

Микробные объекты в биотехнологии

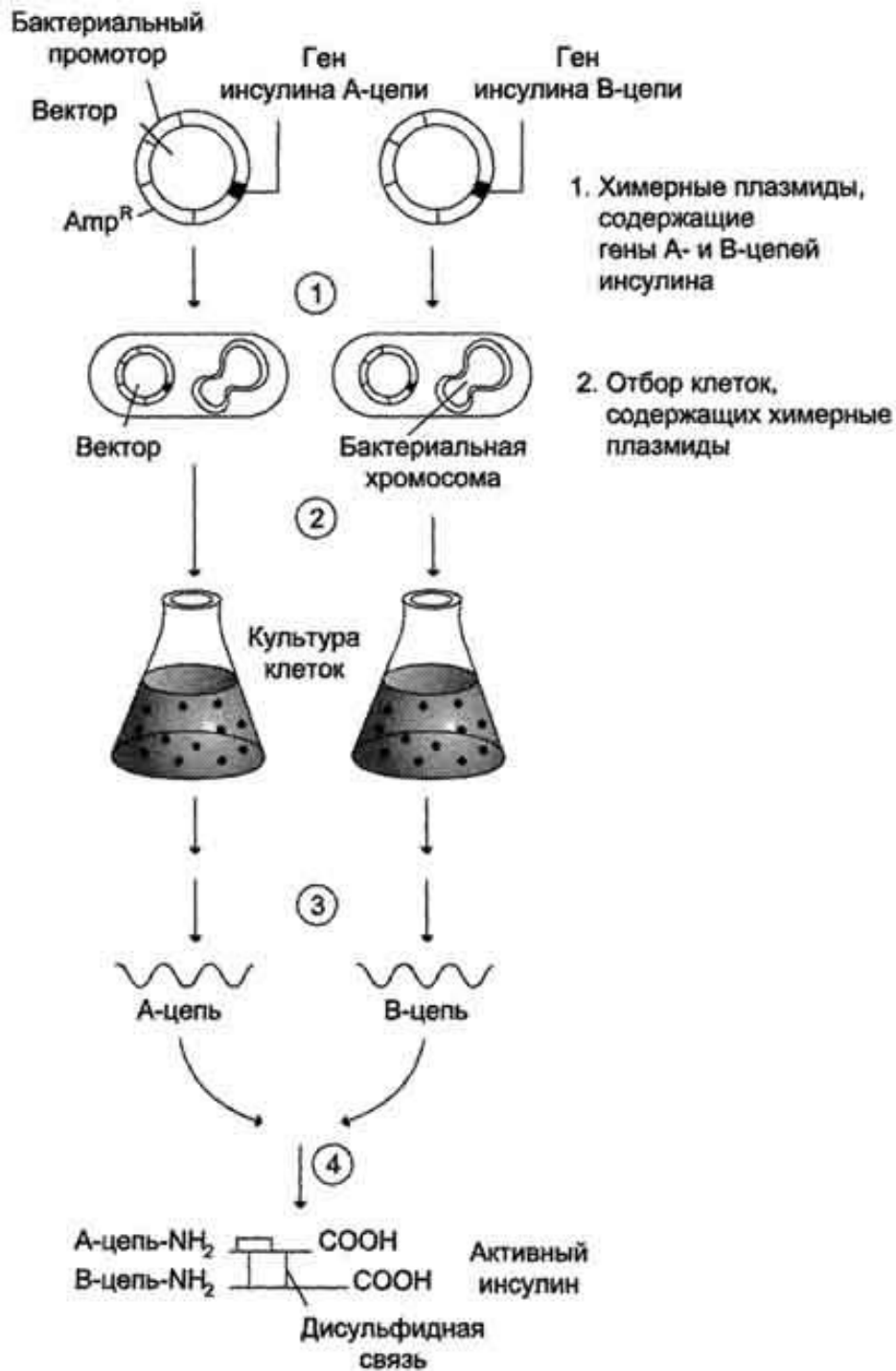
Принципы генной инженерии микроорганизмов

к.х.н., доцент кафедры
микробиологии
Герловский Денис Олегович

Минск, 2015

Генетическая инженерия (генная инженерия) — совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введение их в другие организмы. Генетическая инженерия не является наукой в широком смысле, но является инструментом биотехнологии, используя методы таких биологических наук, как молекулярная и клеточная биология, цитология, микробиология, вирусология

Генная инженерия служит для получения желаемых качеств изменяемого или генетически модифицированного организма. В отличие от традиционной селекции, в ходе которой генотип подвергается изменениям лишь косвенно, генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат, применяя технику молекулярного клонирования. Примерами применения генной инженерии являются получение новых генетически модифицированных сортов зерновых культур, производство человеческого инсулина путём использования генномодифицированных бактерий, производство эритропоэтина в культуре клеток или новых пород экспериментальных мышей для научных исследований.



Получение инсулина человека в клетках *E. coli*.

- 1 - трансформация клеток *E. coli* плазмидами, которые содержат гены, кодирующие структуру А- и В-цепей инсулина;
- 2 - синтез А- и В-цепей инсулина в процессе выращивания культуры трансформированных клеток *E. coli*;
- 3 - выделение и очистка А- и В-цепей инсулина;
- 4 - пространственная укладка А- и В-цепей (инсулина и окисление остатков цистеина)

Основой микробиологической, биосинтетической промышленности является бактериальная клетка. Необходимые для промышленного производства клетки подбираются по определённым признакам, самый главный из которых — способность производить, синтезировать, при этом в максимально возможных количествах, определённое соединение — аминокислоту или антибиотик, стероидный гормон или органическую кислоту. Иногда надо иметь микроорганизм, способный, например, использовать в качестве «пищи» нефть или сточные воды и перерабатывать их в биомассу или даже вполне пригодный для кормовых добавок белок. Иногда нужны организмы, способные развиваться при повышенных температурах или в присутствии веществ, безусловно смертельных для других видов микроорганизмов.

Задача получения таких промышленных штаммов очень важна, для их видоизменения и отбора разработаны многочисленные приёмы активного воздействия на клетку — от обработки сильнодействующими ядами, до радиоактивного облучения. Цель этих приёмов одна — добиться изменения наследственного, генетического аппарата клетки. Их результат — получение многочисленных микробов-мутантов, из сотен и тысяч которых учёные потом стараются отобрать наиболее подходящие для той или иной цели. Создание приёмов химического или радиационного мутагенеза было выдающимся достижением биологии и широко применяется в современной биотехнологии.

Но их возможности ограничиваются природой самих микроорганизмов. Они не способны синтезировать ряд ценных веществ, которые накапливаются в растениях, прежде всего в лекарственных и эфирномасличных. Не могут синтезировать вещества, очень важные для жизнедеятельности животных и человека, ряд ферментов, пептидные гормоны, иммунные белки, интерфероны да и многие более просто устроенные соединения, которые синтезируются в организмах животных и человека. Разумеется, возможности микроорганизмов далеко не исчерпаны. Из всего изобилия микроорганизмов использована наукой, и особенно промышленностью, лишь ничтожная доля. Для целей селекции микроорганизмов большой интерес представляют, например, бактерии анаэробы, способные жить в отсутствие кислорода, фототрофы, использующие энергию света подобно растениям, хемоавтотрофы, термофильные бактерии, способные жить при температуре, как обнаружилось недавно, около 110 °С, и др.⁷

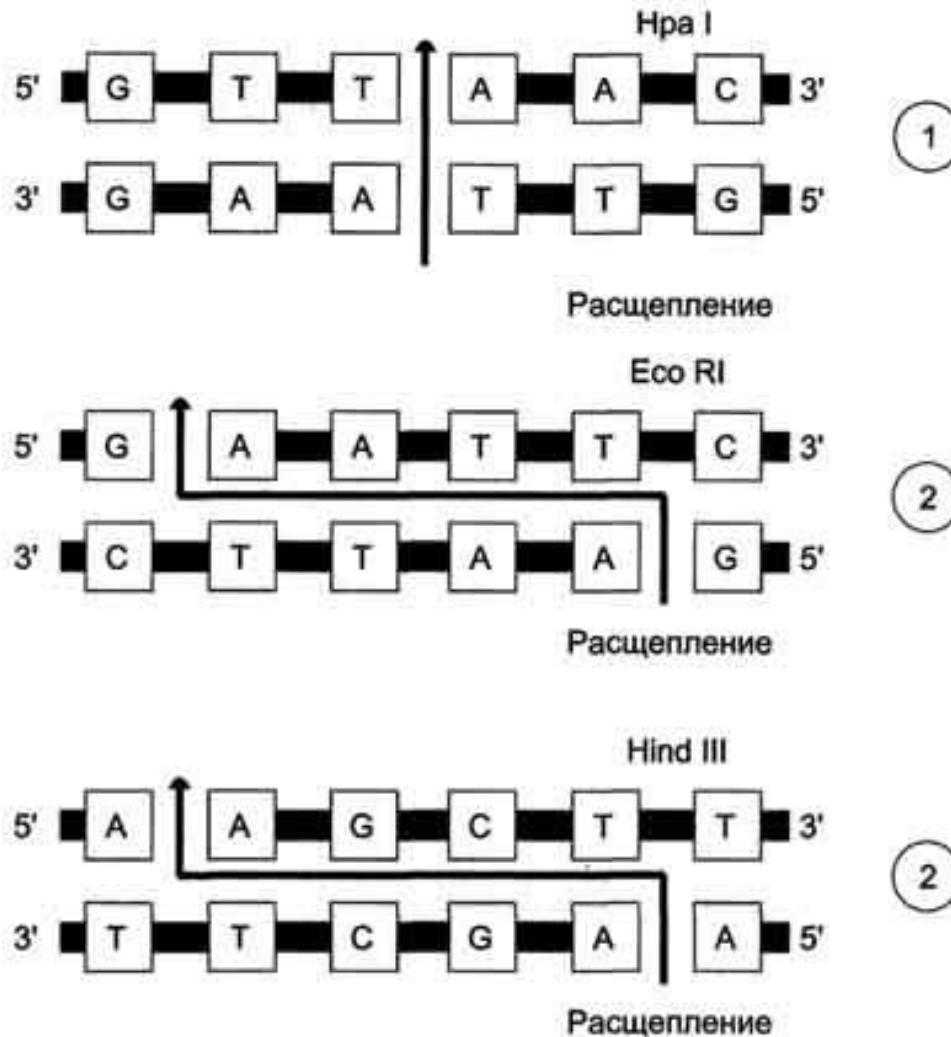
Во второй половине XX века было сделано несколько важных открытий и изобретений, лежащих в основе генной инженерии. Успешно завершились многолетние попытки «прочитать» ту биологическую информацию, которая «записана» в генах. Эта работа была начата английским учёным Ф. Сенгером и американским учёным У. Гилбертом (Нобелевская премия по химии 1980 г.). Как известно, в генах содержится информация-инструкция для синтеза в организме молекул РНК и белков, в том числе ферментов. Чтобы заставить клетку синтезировать новые, необычные для неё вещества, надо чтобы в ней синтезировались соответствующие наборы ферментов. А для этого необходимо или целенаправленно изменить находящиеся в ней гены, или ввести в неё новые, ранее отсутствовавшие гены. Изменения генов в живых клетках — это мутации. Они происходят под действием, например, мутагенов — химических ядов или излучений. Но такие изменения нельзя контролировать или направлять. Поэтому учёные сосредоточили усилия на попытках разработать методы введения в клетку новых, совершенно определённых генов, нужных человеку.

Основные этапы решения генно-инженерной задачи следующие:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

Рассмотрим сначала первый этап этой работы - выделение и клонирование генов. Инструментами в этой работе, как уже говорилось, служат особые ферменты, которые получают из самых различных источников - бактерий, клеток млекопитающих и птиц, выращиваемых в культуре и зараженных разными вирусами, и т.д. В основном используют три вида ферментов: **рестриктазы, лигазу и обратную транскриптазу.**

Рестриктазы - это разновидность дезоксирибонуклеаз, ферментов, разрезающих ДНК на короткие или длинные отрезки или даже на отдельные нуклеотиды. Особенность рестриктаз состоит в том, что они разрезают ДНК не в любом месте, а только **между определенными нуклеотидами** в участке со строго характерной для каждой рестриктазы последовательностью нуклеотидов. Обычно это 4-6 пар нуклеотидов, но разные рестриктазы отличаются именно порядком нуклеотидов в месте разреза. Например, **рестриктаза EcoR1** расщепляет ДНК в участке **ГААТТЦ**, а рестриктаза **BamH1** - в участке **ГГАТЦ**. Сейчас известно более сотни различных последовательностей, которые "узнаются" различными рестриктазами. При случайном распределении нуклеотидов вдоль ДНК вероятность нахождения последовательности из четырех определенных нуклеотидов составляет $1/256$, а из шести - $1/4096$. Поэтому рестриктазы разрезают ДНК на куски, состоящие из нескольких сотен или тысяч пар нуклеотидов.

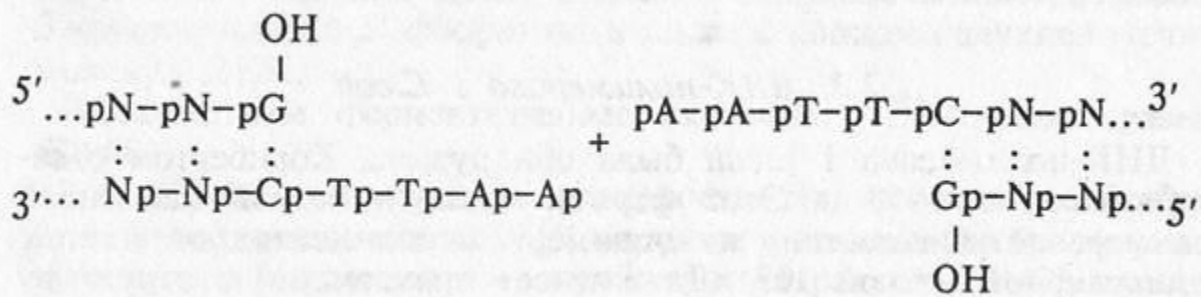


Последовательность нуклеотидов в ДНК, узнаваемая тремя наиболее часто используемыми рестриктазами. Рестриктирующие нуклеазы получают из различных бактерий: **Hpa I** - *Haemophilus parainfluenzae*; **Eco RI** - из *Escherichia coir*, **Hind III** - из *Haemophilus influenzae*. Рестриктазы типа 1 расщепляют ДНК с образованием "слепых" концов, а другие (типа 2) с образованием по месту разрыва одноцепочечных "липких" концов.

Лигаза - фермент, сшивающий свободные концы ДНК между собой. Этот фермент в нормальных клетках участвует в синтезе ДНК и в процессах ее репарации, т. е. восстановления нормальной структуры ДНК после ее частичного повреждения.

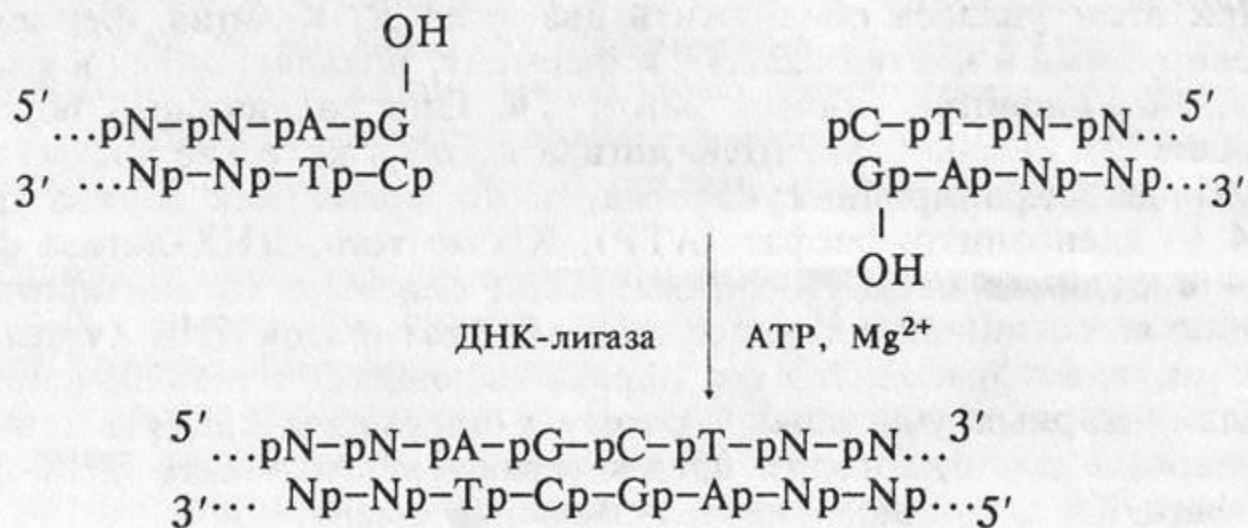
Обратная транскриптаза - фермент, аналогичный ДНК-полимеразе, но синтезирующий ДНК не на ДНК, а на РНК. Этот фермент по сравнению с РНК-полимеразой работает как бы в обратном направлении, т. е. не от ДНК к РНК, а от РНК к ДНК. Есть ли обратная транскриптаза в нормальных клетках и происходит ли в них синтез ДНК на РНК - вопрос спорный и пока еще окончательно не решенный. Но этот фермент появляется в клетках эукариот при заражении их вирусами, содержащими РНК и размножающимися через ДНК. Геном этих вирусов кодирует обратную транскриптазу, с помощью которой образуется вирусная ДНК-матрица, на которой затем происходит синтез многих молекул вирусных РНК.

1. Лигирование липких концов:

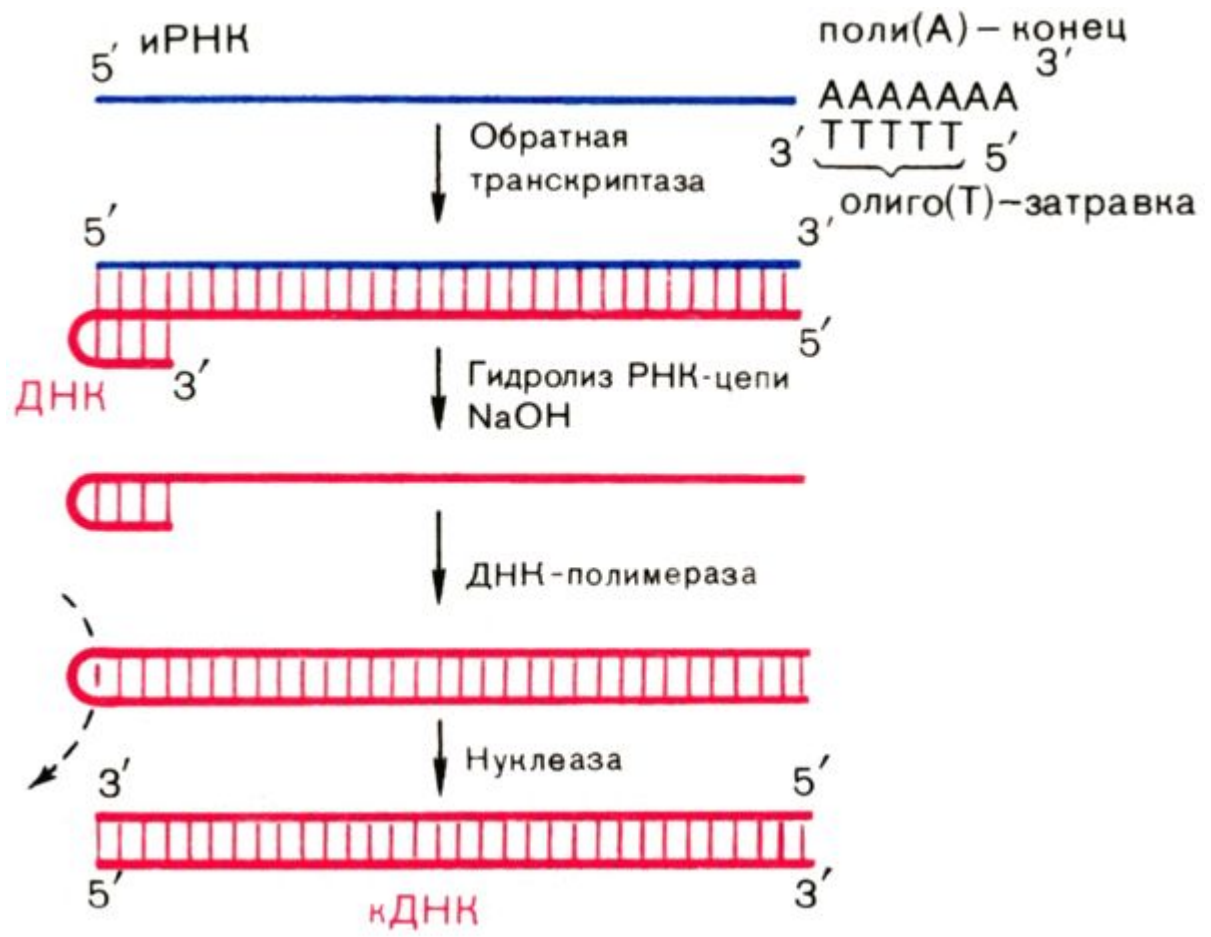


Субстраты этой реакции — двухцепочечные молекулы ДНК с одноцепочечными, полностью комплементарными липкими концами.

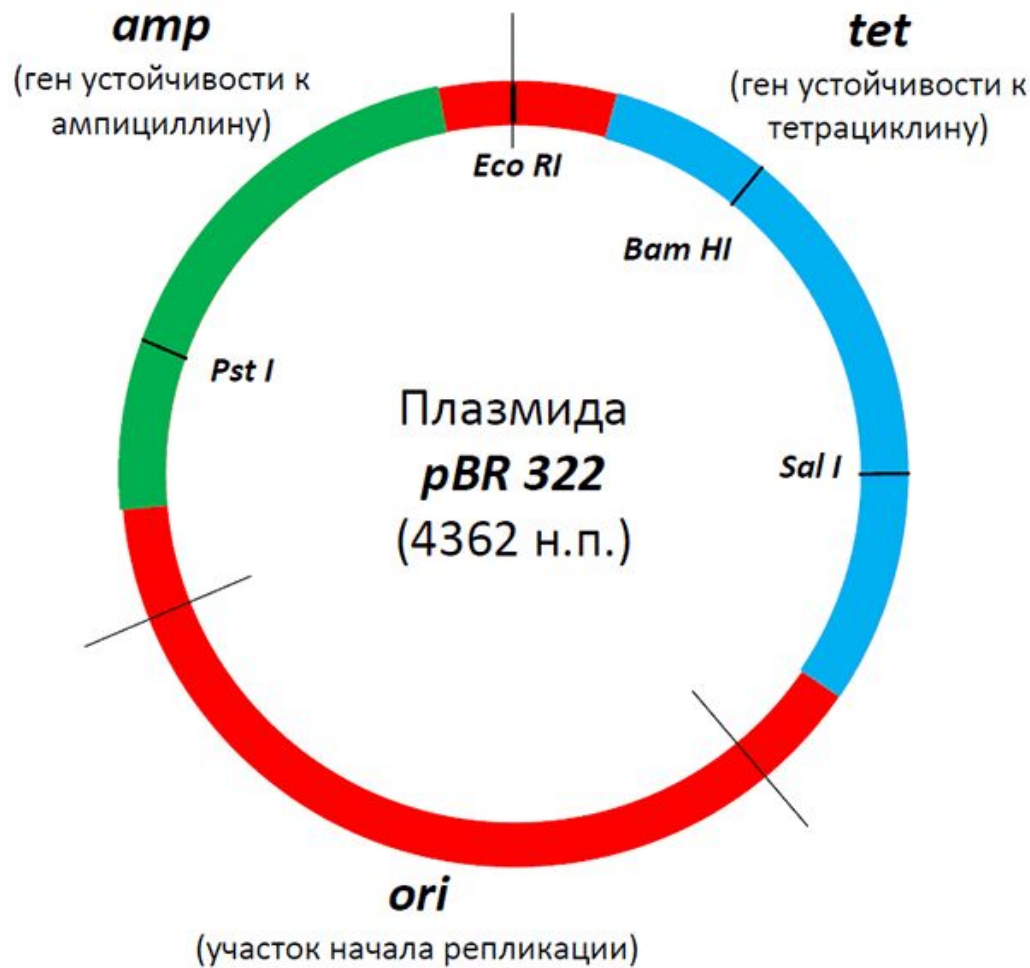
2. Лигирование тупых концов:



Таким образом, ДНК-лигаза фага Т4 обеспечивает ковалентное соединение любых двухцепочечных фрагментов ДНК, для которых имеется возможность состыковать 5'-р и 3'-ОН концы. Поэтому она является одним из важнейших ферментов, на использовании которых основаны современные методы рекомбинации молекул ДНК *in vitro*.

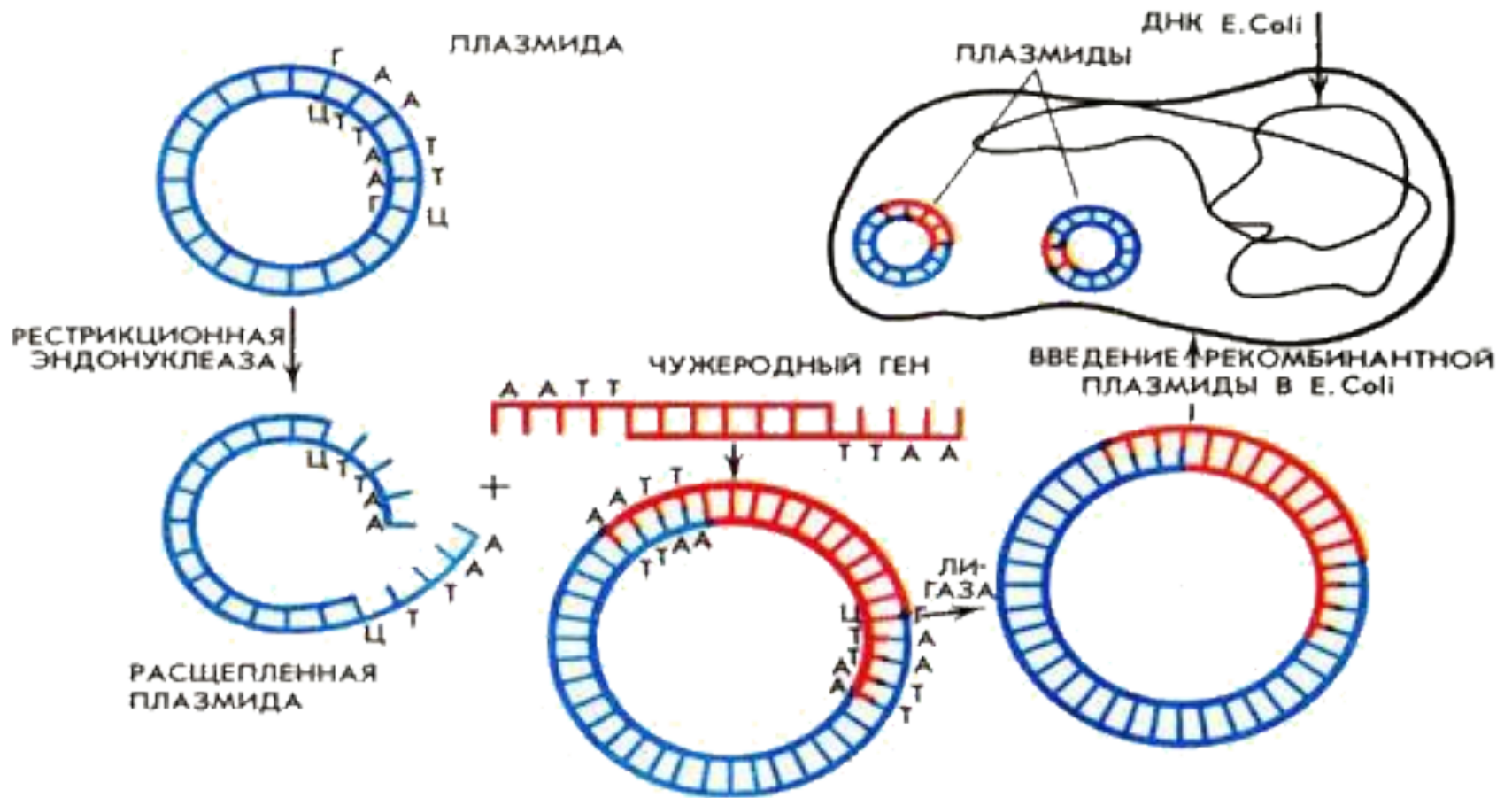


Первый этап клонирования какого-либо гена - получение "библиотеки" генов и отыскание в ее составе нужного нам гена, например гена человека, кодирующего один из глобинов - белков, образующих в эритроцитах гемоглобин. Получение "библиотеки" генов начинается с разрезания изучаемой ДНК (в нашем примере ДНК человека) на множество фрагментов. Число таких фрагментов зависит от выбранной рестриктазы. Для того, чтобы получить фрагменты, содержащие отдельные гены, нужно разрезать ДНК на несколько десятков или даже сотен тысяч фрагментов. Чтобы отделить гены друг от друга, используют плазмиды, в составе которых фрагменты ДНК вводятся в другие клетки, обычно бактериальные. Такую плазмиду-переносчик называют вектором.



Структура знаменитой плазмиды [pBR322](#). В свое время это была, пожалуй, самая популярная плазмида во всём научном мире, а потом она стала основой для множества плазмид нового поколения. В этой плазмиде есть участок начала репликации (*ori*), благодаря которому она может размножаться в клетках бактерии *E. Coli*; гены устойчивости к двум антибиотикам — ампициллину (*amp*) и тетрациклину (*tet*); а также множество сайтов рестрикции (на самом деле их больше сорока, но здесь представлены только четыре — *Eco RI*, *Sal I*, *Pst I*, *Bam HI*).

В качестве вектора обычно выбирают плазмиду, в которой содержится ген устойчивости к антибиотику, например ампицилину, к которому очень чувствительна кишечная палочка *E. coli*. Такую плазмиду разрезают с помощью рестриктазы в одном определенном месте, смешивают со смесью фрагментов ДНК человека и добавляют лигазу, которая вновь сшивает разрезанные концы. Во многих случаях лигаза просто замыкает плазмиду снова в кольцо, но достаточно часто она сшивает свободные концы фрагментов ДНК со свободными концами ДНК плазмиды. В результате возникает множество кольцевых плазмид, в которые встроены различные фрагменты ДНК человека. Где-то среди них окажется и нужный нам ген одного из глобинов.



Затем этими плазмидами "заражают" кишечную палочку или другой вид клеток. Клетки высевают на питательную среду так, чтобы каждая бактериальная клетка лежала отдельно от других и могла образовать собственную колонию. Такие колонии не образуют бактерии, в которых не оказалось плазмиды, так как в среду добавляют тот самый антибиотик (ампицилин), от которого плазида защищает. Но в некоторых бактериях окажутся те плазмиды, в которые никакой фрагмент ДНК не встроился. Такие колонии тоже удастся исключить, так как включение чужих генов уменьшает устойчивость к другому антибиотику (тетрациклину), и далее выращивают только эти чувствительные колонии.

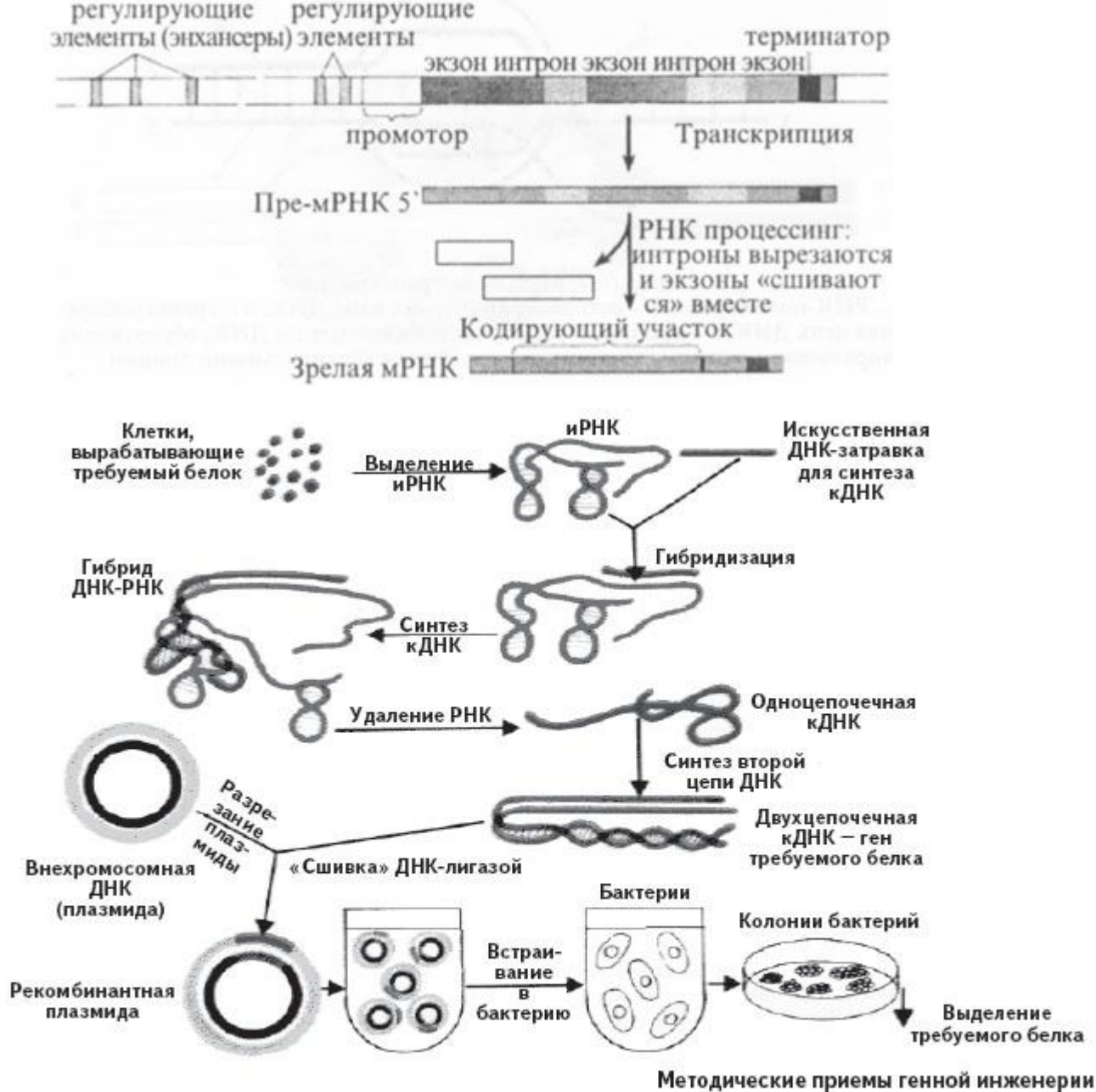
Каждая колония, образованная из одной бактериальной клетки, будет содержать только один вариант плазмид с каким-то одним фрагментом ДНК человека - тем, который случайно оказался в составе плазмиды, попавшей в исходную бактерию. Но так как колоний образуется очень много (обычно десятки тысяч), то в них в принципе должны быть представлены по отдельности все фрагменты ДНК, т. е. в нашем случае все гены человека. Конечно, такая "библиотека" получается в идеале. На самом же деле во многих плаزمидах будут только фрагменты участков, не содержащие генов, в некоторых окажется только часть гена или два гена (это зависит от выбора рестриктазы). Но есть основания ожидать, что одна или несколько колоний будут содержать как раз ту плазмиду, в которую попал нужный нам ген в целом виде.

Хотя из такой "библиотеки" в принципе можно получить все гены человека, для этого нужно уметь их выделить, т. е. каждый раз отличить нужную нам колонию от всех остальных. Существуют различные способы выявления. Рассмотрим самый простой, пригодный как раз для глобиновых генов. Не очень сложно получить молодые клетки крови, будущие эритроциты, в которых очень интенсивно идет синтез глобинов, и глобиновая мРНК составляет более 80% всей мРНК. Если молекулы этой мРНК гибридизовать с ДНК бактерий, она образует гибрид только с той колонией, в которой оказался фрагмент ДНК, содержащий ген глобина. Гораздо чаще это делают иначе, через радиоактивно-меченую ДНК. Для этого мРНК глобина выдерживают вместе с обратной транскриптазой и радиоактивными нуклеотидами, так что синтезируется радиоактивная ДНК, являющаяся комплементарной копией мРНК. Такую ДНК называют кДНК. Радиоактивную глобиновую кДНК гибридизуют с разрушенными бактериями. В результате те очень немногие колонии, в которых гибридизация произойдет, легко обнаружить по их радиоактивности. Это и есть нужная нам колония, содержащая ген глобина человека.

После того как обнаружат колонию бактерий, содержащих плазмиду с нужным нам геном, его можно неограниченно клонировать. Для этого штамм бактерий размножают, выделяют из них плазмидную ДНК, а из нее (опять с помощью рестриктаз) - встроенный ген. Первую и еще не самую трудную часть работы на этом можно считать выполненной. Оставшуюся "библиотеку" можно использовать для выделения из нее других генов. Клонированный ген можно затем использовать в различных целях, например для его подробного изучения. Во многих работах гены подвергают секвенированию, т.е. изучению в них последовательности нуклеотидов. Такие данные очень нужны для сравнения с последовательностью нуклеотидов в аналогичных генах других животных или с другими генами, чтобы обнаружить их общее эволюционное происхождение.

Нам сейчас важнее рассмотреть другое - попытки заставить клонированный ген работать в бактериальной клетке. Работа гена, называемая экспрессией, состоит из транскрипции и трансляции. В самом простом случае фрагмент ДНК, содержащий ген, включает также и его регуляторную часть. Казалось бы, теперь можно ожидать, что транскрипция такого гена окажется возможной. Однако для генов эукариот такая возможность маловероятна, так как в бактериях нет тех регуляторных белков, которые способны включать эукариотические гены. Поэтому нужно удалить весь регуляторный участок эукариотического гена и заменить его на регуляторный участок бактериального гена или проще разрезать бактериальную ДНК на границе гена и промотора и вставить туда ген эукариот. Все эти манипуляции осуществляются также с помощью рестриктазы, способной разрезать ДНК в нужном месте, и лигазы, сшивающей места разреза. Так создают кольцевую ДНК, в которой соседствуют участки ДНК разного происхождения - плазмидного и человеческого. Такие ДНК называют рекомбинантными.

Конструирование хорошего промотора обеспечивает только первую часть экспрессии гена - его транскрипцию, т. е. синтез РНК. Но не менее важно обеспечить и вторую часть экспрессии - трансляцию, т. е. синтез белка. Здесь препятствием может оказаться отличие бактериальных рибосом от эукариотических. Дело в том, что не вся молекула мРНК кодирует последовательность аминокислот в белке. Ее начальный короткий участок служит для прикрепления к рибосоме, и для этого в нем имеется особая последовательность из нескольких нуклеотидов. Эта последовательность оказалась различной у эукариот и у прокариот. Поэтому приходится помещать ген эукариот, который мы изучаем, после того участка бактериального гена, который важен для начала трансляции. Наконец, есть еще одно важное препятствие - неспособность бактерий к сплайсингу, т. е. вырезанию из только что синтезированной РНК эукариот тех некодирующих участков, которые были считаны с интронов. Один из путей преодоления этого препятствия - использование не настоящего гена, а его кДНК. Как уже говорилось, если взять мРНК, прошедшую сплайсинг, т.е. уже без интронов, и подвергнуть ее действию обратной транскриптазы, то синтезируется кДНК (копия гена эукариот, но лишенная интронов). Экспрессия такого гена не нуждается в сплайсинге.



Предлагается также использовать для экспрессии клетки не бактерий, а эукариот, например дрожжей. Действительно можно поместить клонированный ген в плазмиду дрожжей и ввести его в эти простейшие, но все же эукариотические клетки, обладающие, в частности, ферментами сплайсинга. Однако пока попытки такого рода оказались неудачными - сплайсинг у дрожжей действительно есть, но он, очевидно, происходит иначе, чем у высших эукариот. Поэтому РНК, считанная с генов млекопитающих, в дрожжах правильного сплайсинга не проходит.

Все эти опыты легче вести тогда, когда существует способ отбора бактериальных клеток, в которых встроенный ген экспрессируется, от тех, в которых такой экспрессии почему-либо не происходит. Примером такого исследования служат опыты, в которых использовали фермент человека - дегидрофолатредуктазу. Этот фермент необходим для нормального синтеза нуклеиновых кислот. Однако существует ингибитор метотрексат, который этот фермент подавляет. Оказалось, что если взять кДНК с мРНК этого фермента и ввести его с плазмидой в бактериальную клетку, а в среду добавить немного ингибитора, то расти и делиться будут только те клетки, где синтез фермента так активен, что малые дозы ингибитора его подавить не могут. В результате отобраны лишь те клетки бактерий, где экспрессия гена человека была особенно интенсивной.

Трудности, связанные с экспрессией эукариотических генов в бактериальных клетках, заставляют исследователей искать иные пути и среди них - использование клеток млекопитающих в культуре ткани. Конечно, работать с ними намного сложнее, и первоначально клонировать гены все равно приходится в кишечной палочке с использованием бактериальных векторов - плазмид. Но зато потом удастся ввести клонированный ген в клетки млекопитающих, например, путем микроинъекций. В другом варианте клонированные гены тоже путем микроинъекций вводят в яйцеклетки млекопитающих и из них выращивают целых животных, в геном которых встроены (интегрированы) клонированные гены. До сих пор это были только мыши, но сейчас уже получены кролики, свинки, овцы, в геном которых интегрированы чужеродные гены. Таких животных называют "трансгенными".

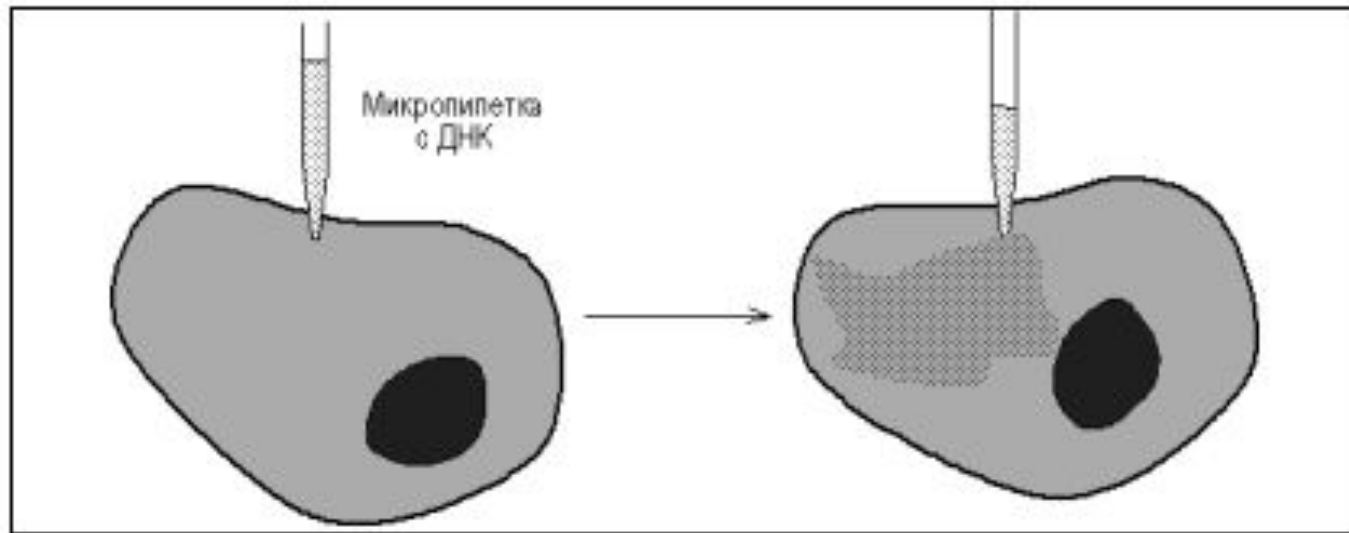
Способы прямого введения гена в клетку

Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:

**трансфекция,
микроинъекция,
электропорация,
метод «мини-клеток»,
упаковка в липосомы
электронная пушка.**

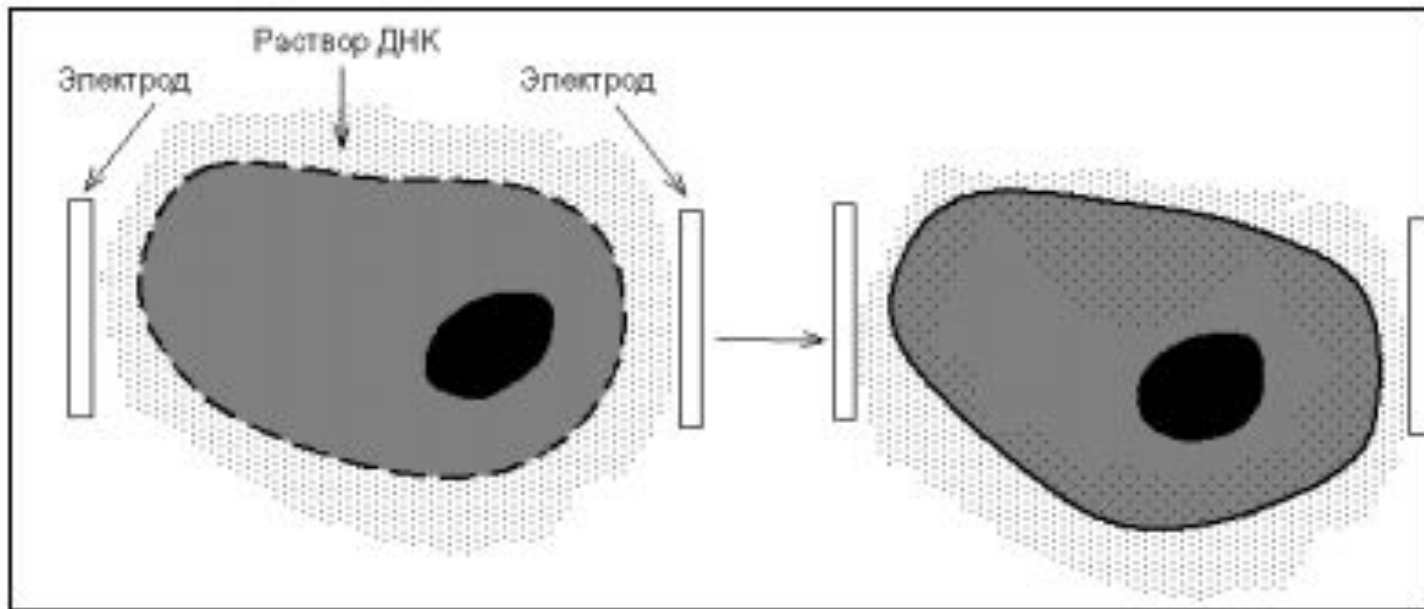
При трансфекции ДНК адсорбируется на кристаллах фосфата кальция. Образуются частицы кальциевого преципитата. Они поглощаются клеткой путем фагоцитоза.

Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора.



Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы (ТК) и плазмиду pVR322, были инъецированы в ТК-клетки и было показано, что ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался.

Электропорация основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки. Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение (200 – 350) В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается.



Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток. Электропорация — физический, а не биохимический метод, и это, по-видимому, обуславливает его широкое применение. Многочисленные исследования продемонстрировали, что электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений. Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислойную липидную мембрану, по-видимому, зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому мелкие бактериальные клетки эффективно поглощают ДНК при значительно большей напряженности (10 кВ/см и более), чем крупные животные и растительные клетки, эффективно поглощающие ДНК при напряженности поля 1—2 кВ/см.

Электропорация — наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки. Однако до недавнего времени этот метод использовался в ограниченном числе лабораторий в связи с отсутствием серийных приборов — электропораторов. Появление и совершенствование таких приборов в ближайшие годы приведет к широкому применению данного подхода в генетической инженерии самых разных типов клеток.

«Мини-клетки» получают путем блокирования донорных клеток митозе колцемидом. При продолжительной обработке клеток колцемидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану. Полученные мини-клетки очень чувствительны к разного рода воздействиям, поэтому для слияния подбирают специальные мягкие условия. Метод трудный, капризный, эффективность низкая – 10^{-6} – 10^{-7} . Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз.

Липосомы - сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

Метод биологической баллистики (биолистики) является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных. Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолиственной пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолиственную пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолиственной пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.

Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации. С помощью биолиственной пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолиственная трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбриогенную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигампоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гампоидных растений получены стабильные трансформанты.

Вектор - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – *донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.* Таким образом, вектор должен быть *небольшим, способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться), многократно копироваться (амплифицироваться), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности), должен иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции их; должен быть способен передаваться в клетку соответствующего организма.*

Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:

1. *Селективные гены*, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам (у растений). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основной принцип работы такого маркера – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.

2. *Репортерные гены*, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.

Чаще всего в качестве репортерных используются гены β -глюкуронидазы (GUS), зеленого флюоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT).

Типы векторов для введения гена в клетку

Векторами для молекулярного клонирования являются молекулы ДНК, которые могут доставлять в клетку-хозяина чужеродную ДНК. Вектор должен быть небольшого размера, иметь сайт рестрикции, в который может быть осуществлена вставка, иметь один или более селективный генетический маркер для отбора реципиентных клеток, несущих чужеродную ДНК.

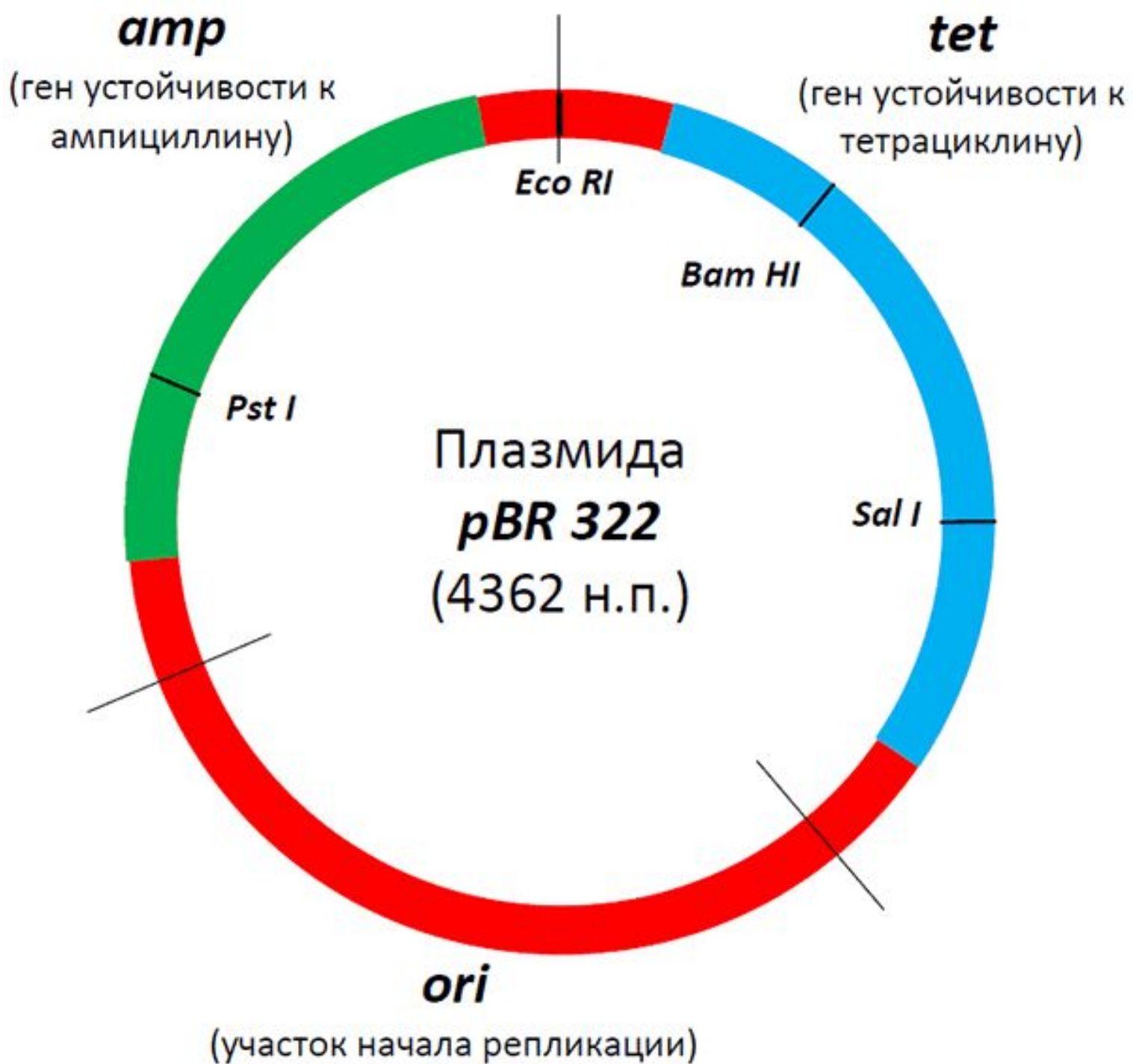
Векторами для клонирования являются:

- *Плазмиды* — кольцевые двухцепочечные экстрахромосомные самореплицирующиеся молекулы ДНК бактерий. В плаزمидах клонируют фрагменты ДНК до 10 т.п.н.
- *Фаги*. Первыми были разработаны векторы на основе фага λ *E. coli*. ДНК фага λ составляет примерно 50 т.п.н. Значительная часть (20 т.п.н.) несущественна для размножения фага и может быть заменена на чужеродную ДНК. В фаге можно клонировать фрагмент ДНК до 20 т.п. н.

- *Космиды* – векторы, объединяющие в себе свойства плазмиды и фага. Созданы искусственно. Могут амплифицироваться в бактерии как плазмиды и упаковываться в фаговые головки. Могут включать вставку чужеродной ДНК до 40 т.п.н.
- *Искусственная дрожжевая хромосома* (yeast artificial chromosome – YAC). Вектор разработан на основе ДНК дрожжей. Применяются для клонирования больших фрагментов ДНК (от 100 до 1000 т.п.н.) эукариот.

В качестве примера рассмотрим процесс клонирования участка чужеродной ДНК бактерией *E. coli* при помощи плазмиды pBR322.

pBR322 — искусственная плазида, созданная Франциско Боливаром и Раймондом Родригесом с целью клонирования генетического материала. Она представляет собой циклический фрагмент ДНК длиной 4361 нуклеотидных пары. Плазида содержит ген устойчивости к тетрациклину *tet*, взятый из естественной плазмиды pSC 101; ген устойчивости к ампициллину *amp*, взятый из транспозона Tn3; и участок начала репликации *ori*, заимствованный из плазмиды pMB 1. Тетрациклин и ампициллин — сильные антибиотики. Наличие в плазмиде генов устойчивости к ним (активных или блокированных) играет существенную роль в выделении бактерий со встроенным участком чужеродной ДНК. Плазида содержит также сайты рестрикции Pst I, Bam HI и Sal I, причём первый находится в гене *amp*, а два остальных — в гене *tet*. Это важное обстоятельство помогает модифицировать плазмиду.



Предположим, что в плазмиду необходимо встроить фрагмент, который ранее был вырезан из другой ДНК рестриктазой Bam HI (то есть он имеет на концах последовательность нуклеотидов, характерную для сайта рестрикции Bam HI). Для этого плазмиды обрабатываются рестриктазой Bam HI, (которая разрежет кольцевую молекулу в сайте рестрикции и образует линейный участок ДНК) и добавляются участки чужеродной ДНК. Поскольку на концах всех фрагментов ДНК находятся комплементарные последовательности нуклеотидов, они начнут «склеиваться», причём возможны два варианта склейки :

- Соединятся концы линейной плазмиды pBR 322, образовав исходную (восстановленную) кольцевую плазмиду.
- Между концами линейной плазмиды pBR 322 вклинится участок чужеродной ДНК, образовав кольцевую плазмиду со встроенным фрагментом.

Поскольку плазмиды со встроенным фрагментом являются целью процесса, необходимо выделить такие плазмиды и клонировать их. Процесс идёт следующим образом:

- Плазмиды внедряются в клетки *E. coli*. Для этого клетки обрабатываются ионами Ca^{2+} , что делает их мембраны проницаемыми для ДНК.

- Полученные бактерии высевают на среду, содержащую ампициллин. В этой среде нормально растут колонии бактерий, содержащие плазмиды, остальные колонии угнетаются. По этому признаку можно отличить бактерии, содержащие плазмиды;

Колонии, содержащие плазмиды, перепечатываются на среду, содержащую тетрациклин. Поскольку чужеродная ДНК вклинивается внутрь гена *tet*, дезактивируя его, колонии бактерий с модифицированными плазмидами угнетаются тетрациклином.

• В результате этих действий выделяются колонии *E. coli*, в плазмиды которых встроен участок чужеродной ДНК. Они высеваются в обычную среду для дальнейшего клонирования.

Процедуру клонирования можно также вести с помощью рестриктаз *Sal I* и *Pst I*. В первом случае процесс будет аналогичен, в последнем бактерии с модифицированными плазмидами будут, наоборот, чувствительны к ампициллину и нечувствительны к тетрациклину.

Спасибо за внимание