

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Курс лекций для студентов IV курса факультета
биологии РГПУ им. А.И. Герцена**

Направление 050100 Педагогическое образование

Профиль 01 Биологическое образование

**Профессор кафедры Зоологии
проф. Цымбаленко Надежда Васильевна**

д.б.н.,

- **ТЕХНОЛОГИЯ
РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК**

ФЕРМЕНТЫ - ИНСТРУМЕНТЫ

**Профессор каф. Зоологии
факультета биологии РГПУ им. А.И. Герцена
д.б.н., проф. Цымбаленко Н.В.**

- **Технология рекомбинантных ДНК** (ее называют также молекулярным клонированием или генной инженерией) — это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (дезоксирибонуклеиновой кислоты, ДНК) из одного организма в другой (Глик Б. и Пастернак Дж).

- **Генетическая инженерия** - получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства.

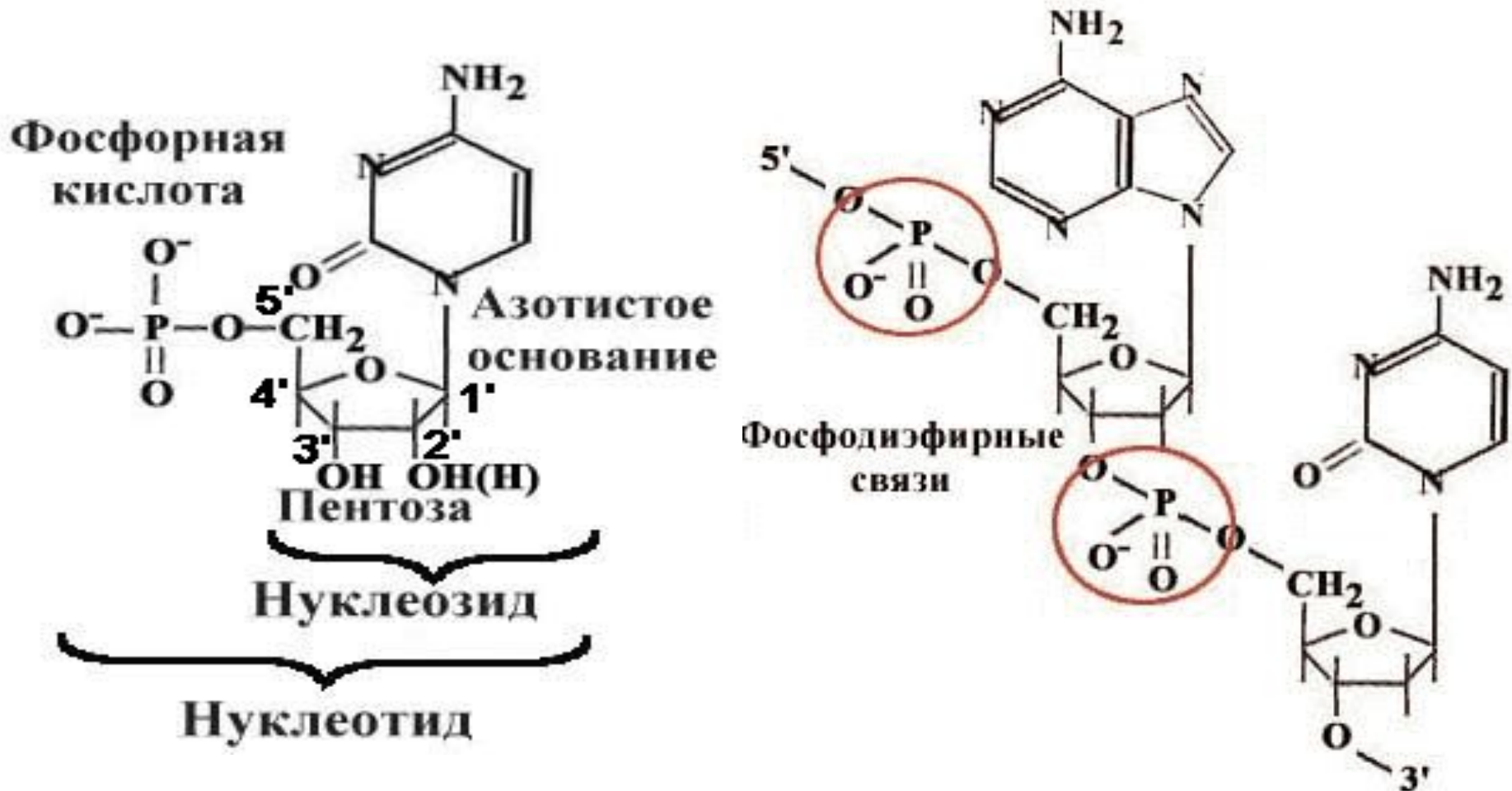
- **Основные предпосылки развития генетической инженерии**
- **1944 г. - Эйвери, Мак Леод и Мак Карти показали, что носителем наследственной информации является ДНК.**
- **1953 г. - Дж. Уотсон и Ф. Крик, основываясь на многочисленном фактическом материале по химии нуклеиновых кислот и рентгеноструктурному анализу ДНК, создали двуспиральную модель структуры ДНК.**
- **На рубеже 50 - 60-х годов были выяснены свойства генетического кода, а к концу 60-х годов его универсальность была подтверждена экспериментально.**
- **70-х годах был открыт ряд ферментов, катализирующих реакции превращения ДНК.**
- **Интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой стали *E. coli*, ее вирусы (бактериофаги) и плазмиды.**

- **Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека.**

Биотехнология

Структура ДНК

- Нуклеотиды соединяются друг с другом в полимерную цепочку с помощью **фосфодиэфирных связей**.



Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- **специфическое расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;**
- **быстрое секвенирование последовательности нуклеотидов очищенного фрагмента ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;**
- **конструирование рекомбинантной ДНК;**
- **гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;**
- **клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;**
- **введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы и др.**

Однако, никакого единого, универсального набора методик здесь не существует, но чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме:

- **из организма — донора нужных генов — экстрагируют нативную ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция “клонлирующий вектор—встроенная ДНК”);**
- **эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией;**
- **идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки);**
- **получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.**

- В условиях *in vivo* инструментами молекулярного манипулирования являются **ферменты**. Технология рекомбинантной ДНК потому и называется технологией или генетической инженерией, что использует инструменты, обеспечивающие реализацию генетических процессов в природе

- **Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно объединить в несколько групп:**
- **- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (эндонуклеазы рестрикции или рестрицирующие эндонуклеазы);**
- **- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);**
- **- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);**
- **- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.**

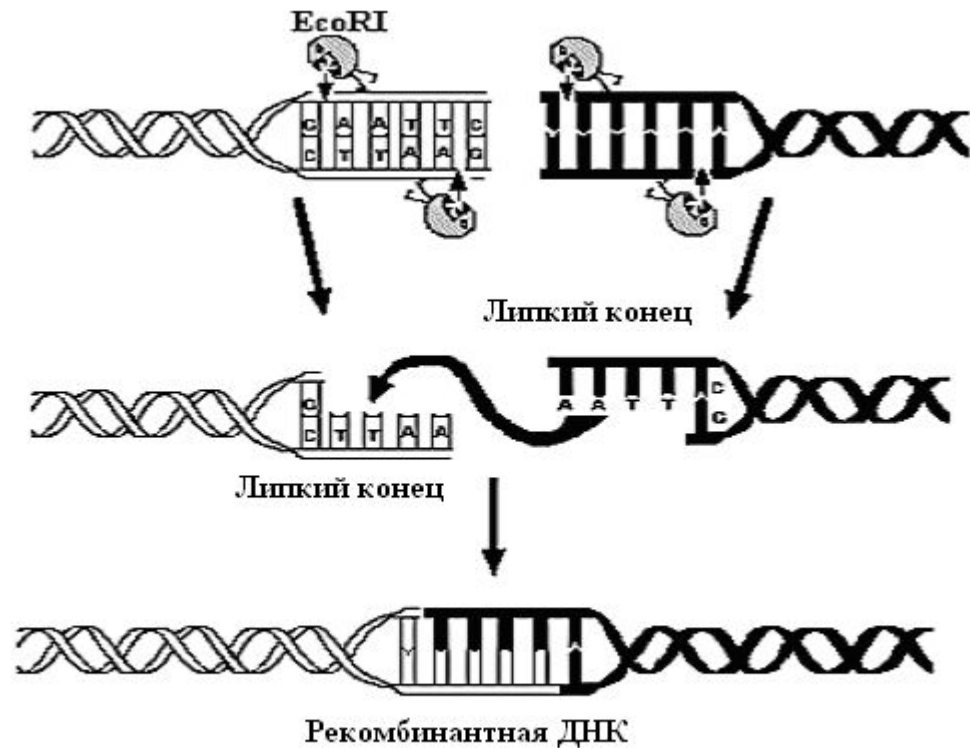
- **ИНСТРУМЕНТАРИЙ ФЕРМЕНТЫ**
- **НУКЛЕАЗЫ** позволяют специфическим образом модифицировать молекулы ДНК и РНК: **эксонуклеазы** и **эндонуклеазы**.
- Нуклеазы могут расщеплять полинуклеотидную цепь с одной или другой стороны от фосфодиэфирного мостика. Каждый фермент проявляет определенную специфичность в этом отношении.

Рестрицирующие эндонуклеазы (РЭ)

- **Эндонуклеазы рестрикции** – высокоспецифичные бактериальные ферменты, которые узнают определенные последовательности оснований в двухцепочечной молекуле ДНК (сайты узнавания) и расщепляют обе цепи, а также обладают способностью к метилированию ДНК.
- **РЭ типа I** – ДНК-зависимые АТФ-азы, узнают специфические последовательности на ДНК, но гидролизуют ее в другом месте, метилирование производят в месте узнавания. Потребность в ионах Mg, АТФ и S-аденозилметионина.
- **РЭ типа III** - обладают нуклеазной и метилазной активностью, специфически узнают участки ДНК, но разрезают неспецифически. Потребность в ионах Mg и S-аденозилметионина.
- **РЭ типа II** – узнают специфические участки на двухцепочечной ДНК и разрезают ее в строго специфических местах либо в участке узнавания, либо на строго определенном расстоянии от него, давая фрагменты определенного размера.

- ***Рестрицирующие эндонуклеазы типа II***
- Ферменты этой группы не проявляют метилазную активность.
- Типичный представитель – EcoRI. Участок узнавания и разрезания на ДНК представлен палиндромной последовательностью 5' – GAATTC – 3'
- При действии EcoR I и подобных ему РЭ образуются “липкие” одноцепочечные концы (cohesive ends), которые, независимо от источника происхождения гидролизуемой ДНК, могут слипаться заново, давая новые, рекомбинантные, последовательности ДНК

Действие эндонуклеаз рестрикции типа II



НОМЕНКЛАТУРА

- **1. Название фермента начинается с трехбуквенного акронима, в котором первая буква совпадает с первой буквой названия рода, а остальные – с первыми двумя буквами вида организма, в котором данный фермент был обнаружен.**
- **2. Дополнительные буквы служат для обозначения конкретного штамма или серотипа.**
- **3. Римские цифры присваиваются в порядке обнаружения ферментов данного типа у конкретного организма. Дополнительные буквы и цифры курсивом не выделяются, но отделяются пробелом.**
- **Например:**
- **Vsu I – фермент первой системы рестрикции-модификации, обнаруженной у *Bacillus subtilis***

- **НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЭ**

- На настоящий момент описано приблизительно 500 РЭ. У всех этих ферментов обнаружено около 90 сайтов узнавания.
- Название РЭ показывает источник их выделения и порядковый номер РЭ в этом источнике.
- Например, ферменты EcoRI, EcoRII, EcoRIII и EcoRV являются РЭ из *Escherichia coli*, а HaeII и HaeIII выделены из *Haemophilus aegypticus*.
- *Изошизомеры* – ферменты, имеющие одинаковые сайты узнавания. Однако изошизомеры необязательно делают разрезы в одном и том же месте, например,
 - XmaI 5'– C↓CCGGG- и SmaI 5'– CCC↓GGG
 - - GGGCC↑C – 5' GGG↑CCC – 5'

- **Палиндромные** участки узнавания и разрезания могут быть представлены шестью парами нуклеотидов (EcoRI, HindIII), пятью парами, где средний нуклеотид может быть любым из четырех нуклеотидов (Hinfl), они могут содержать восемь нуклеотидов (NotI), четыре нуклеотида (MboI).
- **РЭ**, имеющие различные сайты узнавания и разрезания, часто образуют идентичные липкие концы
- MboI 5'–↓GATC - и BamHI 5'– G↓GATCC -
- - CTAG↑ – 5' - CCTAG↑G – 5'
- **РЭ**, разрезающие фосфодиэфирный мостик в середине узнаваемой последовательности, образуют “тупые” двуцепочечные концы
- HpaI 5'– GTT↓AAC -
- - CAA↑TTG – 5'
- **РЭ** могут узнавать непалиндромные участки и разрезать ДНК на некотором расстоянии от них. В таких случаях образуются одноцепочечные выступающие концы длиной в один нуклеотид
- MboII 5'– **GGTG**ANNNNNNN↓–
- **CCA**CTNNNNNNN↑ - 5'

- **Фосфомоноэстеразы** (фосфатазы). Эти ферменты отщепляют как 5'-, так и 3'-концевые фосфомоноэфирные группы в ДНК и РНК.
- **Полинуклеотидкиназа**. Это еще один фермент, модифицирующий полинуклеотидные цепи. Он является фосфотрансферазой, которая специфически фосфорилирует 5'-концевые гидроксильные группы молекул ДНК и РНК. Полинуклеотидкиназу используют для получения радиоактивно меченых зондов. Фермент обеспечивает введение радиоактивной метки с 5'-конца полинуклеотидной цепи с помощью изотопа Р-32 в составе АТФ, меченой по γ -фосфату. Последовательное действие фосфатазы и полинуклеотидкиназы приводит к замещению немеченого 5'-концевого фосфомоноэфира на радиоактивный без каких-либо других изменений в цепи.

- **Лигаза** (лат. *ligare* – сшивать, соединять) – это ферменты, катализирующие соединение двух молекул с образованием новой химической связи (*лигирование*). В молекулярной биологии лигазы разделяют на две большие группы: ДНК-лигазы и РНК-лигазы.

ДНК-полимераза I

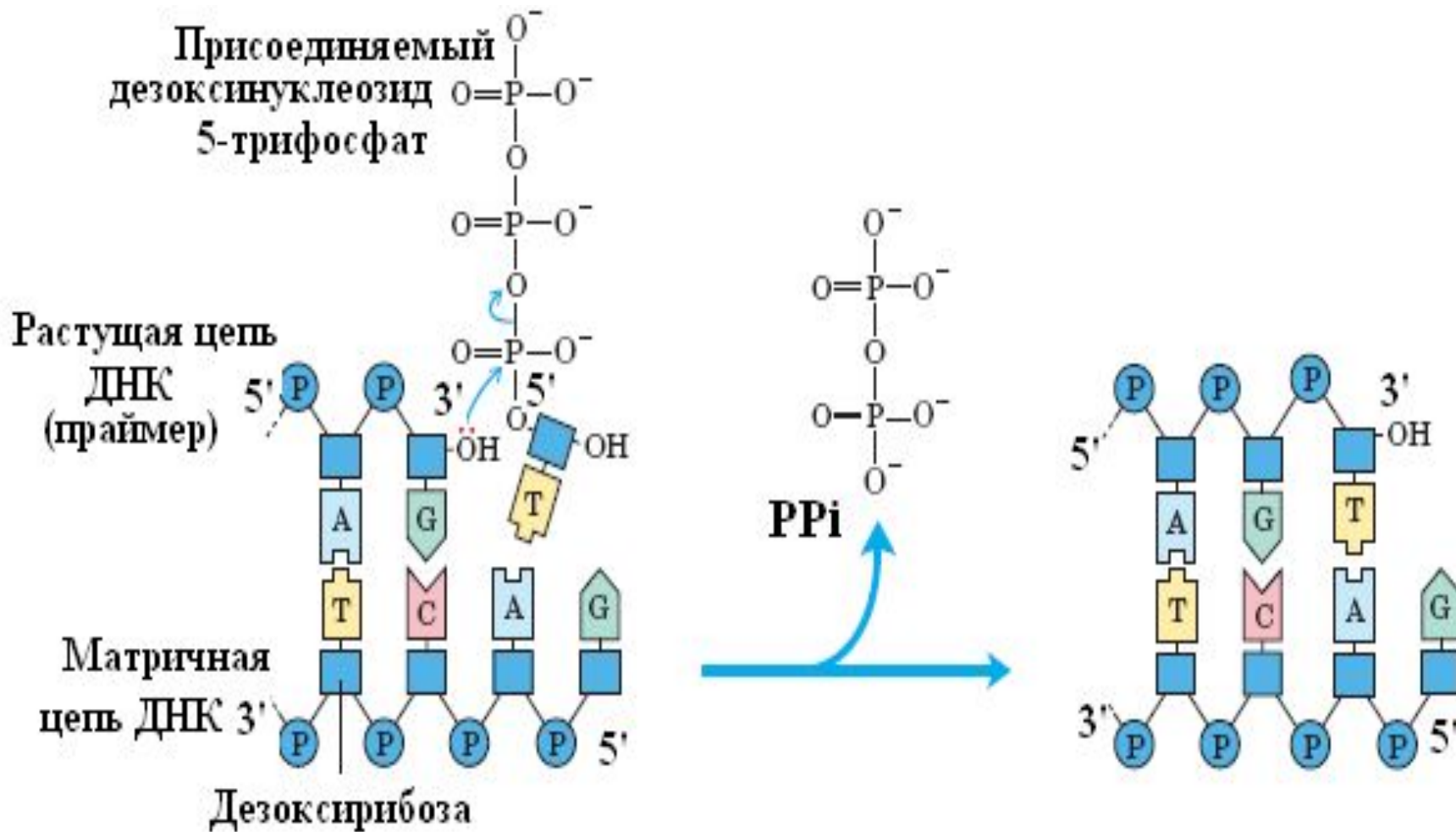
- **удлинение цепи путем последовательного присоединения нуклеотидов к праймеру со свободной 3' – гидроксильной группой. Процесс направляется ДНК матрицей. Также осуществляет экзонуклеазную функцию как с 5' -, так и с 3' – конца.**

• ДНК-полимераза *E.coli*.

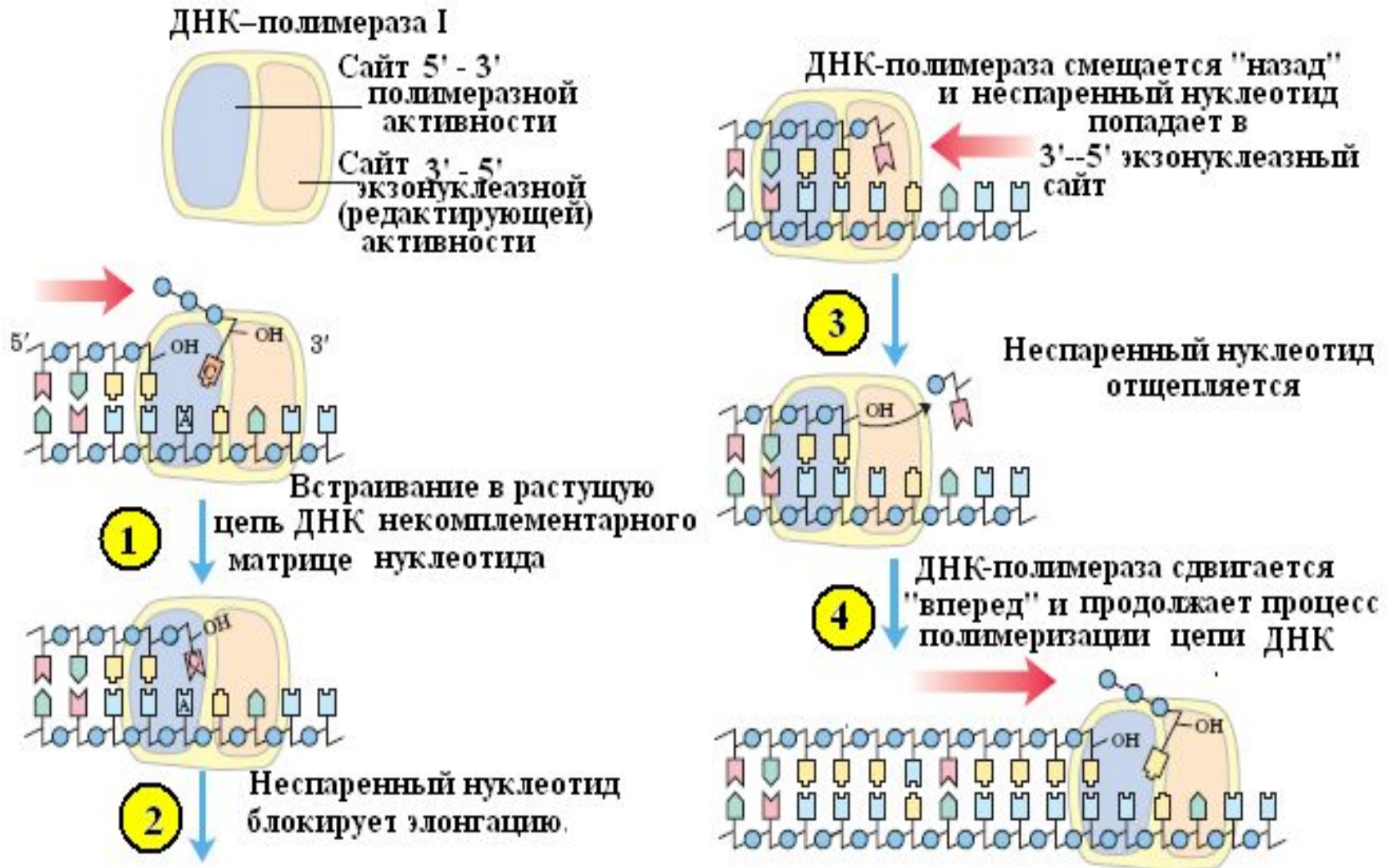
- Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5'→3' полимеразной, 3'→5' экзонуклеазной, 5'→3' экзонуклеазной.



- Схема, демонстрирующая 5'→3' полимеразную активность ДНК-полимеразы I *E.coli*



- Схема, демонстрирующая 3'→5'-экзонуклеазную активность ДНК-полимеразы I *E.coli*



- Бифункциональная часть ДНК-полимеразы, состоящая из $5' \rightarrow 3'$ полимеразы и $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазы, названа **фрагментом Кленова** (по фамилии одного из авторов, описавших ее).
- **Применение ДНК-полимеразы I:**
 - достраивание одноцепочечных 5'-концов на двухцепочечной ДНК, часто генерируемых эндонуклеазами рестрикции, до тупых;
 - синтез второй цепи на одноцепочечной ДНК . ДНК-полимераза способна превращать фрагменты ДНК с липкими концами во фрагменты с тупыми концами при наличии выступающего 5 – конца;
 - гидролиз одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК;
 - получение меченых ДНК-зондов (*метод ник-трансляции*) с высокой удельной активностью;
 -

- **Обратная транскриптаза** (ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза) представляет собой фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе, который получил название “*обратная транскрипция*”.
- Ферментативные активности:
- 1) ДНК-полимеразная, использующая в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активность РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК - ДНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазная активность.

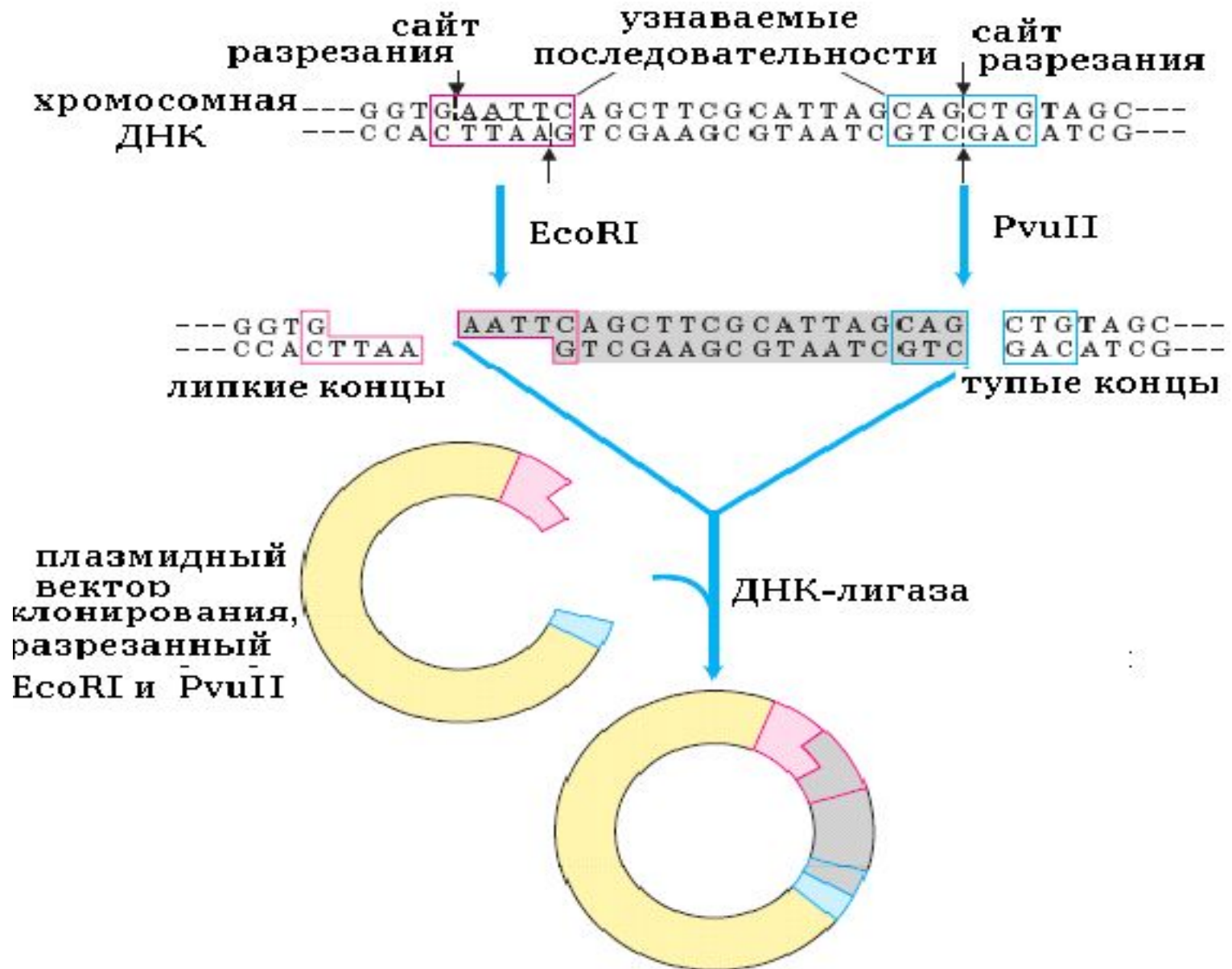
- **Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза** (терминальная трансфераза) синтезирует полинуклеотидную цепь в безматричном синтезе. Используется для создания липких концов.



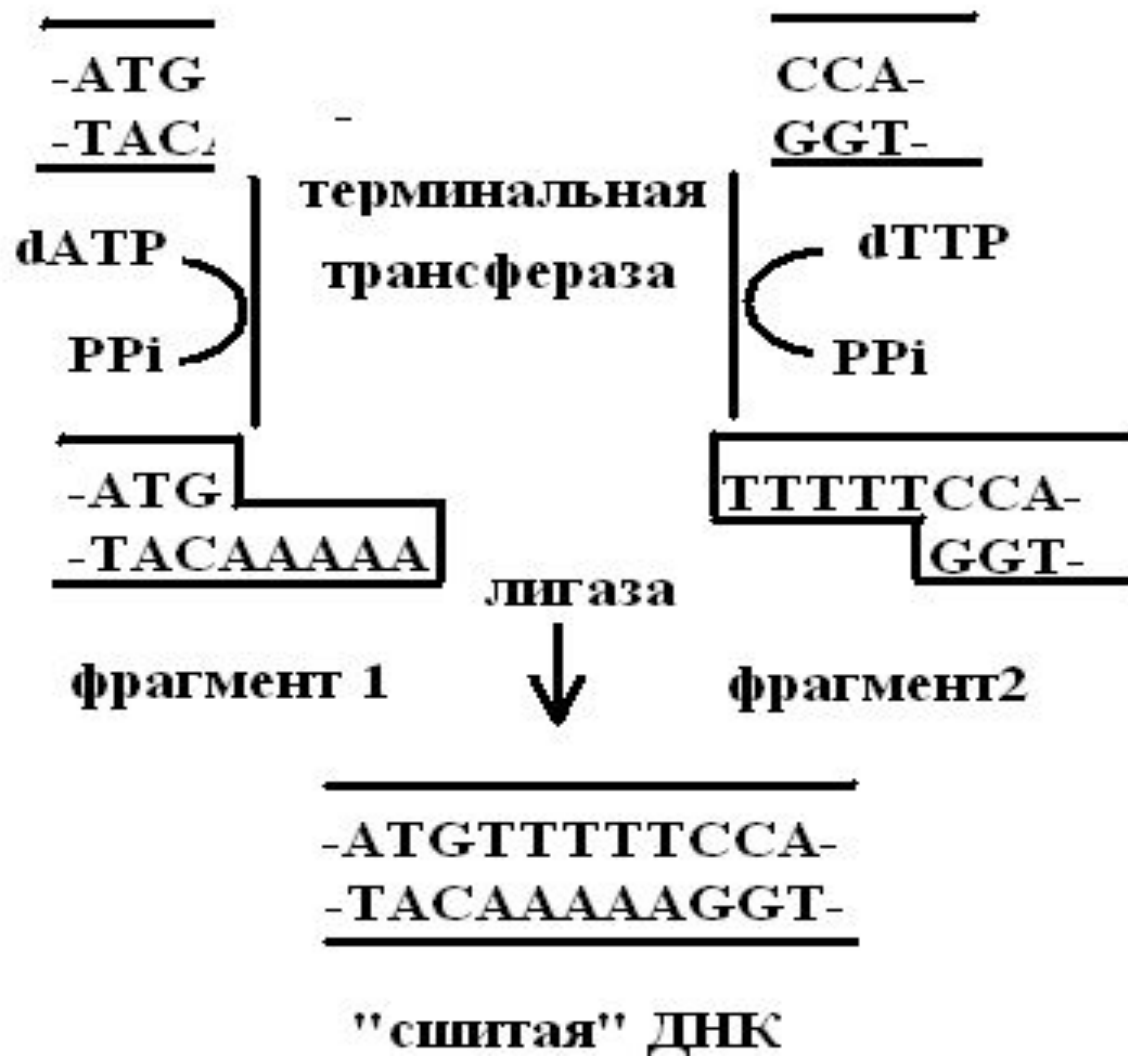
- Реакция, катализируемая терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой.
- N- любой из четырех дезоксинуклеотидов: А,Т,С или G

- **Создание рекомбинантной ДНК – это процесс объединения *in vitro* двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников.**
- **Фрагменты ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности структурных или регуляторных участков генов, представляющих интерес для исследователя, получают с использованием эндонуклеаз рестрикции.**

- Лигирование по одноименным "липким" концам

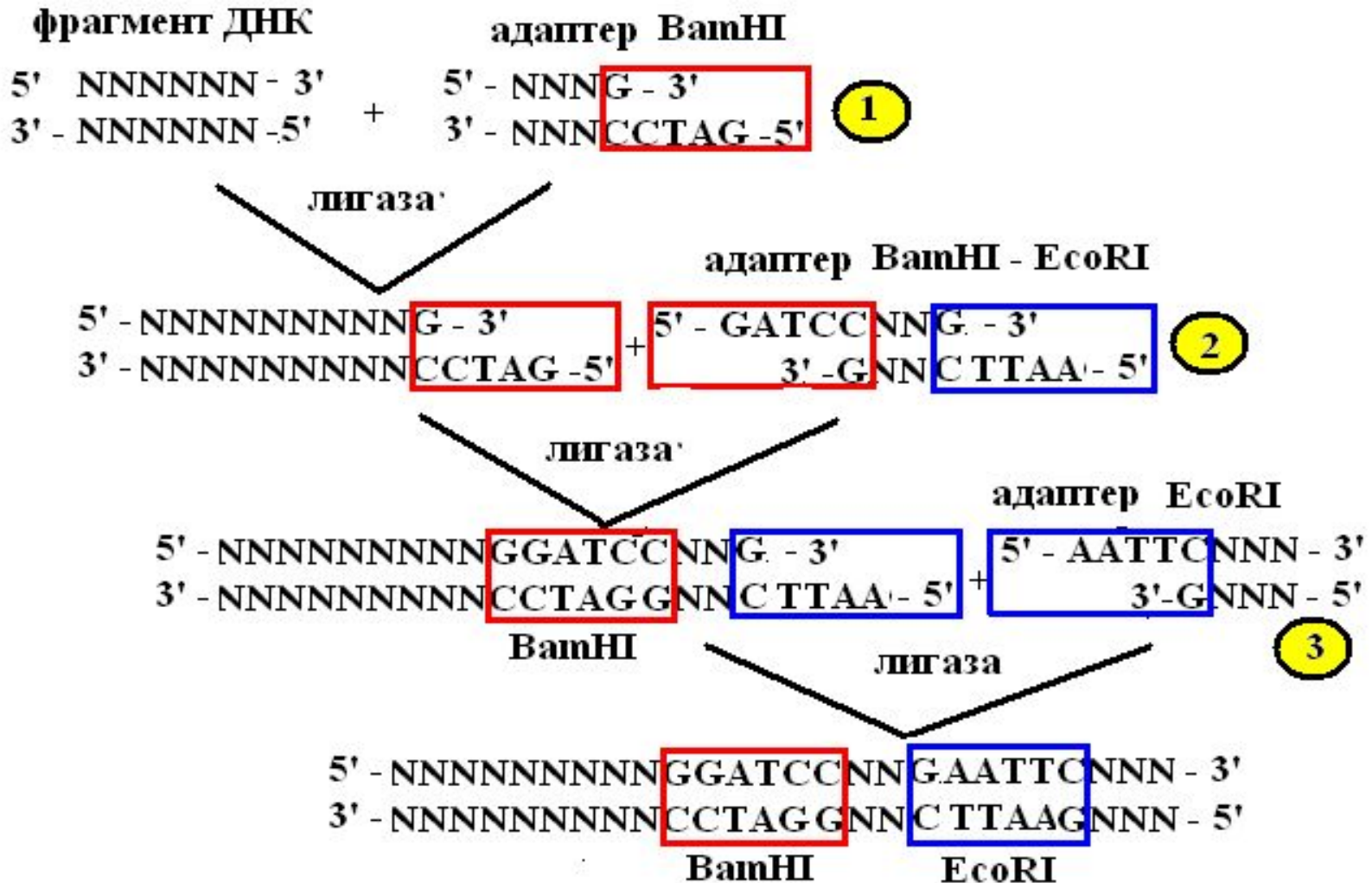


- Лигирование по "тупым" концам коннекторным методом

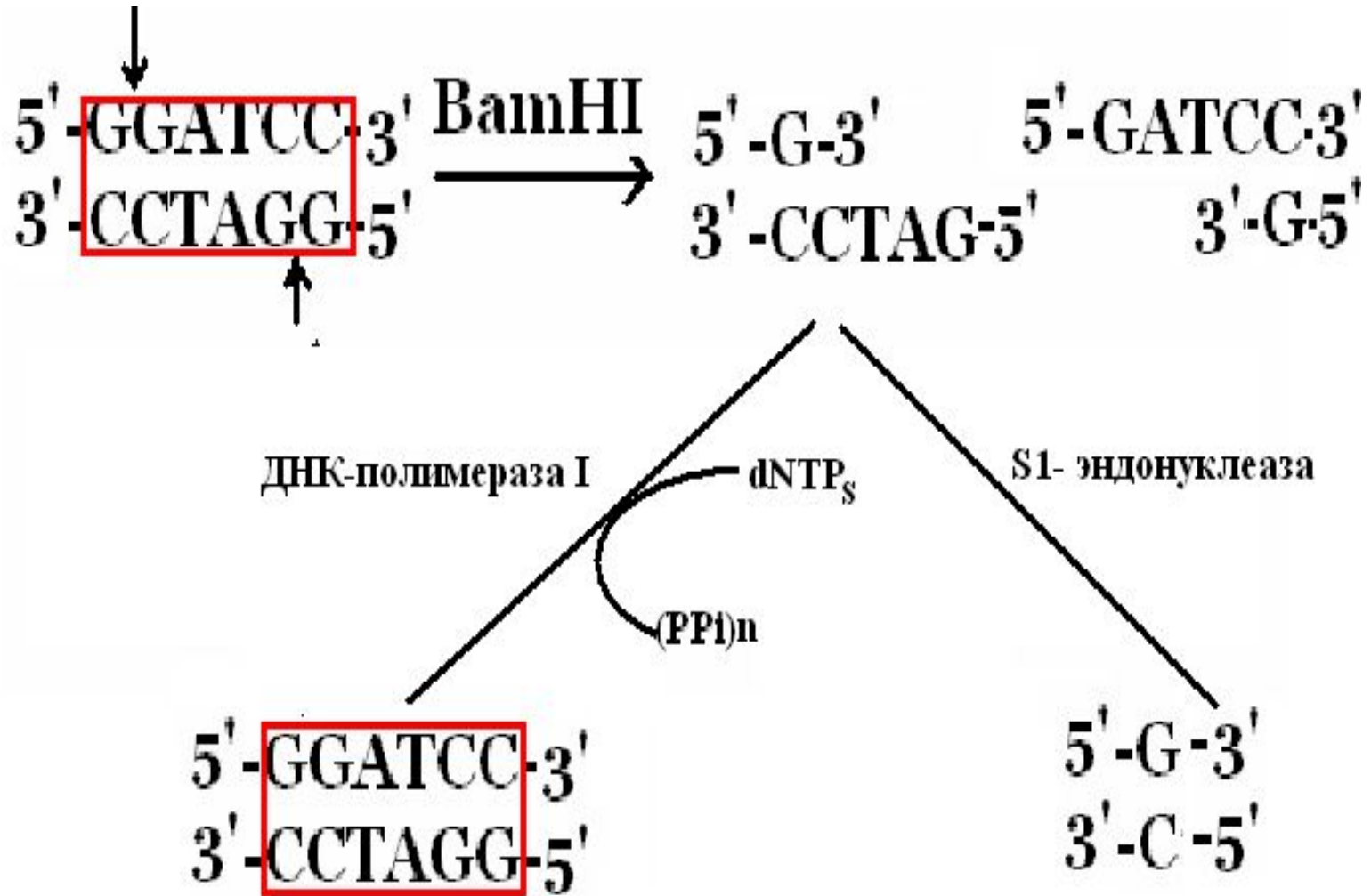


- ***Лигирование фрагментов с разноименными липкими, или липким и тупым концам***
- **В ситуациях, когда необходимо сшить фрагменты ДНК, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, то есть некомплементарные друг другу липкие концы, или тупой и липкий концы применяют *адаптеры* (to adapt – переделывать) или *линкеры* (to link – связывать). Это молекулярные "переходники".**

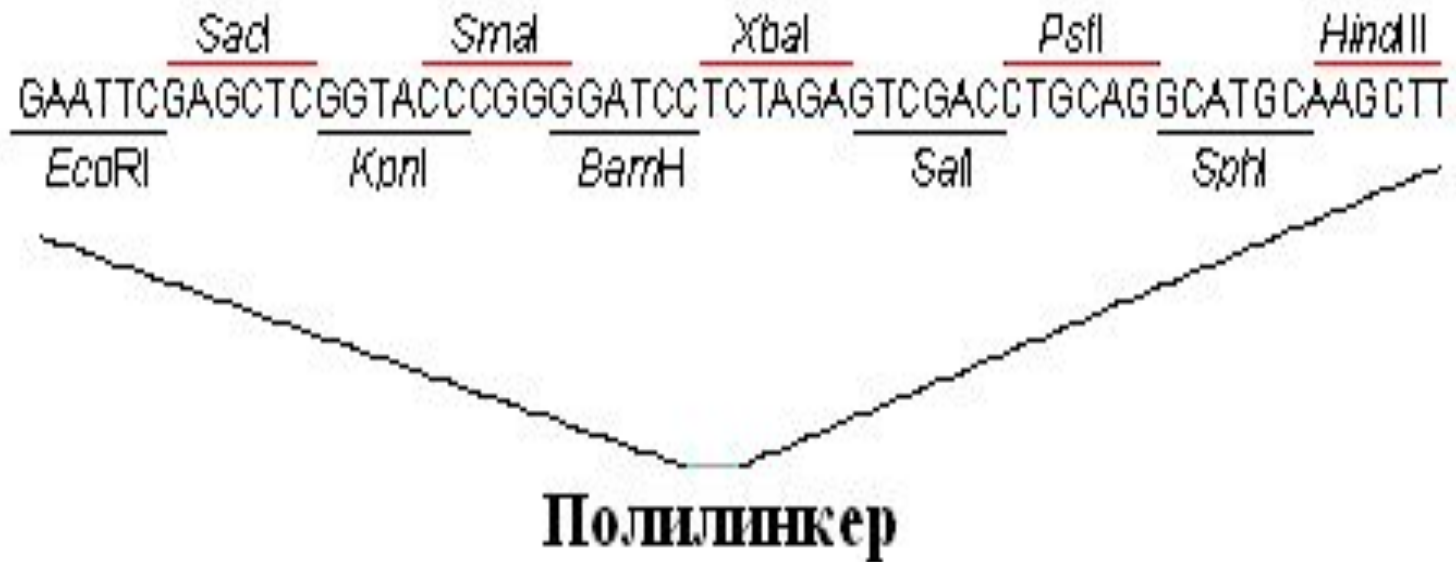
- Изменение концов фрагментов ДНК с помощью различных адаптеров: “тупой – липкий” (1); “липкий – липкий” (2); “липкий – тупой” (3).



- Преобразование липких концов рестрикционных фрагментов ДНК в тупые.



- Линкеры, содержащие участки узнавания для нескольких эндонуклеаз рестрикции, называются **полилинкерами** или множественными сайтами клонирования (MCS – multiply cloning sites).



- **СЛОВАРЬ**

- **Рекомбинантная ДНК, генетическая инженерия, нуклеотид, нуклеозид, ДНК-мишень, нуклеазы, эндонуклеазы рестрикции, “липкие” и “тупые” концы, изошизомеры, палиндром, фосфотрансфераза, фосфомоноэстераза, фосфатаза, полинуклеотидкиназа, лигаза, гидролиз фосфодиэфирной связи, ДНК-полимераза, фрагмент Кленова, ник-трансляция, ревертаза, обратная транскрипция, терминальная трансфераза, адаптер, линкер, полилинкер.**