

Основы биотехнологии и биомедицины

Лекция 2

Технологии рекомбинантных
ДНК

Экспрессия рекомбинантных
генов

Что такое «генная инженерия»?

Раздел молекулярной генетики, занимающийся разработкой искусственных генетических систем с использованием манипуляций генами *на молекулярном уровне* путем конструирования *рекомбинантных* ДНК и РНК

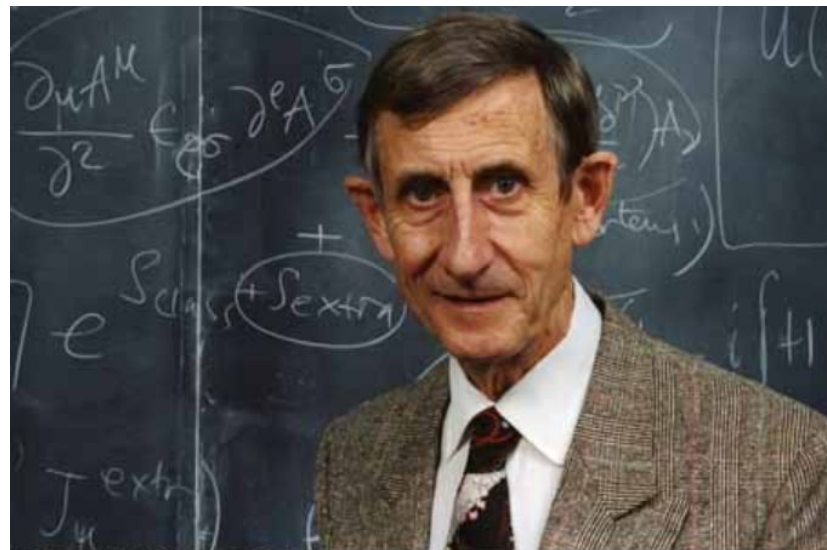


«Новые направления в науке гораздо чаще создаются с помощью новых методов, а не новых концепций.

Новые концепции объясняют известные явления по-новому.

Новые методы открывают новые явления, которые необходимо объяснить.»

Freeman J. Dyson





**В. Гейзенберг:
Профессионал это тот, кто
знает основные ошибки в
своей области и умеет их
избегать**

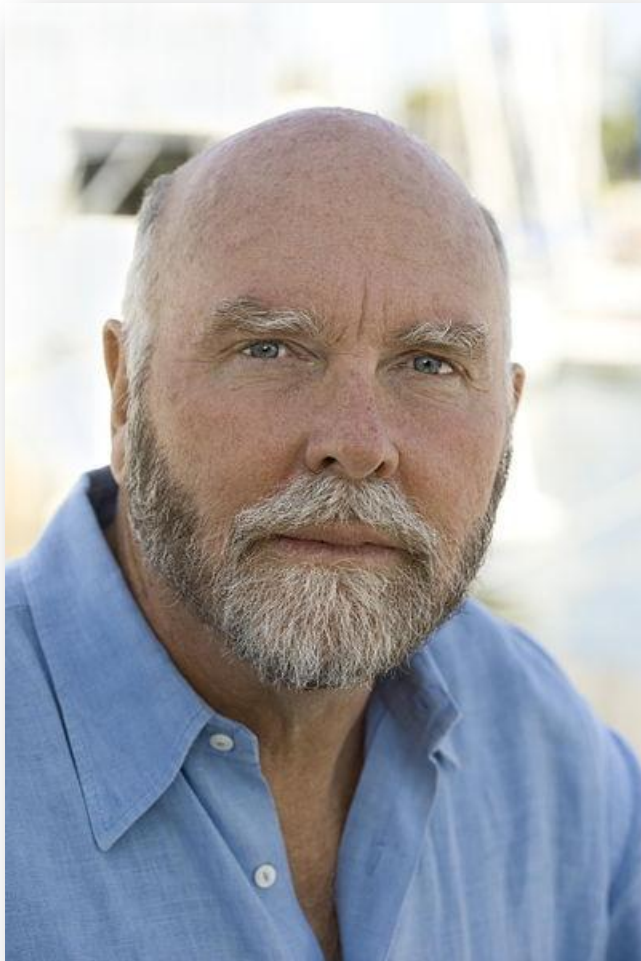
Генная инженерия облегчает обмен генами между природными генетическими системами

- ❖ В классической генетике и селекции – отбор среди потомства по определенным признакам ограничен репродуктивной изоляцией**
- ❖ В генной инженерии при получении трансгенных организмов такие ограничения действуют слабее**

***Программа-максимум* генной инженерии – создание жизнеспособного организма *de novo* по чертежам, разработанным в лаборатории - «*синтетическая биология*»**

2000 г. - геном вируса гепатита С (9,6 kbp)

Крейг Вентер – один из лидеров современной синтетической биологии



John Craig Venter, born 1946

Разработка и создание биологических модулей, биологических систем и биологических машин

для решения прикладных задач идентификации мРНК с использованием EST-маркеров (expressed sequence tags)

- 1998 Основал фирму Selera (секвенирование генома человека)
- 2010 Синтетический митохондрия (16.3 kb) геном мыши
- 2010 Синтетический геном (580-kb) и синтетический штамм *Mycoplasma mycoides*
- 2014 Синтетическая хромосома дрожжей III (273 kb) *S. cerevisiae*

**Клонирование – одно из
ключевых понятий генной
инженерии**

Что такое «клонирование»?

«клона»: препарата идентичных молекул ДНК

или

«идентичных» живых организмов

В случае ДНК два пути решения задачи:

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
2. Рекомбинантные молекулы ДНК

Для чего нужны клоны ДНК?

Для удобства проведения исследований

Работать с индивидуальными молекулами ДНК трудно, но ВОЗМОЖНО

Клонирование ДНК

Цель – получение клона идентичных последовательностей

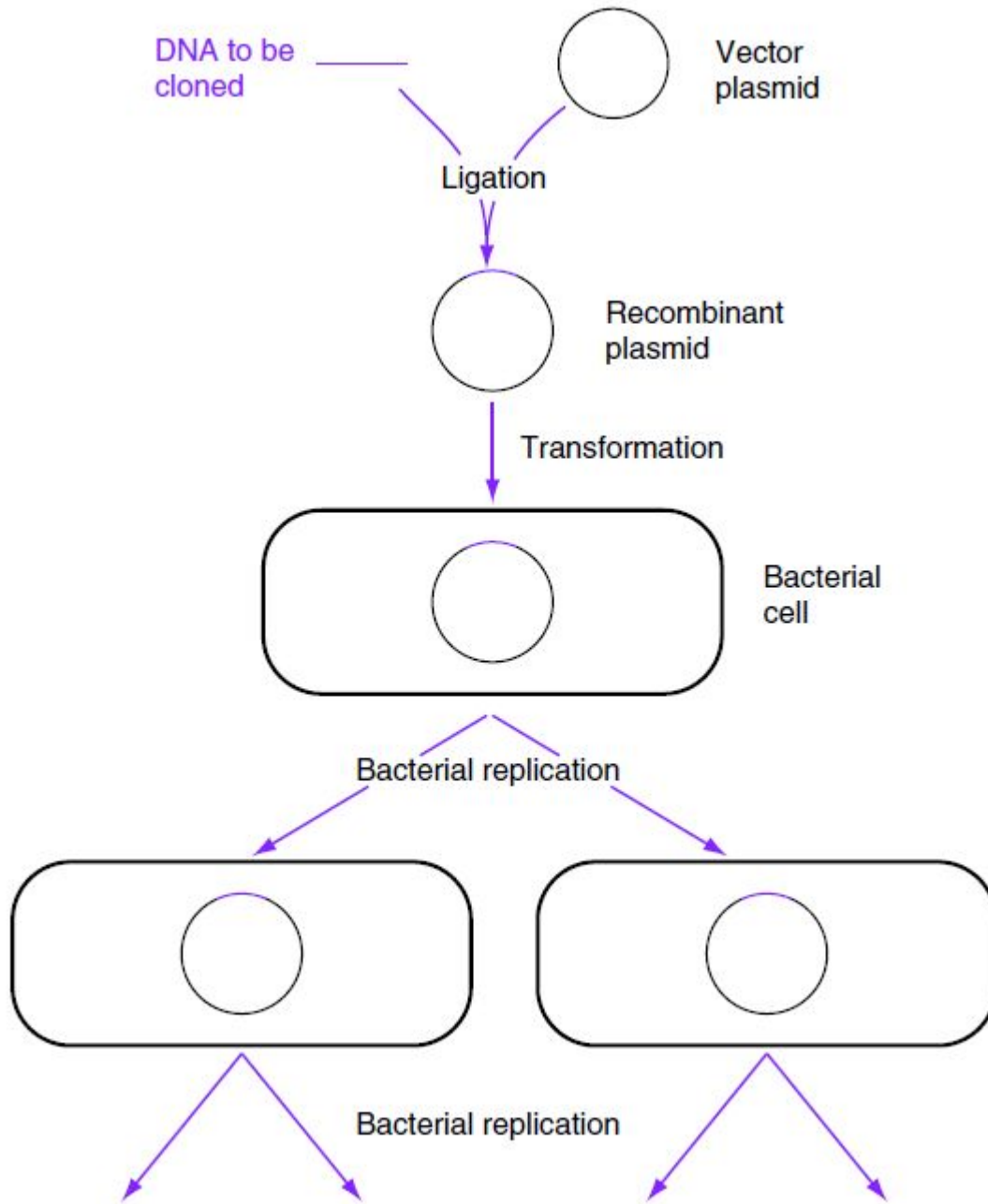
1 – Объединение вектора со вставкой чужеродной ДНК

2 – Введение рекомбинантного вектора в клетки

3 – Размножение клеток

(получение клона клеток)

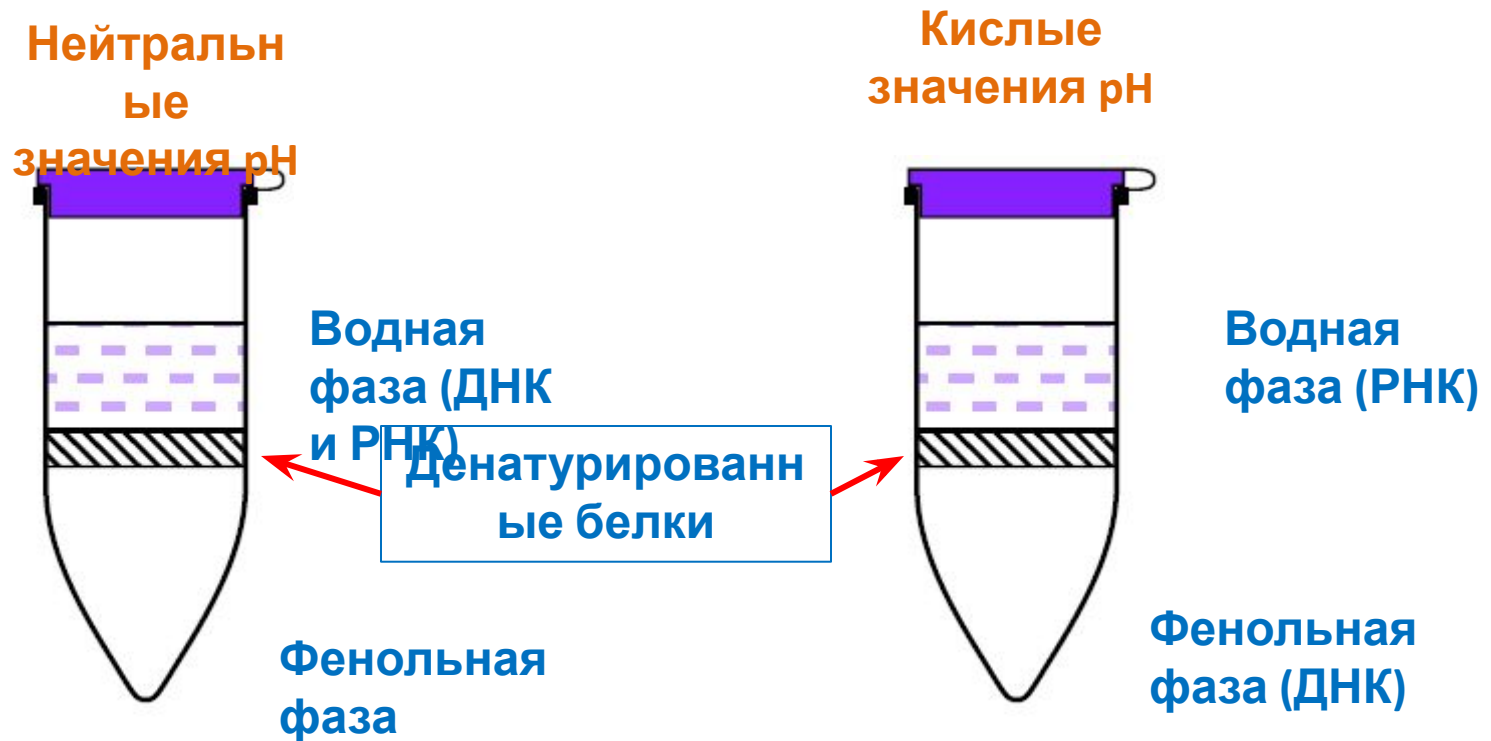
или амплификация молекул нуклеиновых



Выделение нуклеиновых кислот

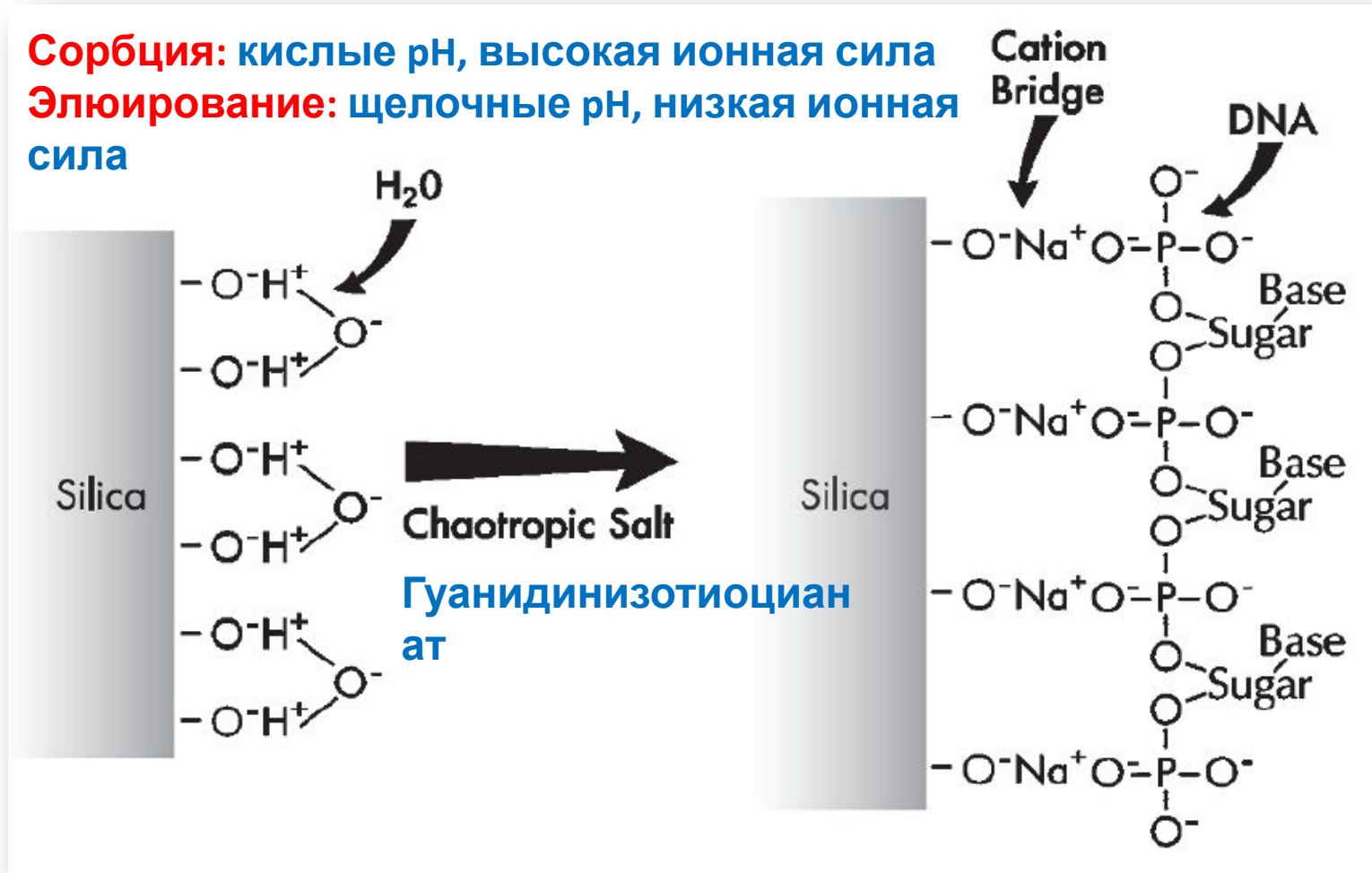
*Прежде чем клонировать
последовательность, необходимо
выделить содержащую ее суммарную
ДНК*

Фенольный метод выделения ДНК

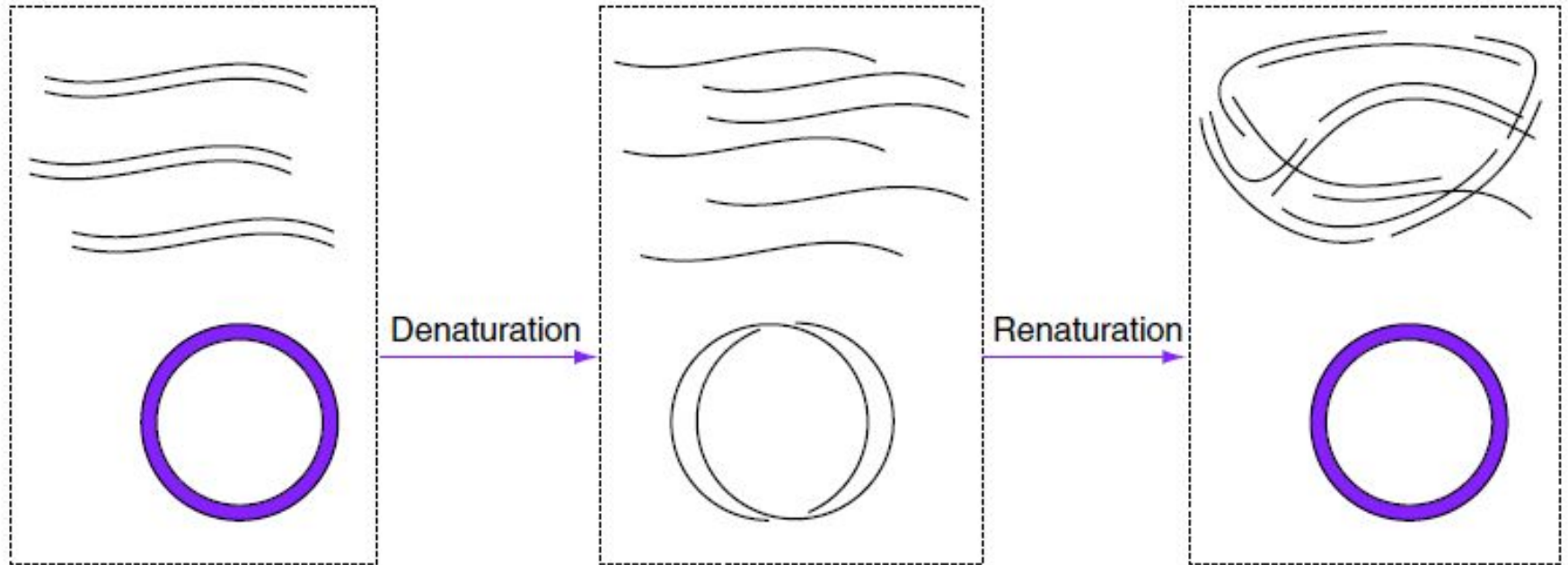


Взаимодействие ДНК с поверхностью стекла

Сорбция: кислые pH, высокая ионная сила
Элюирование: щелочные pH, низкая ионная сила



Щелочной метод выделения бактериальных плазмид



pH 8,0

Фрагменты
линейной ДНК
и кольцевая
плазмидная
ДНК

pH 12,0

Кольца
плазмидной ДНК
остаются
зацепленными
друг за друга

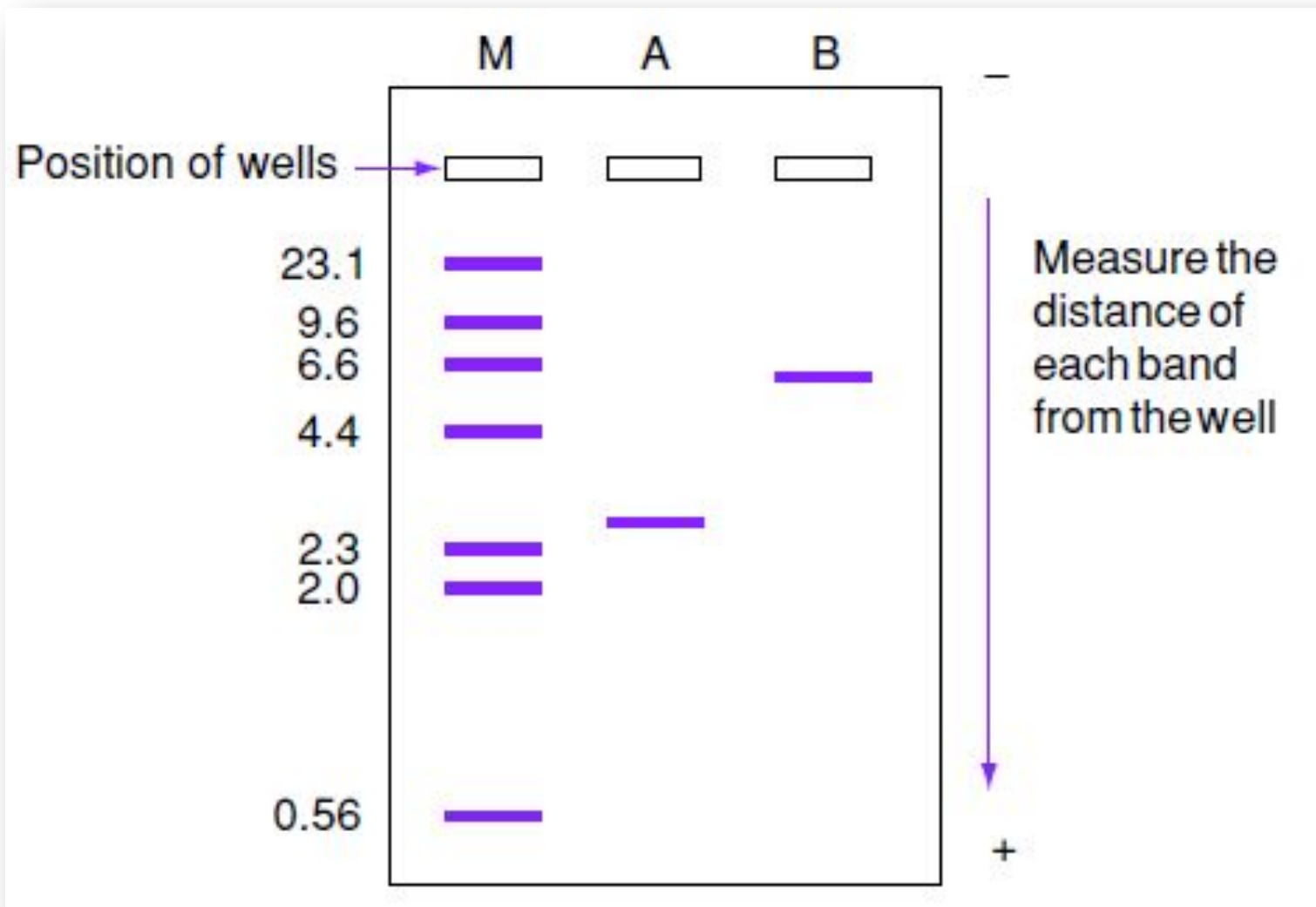
pH 8,0

Линейная ДНК
агрегирует,
кольцевая
восстанавливается

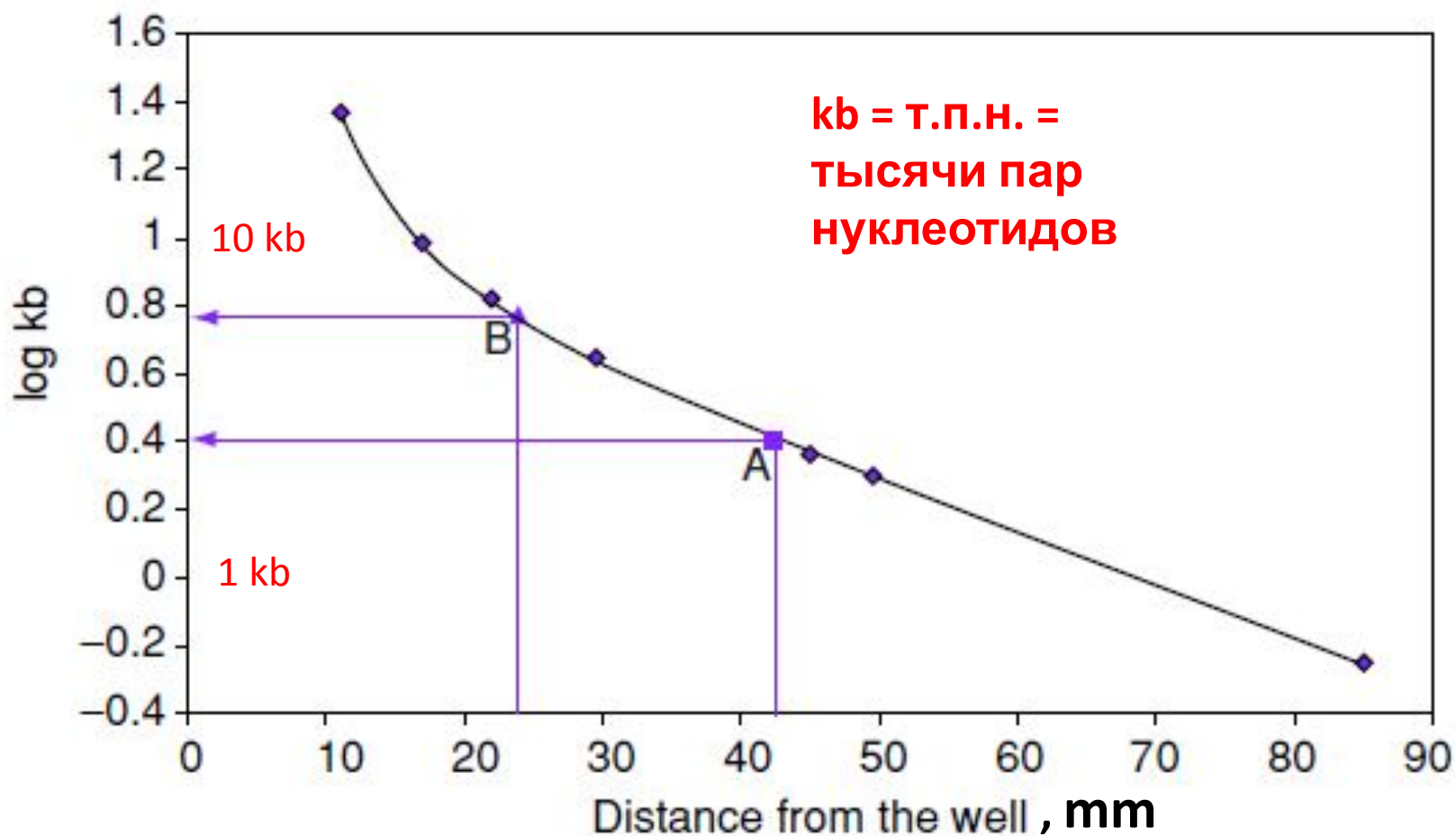
Разделение нуклеиновых кислот

**Цель: обогащение препаратов
нуклеиновых кислот нужными
последовательностями**

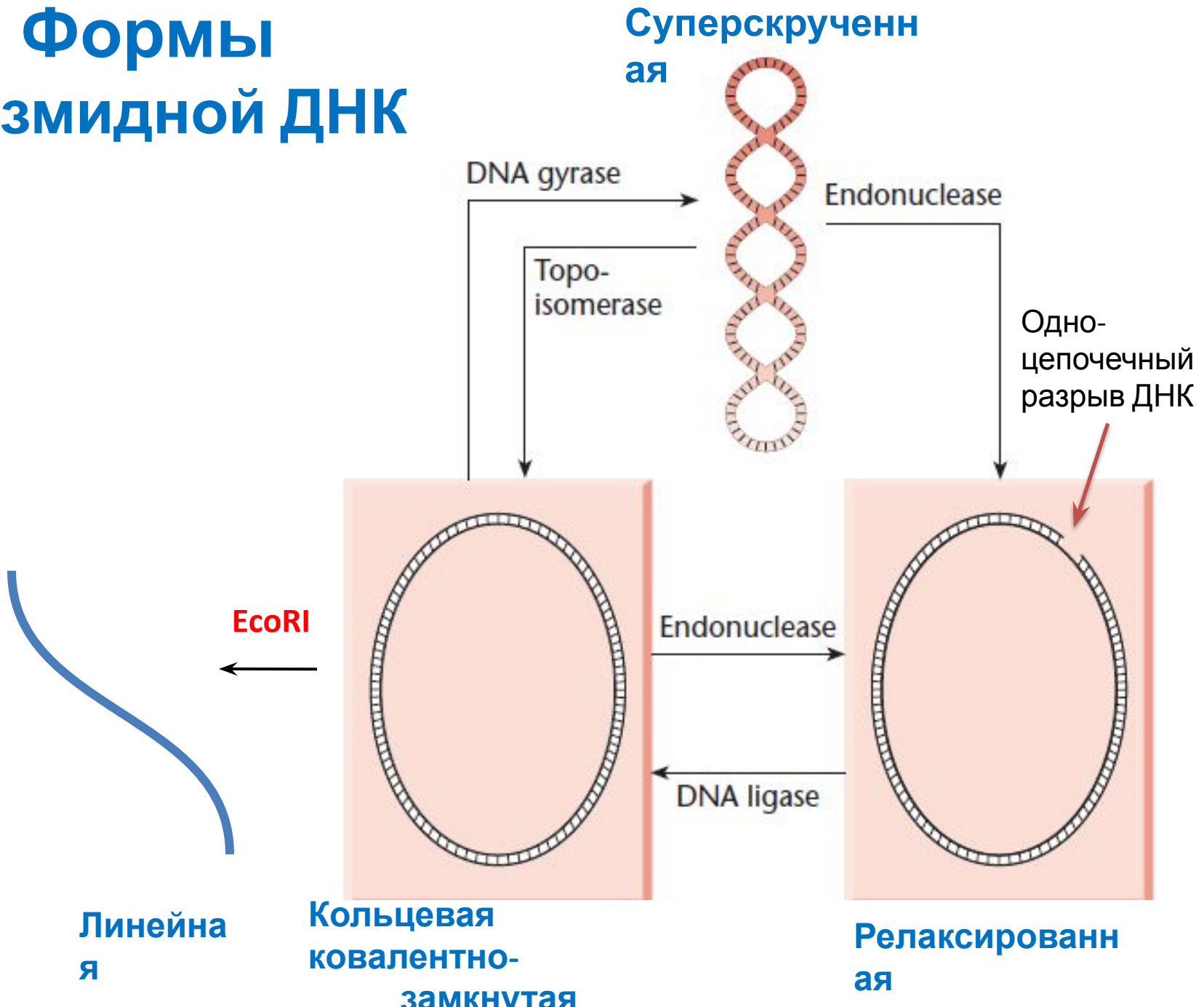
Аналитический электрофорез молекул ДНК в агарозном или полиакриламидном геле



Калибровочная кривая для определения размеров фрагментов ДНК



Формы плазмидной ДНК



Электрофоретическая подвижность разных форм плазмиды в присутствии бромистого этидия

ЭТИДИЯ

Direction of migration



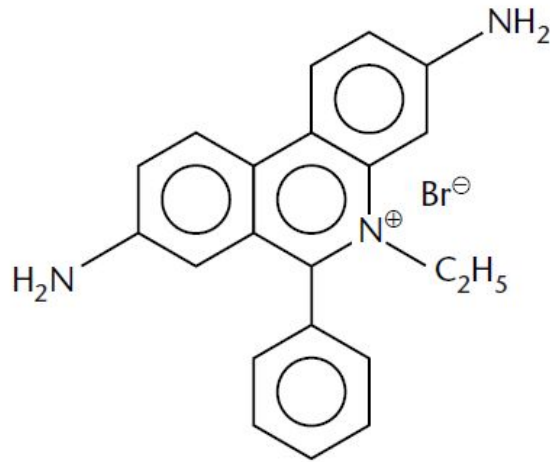
Релакс

Супер.



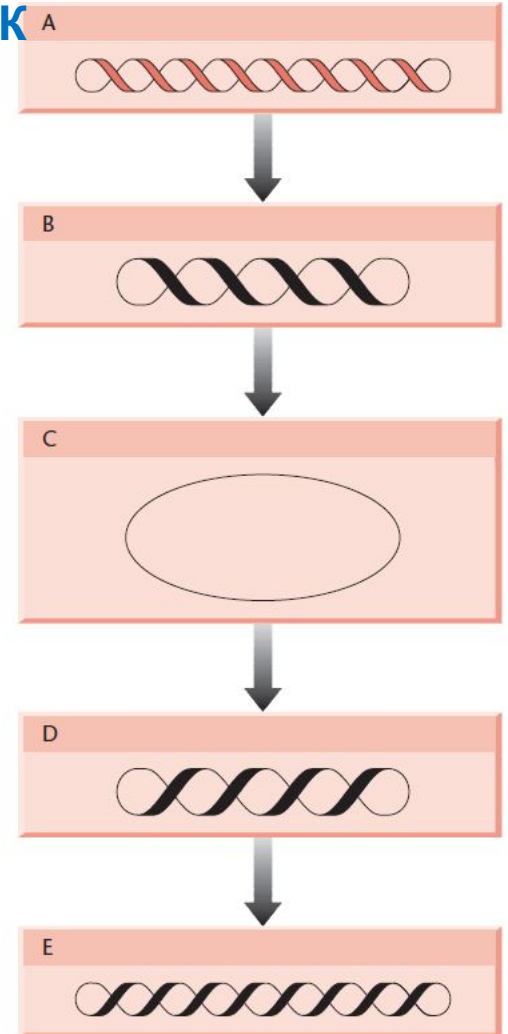
Предел визуальной чувствительности
—
50 нг ДНК/полоса

Линейная



Бромистый этидий

Увеличение отношения EtBr/ДНК



Ферменты, используемые в генной инженерии

***Генные инженеры
используют элементы
генетических систем,
функционирующие в природе***

Эндонуклеазы рестрикции класса II (рестриктазы) – основной инструмент генной инженерии

- ◆ Узнают специфические последовательности – сайты рестрикции
- ◆ Активны в виде димеров в присутствии ионов Mg^{2+}
- ◆ Изучено более 3000 и коммерчески доступно около 600 рестриктаз

Номенклатура рестриктаз класса II

HaeI, *HaeII*, *HaeIII* – *Haemophilus aegypticus*,
открыты в указанной последовательности

Hinc и *Hind* – *Haemophilus influenzae*, штаммы *c* и *d*

Субстратная специфичность рестриктаз класса II

Палиндромные сайты

мелкощепящие: *Bgl*I (GGCC), крупнощепящие: *Eco*RI (GAATTC),
*Not*I (GCGGCCGC)

Частично вырожденные сайты

*Hinc*II (GT $\color{red}{Y}$ RAC, Y = p $\color{red}{Y}$ rimidine, R = pu $\color{red}{R}$ ine),

Разорванные сайты

*Bgl*I (GCC $\color{red}{N}_5$ GGC, N = a $\color{red}{N}$ y)

Квазисимметричные сайты

*Btr*I (CAC \downarrow GTC, класс IIQ)

Двойные сайты:

*Sfi*I (GGCC $\color{red}{N}_5$ GGCC)

Разрезание со смещением - класс IIS

(*Foc*I GGATGN $\substack{9,13}{\color{red}{S}}$ hifted cleavage) Последовательности липких
концов уникальны

Изменение субстратной специфичности в неоптимальных условиях

*Eco*RI - GAATTC, *Eco*RI* - AATT (Mg $^{2+}$, органические
растворители)

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^{Me}ATC), *DpnI* (только G^{Me}ATC), *MboI* (только GATC)

❖ *Гетерошизомеры*

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

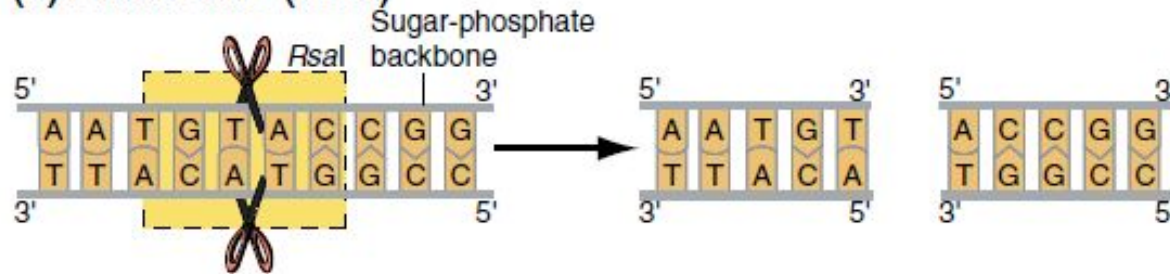
❖ *Изокаудомеры*

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

NotI GC*GGCC GC *Bsp120I* G*GGCC C *BamHI/BclI/BglII/BstYI/DpnII*

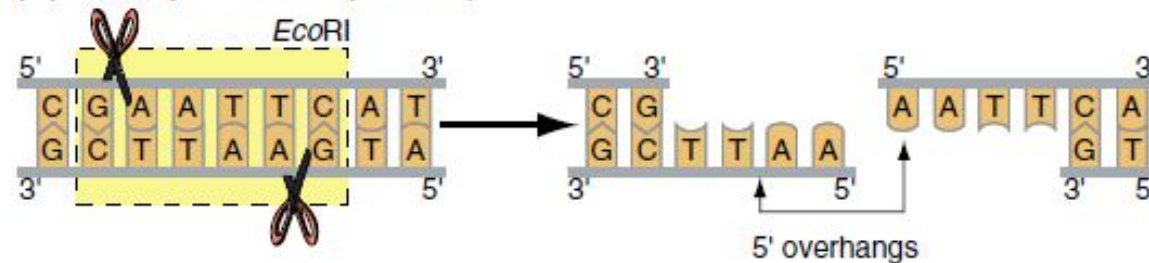
Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

(a) Blunt ends (*RsaI*)



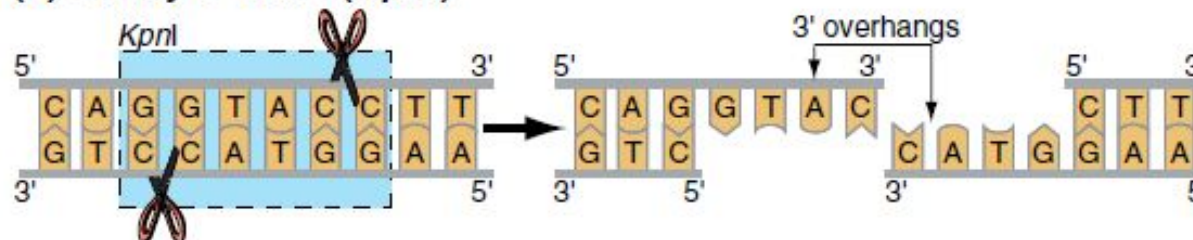
«Тупые»
концы

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



5'-
выступающие

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

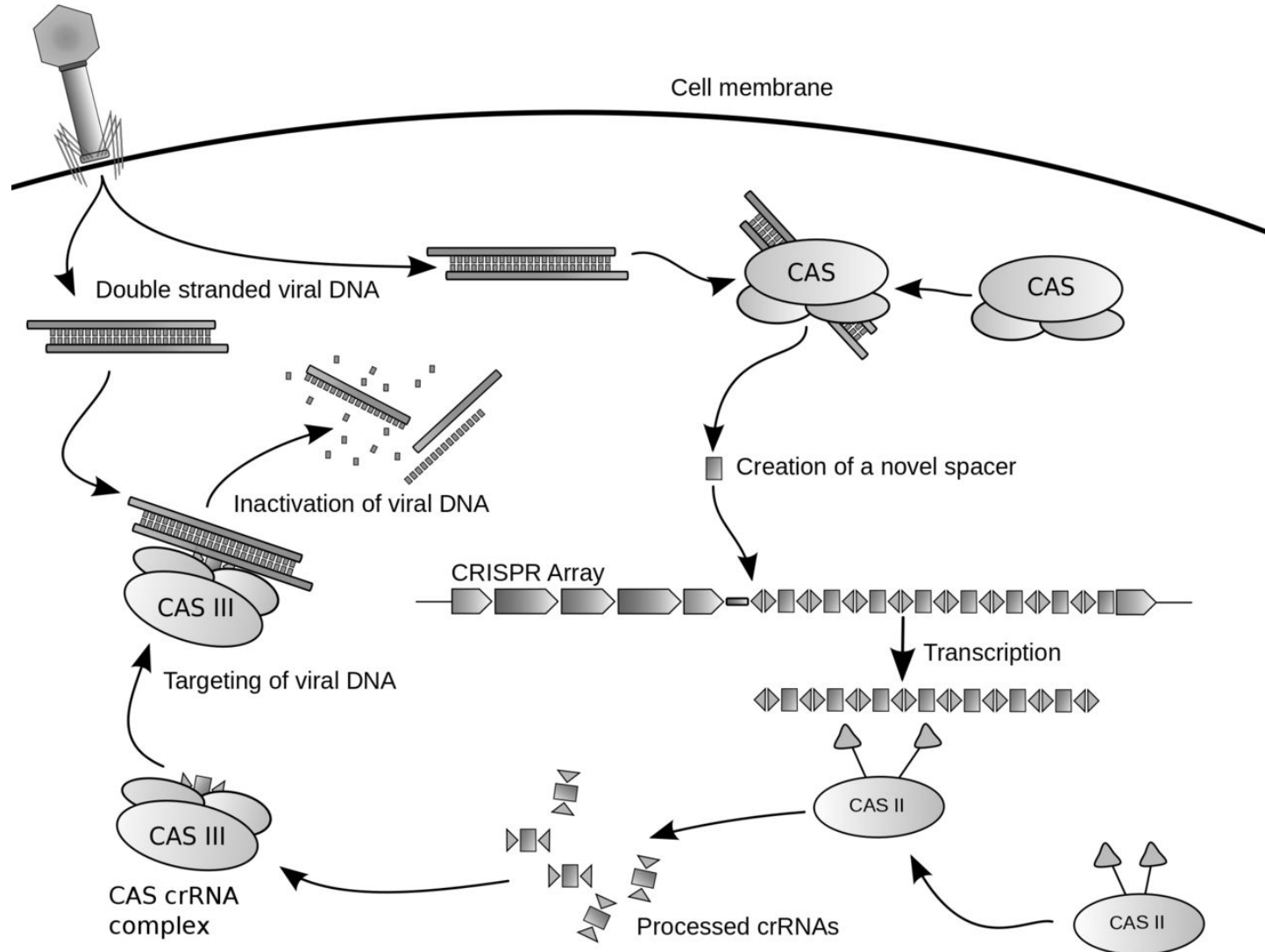


3'-
выступающие

Система бактериальной антивирусной защиты CRISPR/Cas

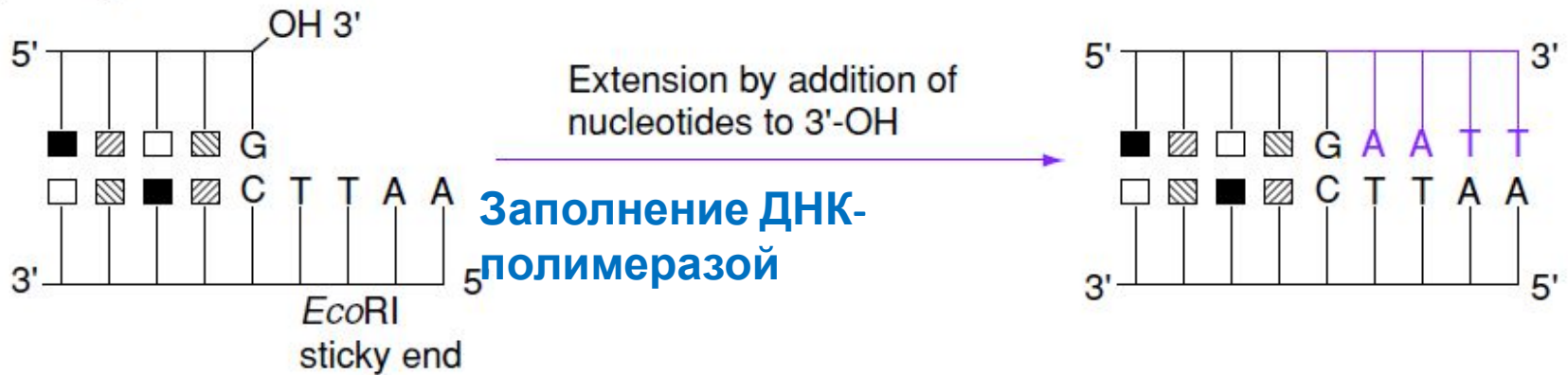
CRISPR - Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Cas - CRISPR associated proteins

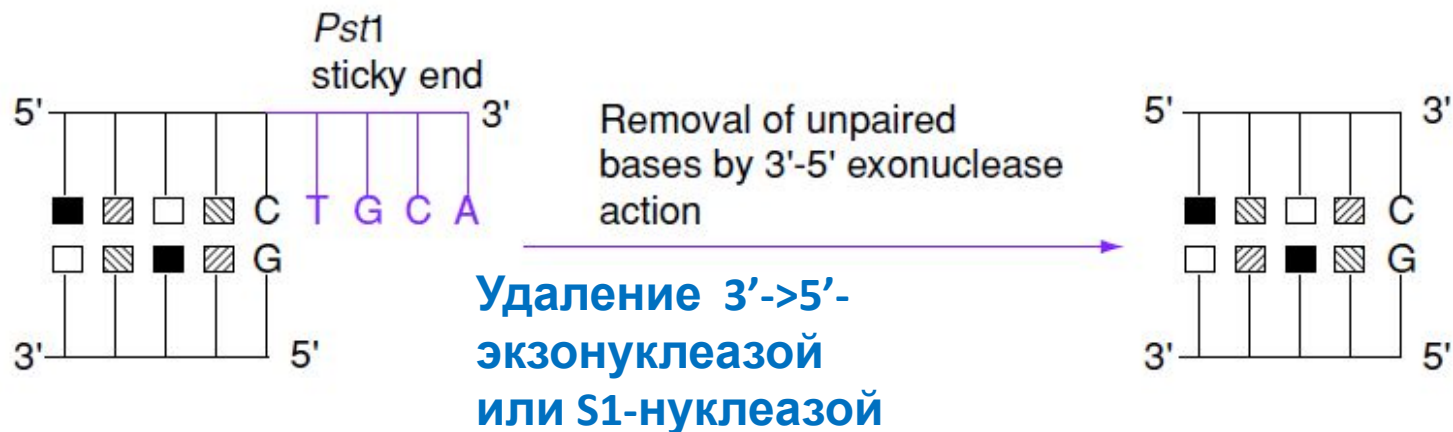


Два способа «затупления» липких концов ДНК

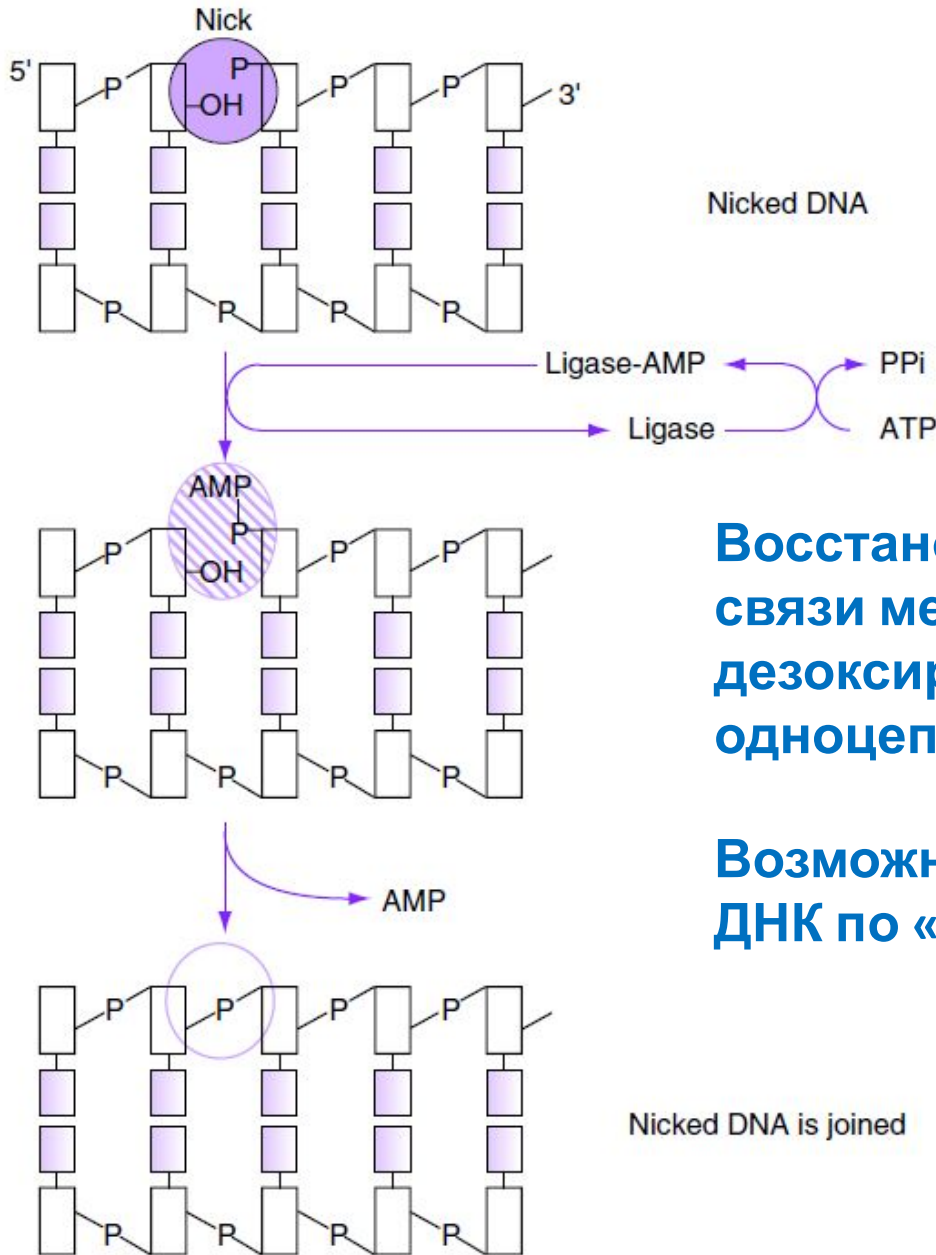
a) Filling in



b) Trimming back



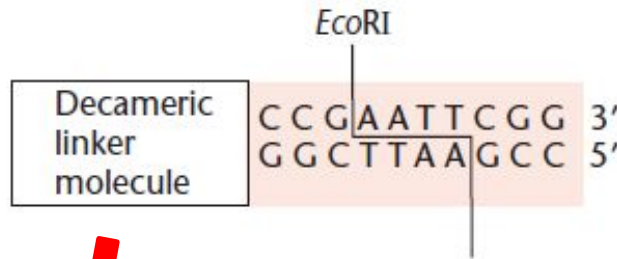
Механизм действия Т4-ДНК-лигазы



Восстановление фосфодиэфирной связи между соседними остатками дезоксирибозы на месте одноцепочечного разрыва ДНК

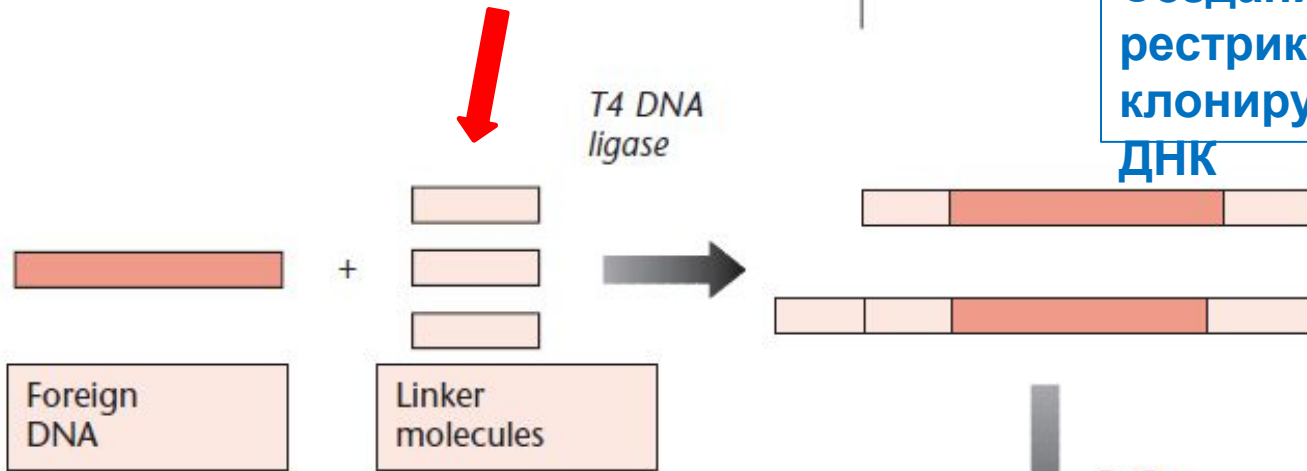
Возможно лигирование фрагментов ДНК по «тупым» концам

Линкеры



Создание новых сайтов рестрикции на концах клонируемых молекул ДНК

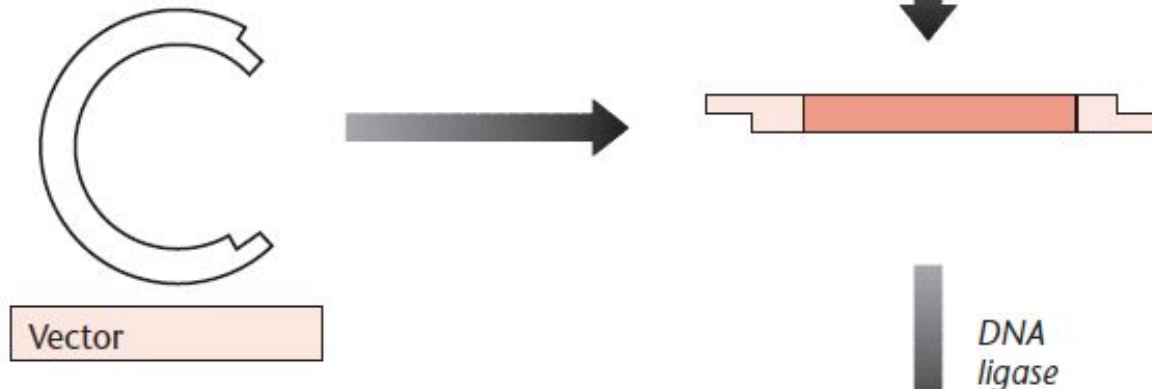
ДНК



Лигирование по «тупым» концам

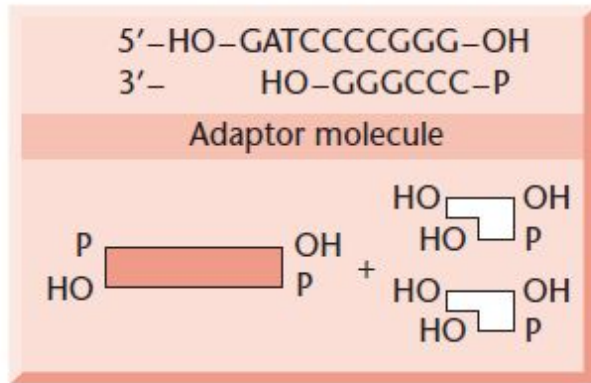
EcoRI

Расщепление EcoRI

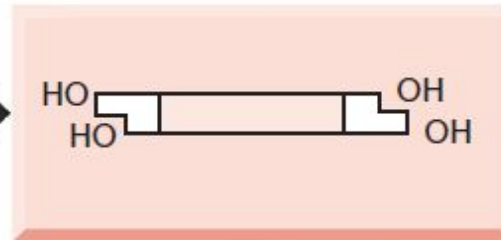


Лигирование по «липким» концам, клонирование

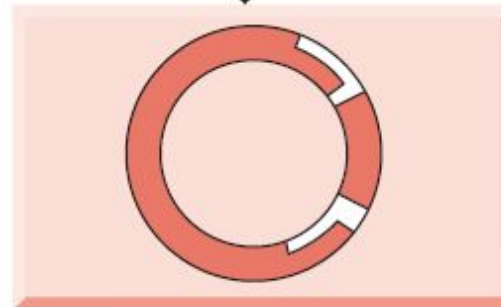
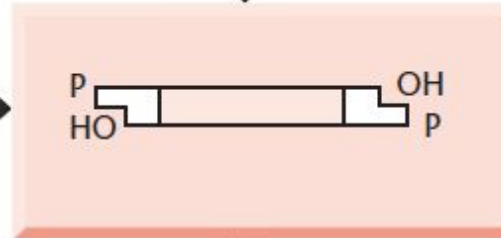
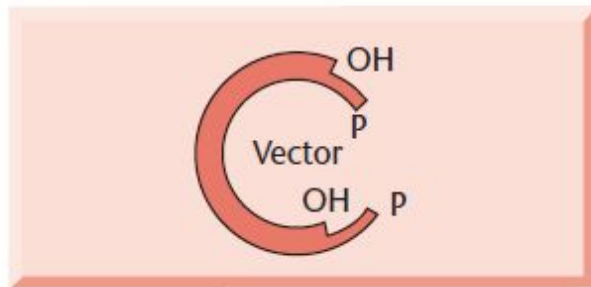
Адаптеры



T4 DNA
ligase,
ATP



Polynucleotide
kinase, ATP



Создание новых сайтов рестрикции на концах клонируемых молекул ДНК **без использования рестриктаз**

Лигирование по «тупым» концам (димеризации адаптеров не происходит из-за отсутствия 5'-фосфатной группы)

Фосфорилирование концов вставки

Лигирование по «липким» концам, клонирование

Щелочная фосфатаза и полинуклеотидкиназа

Щелочная фосфатаза:

- ❖ Оптимальные значения pH - щелочные
- ❖ Удаление 5'-фосфатных групп (дефосфорилирование) из ДНК, РНК и нуклеотидов
- ❖ Фосфатаза кишечника телят (calf intestinal phosphatase - CIP). Термолабильна

Полинуклеотидкиназа бактериофага T4:

- ❖ Перенос γ -фосфатной группы АТФ на 5'-ОН-группу фрагментов ДНК (фосфорилирование). Введение радиоактивной метки, подготовка к лигированию

ДНК-зависимые ДНК-

ПОЛИМЕРАЗЫ

◆ ДНК-полимераза I (Pol I) (EC 2.7.7.7)

Мол. масса 109 кДа, Активности: 5'→3'-полимераза, 5'→3'- и 3'→5'- (корректирующая) –экзонуклеазы. Введение концевой метки в ДНК, ник-трансляция, синтез 2-й цепи кДНК.

Фрагмент Кленова: мол. масса 76 кДа (субтилизин), отсутствует 5'→3'-экзонуклеазная активность, введение метки, одноцепочечные зонды.

Термостабильные ДНК-полимеразы

◆ T4-ДНК-полимераза

Мол. масса 114 кДа, отсутствует 5'→3'-экзонуклеаза, введение метки, «шлифовка» концов ДНК 3'→5'-экзонуклеазой.

◆ T7-ДНК-полимераза

«Секвеназа» - искусственно снижена 3'→5'-экзонуклеазная активность, повышены процессивность и скорость синтеза ДНК.

«Термосеквеназа» - получена из *Taq*-ДНК-полимеразы – повышено сродство к ddNTPs, снижена активность

Обратные транскриптазы (ОТ)

- ❖ ОТ вируса миелобластоза птиц (AMV RT) – димер, хорошо транскрибирует сильно структурированные матрицы
- ❖ ОТ вируса мышиноного лейкоза Молони (M-MLV RT) – мономер, рекомбинантный фермент
- ❖ ОТ ВИЧ-1 – транскрибирует как РНК, так и ДНК

Нуждаются в ДНК-затравке (праймере)

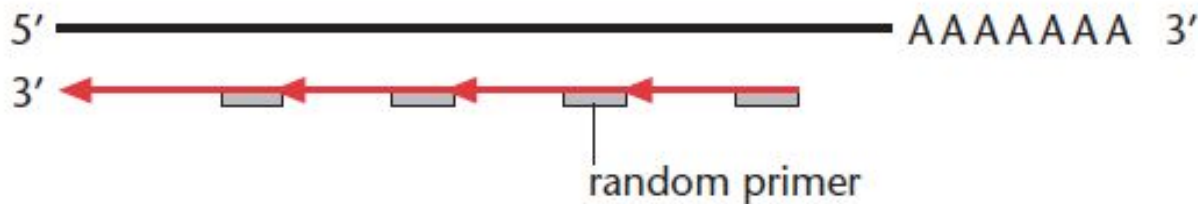
Обладают активностью РНКазы Н, деградирует РНК-матрицу в процессе синтеза первой цепи

Мутанты рекомбинантной M-MLV RT без РНКазы Н более эффективны в синтезе первой цепи кДНК

Высокая частота ошибок – до 5×10^{-3} /нуклеотид

Три стратегии синтеза первой цепи кДНК обратной транскриптазой

Random primer



Случайный
праймер

Oligo (dT) primer



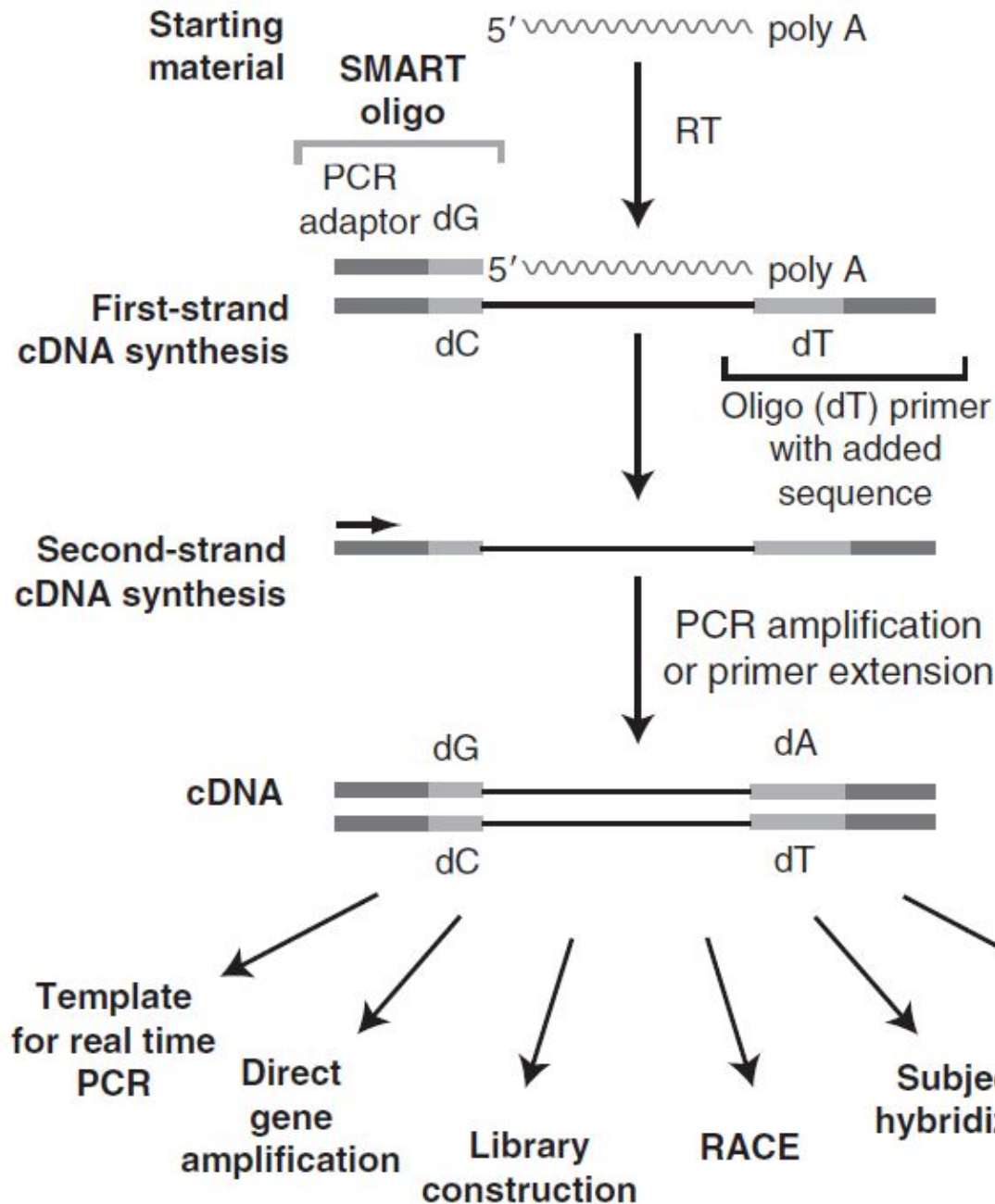
Олиго(dT)-
праймер

Sequence-specific primer



Специфический
праймер

SMART-синтез кДНК



- Олиго-dC присоединяется независимо от матрицы обратной транскриптазой
- Олиго-dG с адаптером исходно добавлен в реакционную смесь и используется ОТ в качестве матрицы для завершения синтеза первой цепи кДНК

Векторы

Молекулярно-генетические конструкции, предназначенные для переноса генетического материала в клетки живых организмов

- ❖ **Векторы для клонирования (Cloning vectors)**
- ❖ **Экспрессирующие векторы (Expression vectors)**
- ❖ **Векторы для слияния генов (Gene fusion vectors)**
- ❖ **Бинарные (челночные) векторы (Shuttle vectors)**

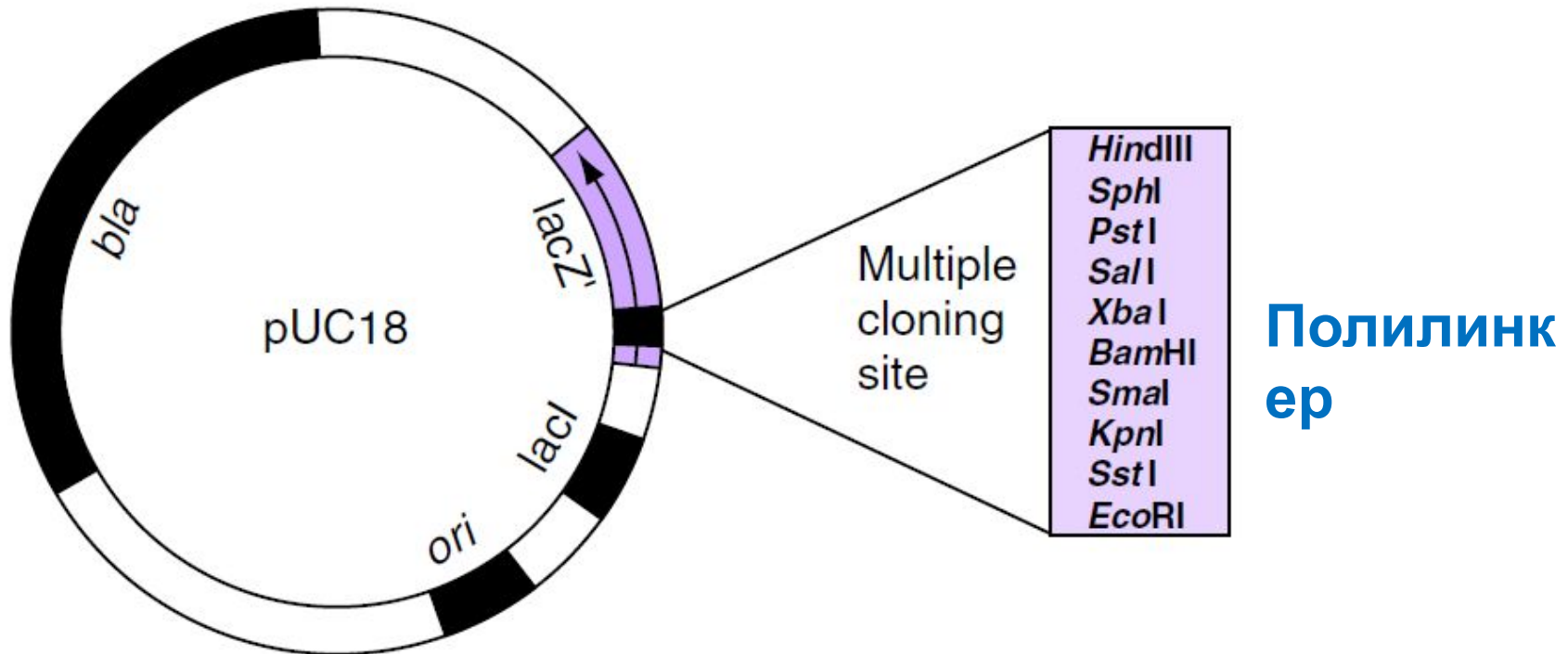
Свойства, которыми должен обладать любой вектор

- ❖ 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 plasmid vectors against a dark blue background. The plasmids vary in size and some appear to be intertwined. A central blue rectangular box contains the text 'Плазмидные векторы' in yellow.

Плазмидные векторы

Плазмидный вектор pUC18



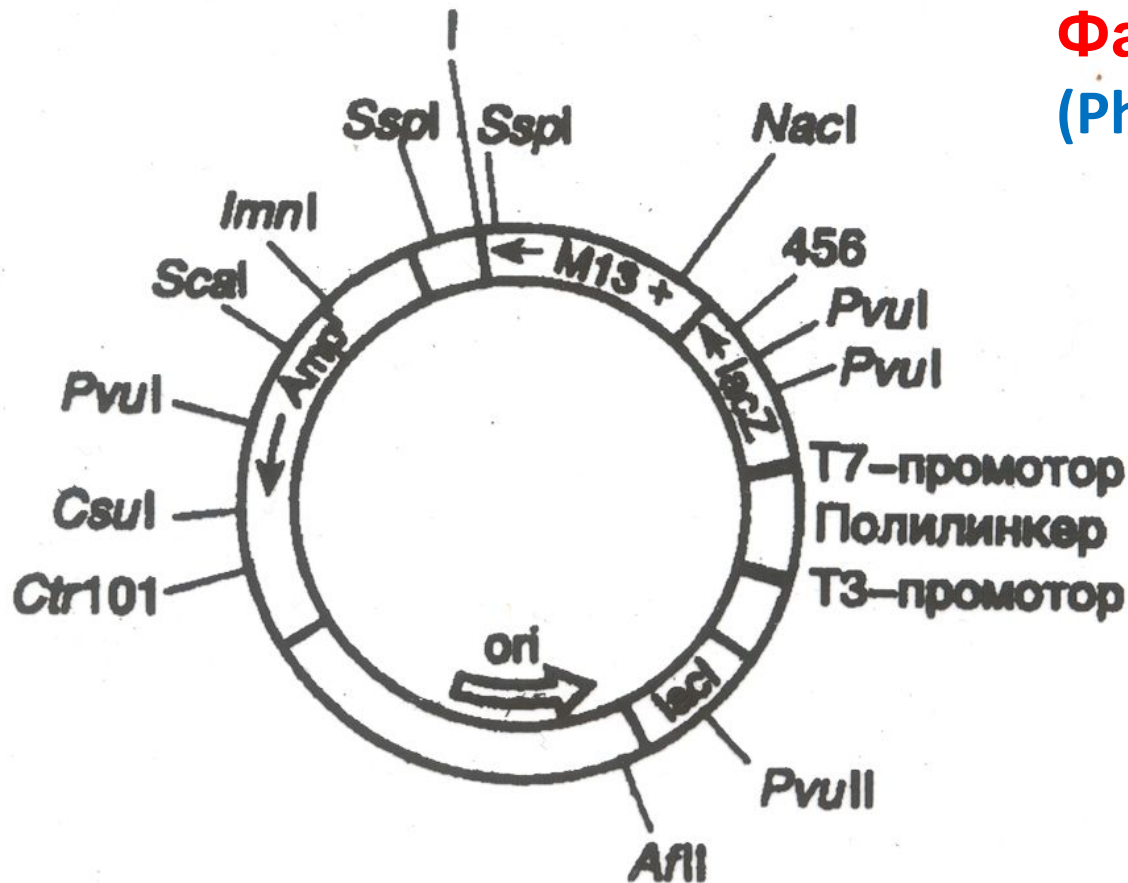
bla – Ген β-лактамазы, **селектируемый маркер** (устойчивость ампициллину)

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)

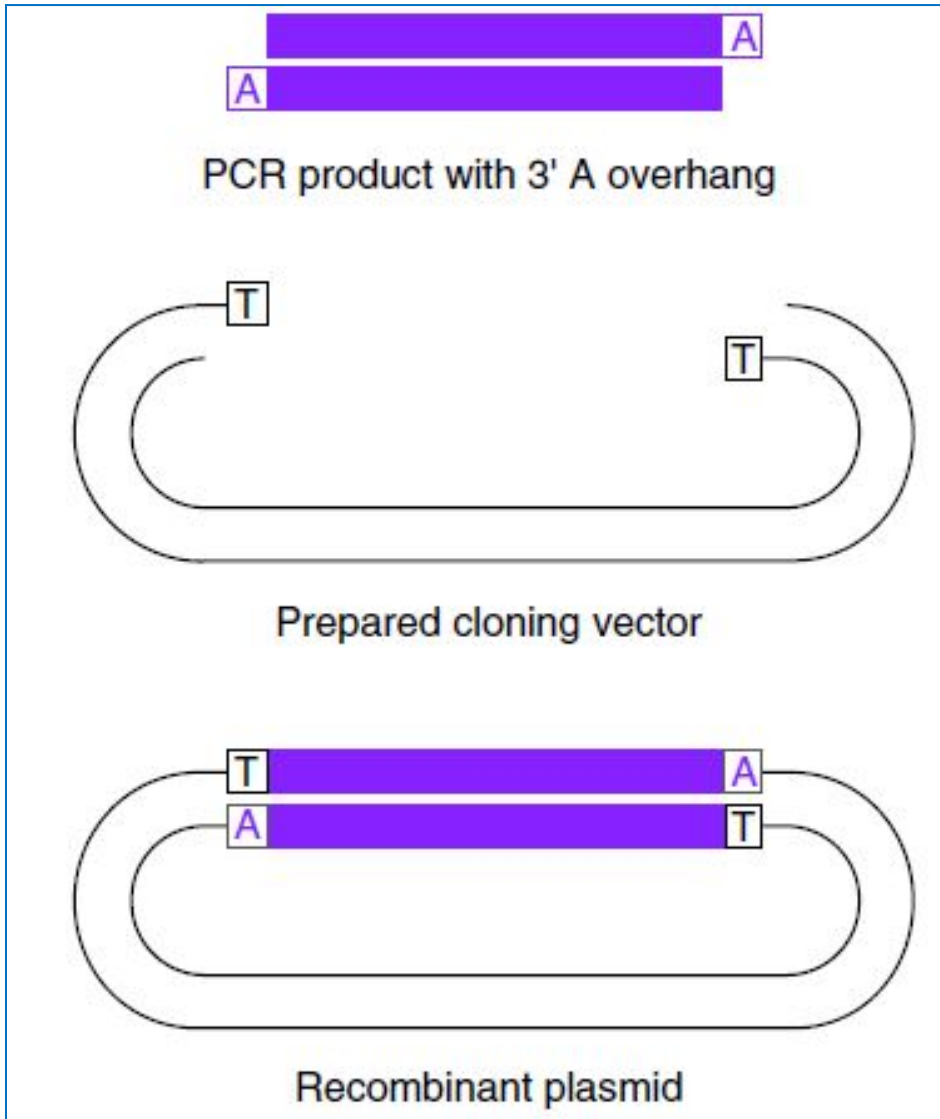
Плазмидный вектор Bluescript



Фагмида (Phagemid)

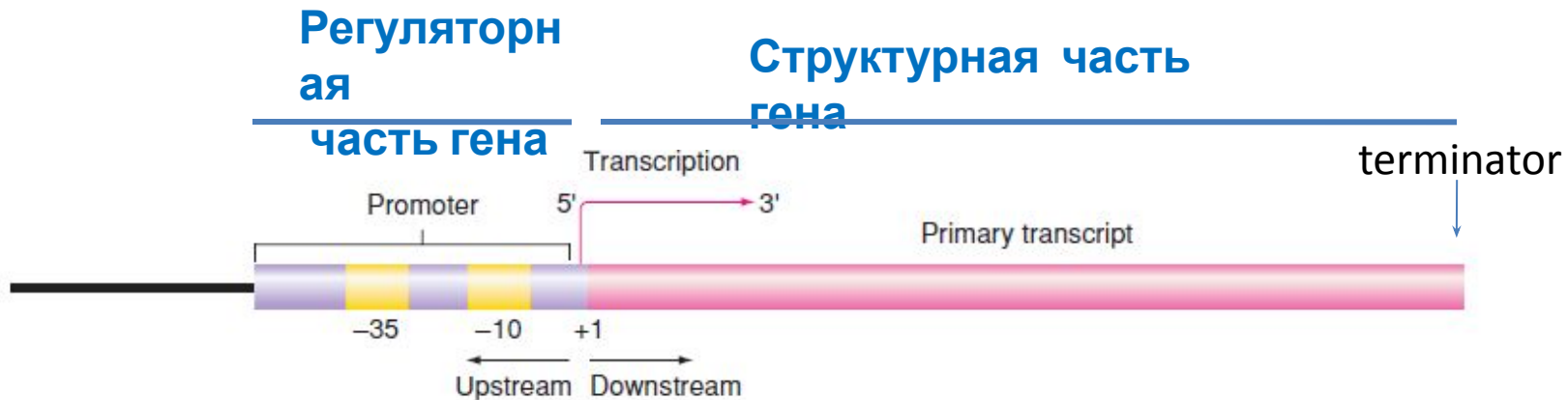
Заражение бактериальных клеток, содержащих фагмиды, фагом-помощником, приводит к синтезу одноцепочечной ДНК фагмиды и ее упаковке в фаговые частицы

TA-Клонирование продуктов ПЦР



Тақ-ДНК-полимераза образует в продукте ПЦР 3'-выступающие А-концы независимо от матрицы

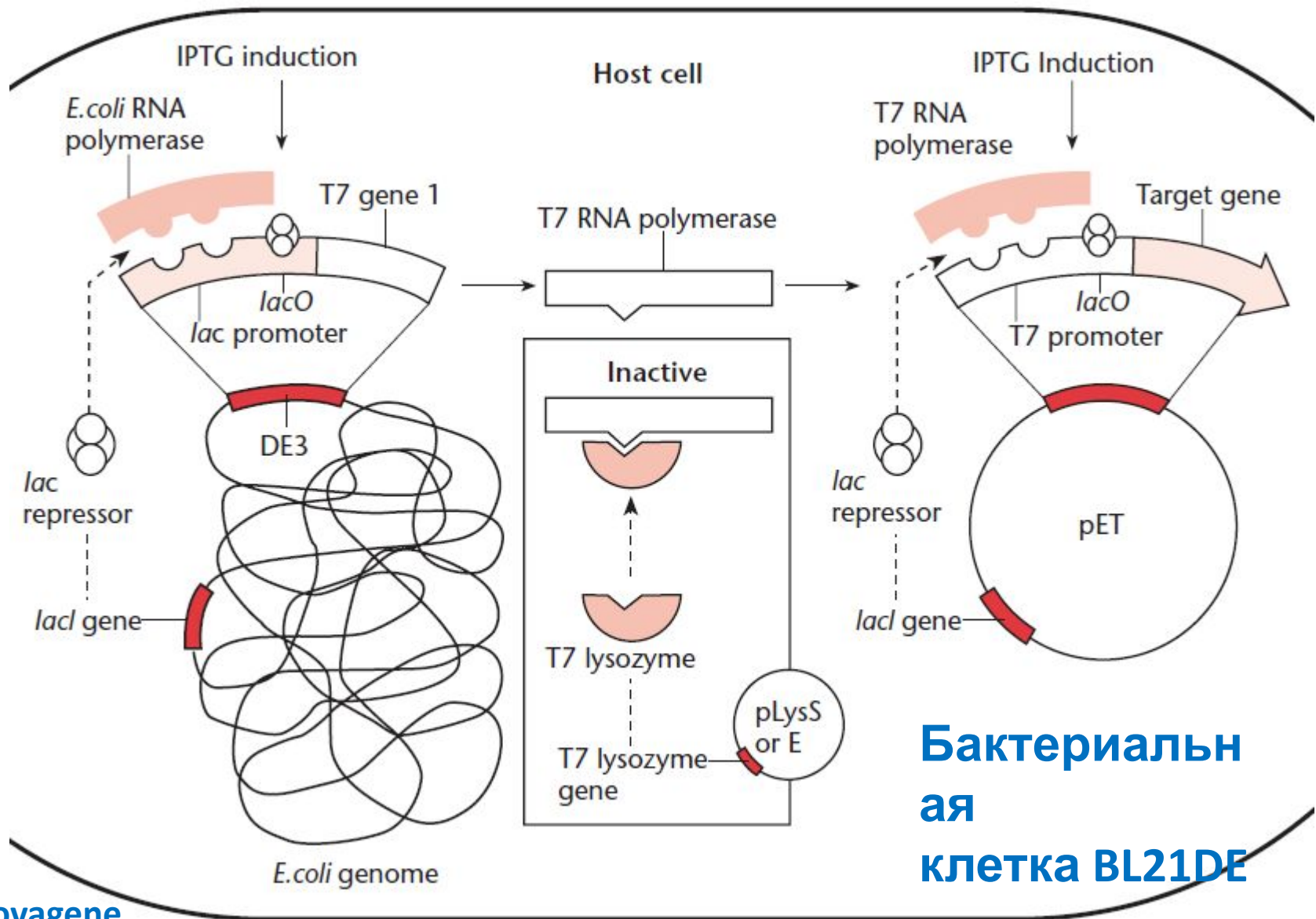
Структура бактериального гена и его некоторых сильных промоторов



(b) Strong *E. coli* promoters

rrn X1	ATGCATTTTTCCGCTTGTCTTCCTGA	• • GCGACTCCCTATAAT	GCGCCTCCATCGACACGGCGGAT
rrn (DXE) ₂	CCTGAAATTCAGGGTTGACTCTGAAA	• • GAGGAAAGCGTAATATAC	GCCACCTCGCGACAGTGAGC
rrn A1	TTTTAAATTTCTCTTGTTCAGGCCGG	• • AATAACTCCCTATAAT	GCGCCACCACTGACACGGAACAA
rrn A2	GCAAAAATAAA TGCTTGACTCTGTAG	• • CGGGAAGGCGTATTATGC	ACACCCCGCGCCGCTGAGAA
λ P _R	TAACACCGTGCCTGTTGACTATTTTA	CCTCTGGCGGTGATAATGG	• • TTGCATGTACTAAGGAGGT
λ P _L	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA	C CACTGGCGGTGATACTGA	• • GCACATCAGCAGGACGCAC
T7 A3	GTGAAACAACCGTTGACAACATGA	A GTAAACACGGTACGATGT	ACCACATGAAACGACAGTGA
T7 A1	TATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGT	C T AACCTATAGGATACTT A	CAGCCATCGAGAGGGACACG
T7 A2	ACGAAAAACAGGTATTGACAACATGA	AGT AACATGCAGTAAGATAC	AAATCGCTAGGTAACTACTAG
fd VIII	GATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTT	• TCGCGCTTGGTATAATCG	• CTGGGCGTCAAAGATGAGTG
Consensus	TTGACAT	15 – 17 bp	TATAAT
			5' → 3' Primary transcript

Регуляция экспрессии генов в Векторе pET



**Бактериальная
клетка BL21DE**

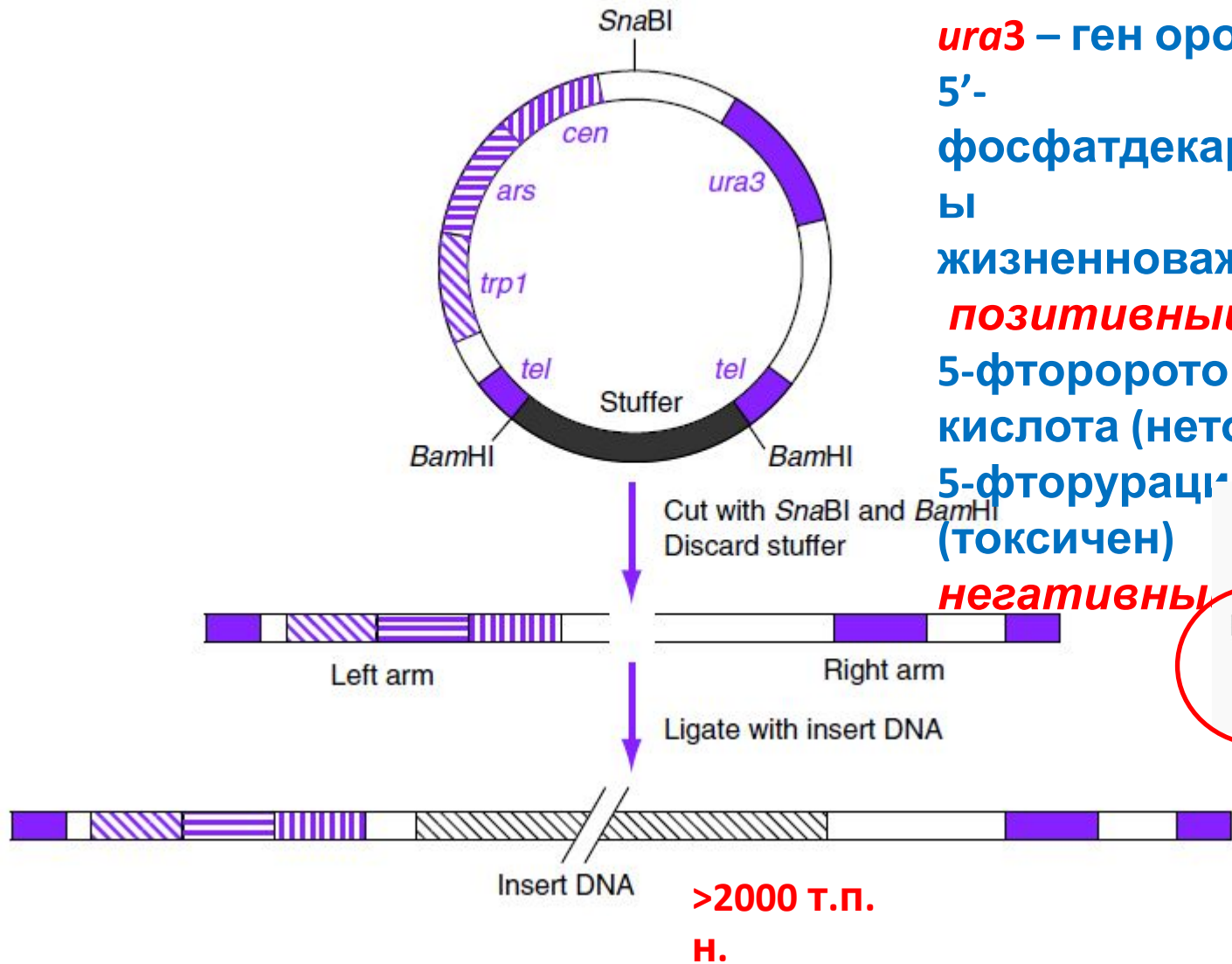
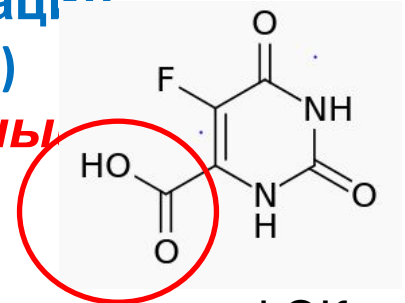
Искусственные хромосомы



Искусственная хромосома дрожжей YAC (Yeast Artificial Chromosome)

ura3 – ген оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазы
жизненноважный:
позитивный отбор
5-фтороротовая кислота (нетоксична)
5-фторурацил (токсичен)

негативны

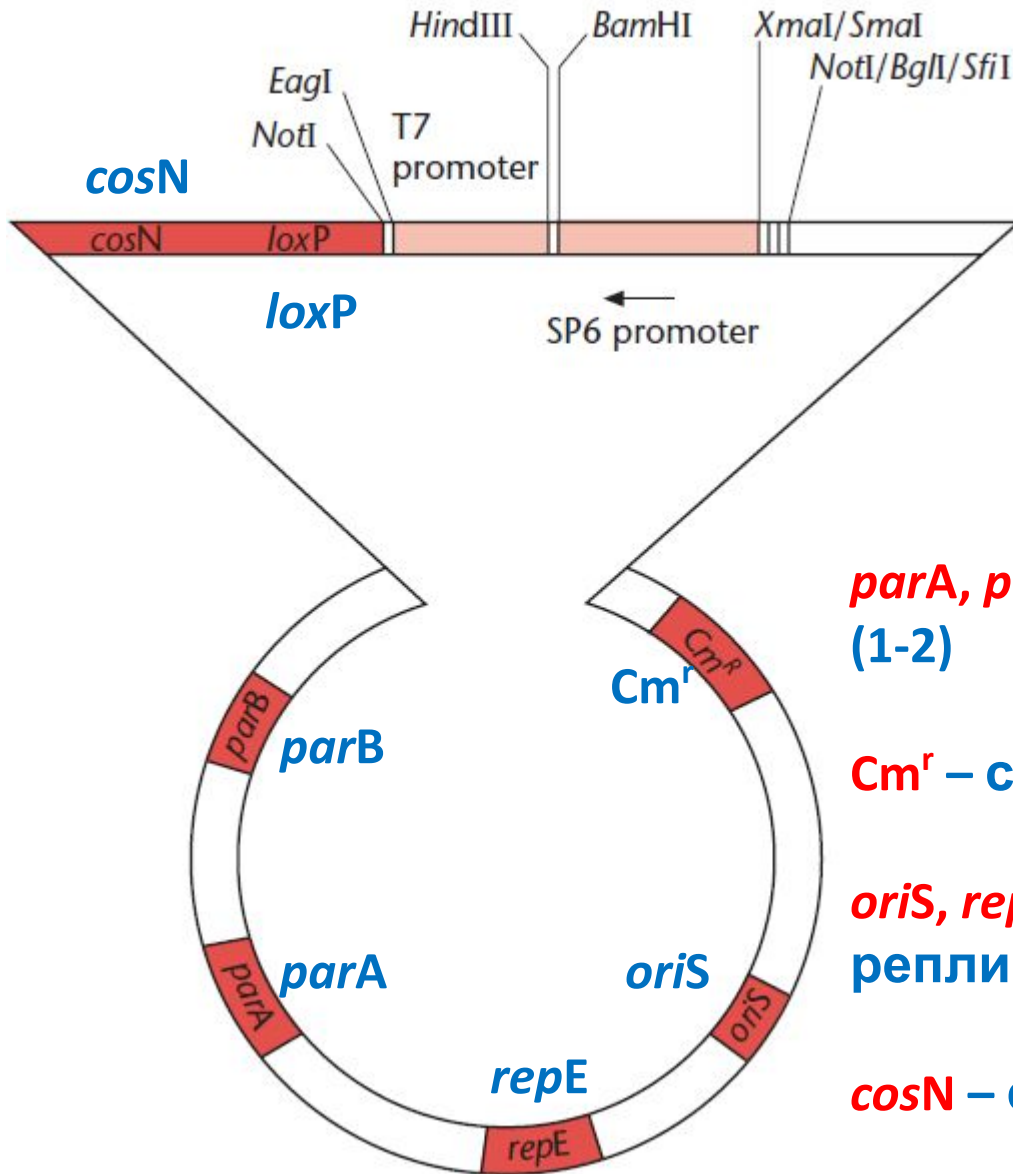


**>2000 т.п.
н.**

Бактериальная искусственная хромосома (ВАС)

Емкость – 300 т.п.н.

Стабилен на протяжении 100 поколений



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

Cm^r – селектируемый маркер

oriS*, *repE – односторонняя репликация

cosN – сайт терминазы λ

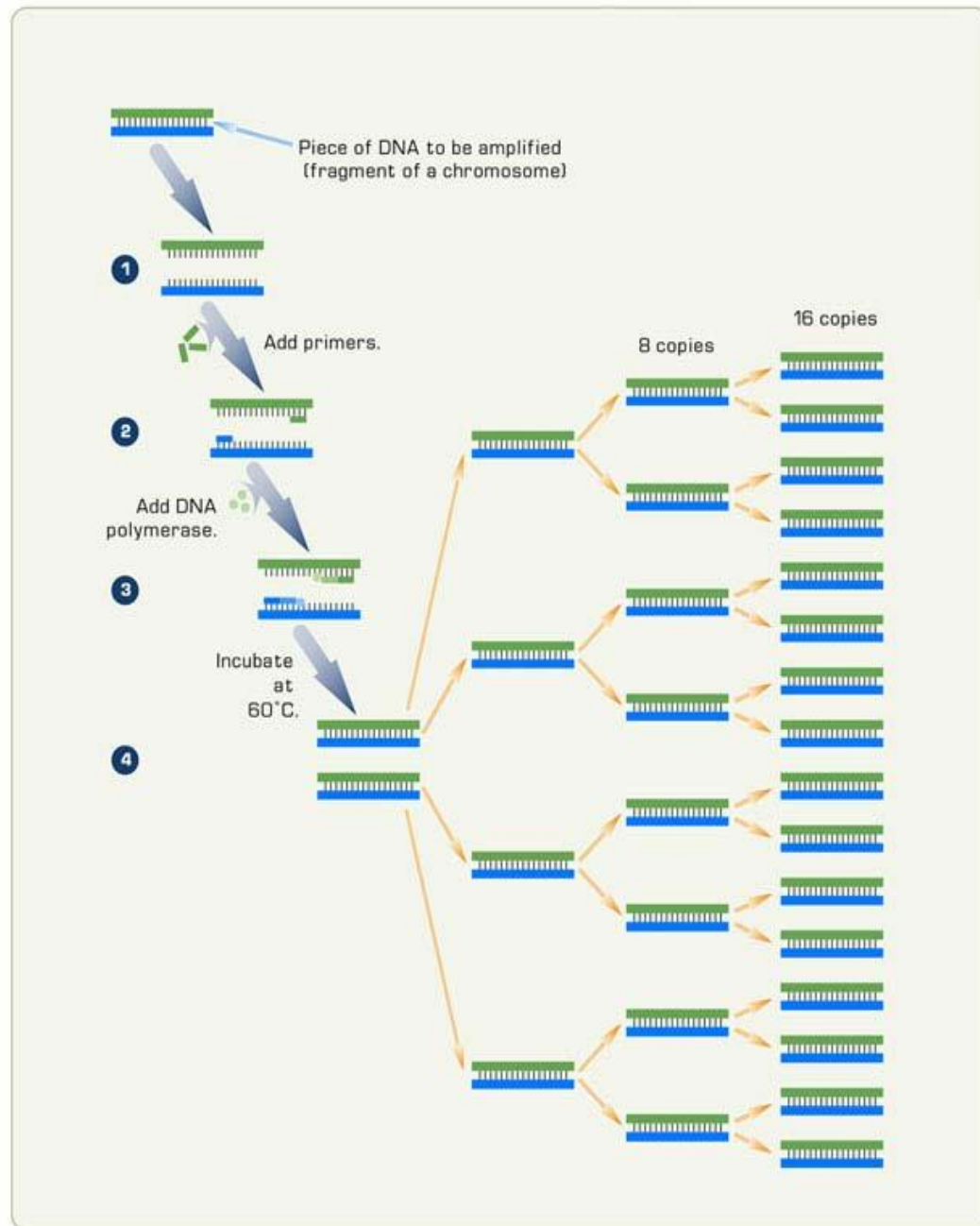
loxP – *cre*-рекомбиназа фага P1

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

Генная инженерия без клонирования

Полимеразная цепная реакция



Кари Б. Муллис (Kary B. Mullis) – изобретатель полимеразной цепной реакции (ПЦР)



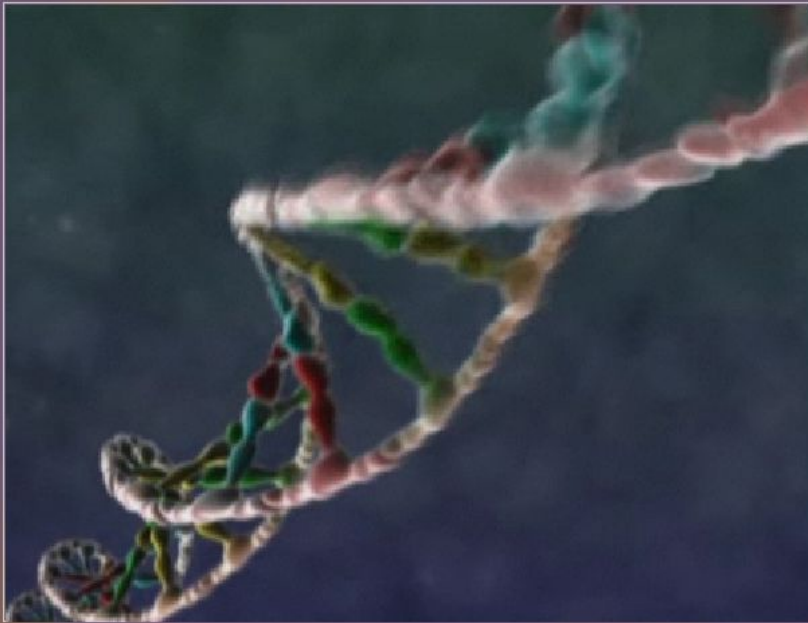
- **Американский биохимик 1944 г.р.**
- **Патент - 1985 г., фирма Cetus Corp. California**
- **Нобелевская премия по химии – 1993 г.**



[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)



[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)





Полимеразная цепная реакция: 1-й цикл

Cycle 1

DNA Sample

Denaturation

Strands separate

Priming

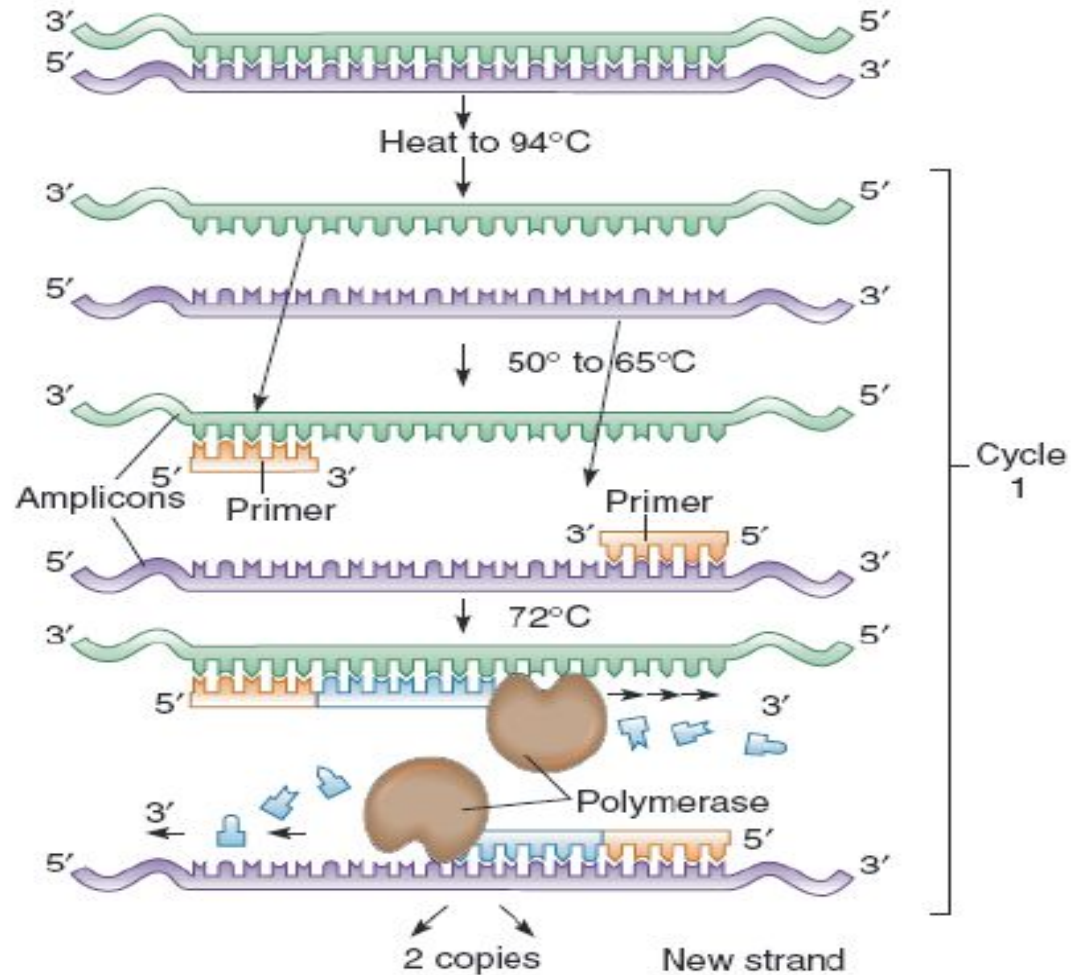
Oligonucleotide primers attach at ends of strands to promote replication of amplicons

Extension

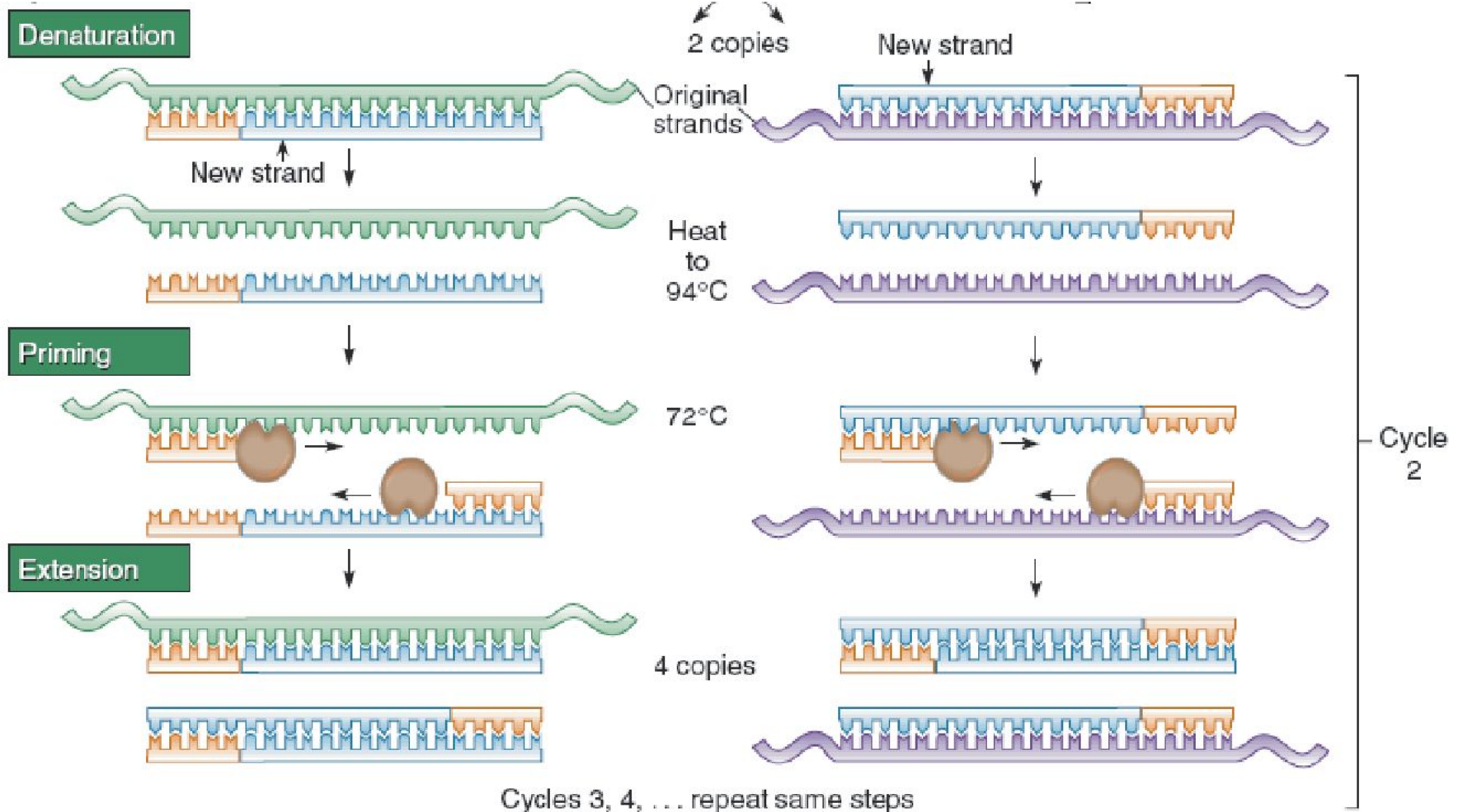
DNA polymerase synthesizes complementary strand

Cycle 2

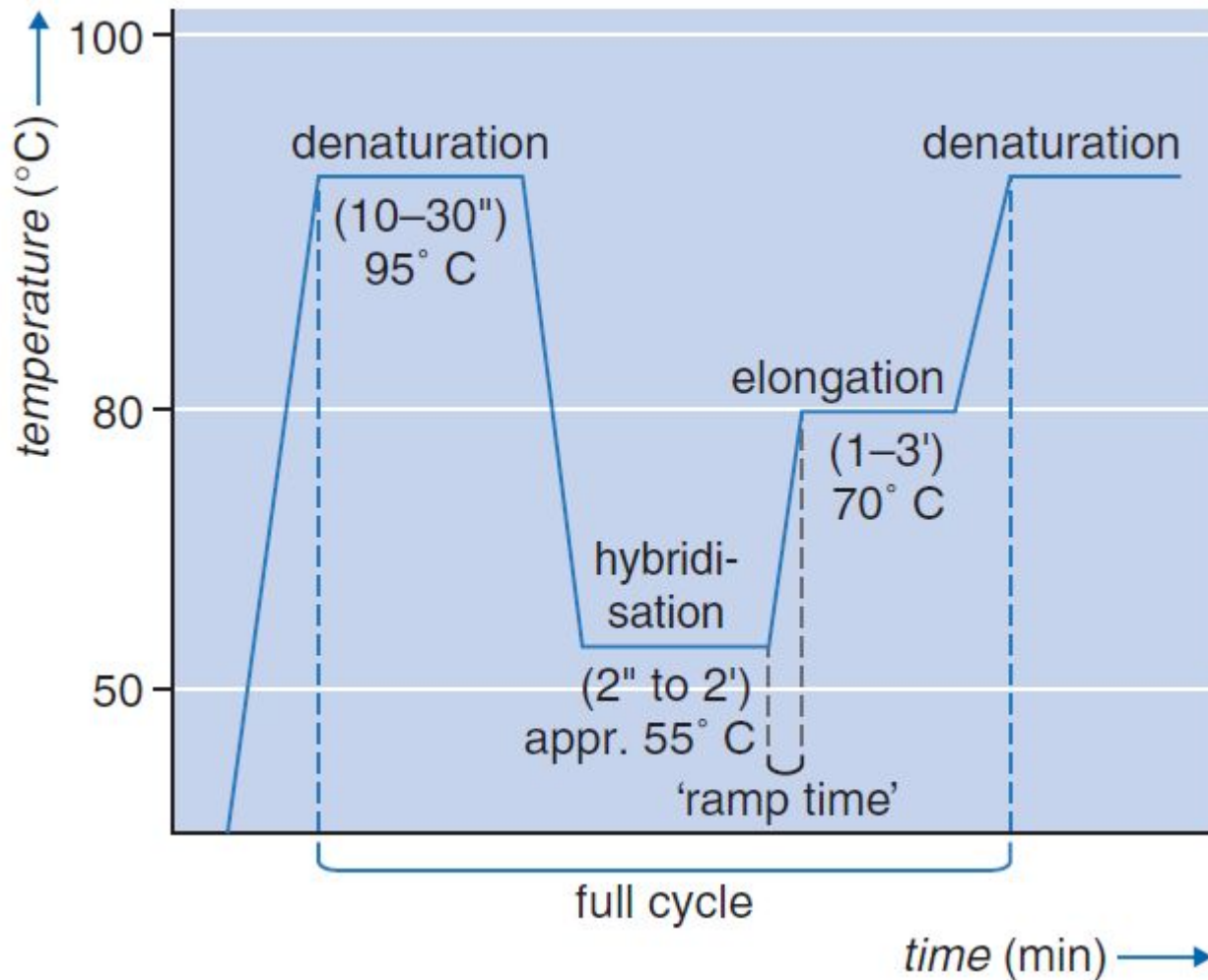
Denaturation



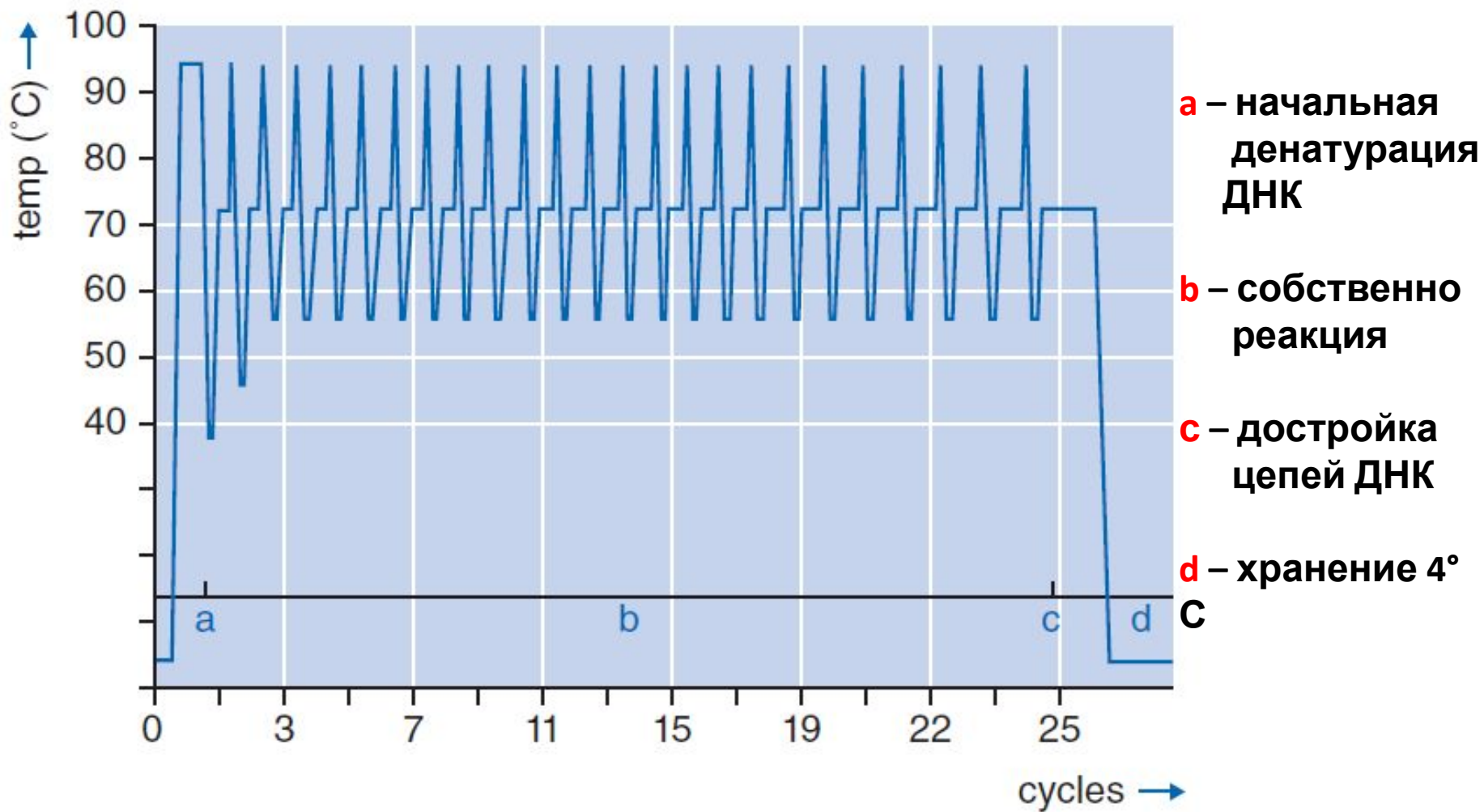
Полимеразная цепная реакция: 2-й цикл



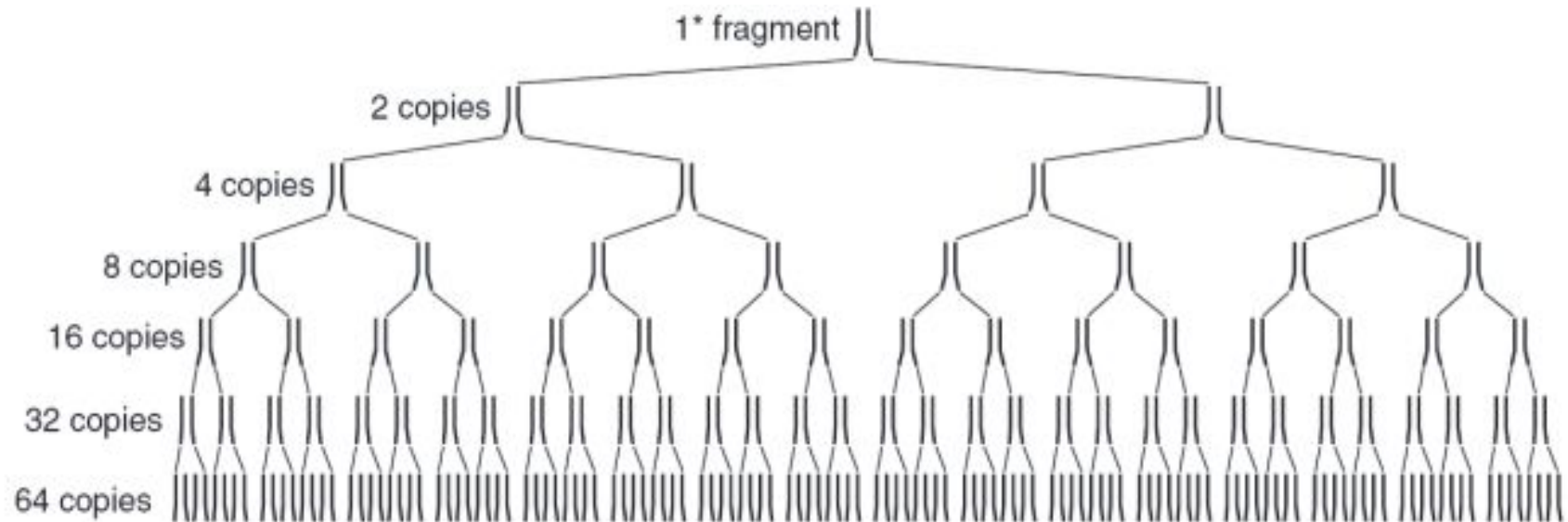
Изменение температуры в типичном трехступенчатом цикле ПЦР



Полный температурный профиль полимеразной цепной реакции (25 циклов)



ПЦР как молекулярная копировальная машина («молекулярный ксерокс»)



- После 6 циклов ПЦР образуется 64 идентичных копии исходного генетического локуса (ампликона)
- Ни одна реакция в цикле не доходит до конца

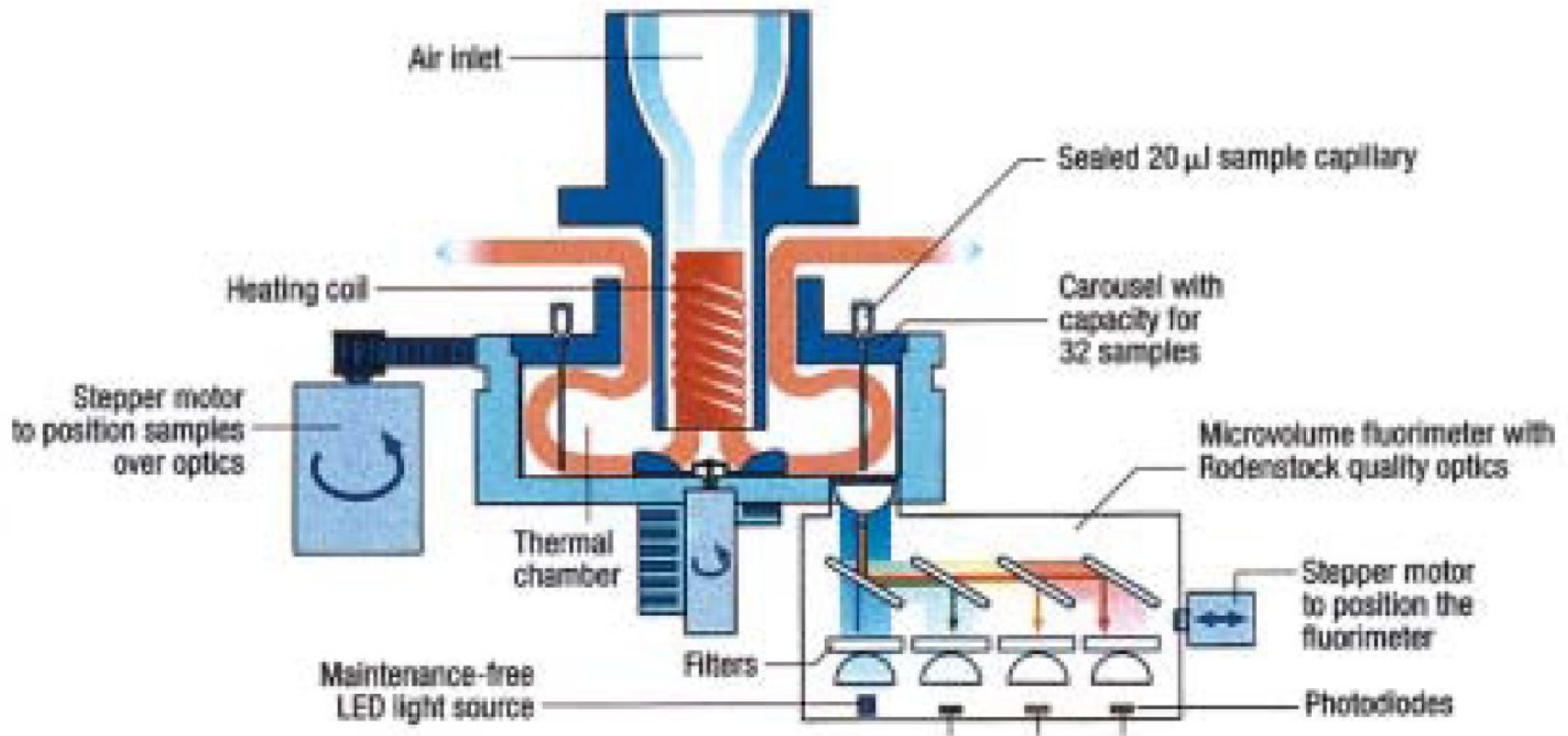
Количественная ПЦР

ПЦР в реальном времени

Real-time PCR

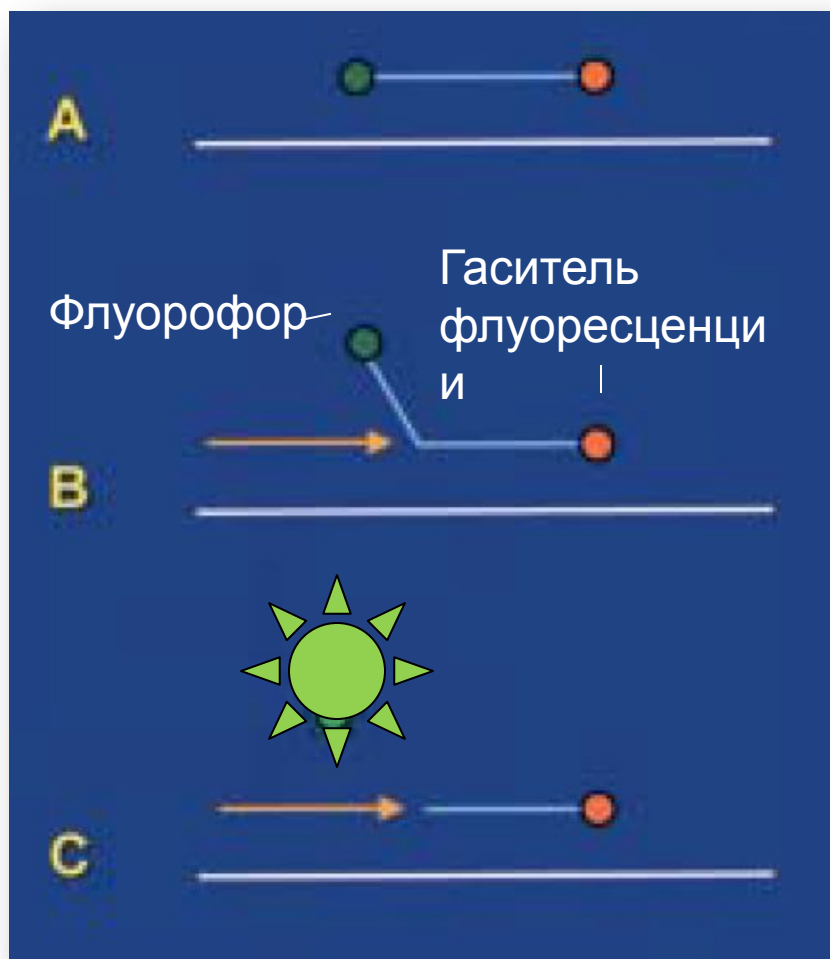
**Позволяет, не открывая пробирки,
непрерывно следить за накоплением
продуктов ПЦР в пробах**

Устройство капиллярного амплификатора LightCycler



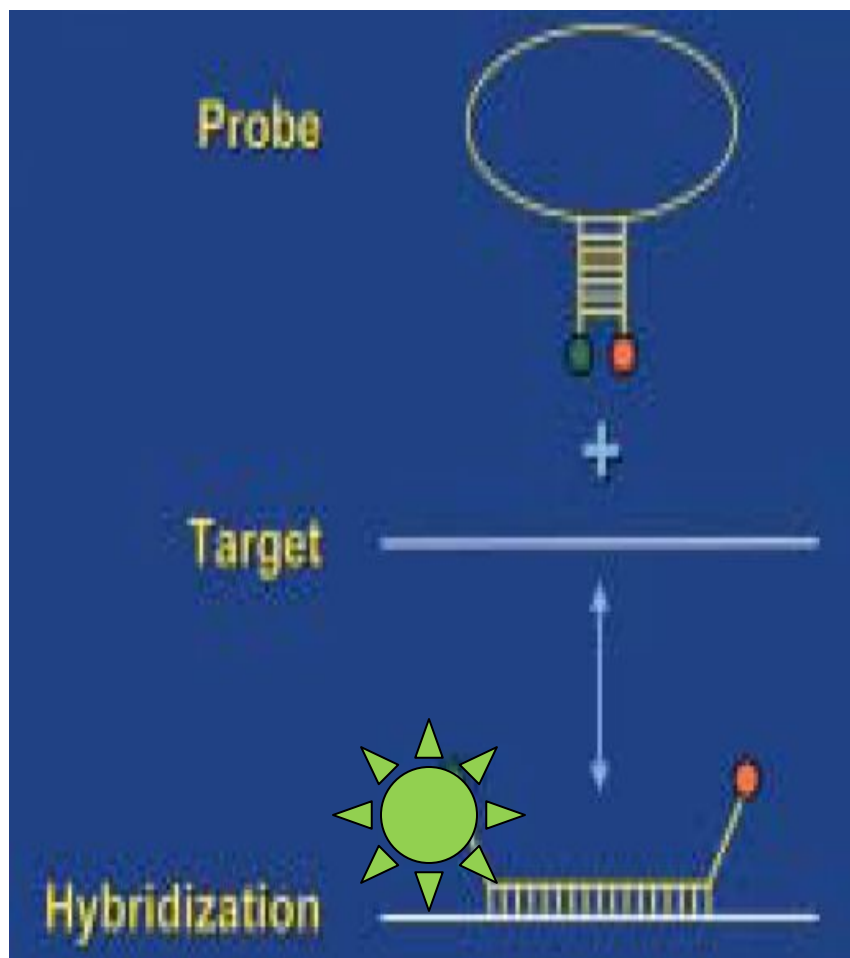
Капилляры объемом 20 мкл обеспечивают высокое соотношение поверхности к объему и высокую скорость теплообмена. 30 циклов завершаются за 20-30 мин

Принцип действия зондов TaqMan



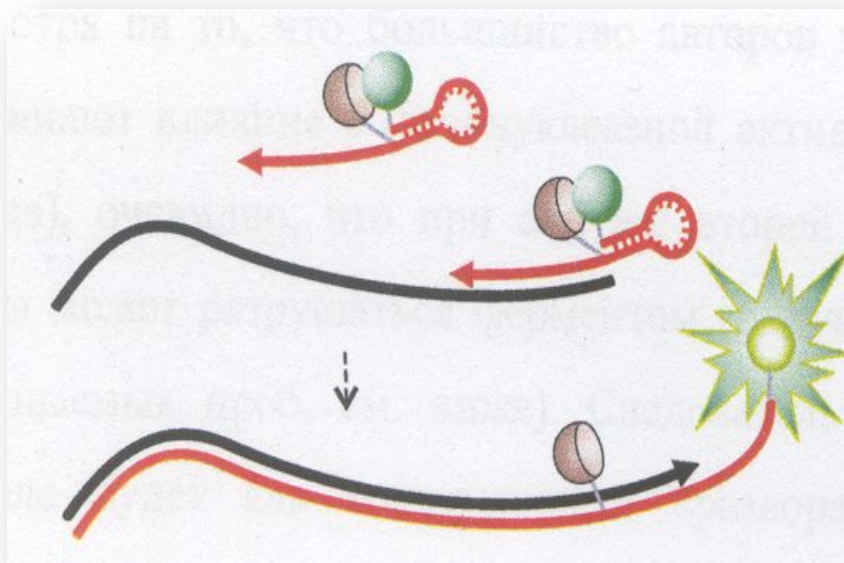
- 5'→3'-экзонуклеаза Taq-ДНК-полимеразы отщепляет флуоресцентный краситель, который начинает флуоресцировать в реакционной смеси

Принцип действия зондов – «молекулярных маяков» (molecular beacon probes)

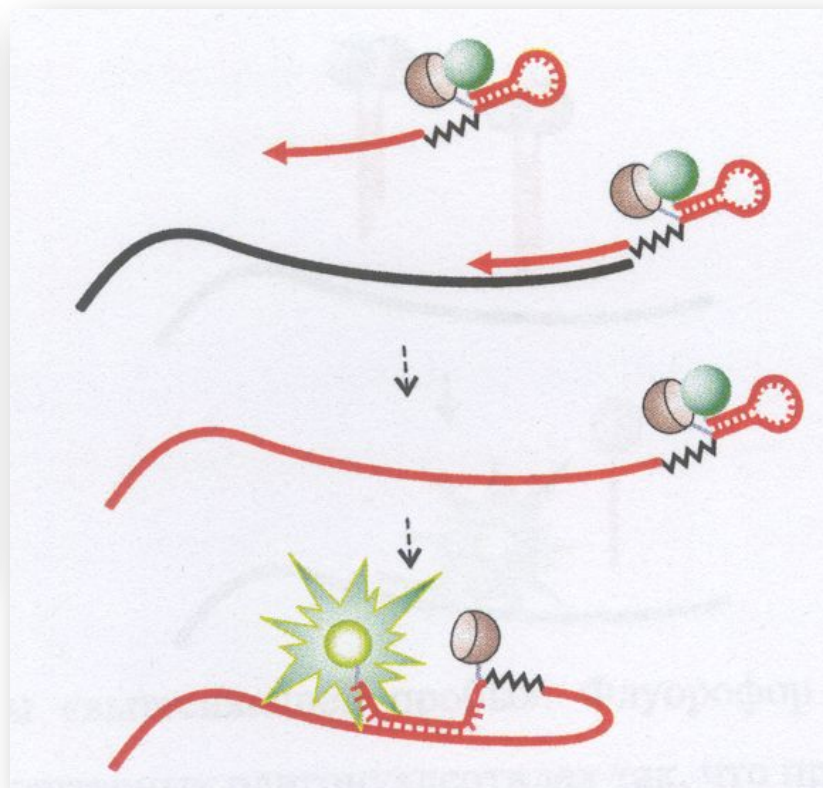


- В растворе зонды образуют структуру «стебель-петля», что приводит к сближению флуорофора и гасителя флуоресценции

Праймеры, меченые флуорофорами, в ПЦР в реальном времени

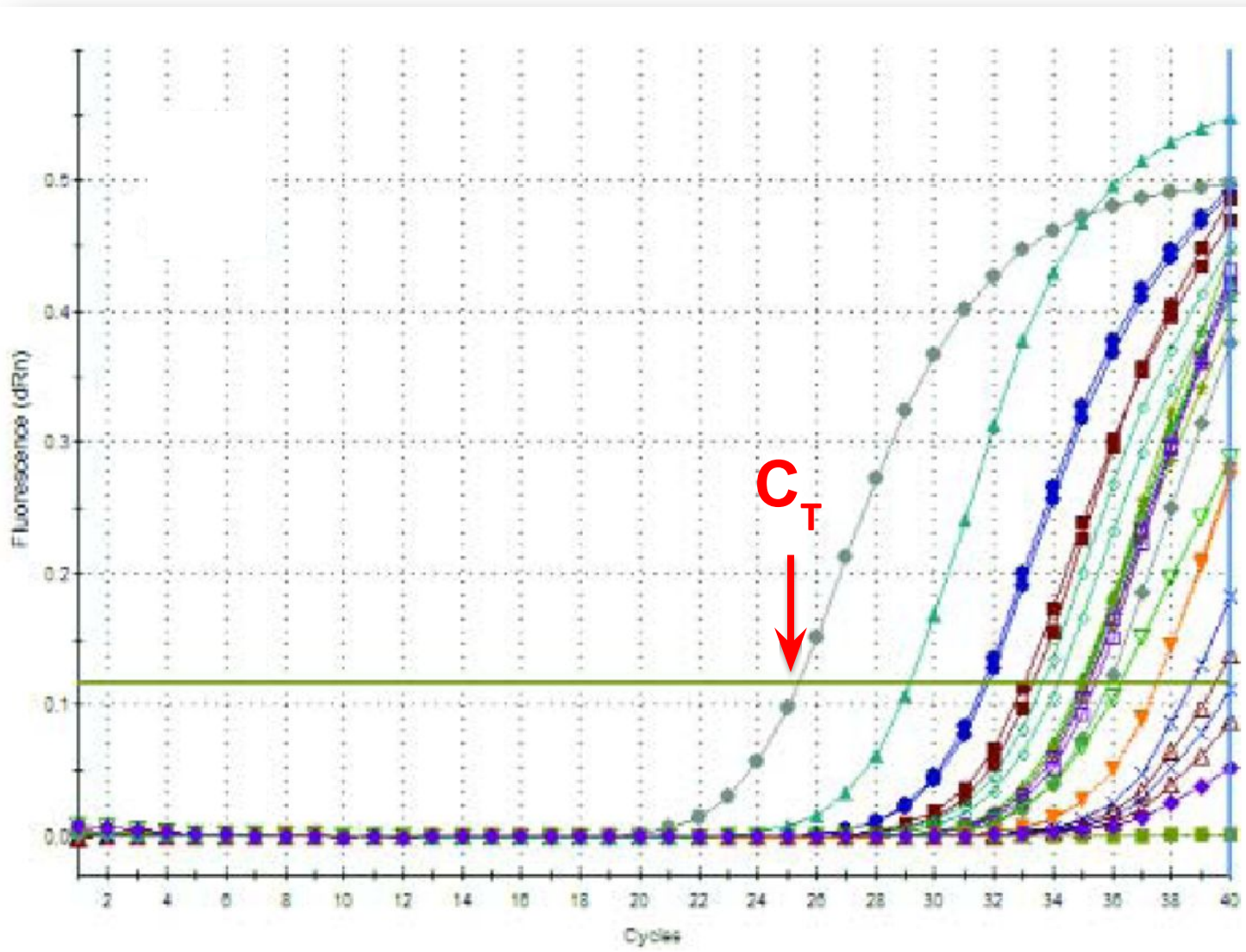


Праймеры
«Амплифлюр»



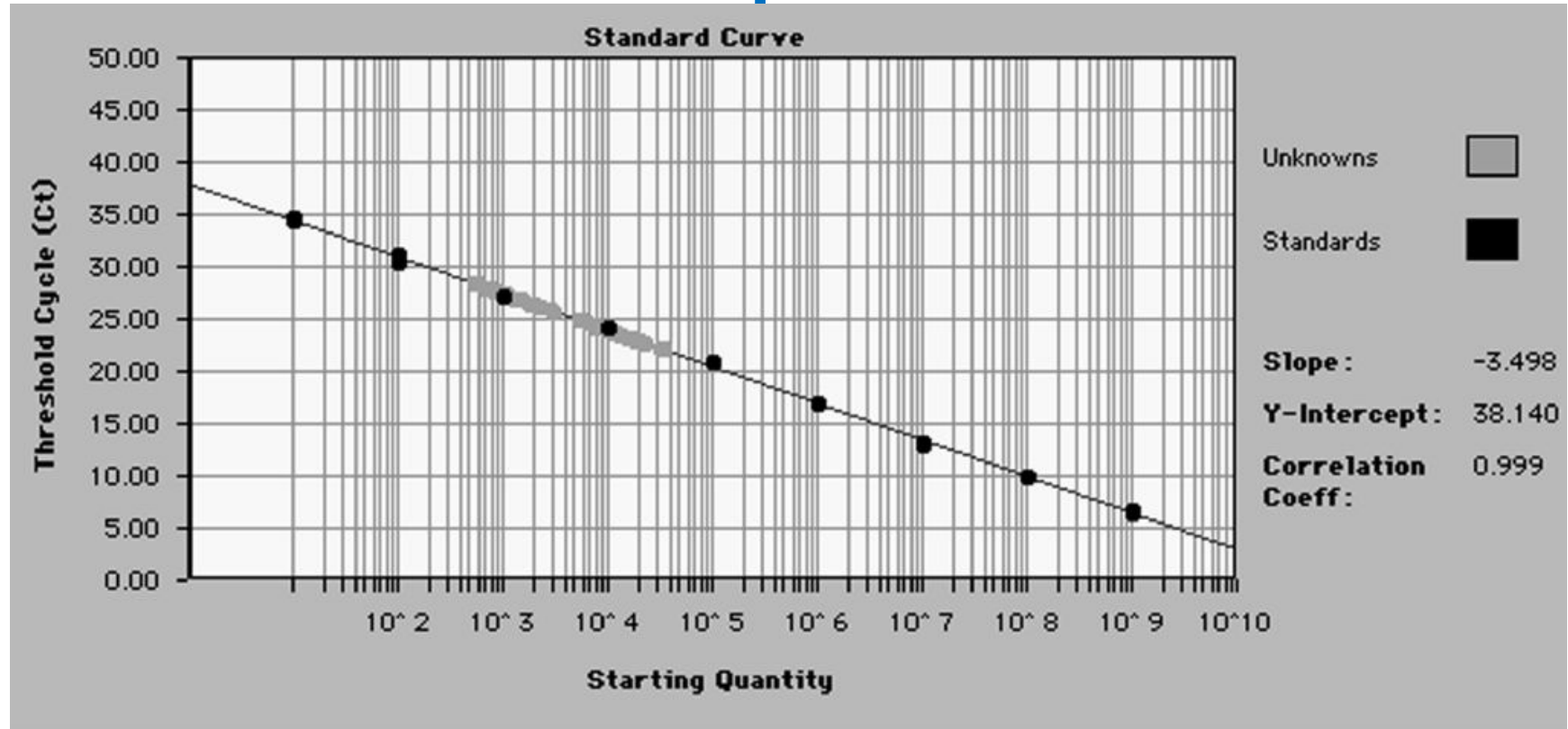
Праймеры
«Скорпион»

Мониторинг накопления продуктов ПЦР в реальном времени протекания реакции



C_T –
порогов
ый цикл

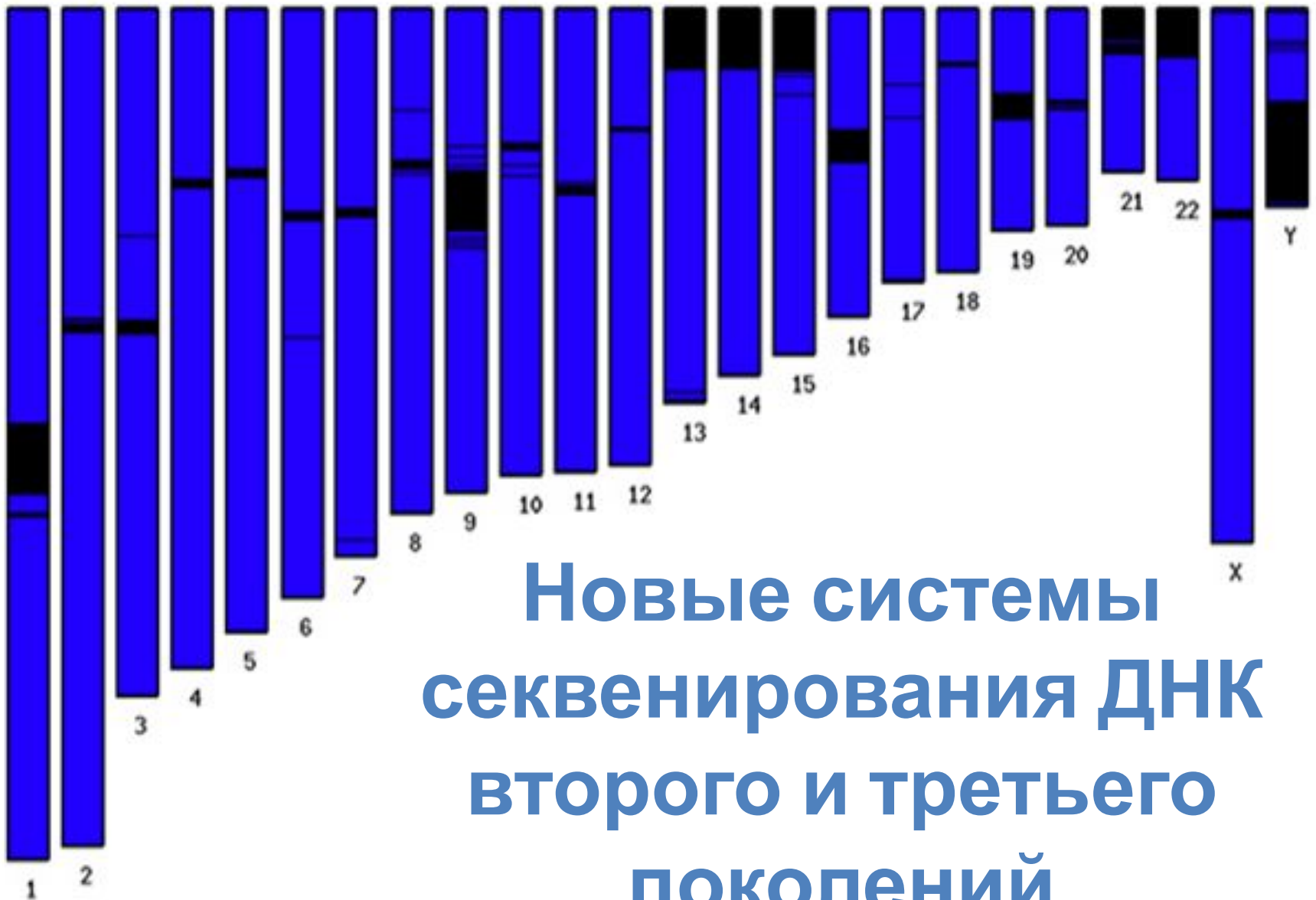
Калибровочная кривая для определения количества ДНК-матрицы в пробе



Определение числа плазмидных копий гена *F8* в трансфицированных клетках человека
Концентрация ДНК в крайних точках различается на 9 порядков

Цифровая ПЦР

Позволяет считать отдельные молекулы матричной ДНК в исследуемых образцах

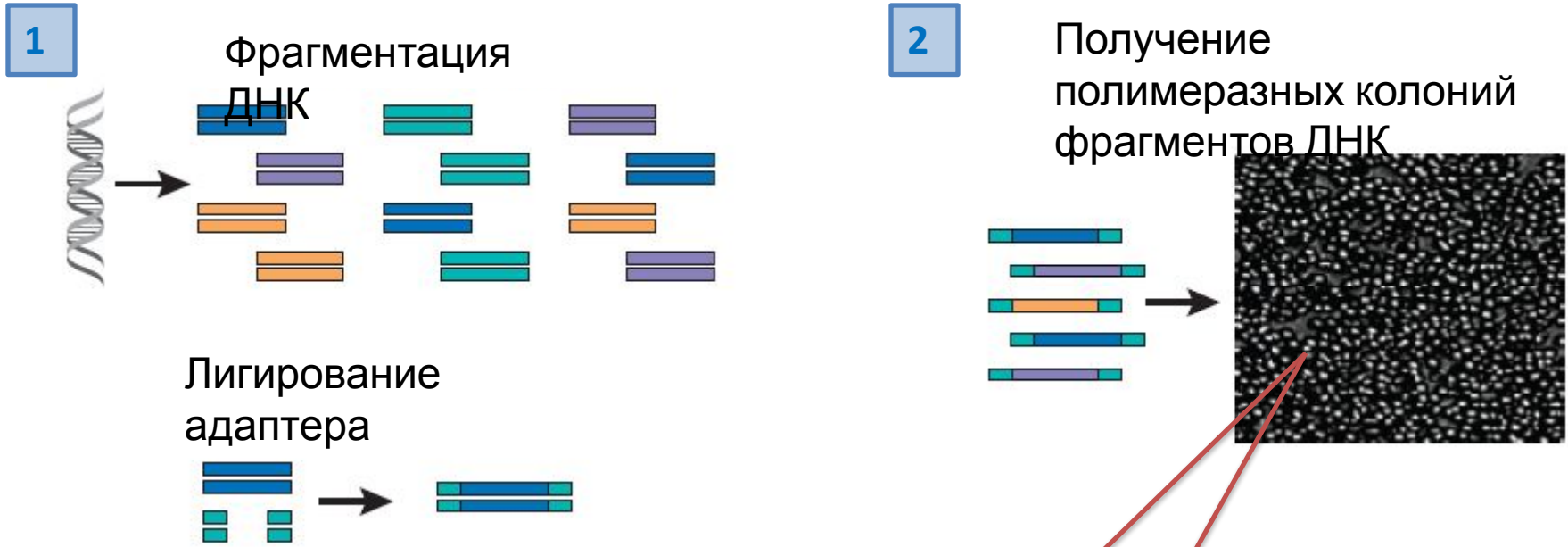


**Новые системы
секвенирования ДНК
второго и третьего
поколений**

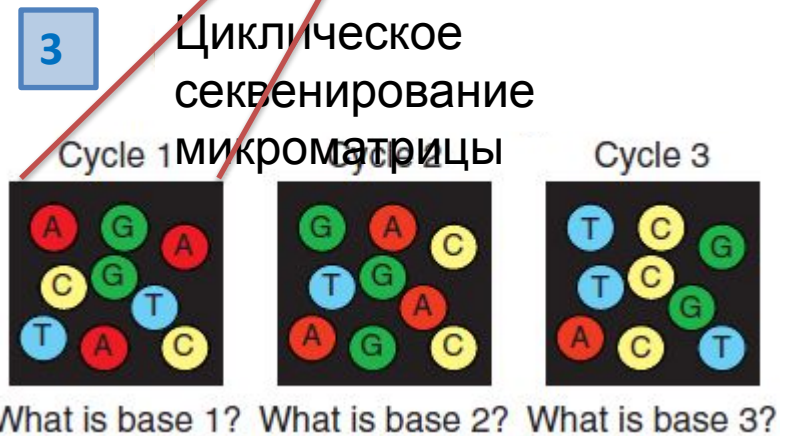
Центр по секвенированию ДНК методом Сэнгера

Одна машина может
анализировать 96 образцов
одновременно (96
капилляров),
750 п.н. за один прогон, 6
прогонов в день,
Итого:
одна машина может
определять
~345 600 п.н. в один день

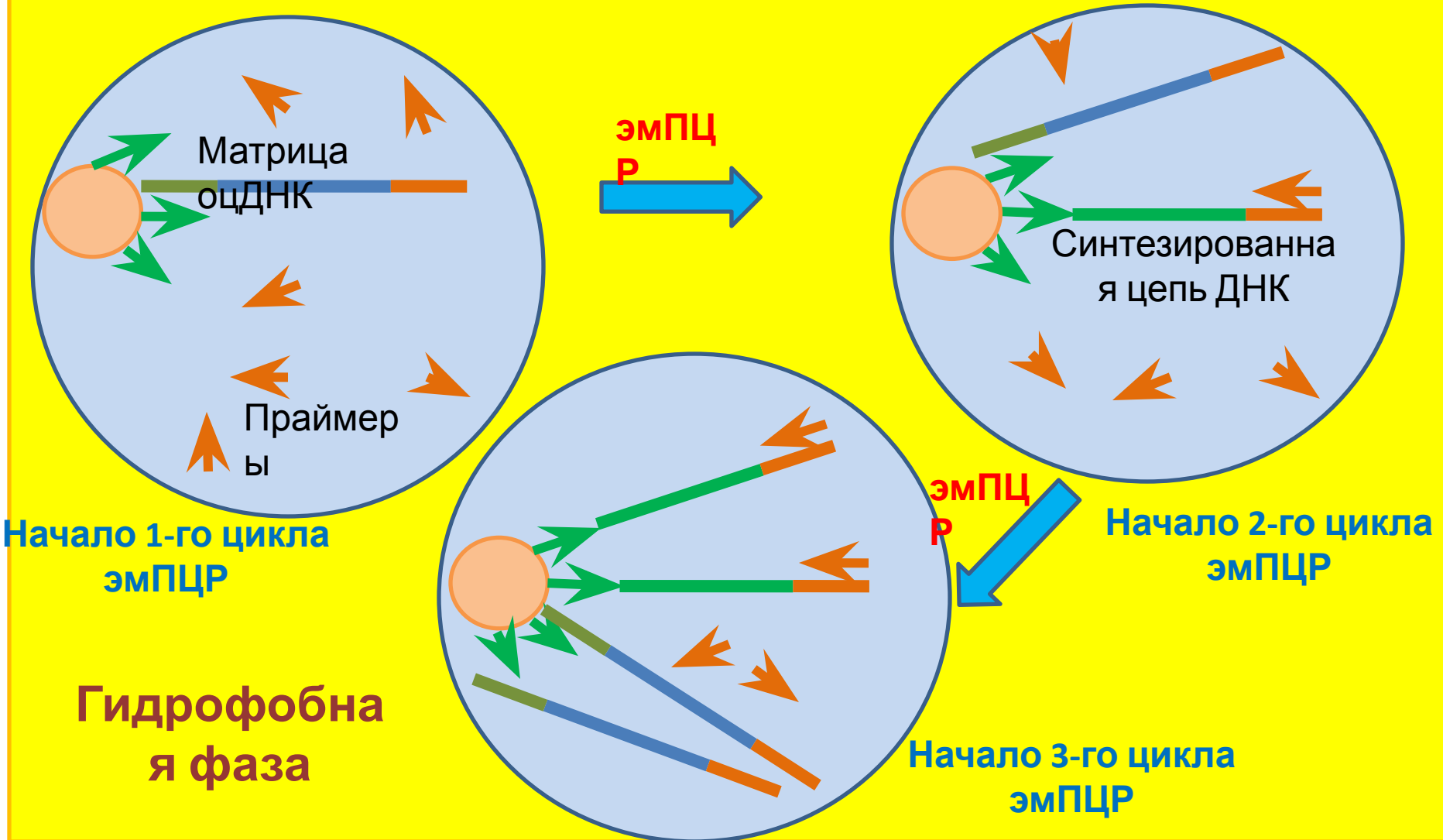
Система секвенирования ДНК второго поколения



- ❖ **Одновременно секвенируются миллионы молекул ДНК**
- ❖ **За один прогон прибора секвенируются более 1 миллиарда нуклеотидов ДНК – 1000-кратное увеличение производительности**



Эмульсионная (эм)ПЦР на микрочастицах с иммобилизованным праймером



Секвенатор второго поколения фирмы *Illumina*



HiSeq 2500/1500

**Производительность – 600 Gb (6×10^{11} bp) за 11 дней;
Макс. длина секвенируемого фрагмента – 2 x 100 bp;
Секвенирование синтезом, молек. колонии - кластеры на стекле**

Цех секвенаторов 2-го поколения в Китае

A photograph of a modern sequencing facility. The room is filled with rows of HiSeq 2000 sequencing machines, each equipped with a computer monitor and keyboard. The machines are arranged in long aisles, with yellow lines marking the floor. The lighting is bright, and the overall appearance is clean and professional.

China's Sequencing Powerhouse Comes of Age

With new sequencing centers in Europe and the United States, BGI hopes its growing clout will help deliver the benefits promised by genomics—and revenue to pay off a mounting debt

Фирма BGI-Shenzhen, ноябрь 2011

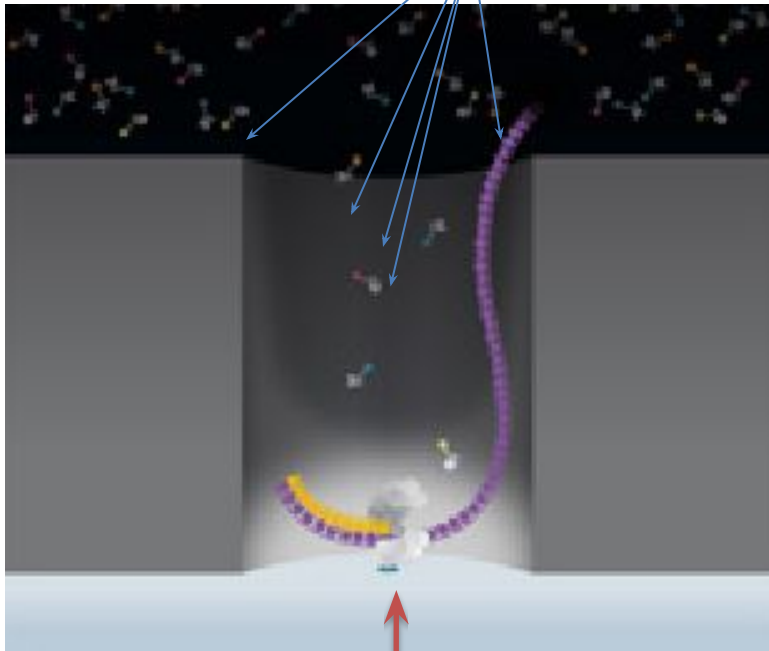
Секвенатор третьего поколения *PacBio RS* фирмы Pacific Biosciences



Система коммерциализирована и активно продается
в течение последнего года

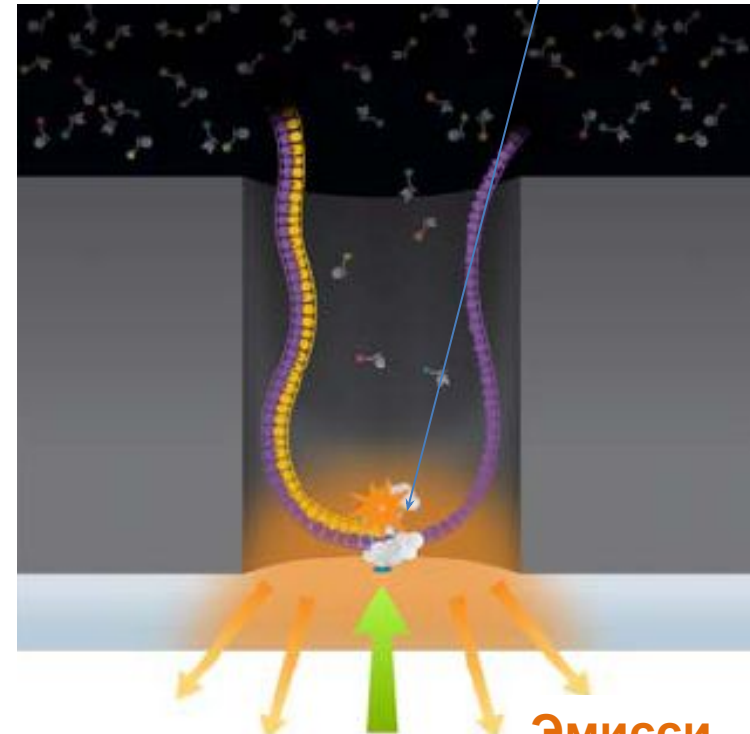
Схема синтеза ДНК в ZMW-волноводе

Меченые dNTPs



Одна молекула ДНК-полимеразы иммобилизована на дне каждого волновода

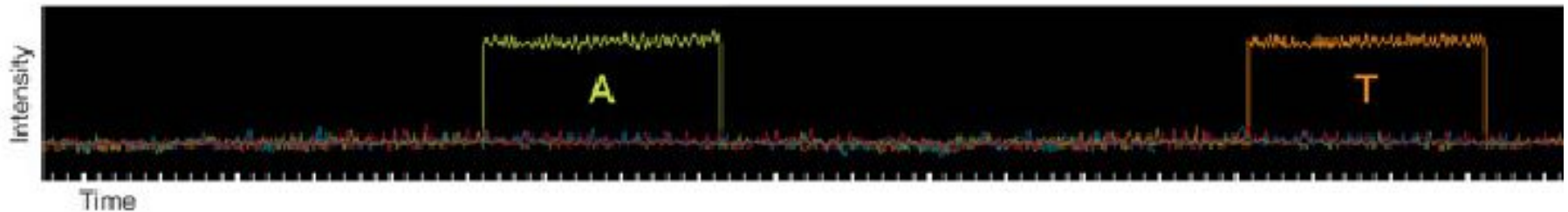
Включившийся dNTP



Эмиссия
Возбуждения

Флуорофор присоединен к γ -фосфатной группе нуклеотида-субстрата

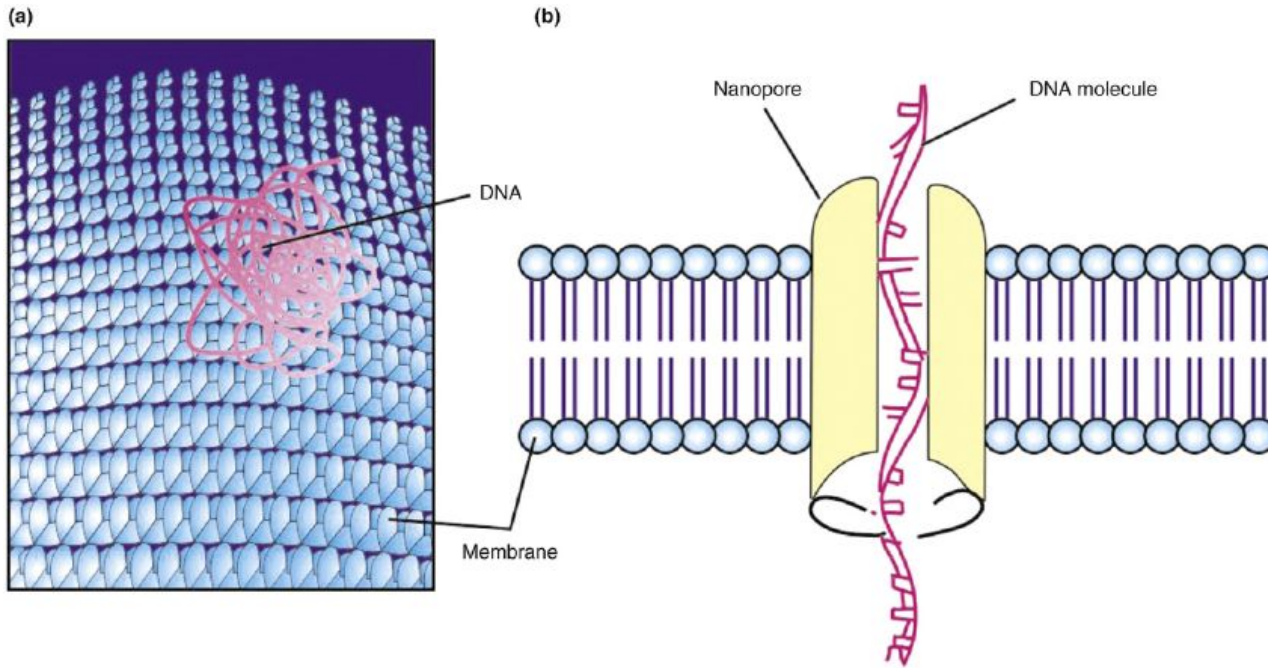
Процесс секвенирования ДНК на SMRT-чипе



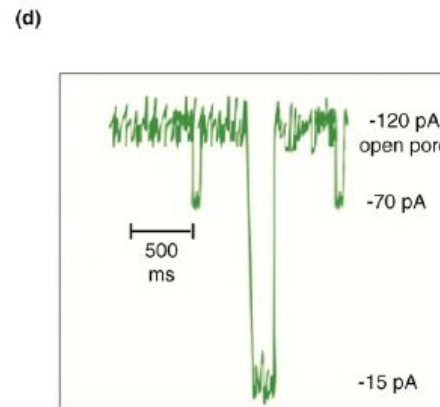
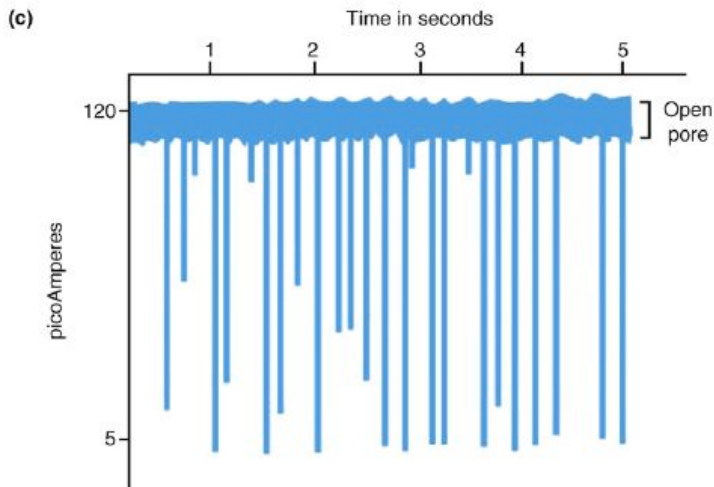
Включающийся в ДНК меченый нуклеотид задерживается в объеме считывания флуоресценции в течение миллисекунд, свободно диффундирующий нуклеотид – в течение наносекунд.

Включение обнаруживается в виде вспышки света определенной длины волны, характерной для конкретного нуклеотида..

Секвенирование через нанопоры



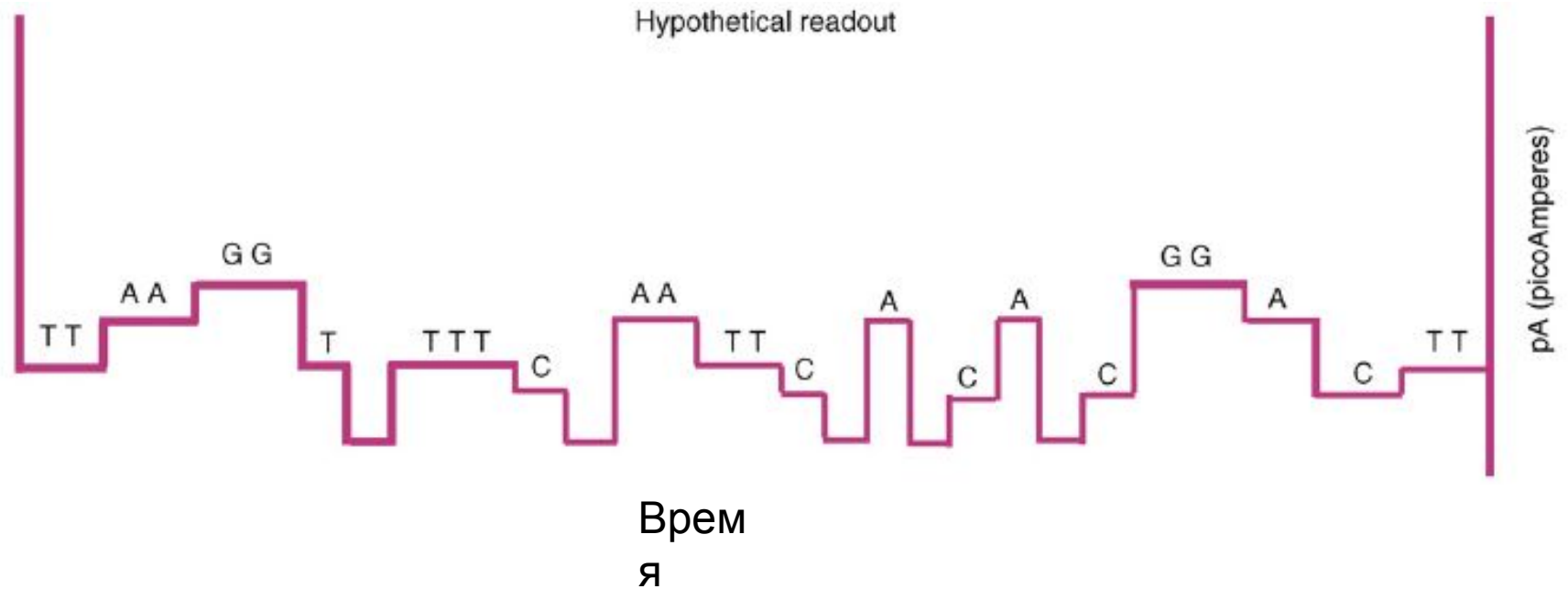
Часть мембраны с нанопорой, через которую проходит одноцепочечная ДНК



Изменения силы тока, проходящего через мембрану, под действием отдельных нуклеотидов ДНК

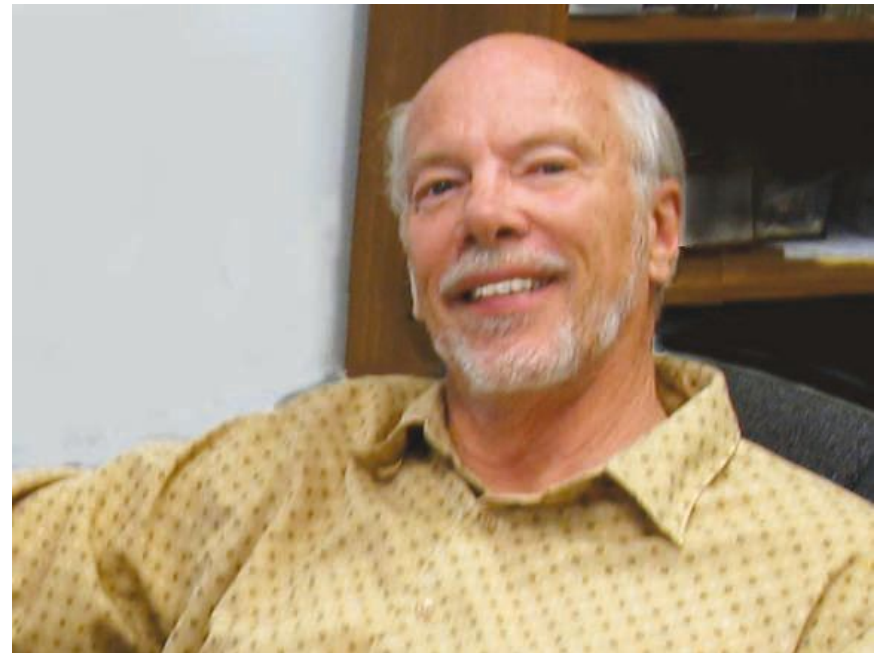
Уникальная последовательность
Гомополимер

Профиль изменений силы электрического тока во времени при секвенировании через нанопоры



Секвенатор третьего поколения фирмы Oxford Nanopore Technologies (2014 г)

A good first shot, but not a game-changer — yet!



Производительность 1 млрд
нуклеотидов за 6 часов. Ср. длина
считывания: 5,4 kb.

Десятки тысяч нуклеотидов/1
прогон

Компьютер – ноутбук с USB-

Дэвид Димер (David Deamer) -
Предложил принцип метода
секвенирования через нанопоры в 1989
году

2014 – секвенирован бактериальный
геном

«Новые направления в науке гораздо чаще создаются с помощью новых методов, а не новых концепций.

Новые концепции объясняют известные явления по-новому.

Новые методы открывают новые явления, которые необходимо объяснить.»

Freeman J. Dyson

