

ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАЦИИ ДНК

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ
или
ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ



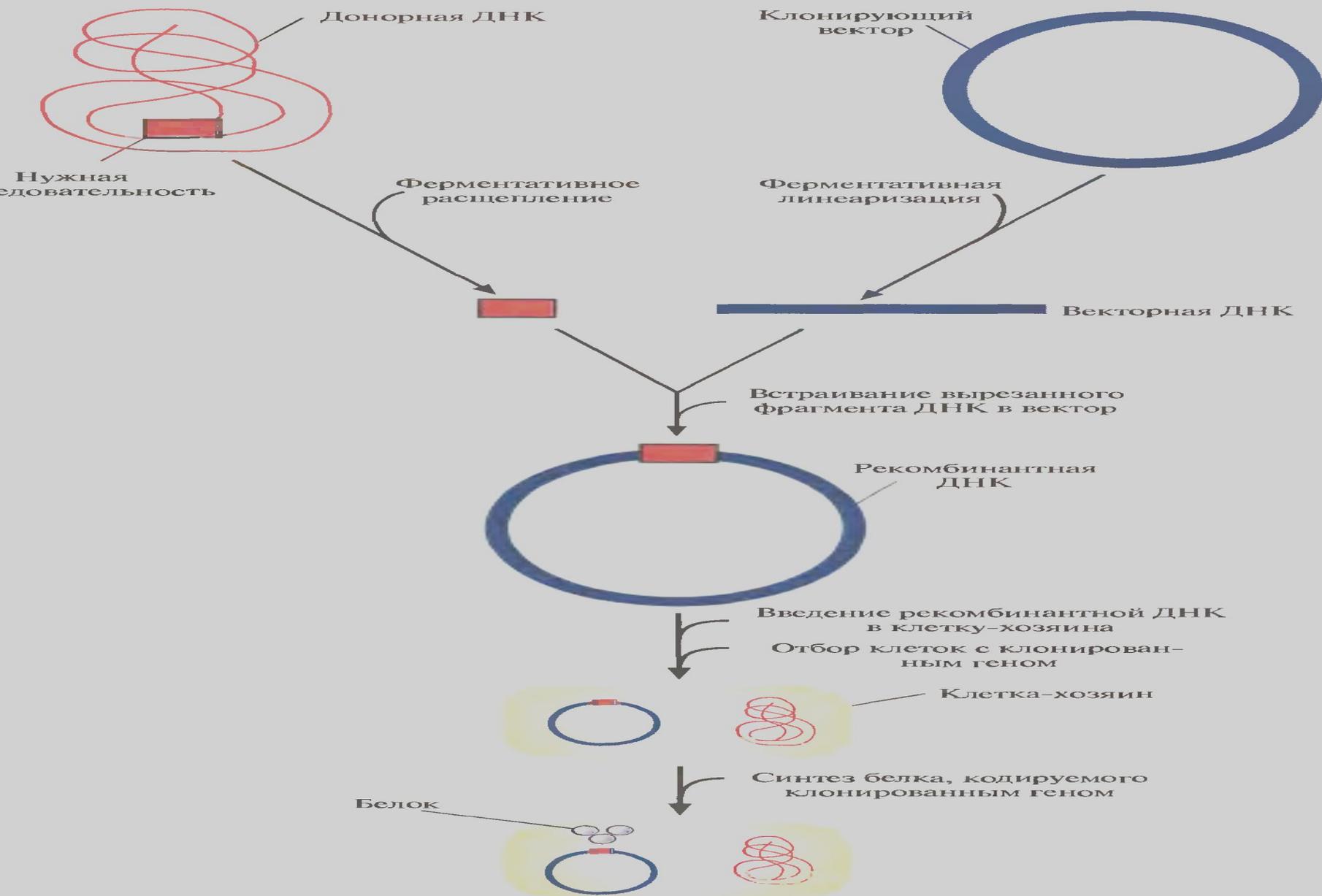
Herbert Boyer
Courtesy Genentech



Stanley Cohen,
Stanford University professor

Показали, что объединив генетические элементы из разных источников (организмов), можно создать новую реплицирующуюся генетическую структуру с новыми свойствами.

Общий принцип рекомбинации ДНК



ОСНОВНЫЕ СТАДИИ ТЕХНОЛОГИИ РЕКДНК в биотехнологическом производстве ЛС



Ферменты, используемые в технологии рекомбинации ДНК

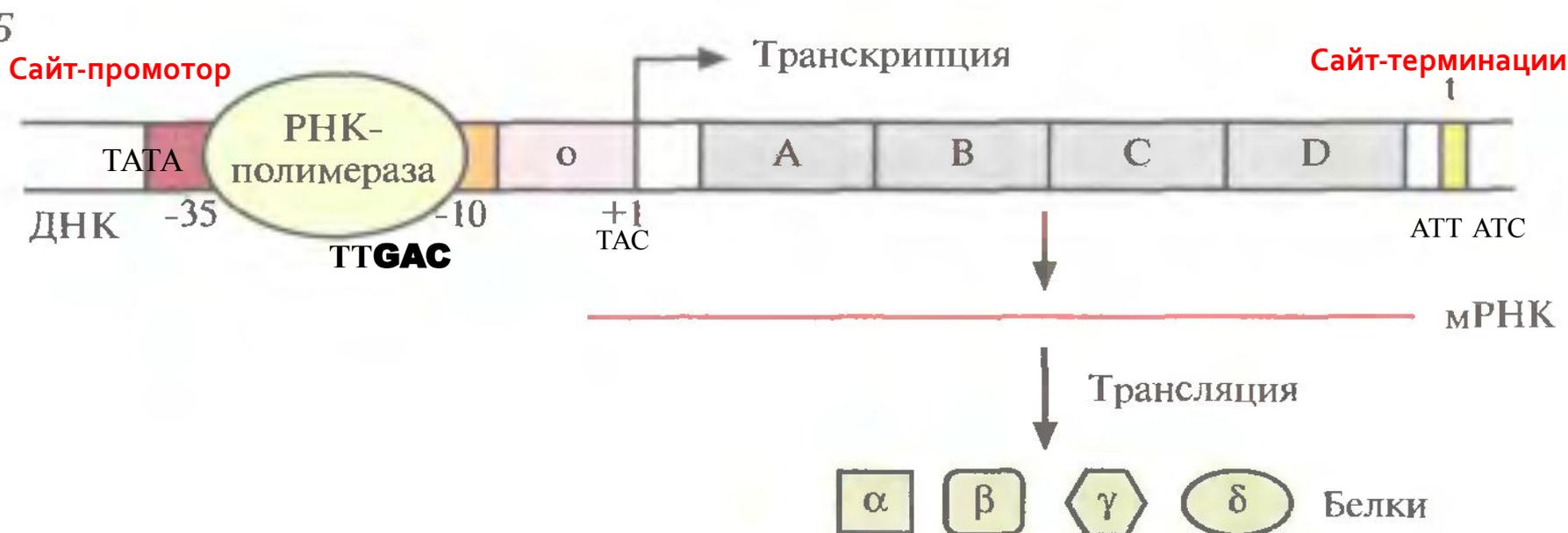
1. РЕСТРИЦИРУЮЩИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ (рестриктазы)
2. ДНК-лигаза БАКТЕРИОФАГА T₄

При молекулярном клонировании важно, чтобы расщепление донорной и векторной ДНК происходило в строго определенных участках ДНК (сайтах) с образованием дискретного и воспроизводимого набора нуклеотидов.

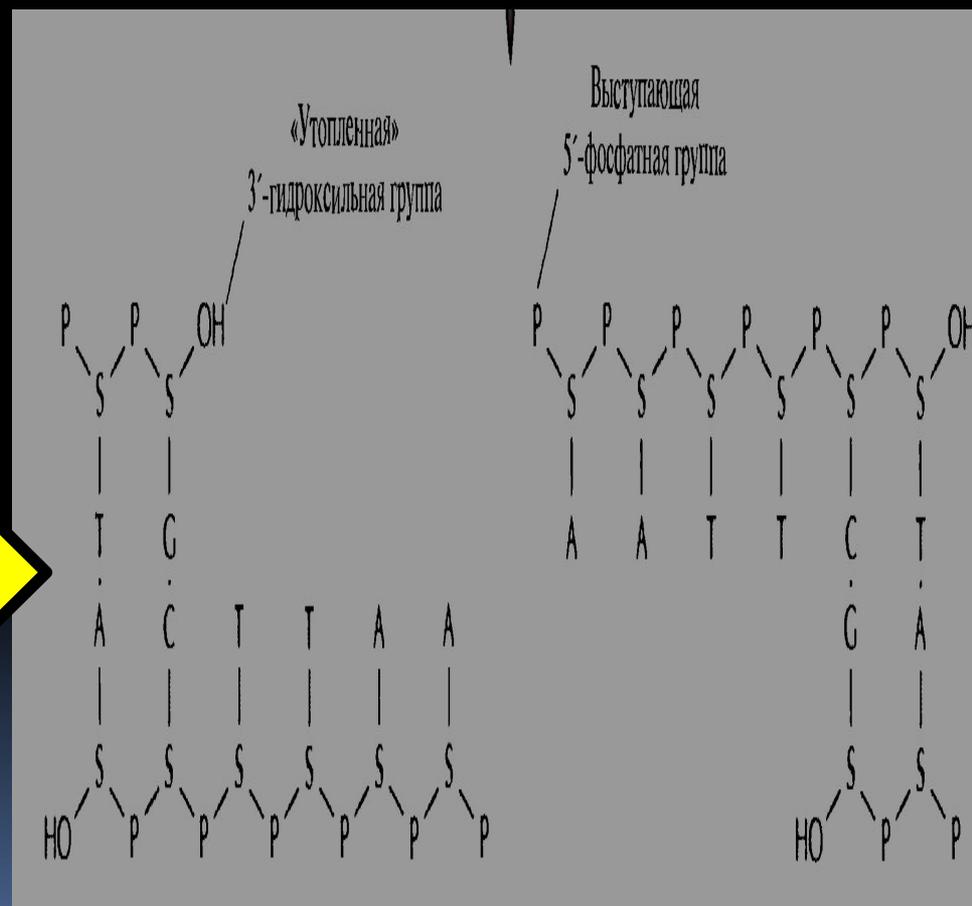
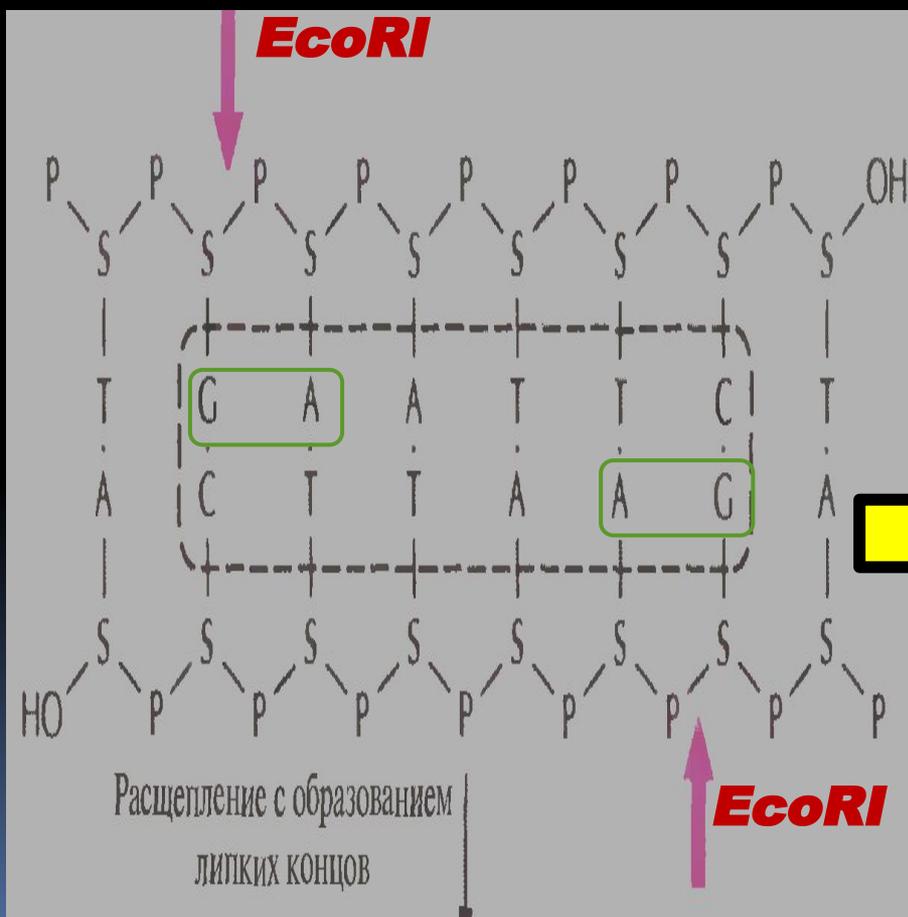
Если разрез ДНК окажется внутри гена, то такой разрез приведет к его инактивации

ИНИЦИАЦИЯ
ТРАНСКРИПЦИИ

ТЕРМИНАЦИЯ
ТРАНСКРИПЦИИ



Расщепление ДНК рестриказой *EcoRI*



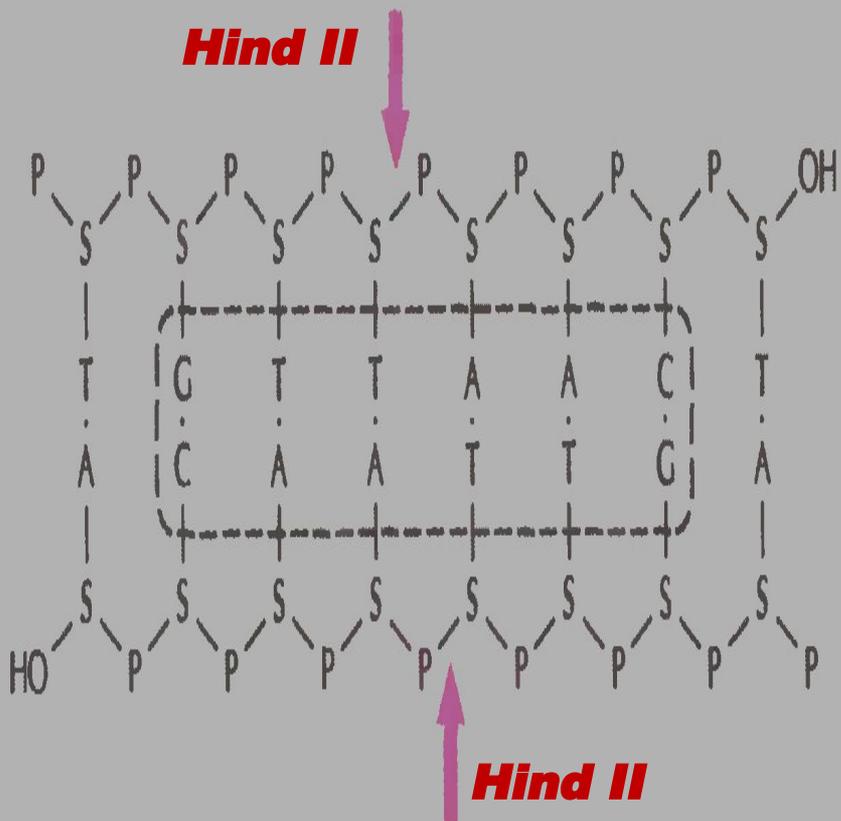
Образование «липких» концов

Рестриктазы и расщепляемые ими последовательности ДНК

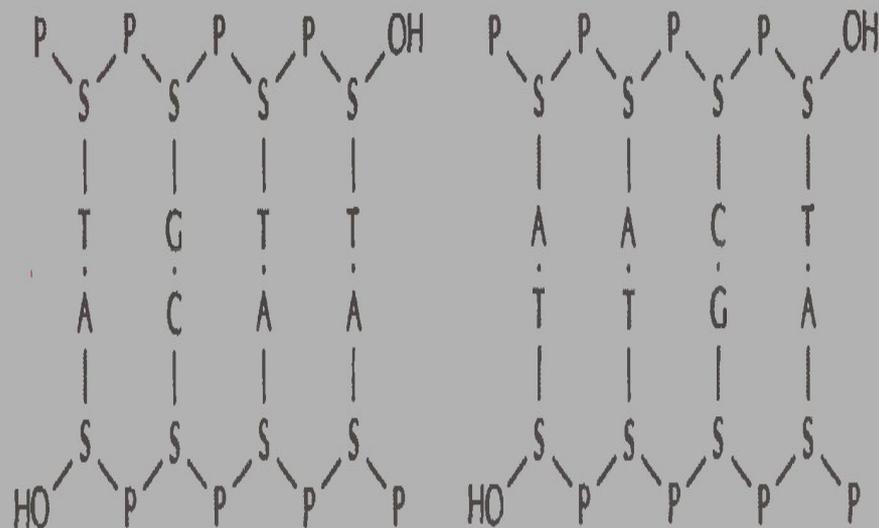
Рестриктазы	Участки распознавания и места разреза ДНК
BamH1 <i>Bac. amph.</i>	5-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3 3-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5
EcoRI <i>Escherichia coli</i>	5-Г-А-А-Т-Т-Ц-3 3-Ц-Т-Т-А-А-Г-5
HindIII <i>Haemophilus ind.</i>	5-А-А-Г-Ц-Т-Т-3 3-Т-Т-Ц-Г-А-А-5
HaeIII	5-Г-Г-Ц-Ц-3 3-Ц-Ц-Г-Г-5
HpaII <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5-Ц-Ц-Г-Г-3 3-Г-Г-Ц-Ц-5

Расщепление ДНК рестриказой **Hind II**

Hind II

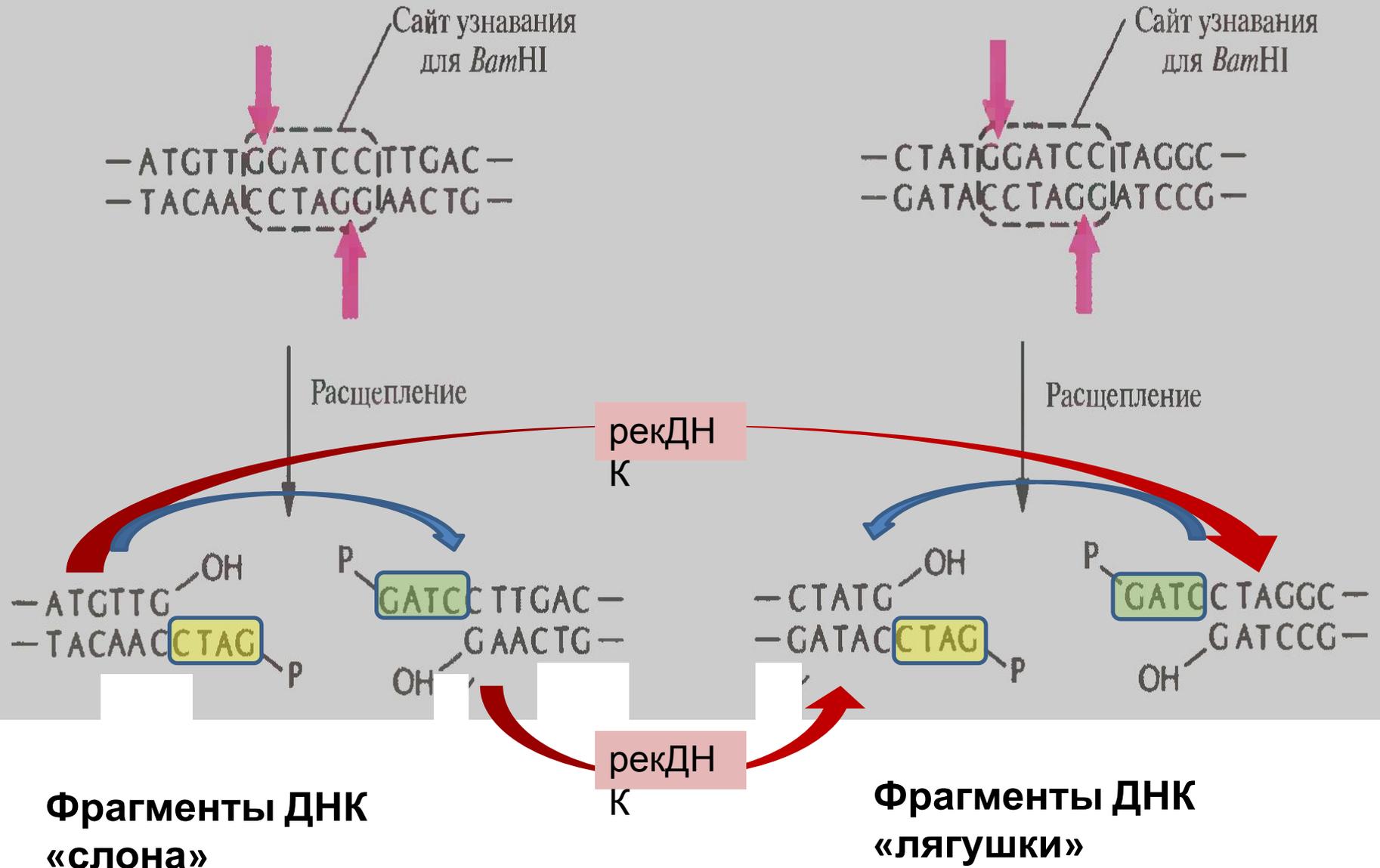


Расщепление с образованием
тупых концов



«тупые» концы

ФРАГМЕНТЫ ОБРАЗУЮЩИЕСЯ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ ДНК РАЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ РЕСТРИКТАЗОЙ ***Bam*HI**



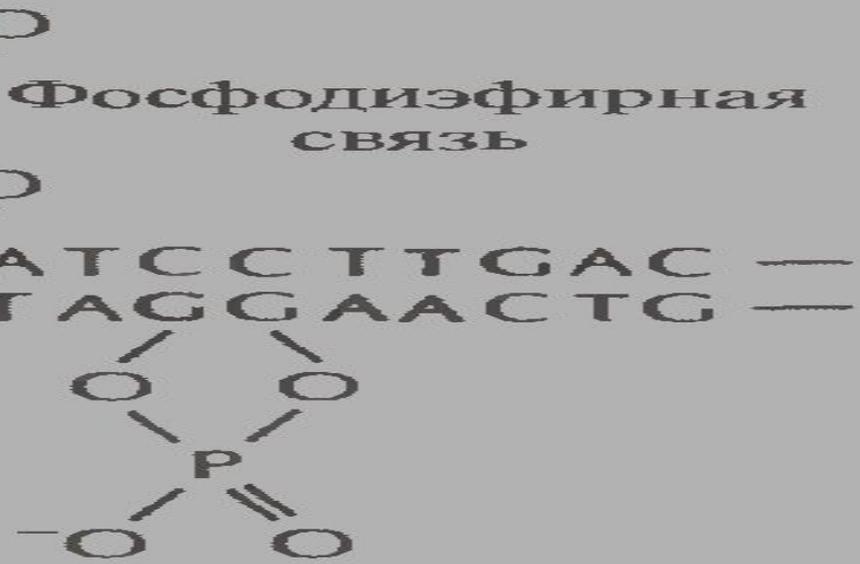
Лигирование липких концов ДНК-лигазой T4

A

Одноцепочечный разрыв



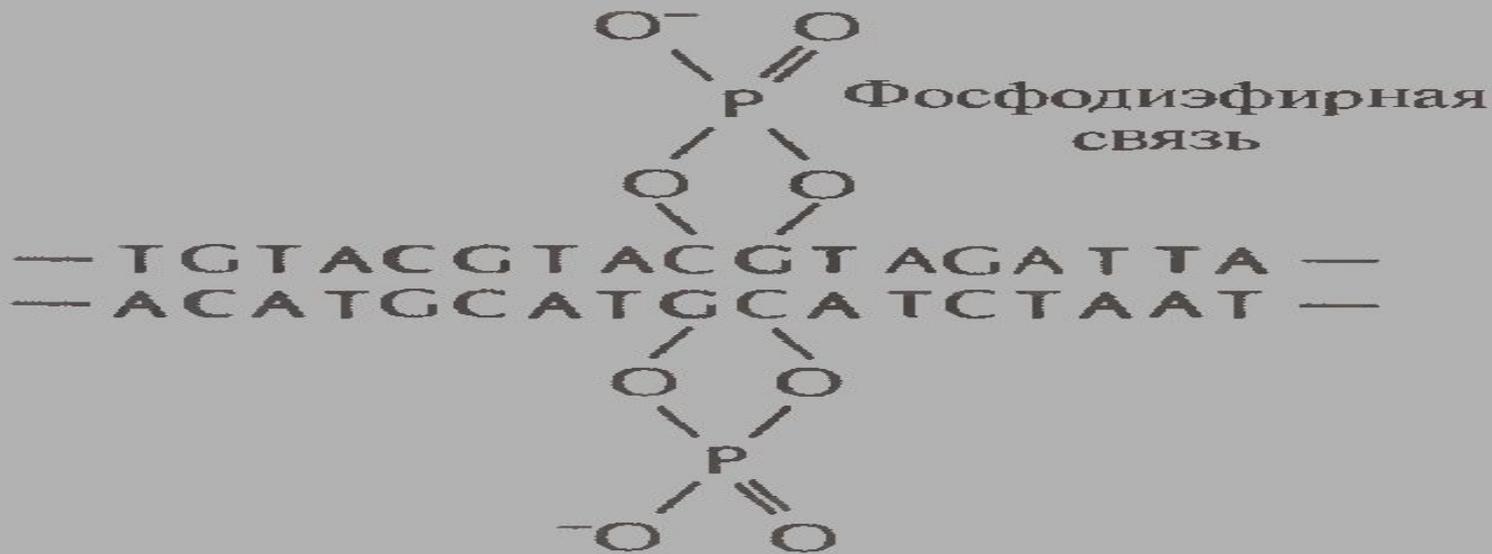
ДНК-лигаза T4



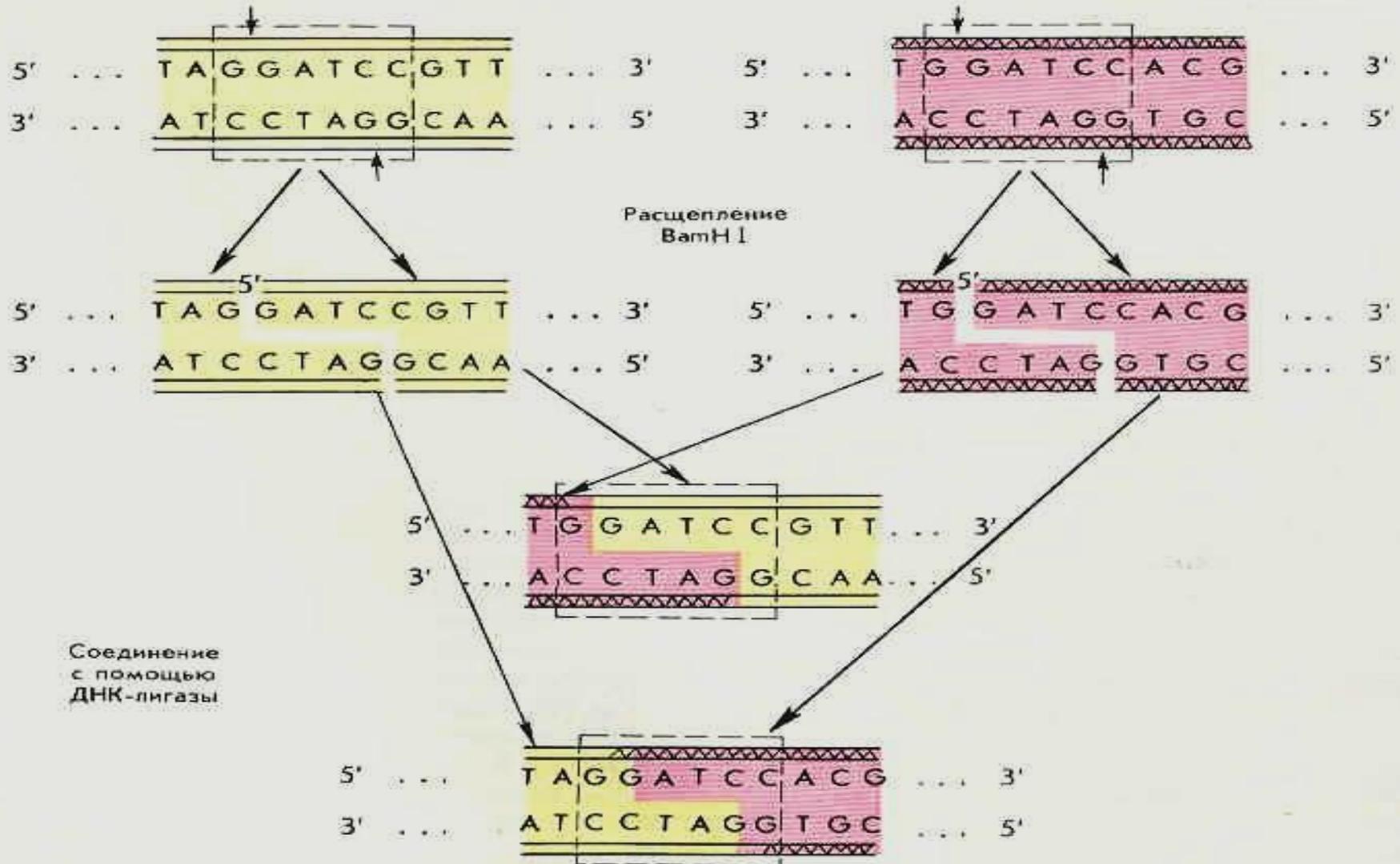
Лигирование тупых концов ДНК-лигазой T4



ДНК-лигаза T4



Расщепление молекул ДНК рестриктазой и соединение полученных фрагментов ДНК-лигазой.



Объединение разных молекул ДНК само по себе бесполезно, если вновь образованные рекДНК не будут реплицироваться в клетке-хозяине и экспрессироваться.

Как полученные гибридные гены ввести в клетку и заставить там работать – производить белки?



Для доставки чужеродных генов в клетки различных организмов применяют ВЕКТОРЫ.

КЛОНИРУЮЩИЕ ВЕКТОРЫ

Vehicle – *англ.* , повозка , транспортное
средство

Вектор (в технологии рекДНК)

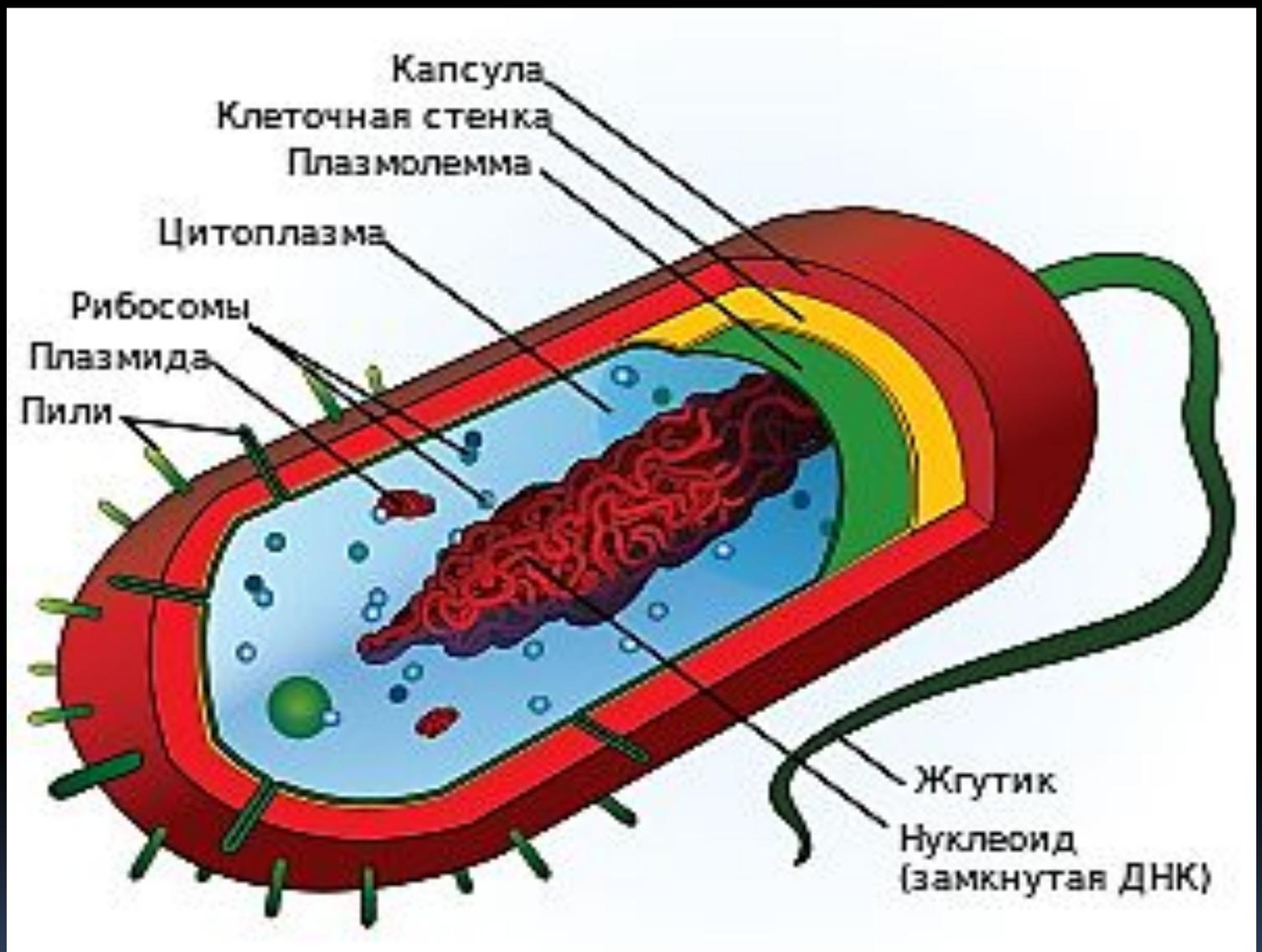
- Это молекула ДНК, способная **самостоятельно** реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать *клонирование* (размножение) и *экспрессию* встроенного в нее искусственно **какого-либо гена**

Клони- рующ- ие векто- ры

- Плазмидные векторы
- Векторы на основе бактериофага λ
- Вирусы растений, животных, человека
- Космидный вектор
- Искусственная хромосома

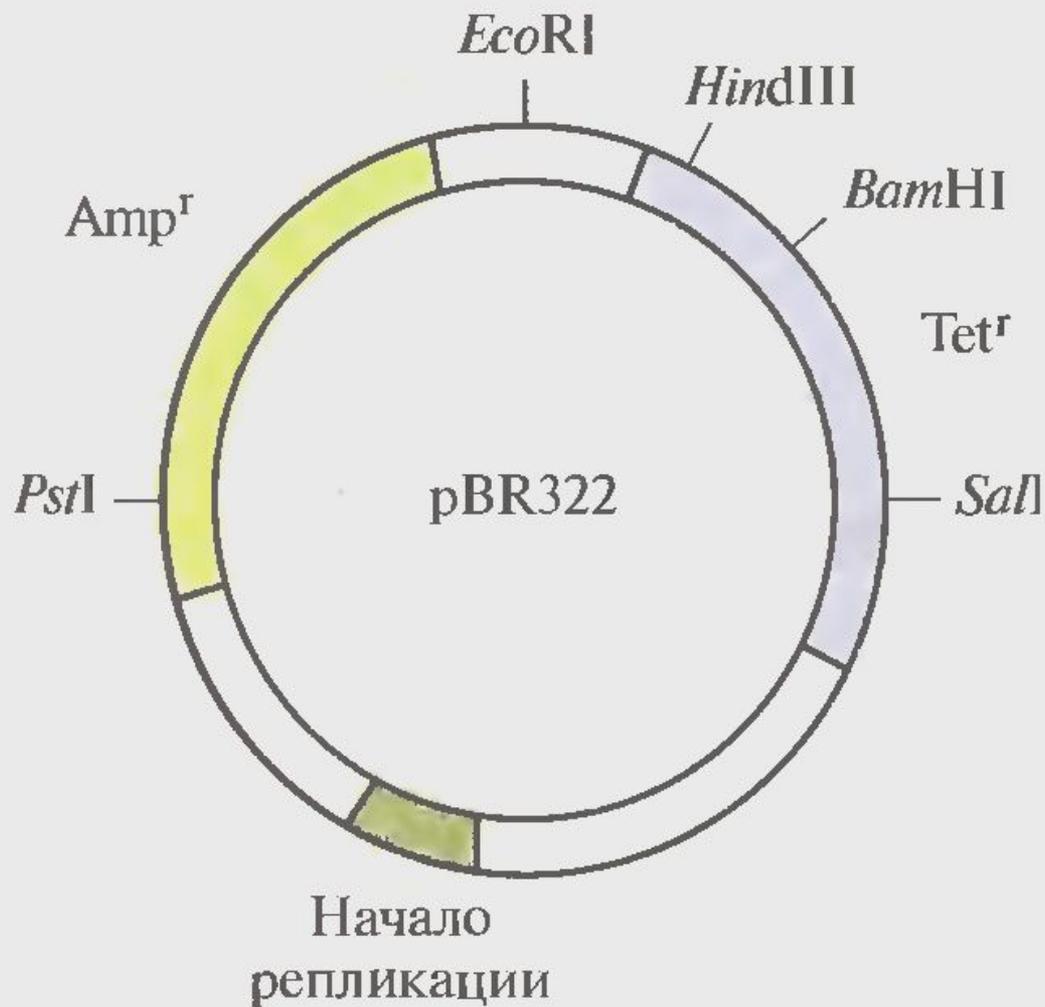
Плазмидные векторы

П
Л
А
З
М
И
Д
Ы

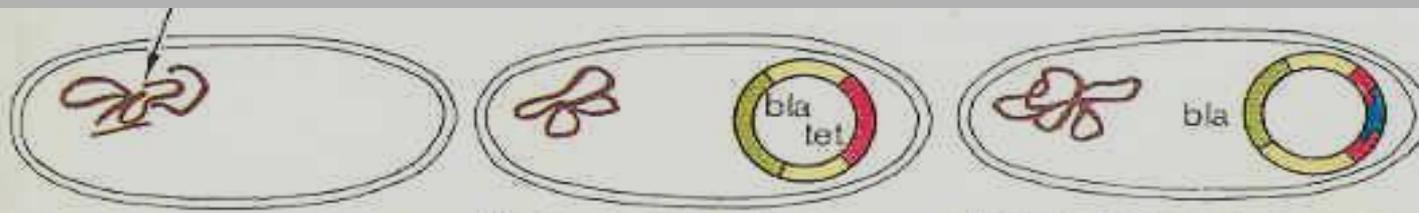
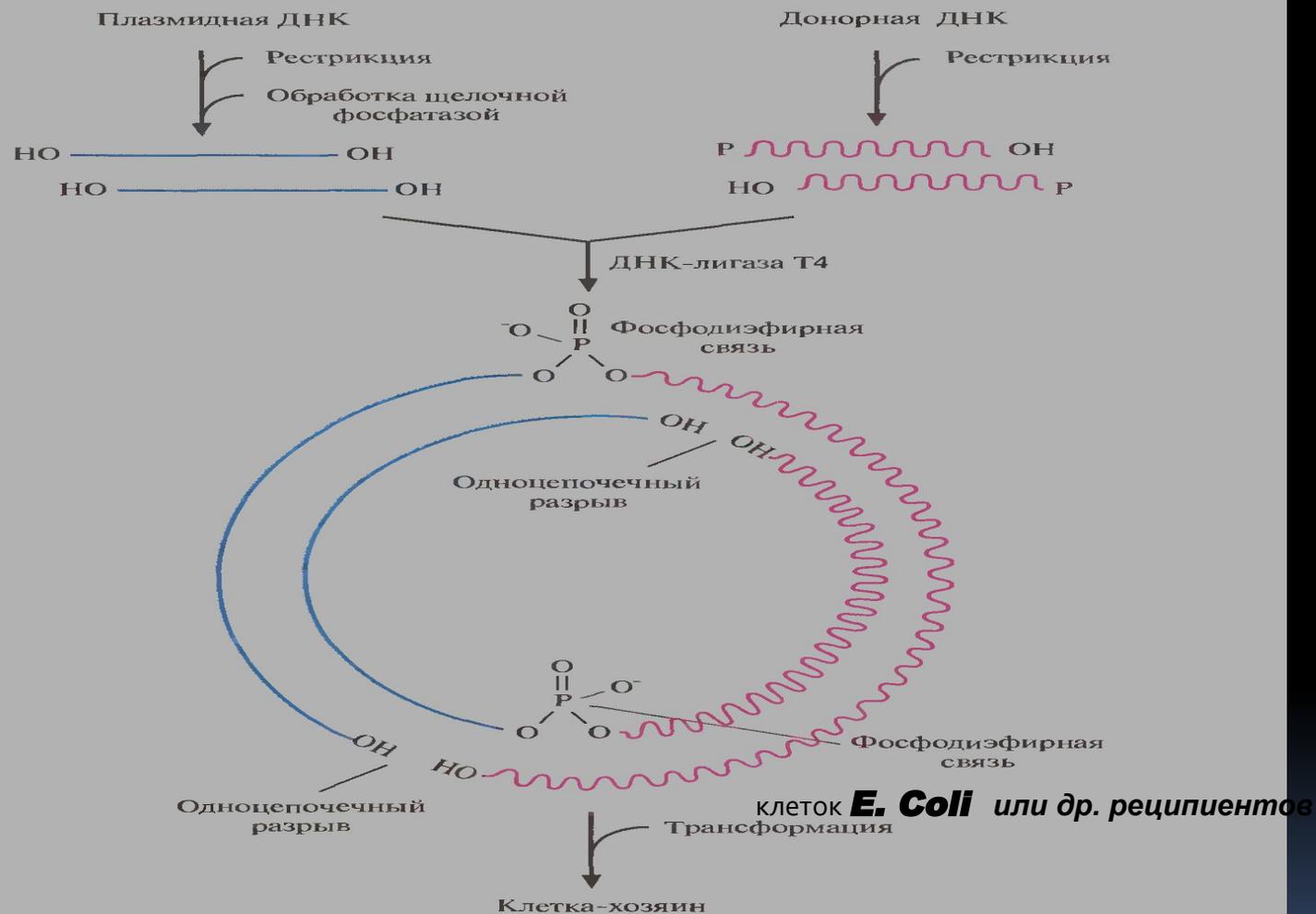


Плазмидный вектор **pBR322**

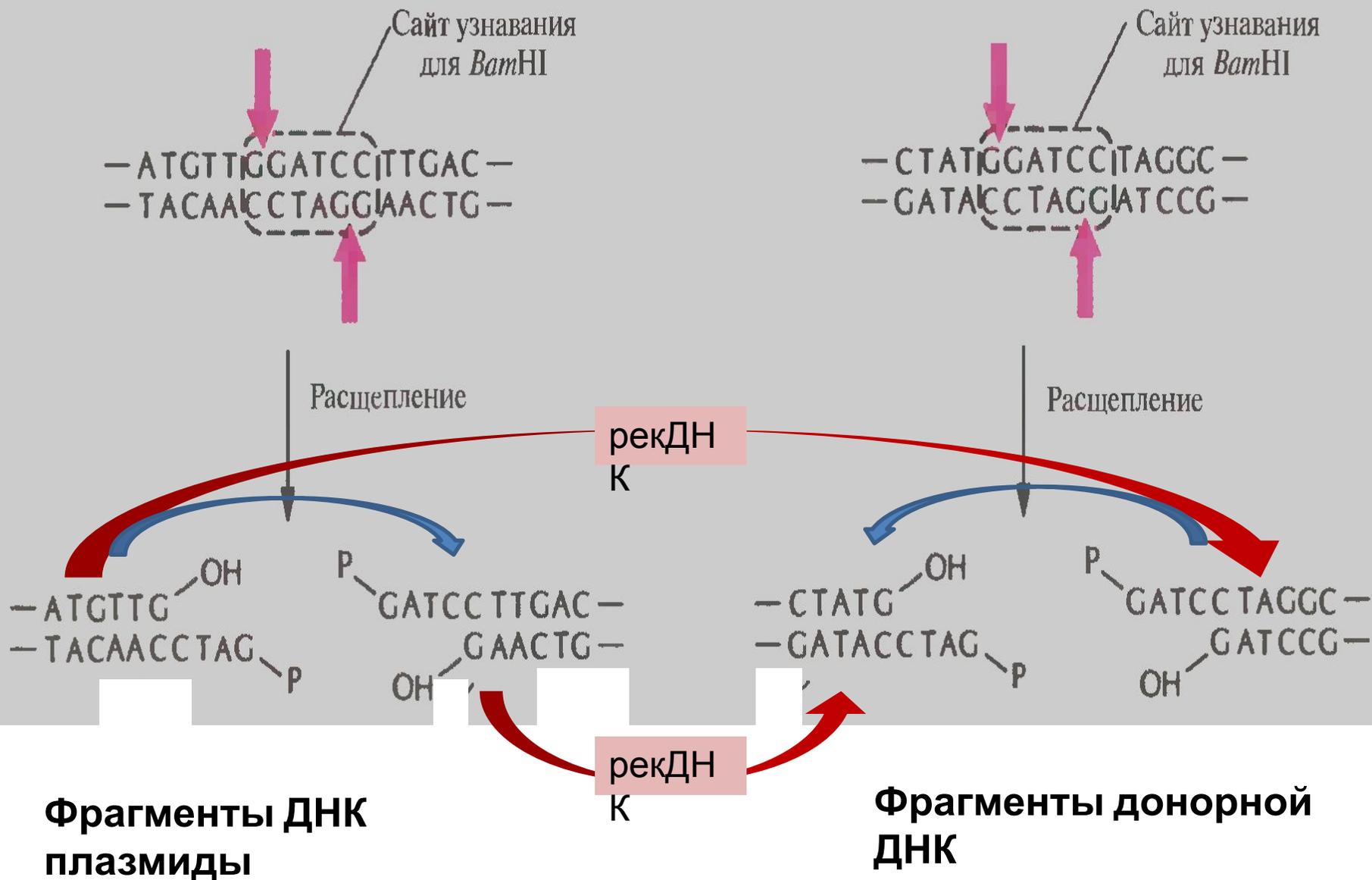
создатели - Боливар Ф., Родригес Р.



Технология рекомбинации ДНК с применением плазмидного вектора



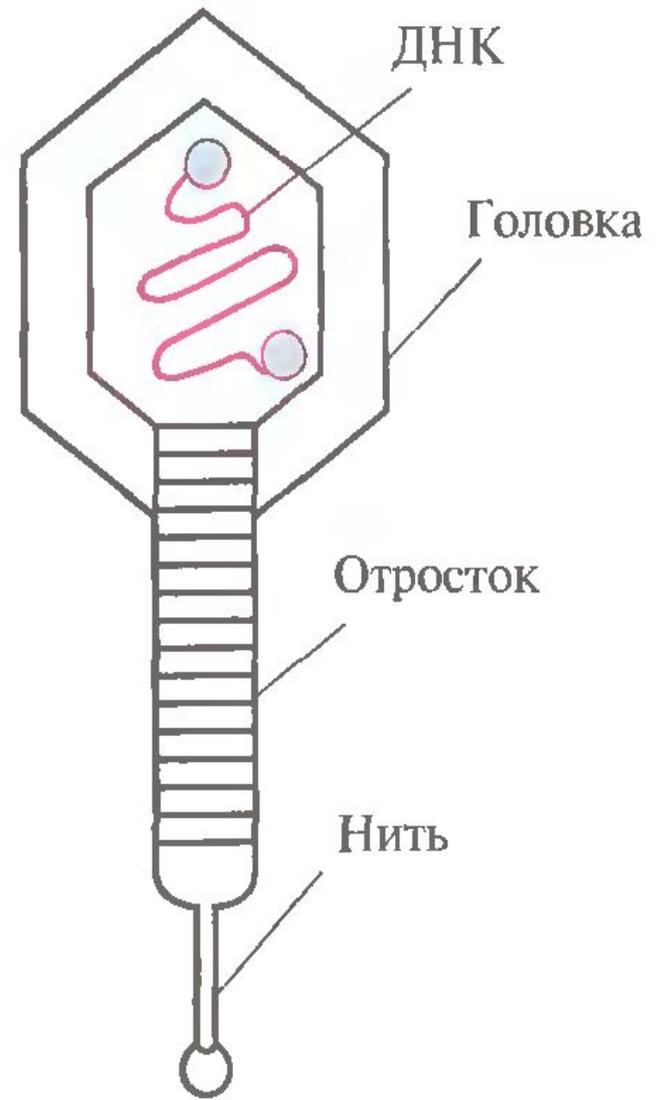
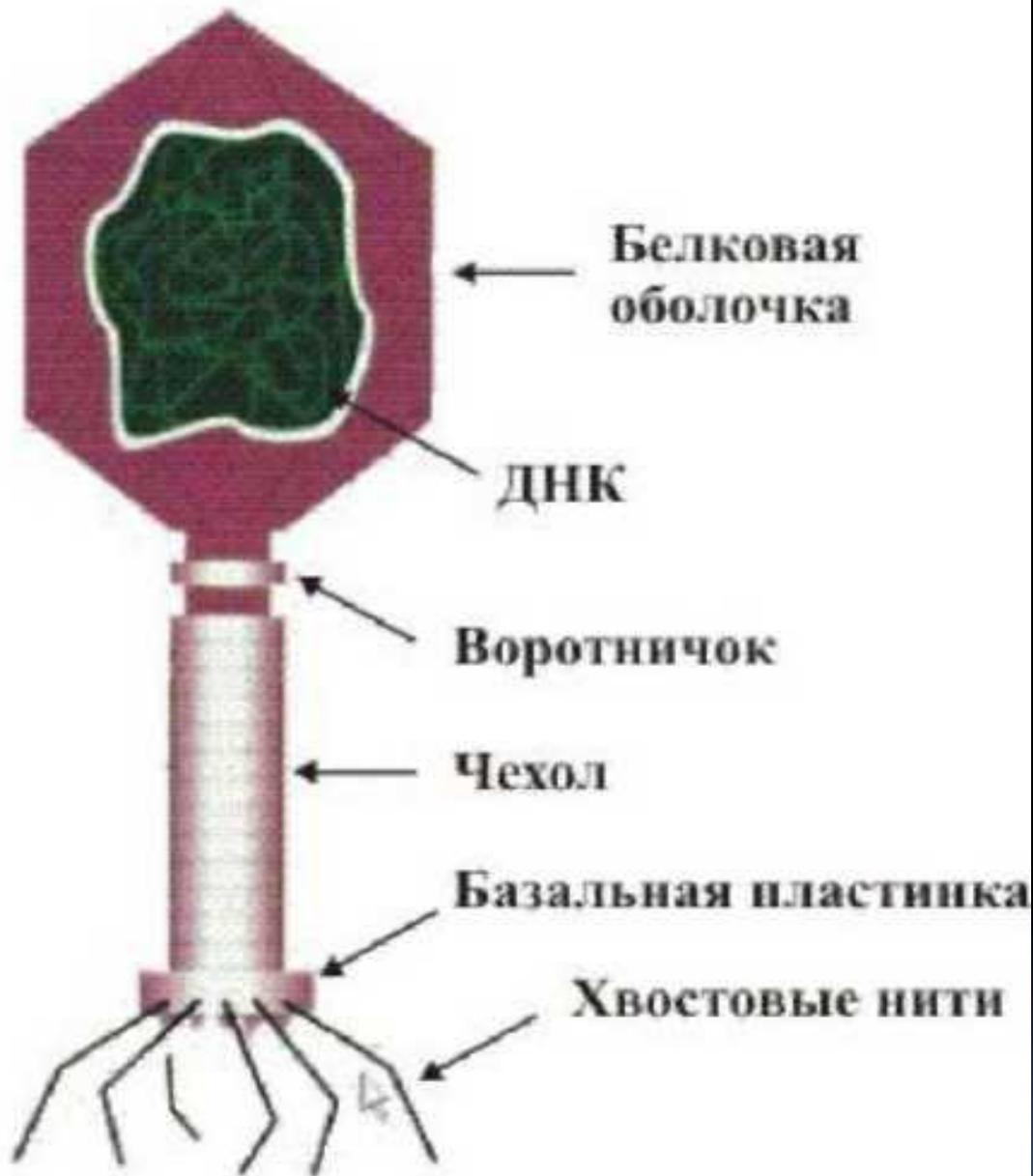
ФРАГМЕНТЫ ОБРАЗОВАВШИЕСЯ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ ДНК РАЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ РЕСТРИКТАЗОЙ *Bam*HI



Модификации плазмидных векторов

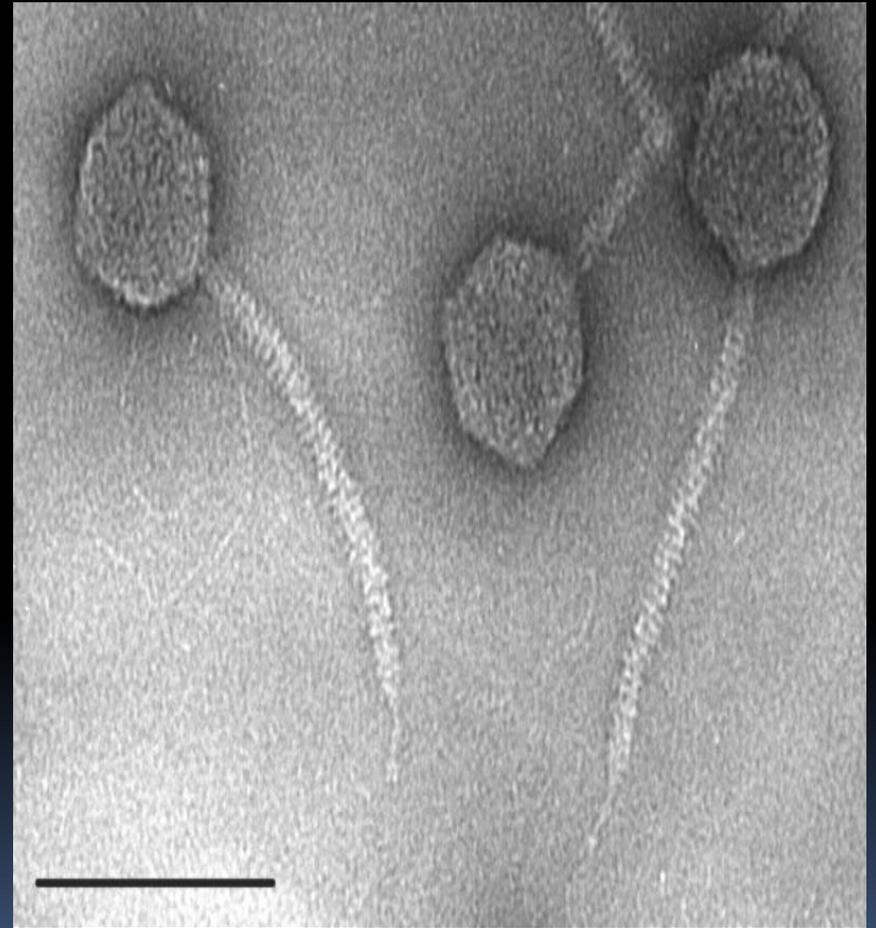
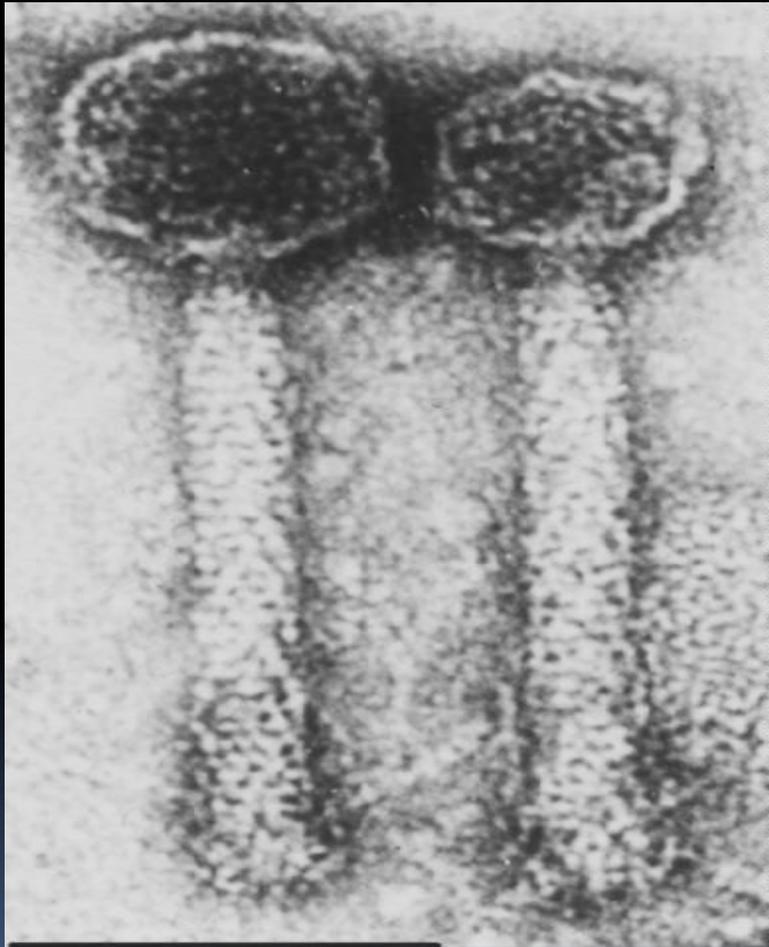
- Для всех рутинных процедур молекулярного клонирования широко используют *E. coli* в качестве клетки-хозяина. Но часто могут выступать и другие бактерии, например *Bacillus subtilis*. Клетки, способные воспринять чужеродную ДНК, называются **компетентными**.
- Часто в векторы, которые функционируют в кишечной палочке, встраивают второй сайт ORIGIN, который инициирует их репликацию в других клетках (не в кишечной палочке). Эти так называемые **ЧЕЛНОЧНЫЕ ВЕКТОРЫ** позволяют сначала проводить внедрение рекДНК в клетки кишечной палочки, а затем в клетки других бактерий.
- Созданы плазмидные вектора, которые содержат универсальный сайт origin для широкого спектра хозяев. Их можно использовать для работы с разными микроорганизмами.
- С помощью плазмидных векторов можно клонировать фрагменты ДНК длиной до 10 т.п.н. Однако часто приходится работать с более крупными фрагментами.

Векторы на основе бактериофага



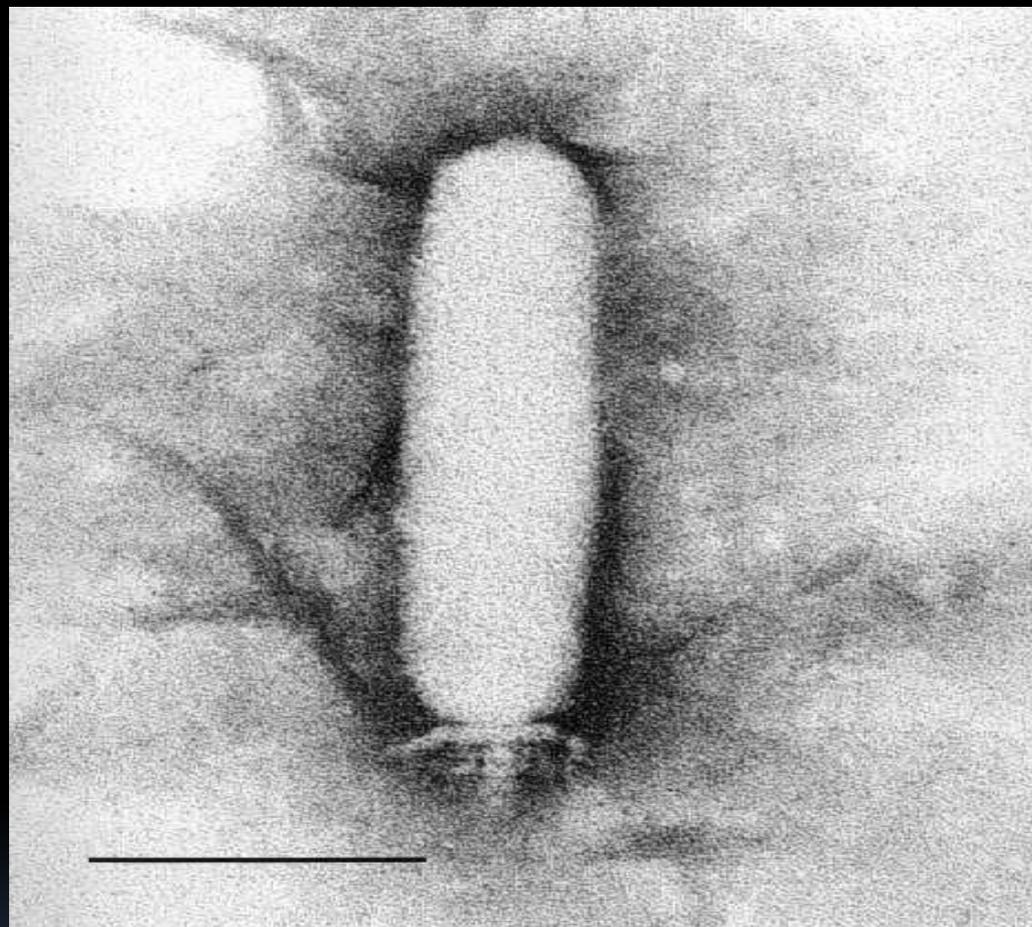
Структура бактериофага λ *Escherichia coli*. Схема

Бактериофаг λ *Escherichia coli*

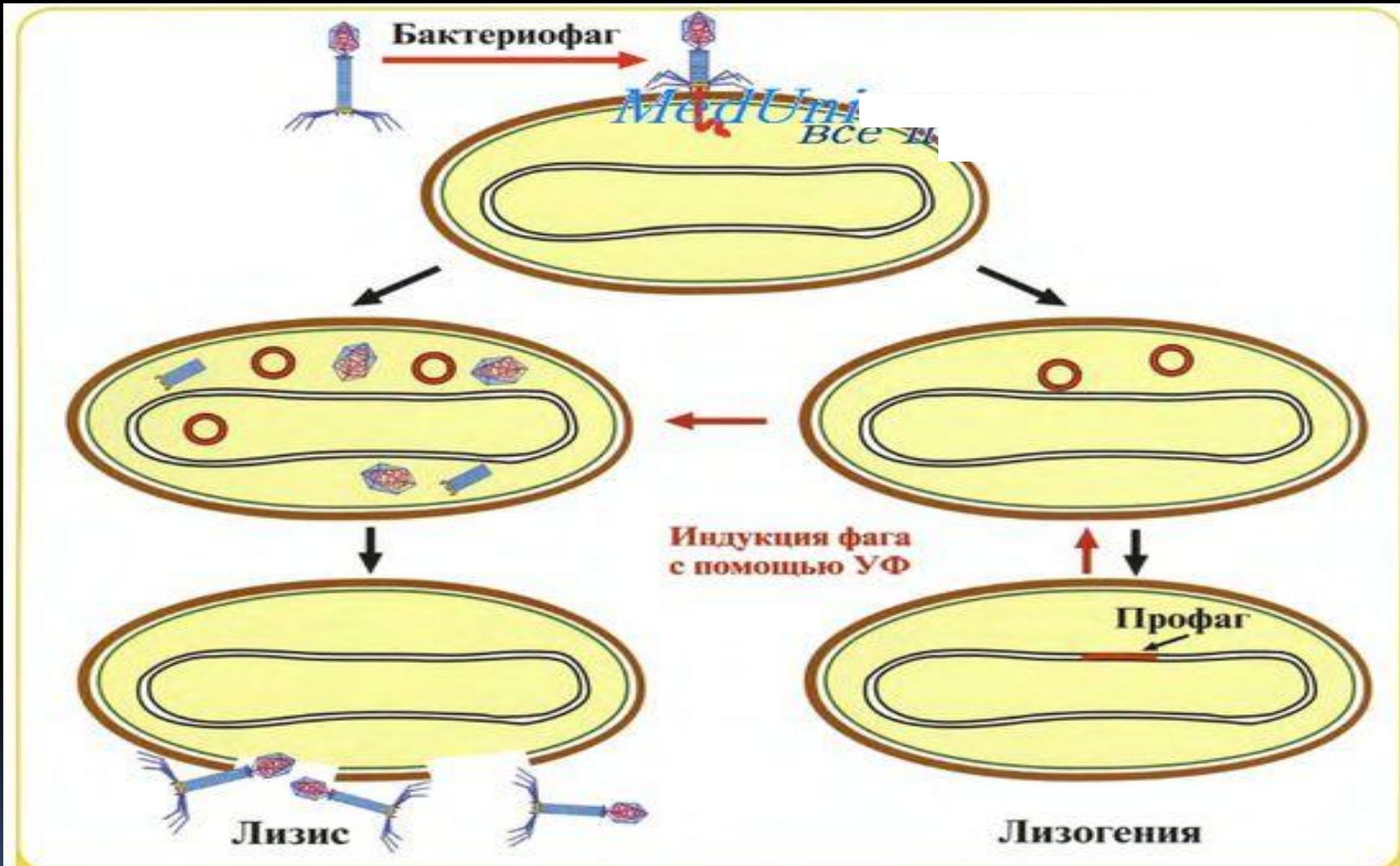


«Портрет» электронномикроскопический

После *адсорбции* фага на поверхности клетки белковый отросток (чехол) сокращается, проталкивая стержень внутрь клетки. Через стержень фаговая ДНК проникает внутрь клетки. Процесс облегчается благодаря местному повреждению клеточной стенки фаговым лизоцимом. Некоторые вирусы *впрыскивают* в клетку свою ДНК, другие проникают в нее сами.



Инфицирование фагом λ клетки ***E.coli***



После проникновения фага λ в клетку кишечной палочки возможны 2 сценария развития событий: лизис или лизогения