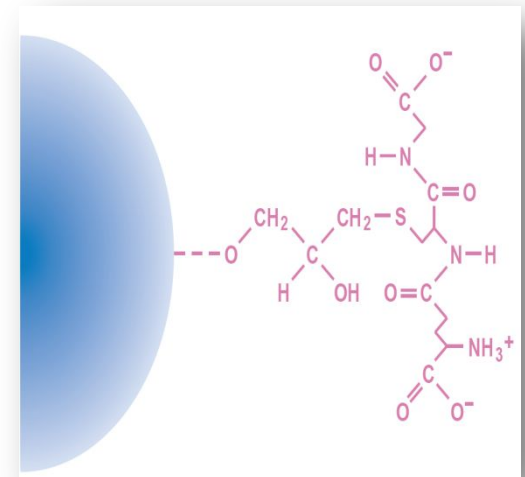
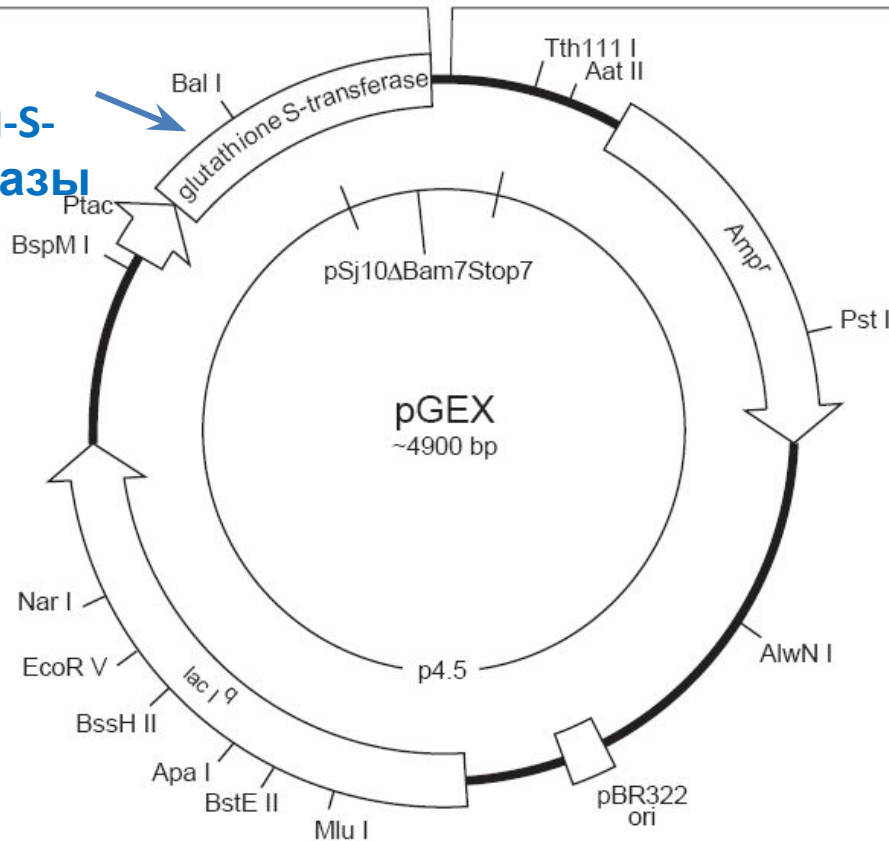
5,5'-Dibromo-4,4'-dichloroindigo



# Вектор для слияния генов pGEX-P-3

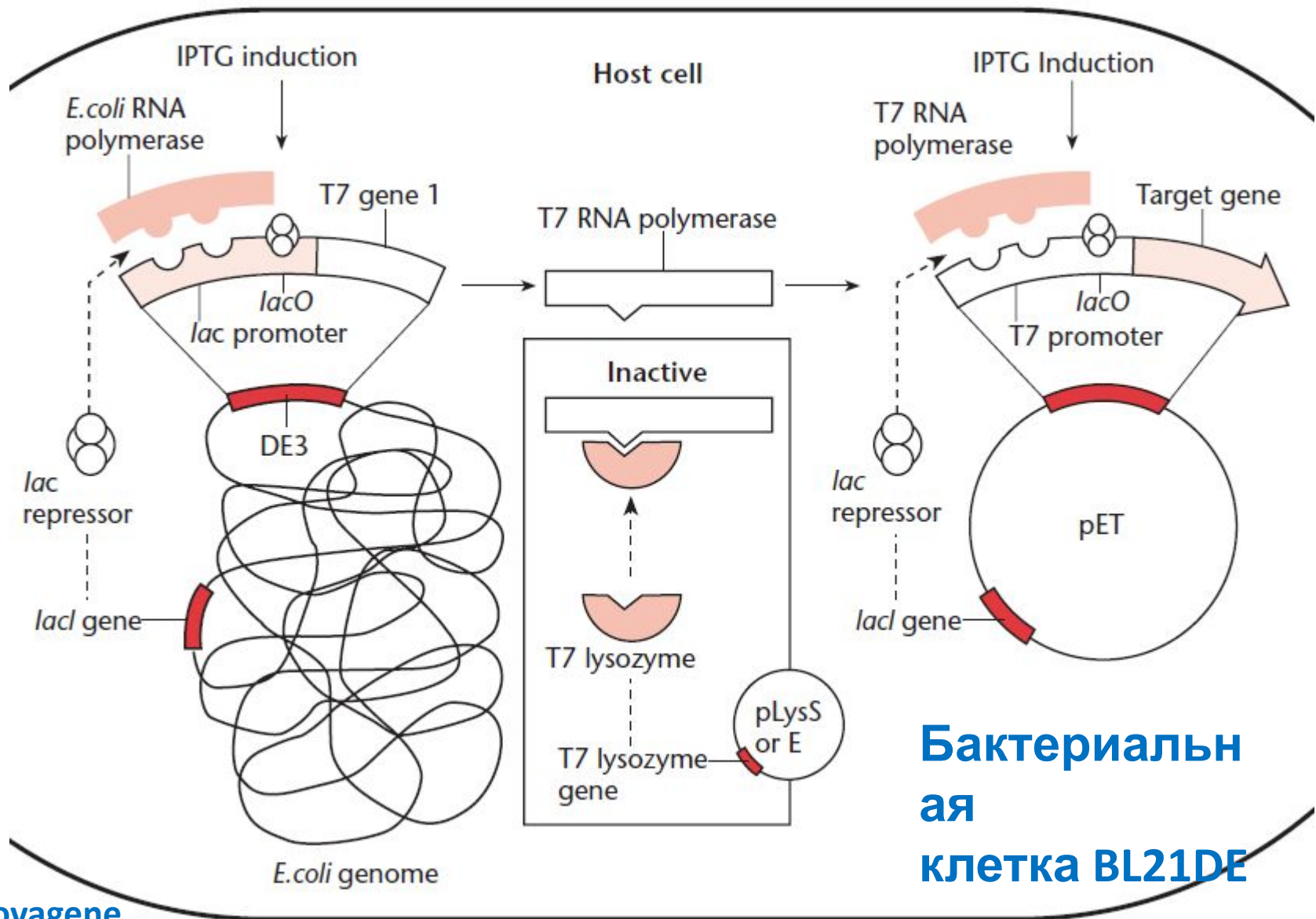


**Ген  
глутатион-S-  
трансферазы**



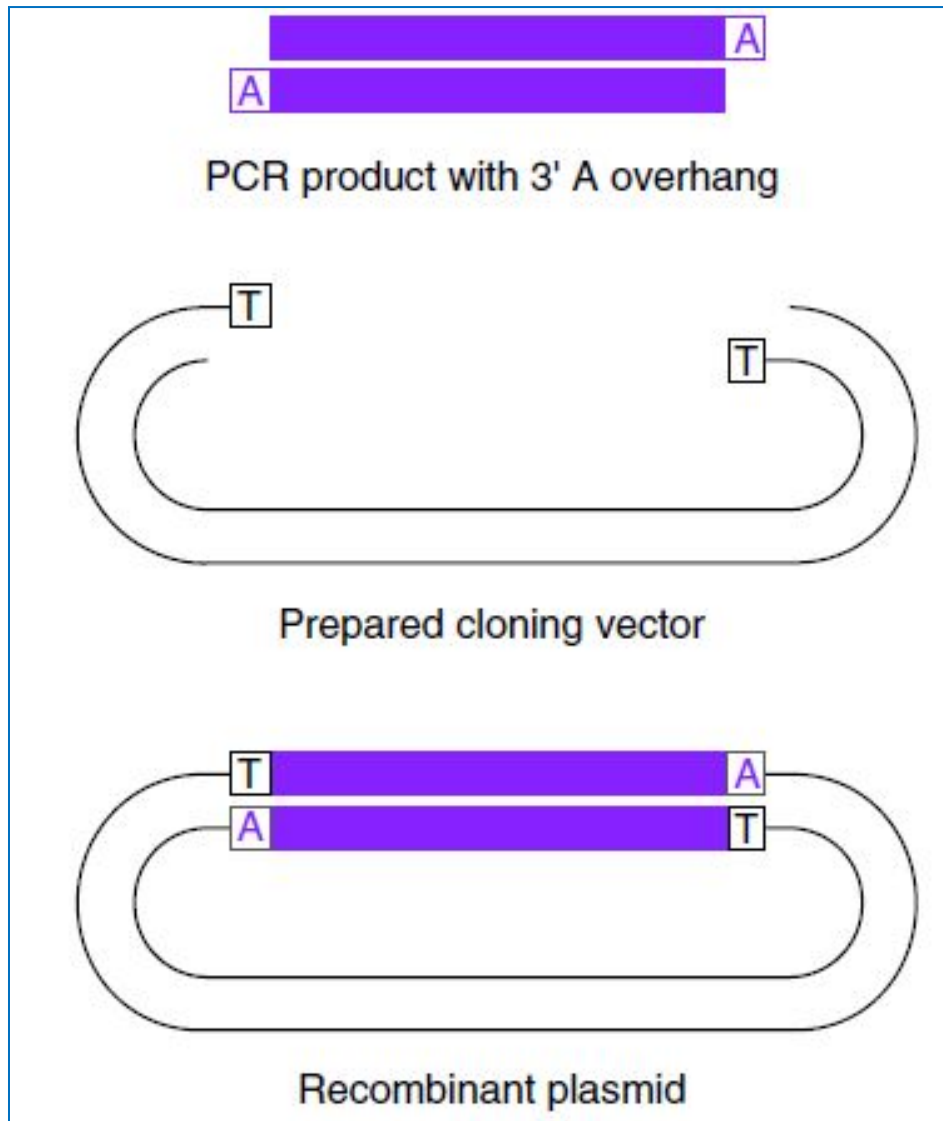
**Иммобилизованный  
глутатион**

# Регуляция экспрессии генов в Векторе pET



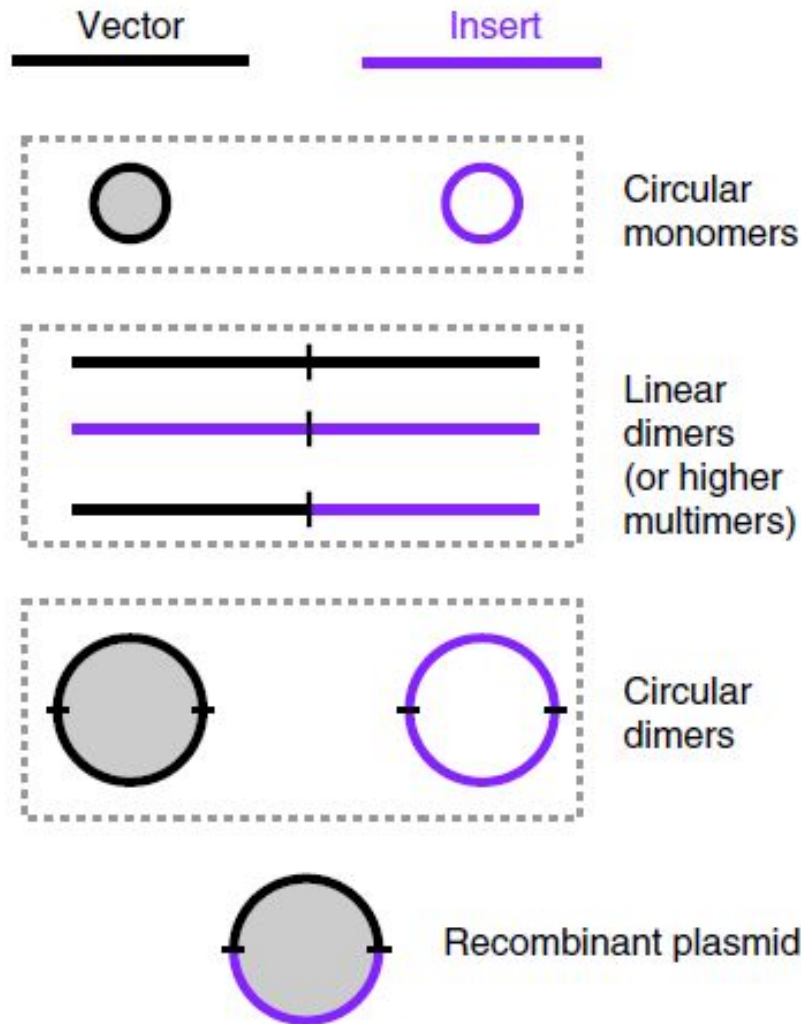
**Бактериальная  
клетка BL21DE**

# TA-Клонирование продуктов ПЦР



**Таq-ДНК-полимераза образует в продукте ПЦР 3'-выступающие А-концы**

# Побочные продукты лигирования вектора и вставки



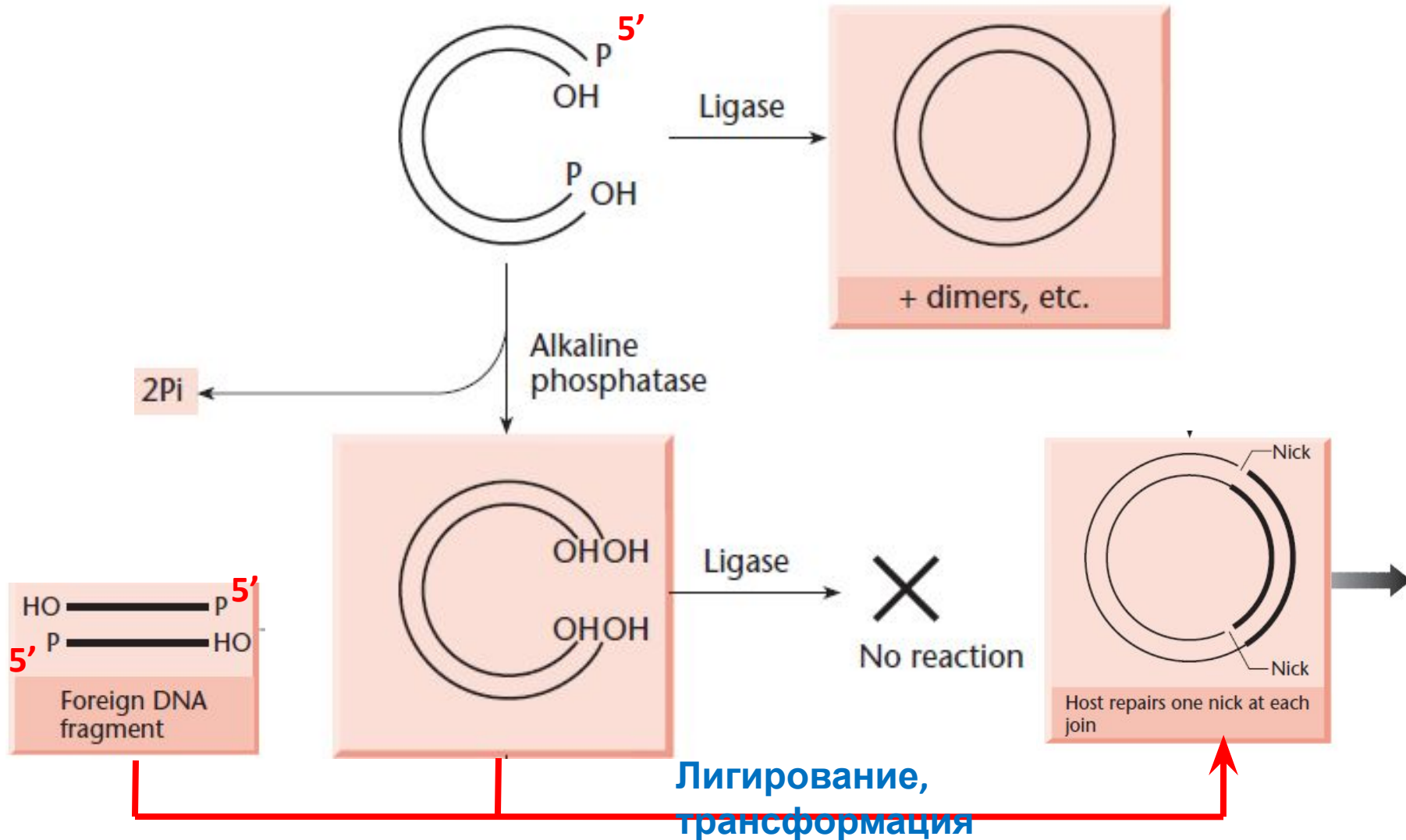
**Кольцевые мономеры**

**Линейные ди-, три-, ... мультимеры**

**Кольцевые димеры**

**Рекомбинантная плазмида**

# Предотвращение образования плазмидного вектора без вставки с помощью щелочной фосфатазы





The image is an electron micrograph showing several long, thin, and highly convoluted DNA molecules. These molecules are stained and appear as bright yellow-orange lines against a dark, grainy reddish-brown background. The molecules vary in length and complexity, with some showing multiple loops and branches. A semi-transparent dark red horizontal bar is overlaid across the center of the image, containing white text.

**Векторы на основе хромосомы  
фага  $\lambda$**

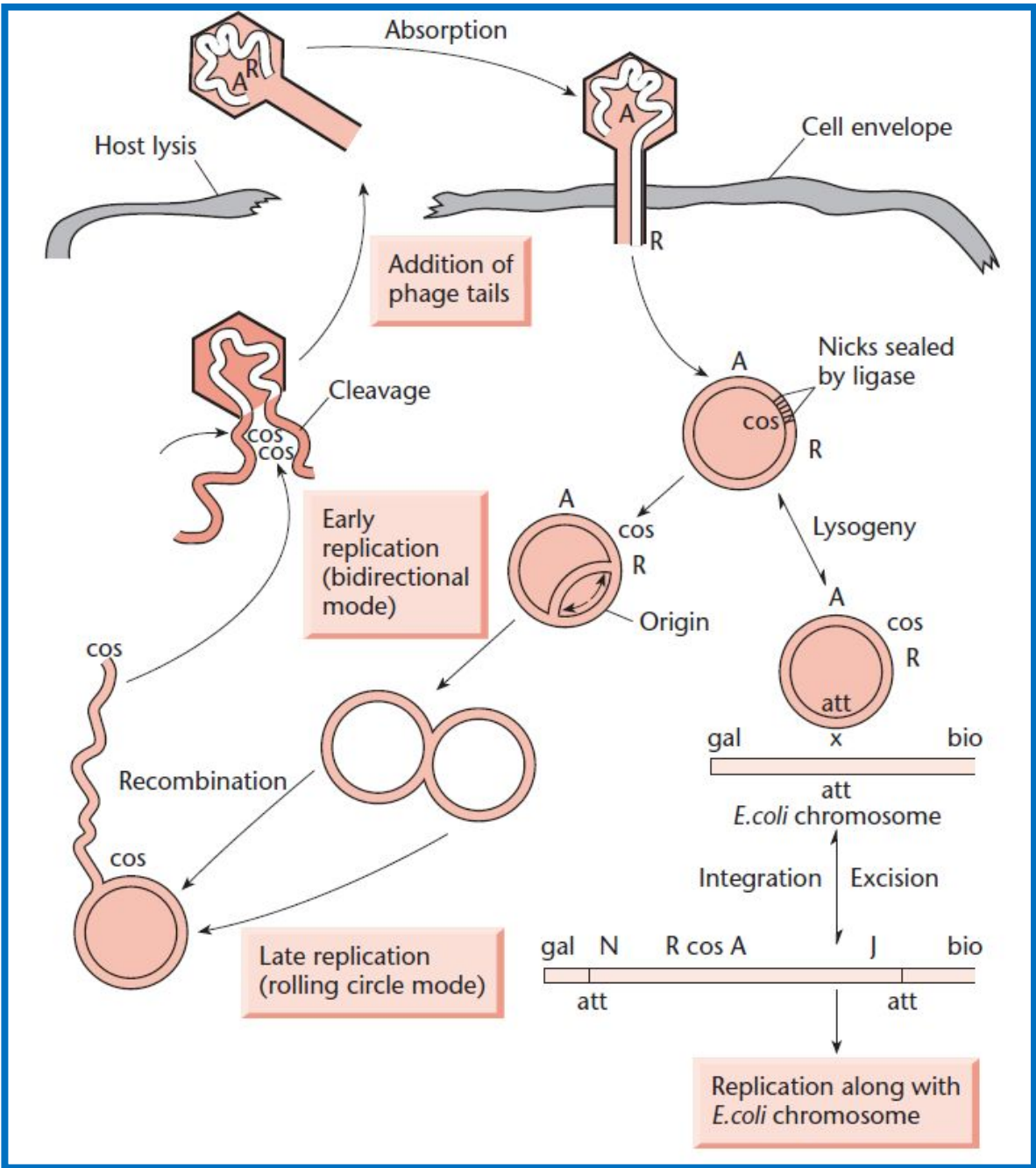


# Жизненный цикл фага λ

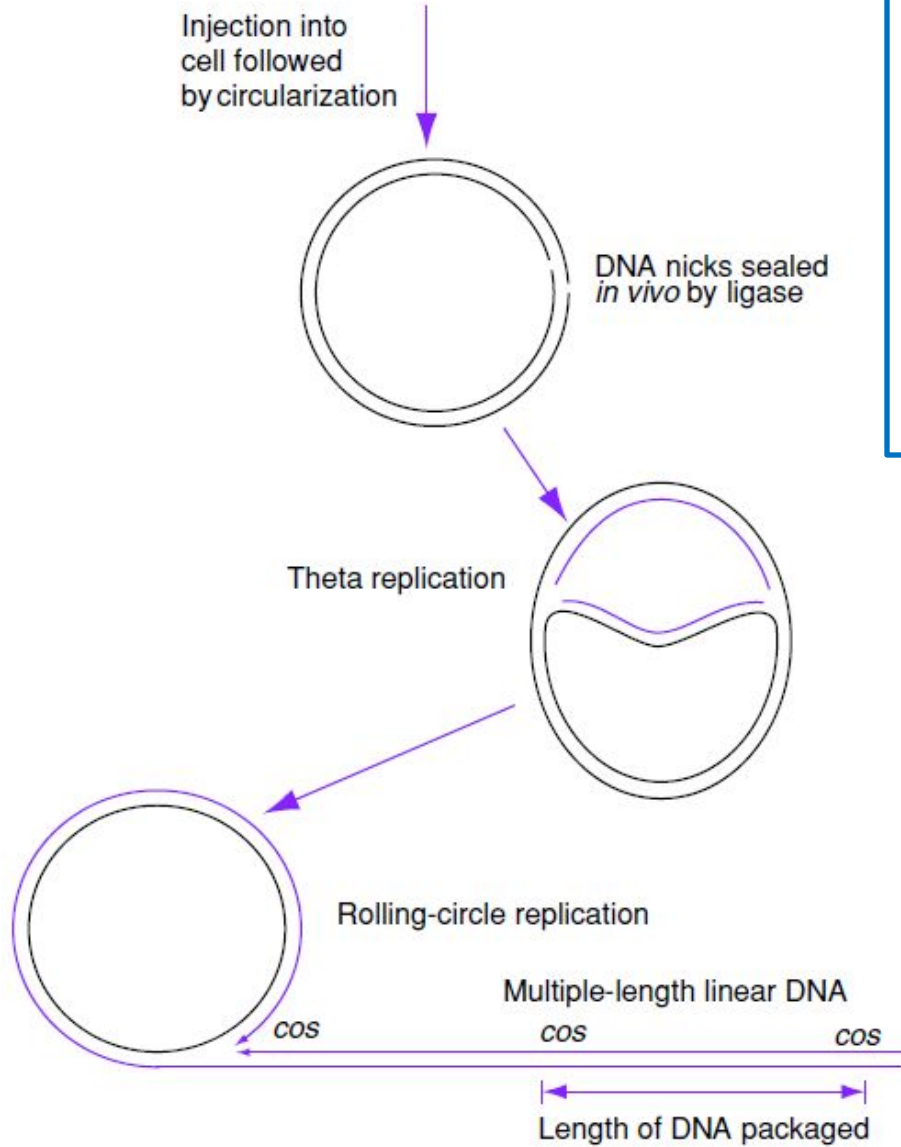
Два пути развития бактериофага:

**1. Лизогенный:**  
интеграция в хромосому хозяина

**2. Литический:**  
а) Двухсторонняя θ-репликация;  
б) Катящееся кольцо

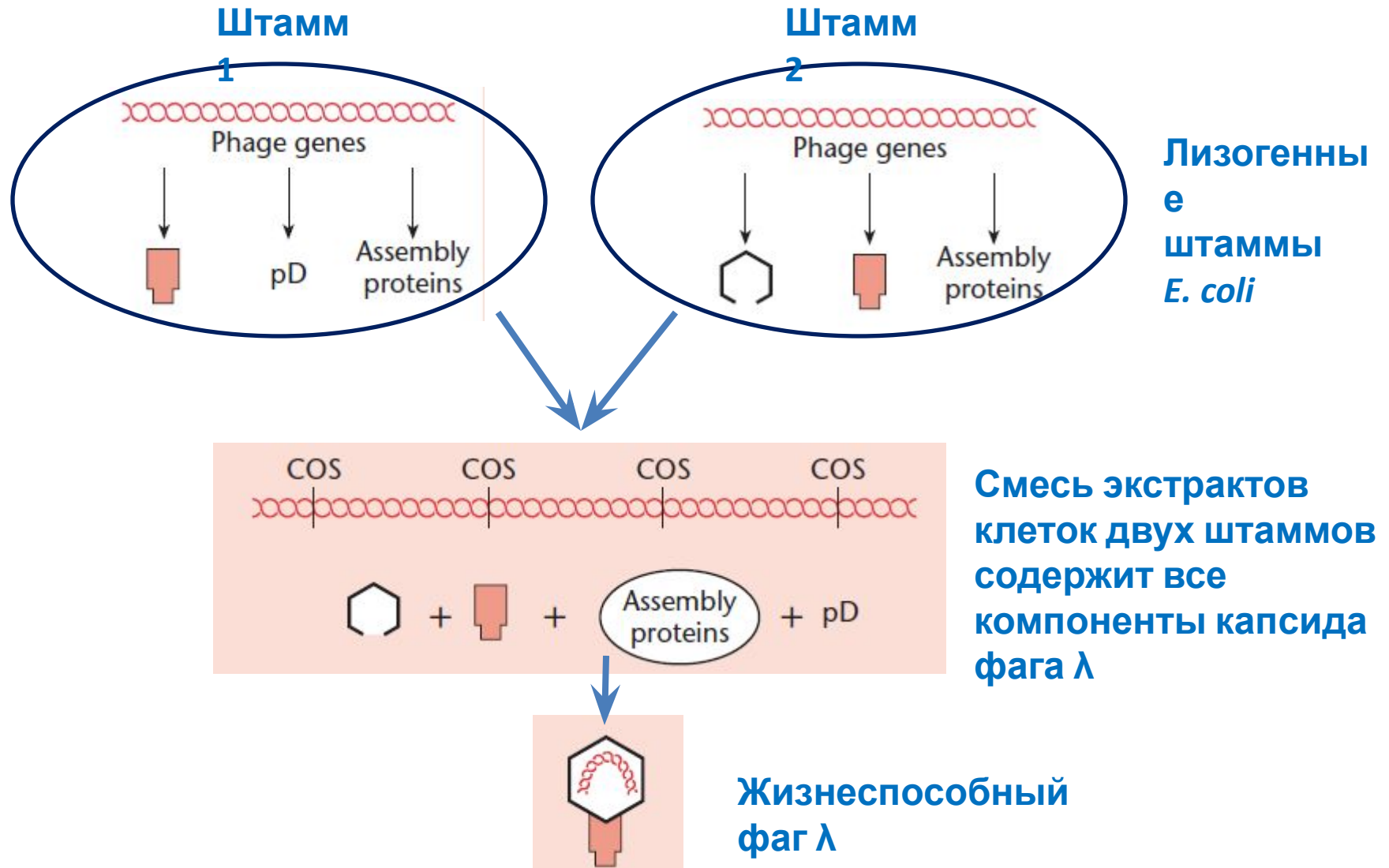


Linear DNA, with sticky ends, in phage particle

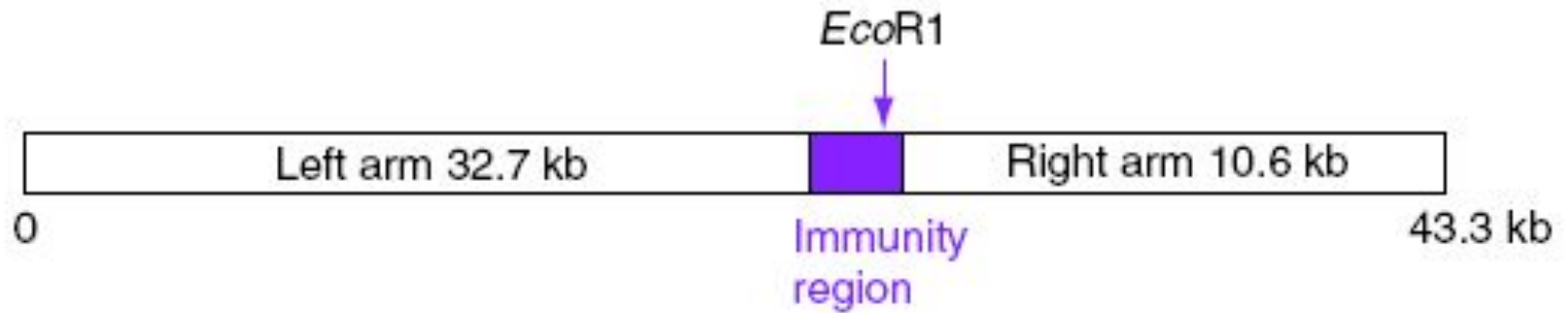


# Репликация ДНК фага λ

# Упаковка ДНК фага λ *in vitro*

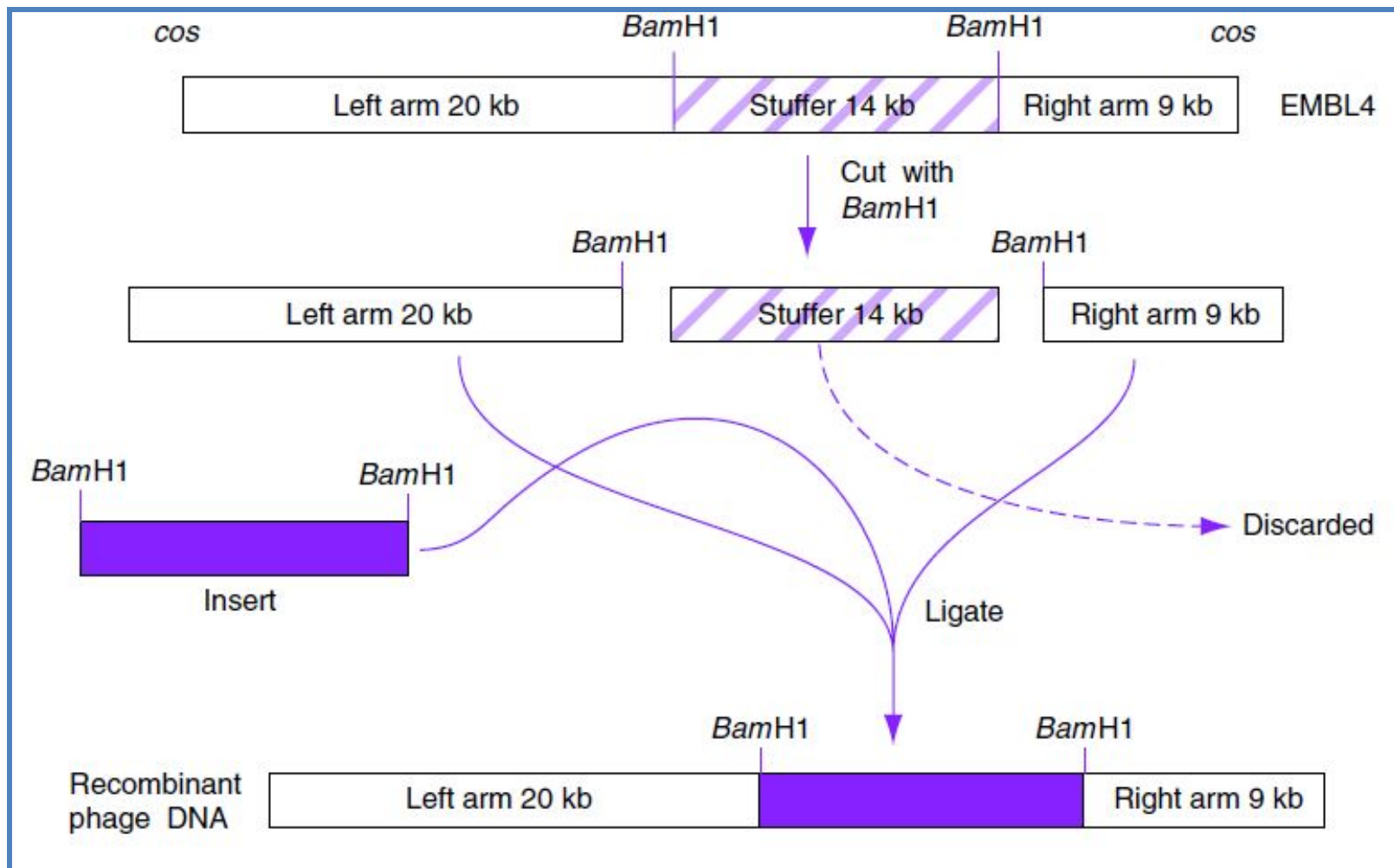


# Инсерционный вектор лямбда gt10

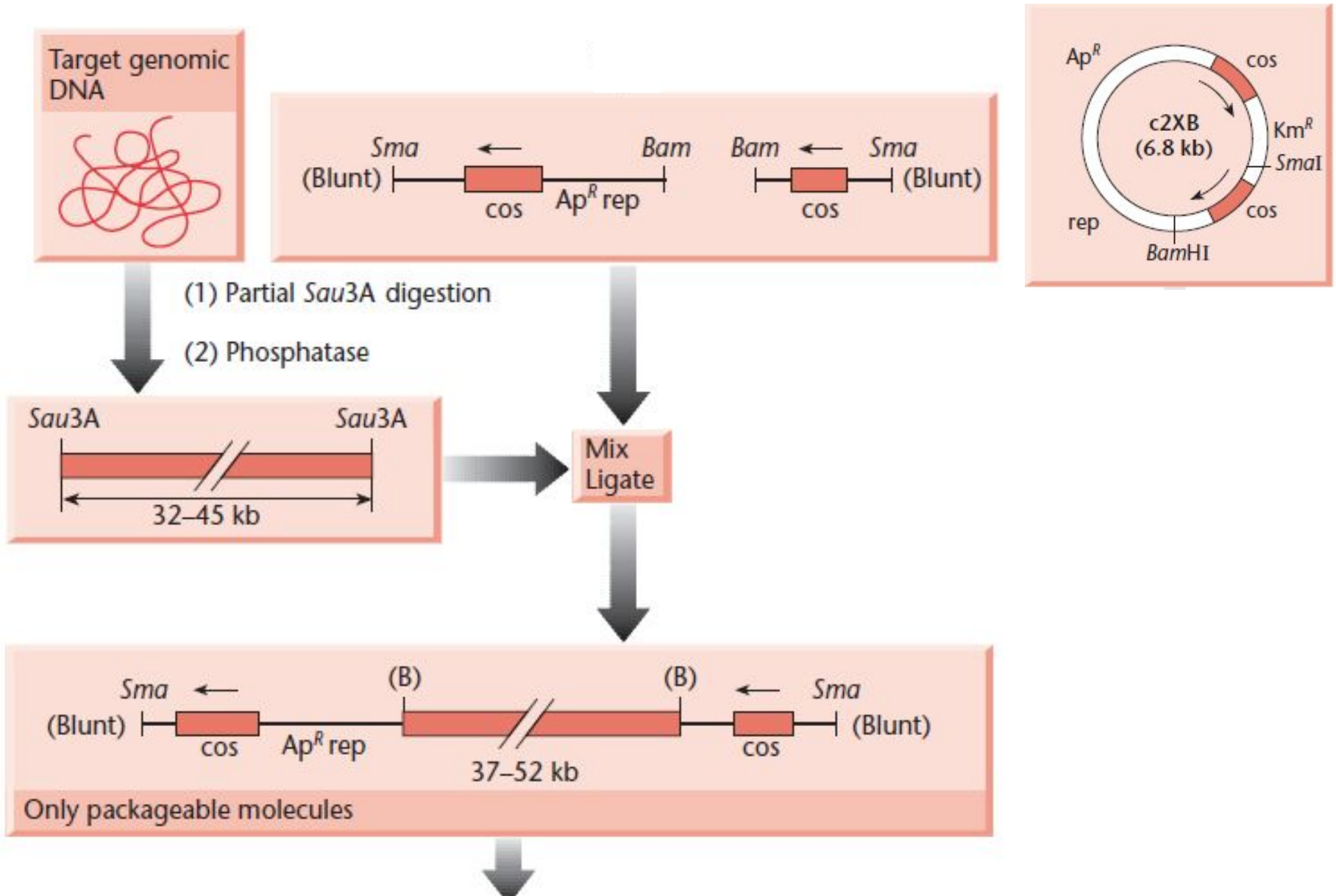


Вставка чужеродной ДНК до **7.6 т.п.о.** по *EcoRI*-сайту

# Использование вектора лямбда EMBL4 с замещением внутренней области



# Космидный вектор (космида) c2XB

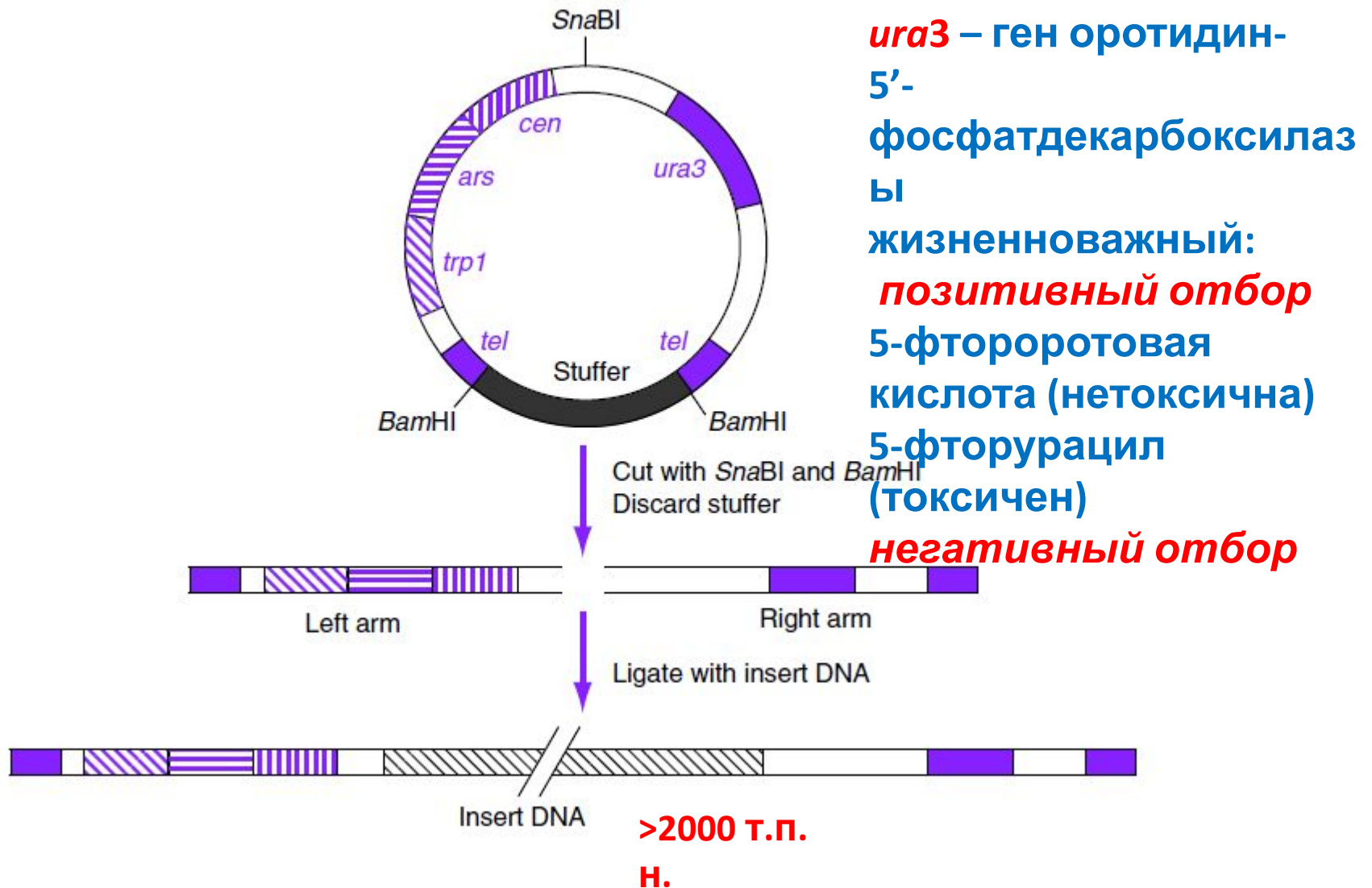




# Искусственные хромосомы



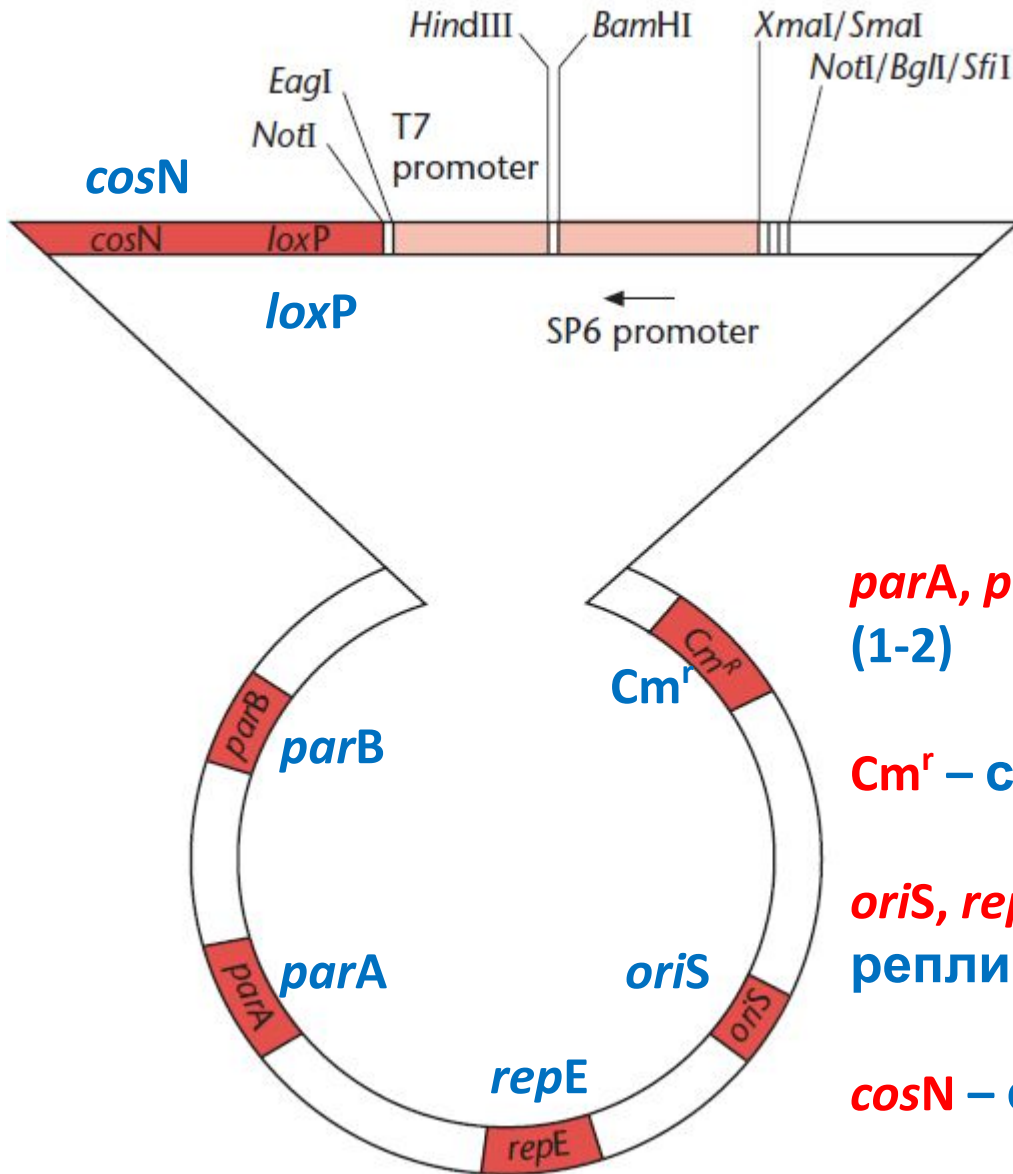
# Искусственная хромосома дрожжей YAC (Yeast Artificial Chromosome)



# Бактериальная искусственная хромосома (ВАС)

**Емкость** – 300 т.п.н.

**Стабилен** на протяжении 100 поколений



***parA*, *parB*** – контроль числа копий (1-2)

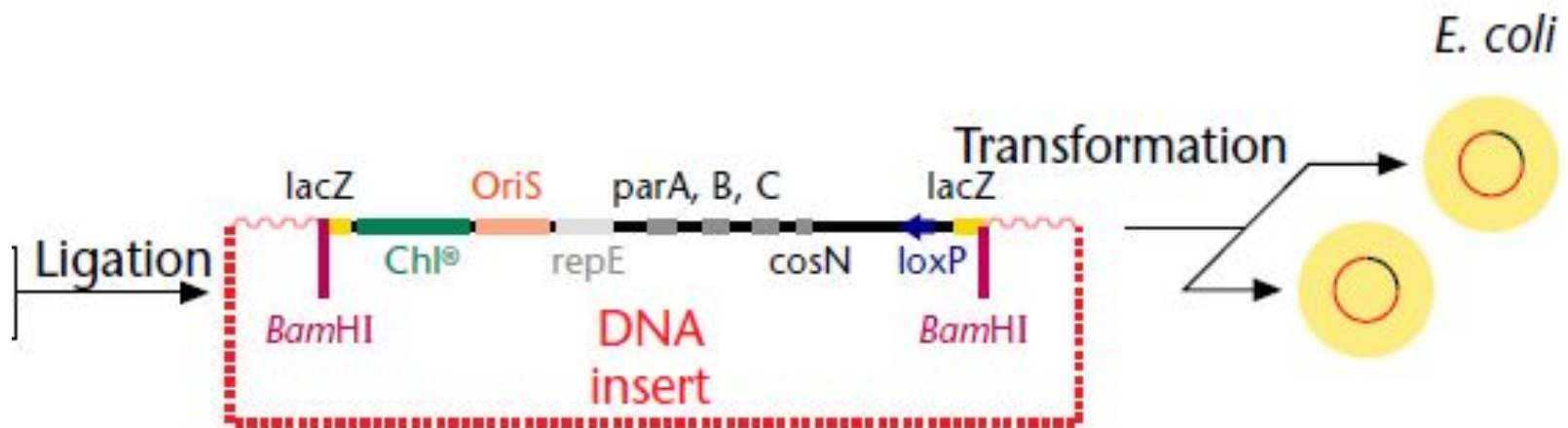
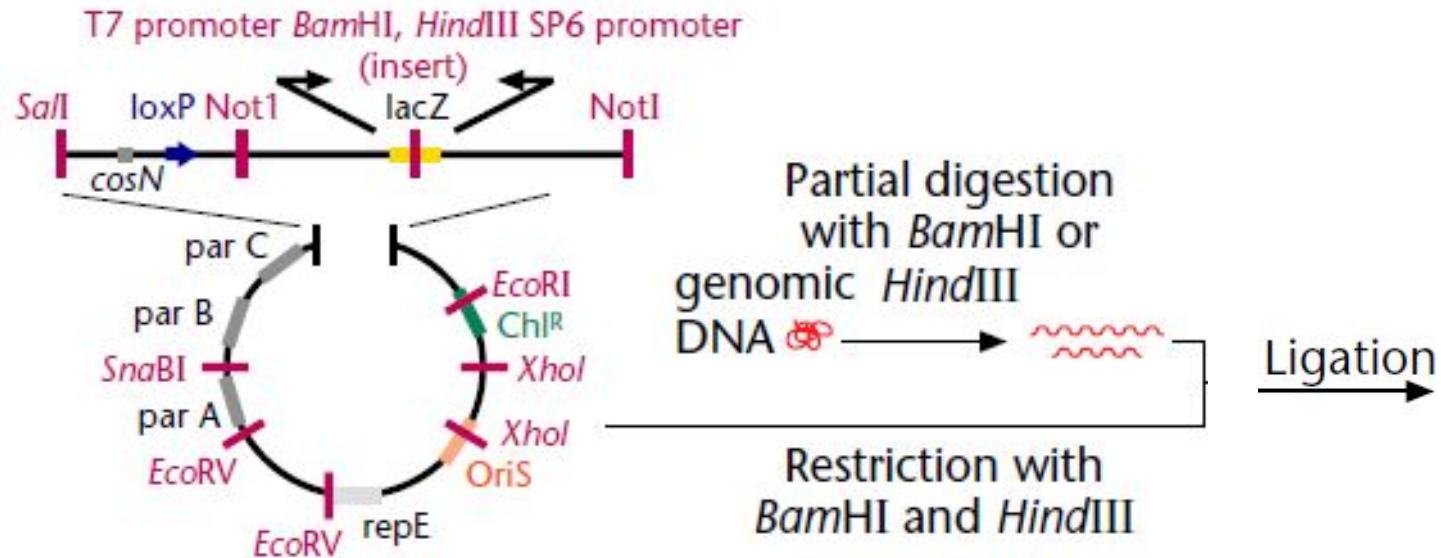
***Cm<sup>r</sup>*** – селектируемый маркер

***oriS*, *repE*** – односторонняя репликация

***cosN*** – сайт терминазы  $\lambda$

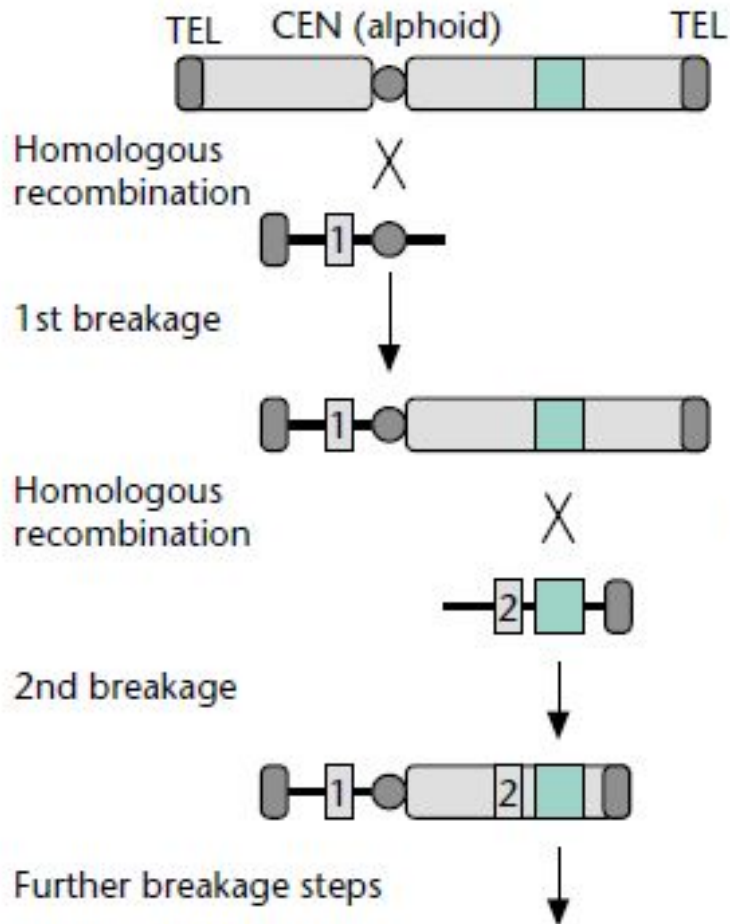
***loxP*** – *cre*-рекомбиназа фага P1

# Клонирование ДНК с помощью ВАС

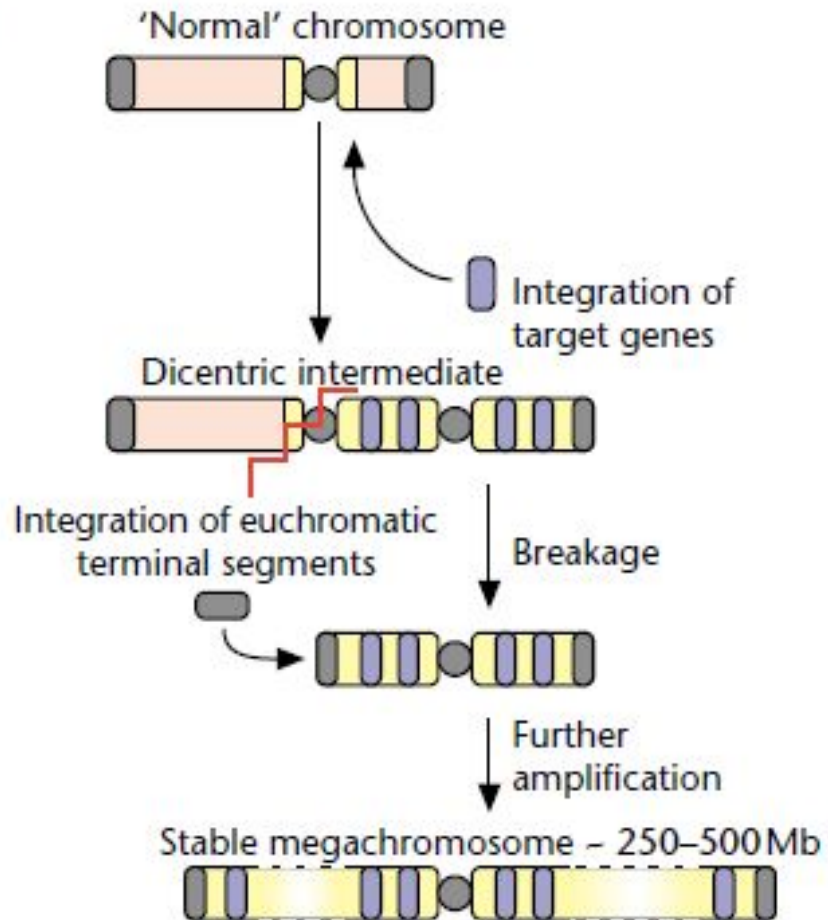


# Получение искусственных хромосом ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ «СВЕРХУ-ВНИЗ»

## Targeted chromosome fragmentation (TCF)

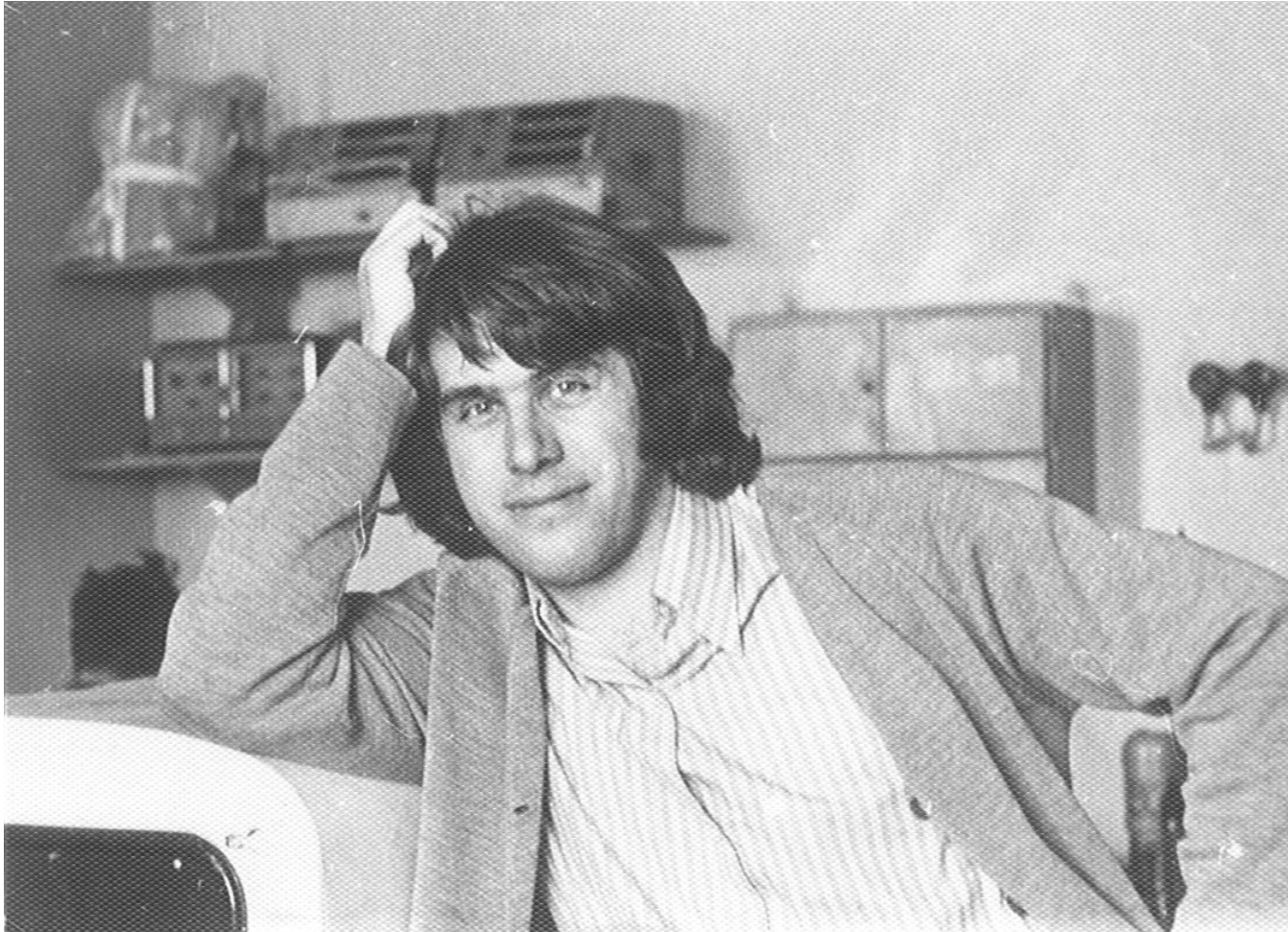


## Satellite DNA-based Artificial Chromosome (SATAC)





# Евгений Витальевич Ананьев, 1970-е

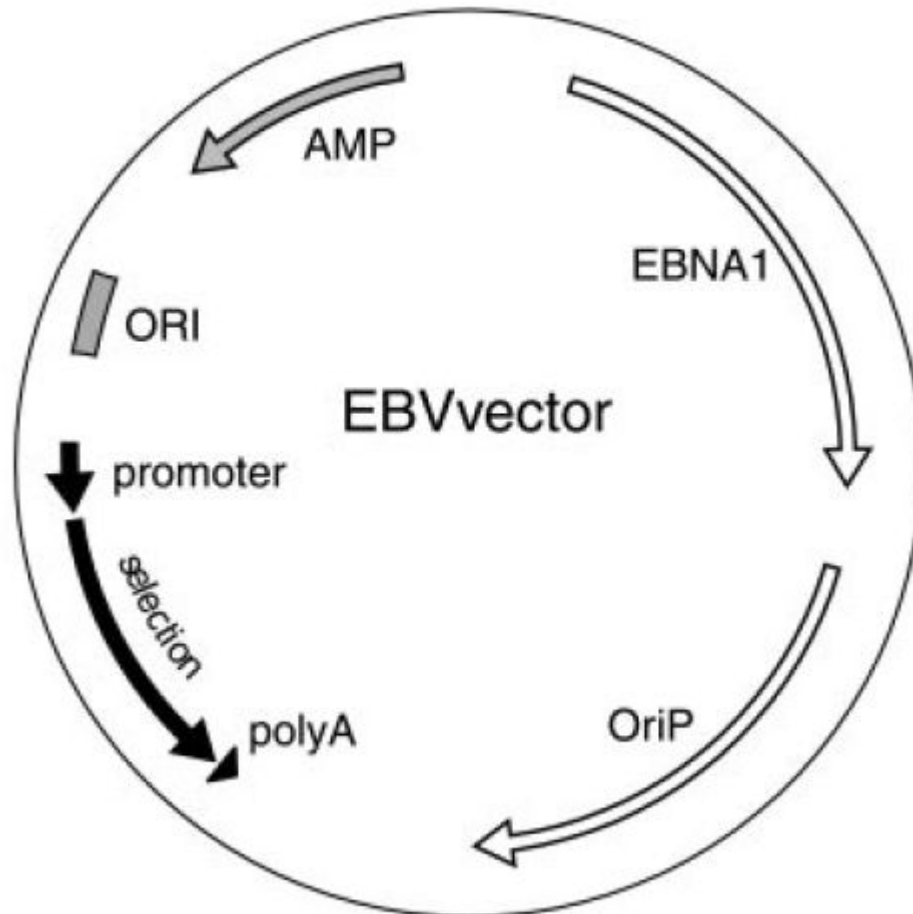


Искусственные  
хромосомы  
кукурузы

Первооткрыват  
ель мобильных  
генетических  
элементов у  
дрозофилы



# Внехромосомные (эписомные) векторы для экспрессии рекомбинантных генов в клетках ЖИВОТНЫХ



Челночный эписомный вектор на основе вируса Эпштейна-Барр

**EBNA1** – Epstein-Barr nuclear antigen 1

**OriP** – Область начала репликации в клетках животных

**ORI** – Область начала репликации в бактериальных клетках

**AMP** – Ген устойчивости к ампициллину

**polyA** – сайт

полиаденилирования

20-300 копий на клетку. Стабильно распределяются между дочерними клетками

# 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

# Способы введения ДНК в бактериальные клетки

- ❖ Трансформация  $10^7$ -  $10^8$  колоний/мкг ДНК
  - ❖ каналы, холодовой шок, ионы магния, рубидия гексаминкобальтхлорид
- ❖ Трансфекция
- ❖ Электропорация  $10^9$ -  $10^{10}$  колоний/мкг ДНК
  - ❖ шок электрическим полем высокой напряженности (3-5 мс), поляризация мембран, обратимое повреждение