

ТЕХНОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ

(продолжени
е)

ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ

Плазмиды – внехромосомные автономнореплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК.

Плазмидные векторы создают на основе природных плазмид (F-плазмиды, R-плазмиды, плазмиды деградации, криптические плазмиды) методами генной инженерии с использованием ферментов-инструментов.

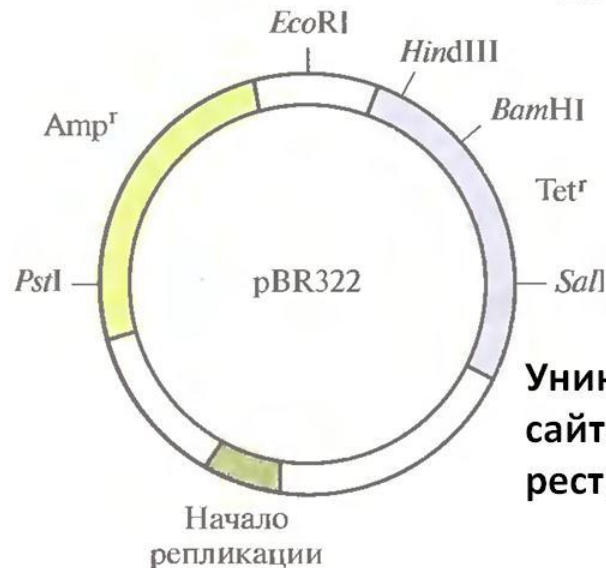
Высококопийные плазмиды - 10-200 копий ДНК на клетку.

Низкокопийные плазмиды - 1-10 копий на клетку.

Размеры плазмид варьируют от <1 до >500 т.п.н.

Содержит:

- 15-20 копий на клетку**



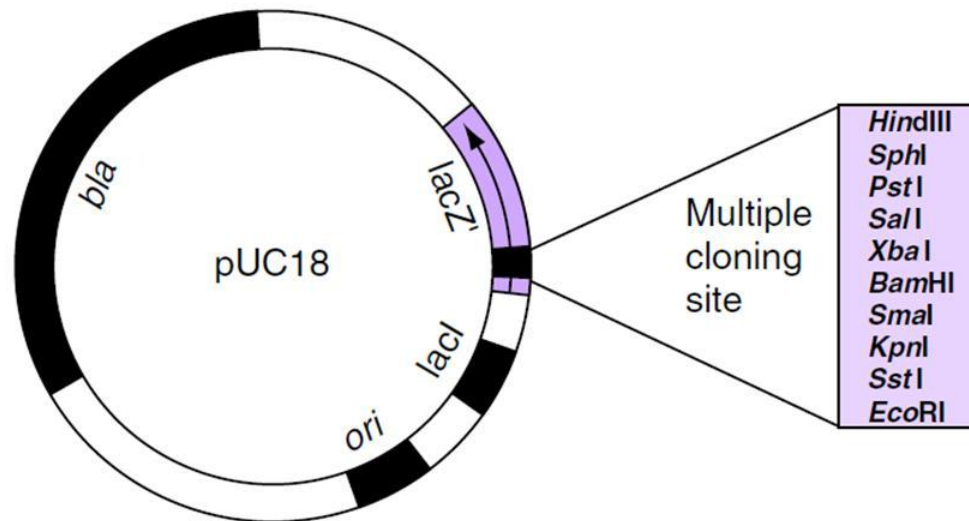
Уникальные сайты рестрикции

Создана на основе репликона
природной плазмиды ColEI

[https://international.neb.com/product/s/n3033-pbr322-vector#Product%20Information Properties%20&%20Usage](https://international.neb.com/product/s/n3033-pbr322-vector#Product%20Information%20Properties%20&%20Usage)

Плазмидный вектор pUC18 (2686 п.н.)

500-700 копий на клетку



ori – ориджин репликации

bla – ген β -лактамазы, селективный маркер (устойчивость к ампициллину)

lacZ ' – N-концевая часть гена β -галактозидазы, селективный маркер (хромогенный субстрат X-Gal)

lacI – ген Lac-репрессора (регуляция транскрипции, индуктор – IPTG)

Плазмиды могут содержать
полилинкер
(multiple cloning site, MCS)

небольшой, искусственно
синтезированный фрагмент ДНК,
который представляет собой
последовательность,
содержащую сайты рестрикции
для наиболее используемых
ферментов

Емкость плазмидных векторов – ~10 т.п.н.

ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ФАГА λ



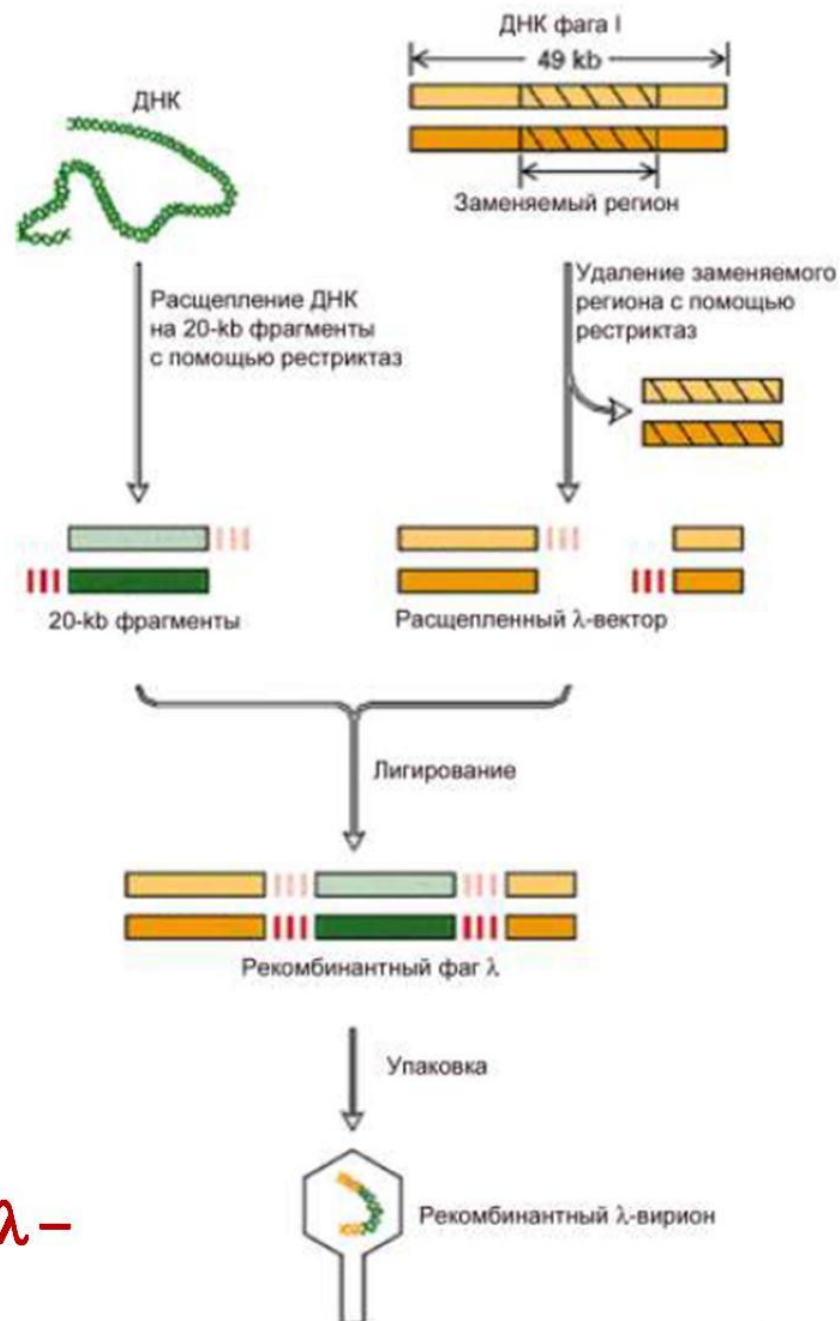
cos-сайты - одноцепочечные
взаимокомплементарные 5'-концы (12 н.),
благодаря которым в клетке ДНК фага
находится в кольцевой форме.
Необходимы для упаковки.

Левое плечо содержит генетическую
информацию о головке и отростке фага

Правое плечо отвечает за репликацию ДНК
и лизис

Есть заменяемый регион (~20 т.п.н.),
вместо которого можно вставить фрагмент
ДНК аналогичного размера

**Емкость векторов на основе фага λ –
до 25 т.п.н.**



КОСМИДЫ

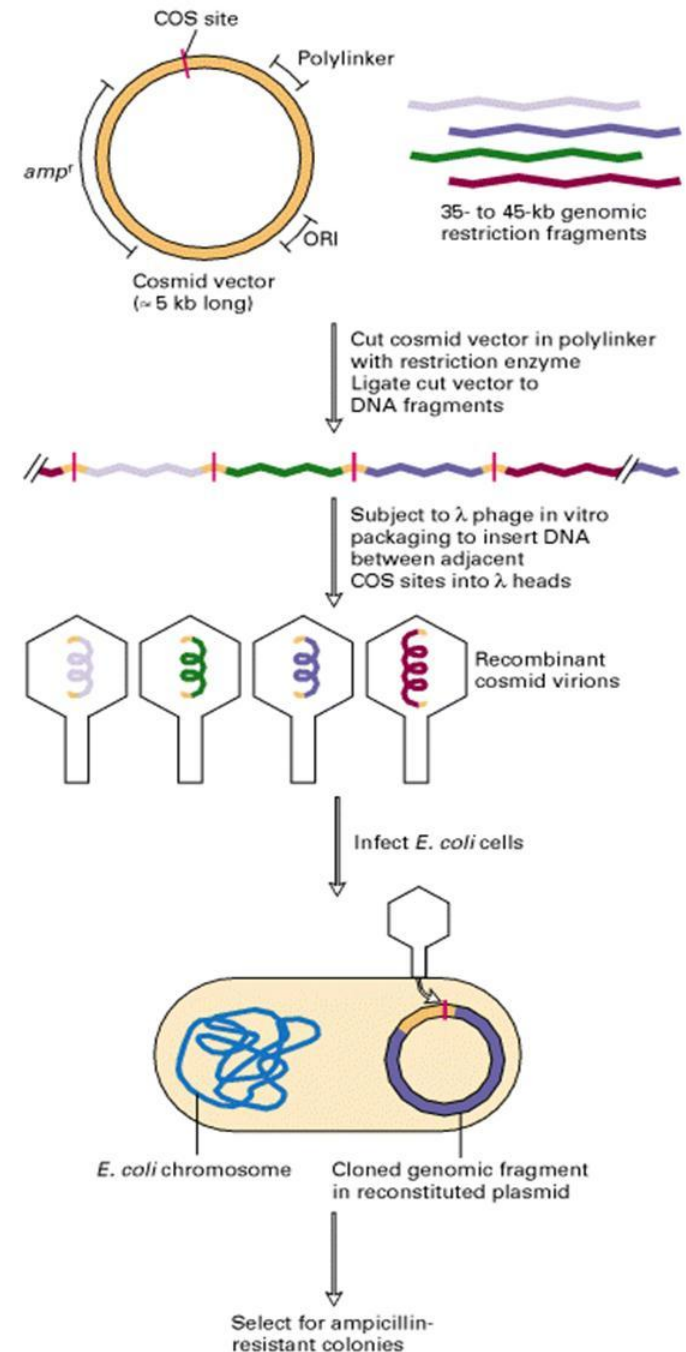
(плазмиды с cos-сайтами фага λ)

Основные компоненты космидного вектора :

- плазмидный репликон,
- ген резистентности к антибиотику,
- полилинкер
- cos-сайты фага λ

Наличие cos-сайтов позволяет произвести упаковку в головку фага
В клетке стабильно существует в циклической форме, реплицируется как плазмида

Размер вектора без вставки 10 т.п.н.
Размер вставки до 40 т.п.н.



ФАЗМИДЫ

**(искусственные гибридные векторы,
включающие ДНК фага и плазмиды)**

Включают:

- **до 70% генома фага**
- **ориджины репликации фага и плазмиды,**
- **ген резистентности к антибиотику,**
- **cos-сайты фага**

Наличие cos-сайтов позволяет произвести упаковку в капсид

Размер вектора без вставки до 30 т.п.н.

Размер вставки до 30 т.п.н.

**Только рекомбинантные фазмиды образуют на бактериальном газоне
фаговые бляшки (простая процедура отбора)**

ФАГМИДЫ

(гибридный тип векторов на основе плазмид и нитчатых фагов (f1, M13))

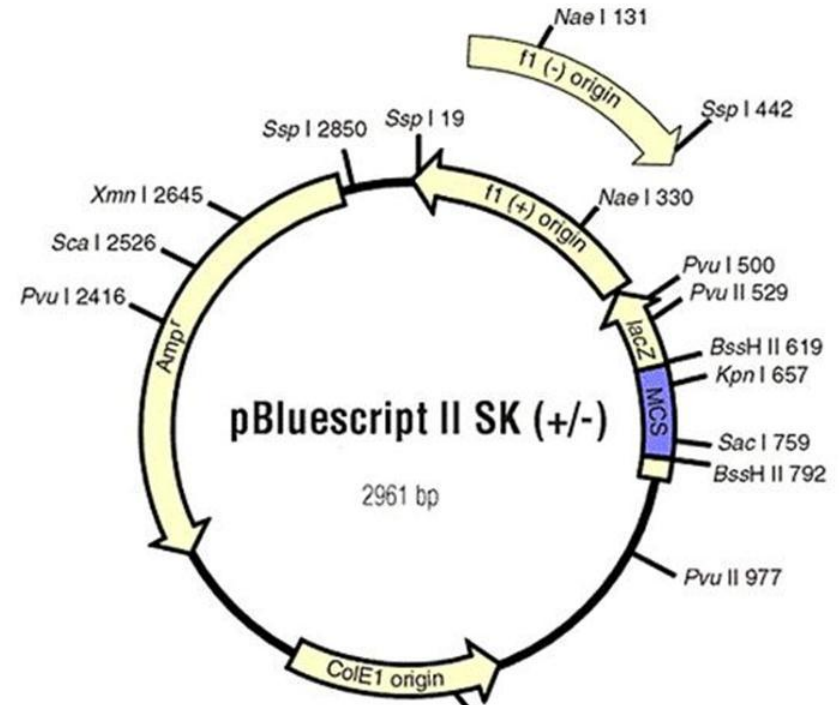
Гибридные векторы, обладающие свойствами плазмид и фагов

Включают:

- ориджины репликации фага и плазмиды,
- ген резистентности к антибиотику,
- cos-сайты фага
- полилинкерную последовательность (multiple cloning site)
- регулируемый сегмент гена lacZ' лактозного оперона под контролем репрессора lacI

Не содержат гены, отвечающие за сборку фаговой частицы

В клетке размножаются как плазмиды



Емкость – до 100 т.п.н

ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

Геном представлен оцРНК

Попадая внутрь клетки, ретровирусная РНК превращается в ДНК путем обратной транскрипции и встраивается в геном

Из состава полностью исключены гены, отвечающие за обеспечение репродукции

Основные преимущества применения РНК-вирусных векторов — эффективная доставка генетического материала в клетки, поддержка долговременной экспрессии

Размер вставки до 8 т.п.н.

Перспективны для создания генно-терапевтических векторов

ИСКУССТВЕННЫЕ ХРОМОСОМЫ

Бактериальные (bacterial artificial chromosome, BAC)

Кольцевые ДНК, выстроенные на базе репликона F-плазмиды (полового фактора)

Размер вектора до 9 т.п.н.

Размер вставки 100–350 т.п.н.

Фаговые (P1-derived artificial chromosome, PAC)

Кольцевые, на основе репликона фага P1

Размер вектора 15-19 т.п.н.

Размер вставки до 110 т.п.н.

Дрожжевые (yeast artificial chromosomes, YAC)

Линейные

Челночные (могут реплицироваться в бактериальных клетках)

Размер вставки до 1000 т.п.н.

Искусственные хромосомы животных (mammalian artificial chromosome, MAC)

Искусственные хромосомы человека (human artificial chromosome, HAC)

Линейные

Размер 6-10 x 10⁶ п.н.

ЕМКОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВЕКТОРОВ (тыс.п.н.)

Плазмиды	до 10
Ретровирусы	до 8
Бактериофаг лямбда	до 25
Космиды	30-45
Фазмиды	до 30
Фагмиды	до 100
РАС	70-90
ВАС	100-500
УАС	250-2000
МАС	>2000

ВВЕДЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК В РЕЦИПИЕНТНЫЕ КЛЕТКИ

Трансформация (англ. transformation) — процесс **поглощения** **бактериальной клеткой молекулы ДНК** из внешней среды

Трансфекция — процесс введения нуклеиновой кислоты **в клетки** **эукариот невирусным методом**

Трансдукция (от лат. transductio — перемещение) – перенос **бактериальной ДНК** из одной клетки в другую **бактериофагами или вирусами**

Конъюгация – перенос **плазмидной ДНК** **из клетки-донора в клетку-реципиент**

Стабильная трансфекция чужеродной ДНК в клетку -

рекомбинантные ДНК интегрируются в хромосомы клеток-реципиентов и становятся их неотъемлемой частью.

Транзиентная (временная) трансфекция (transient transfection) -

молекулы рекомбинантной ДНК существуют и транскрибируются в ядрах во внехромосомном состоянии непродолжительное время.

Стабильное наследование внедренной чужеродной ДНК – основное условие получения трансгенных организмов

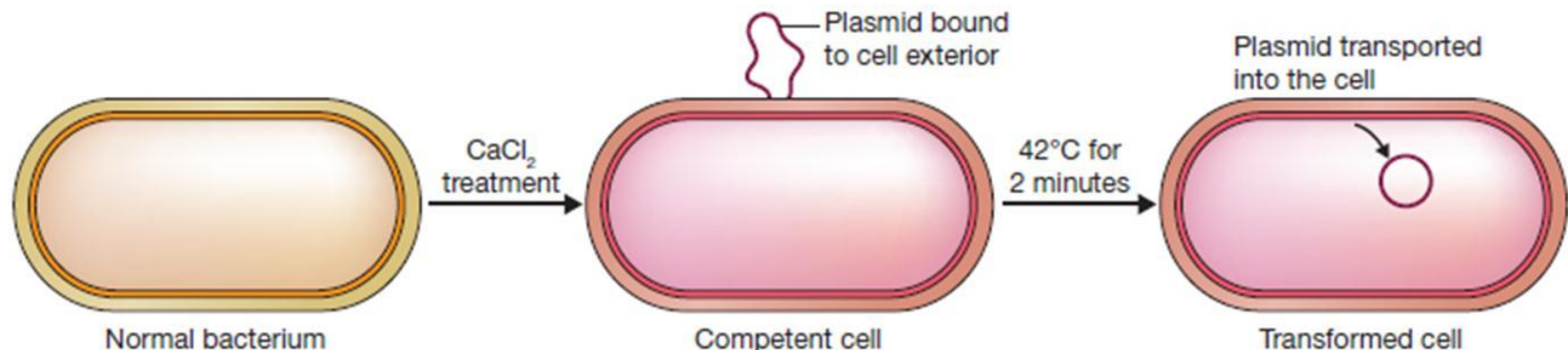
Компетентные клетки – клетки, способные сорбировать экзогенную ДНК на своей поверхности и поглощать ее

Поглощенная экзогенная ДНК может быть интегрирована в бактериальную хромосому или существовать в виде внехромосомного элемента

E. coli природной компетентностью не обладают

Наиболее распространен кальциевый метод.

Клетки бактерий выдерживают в присутствии ионов Ca^{2+} (50 мМ) при 0°C с последующим кратковременным тепловым воздействием при 37°C или 42°C .



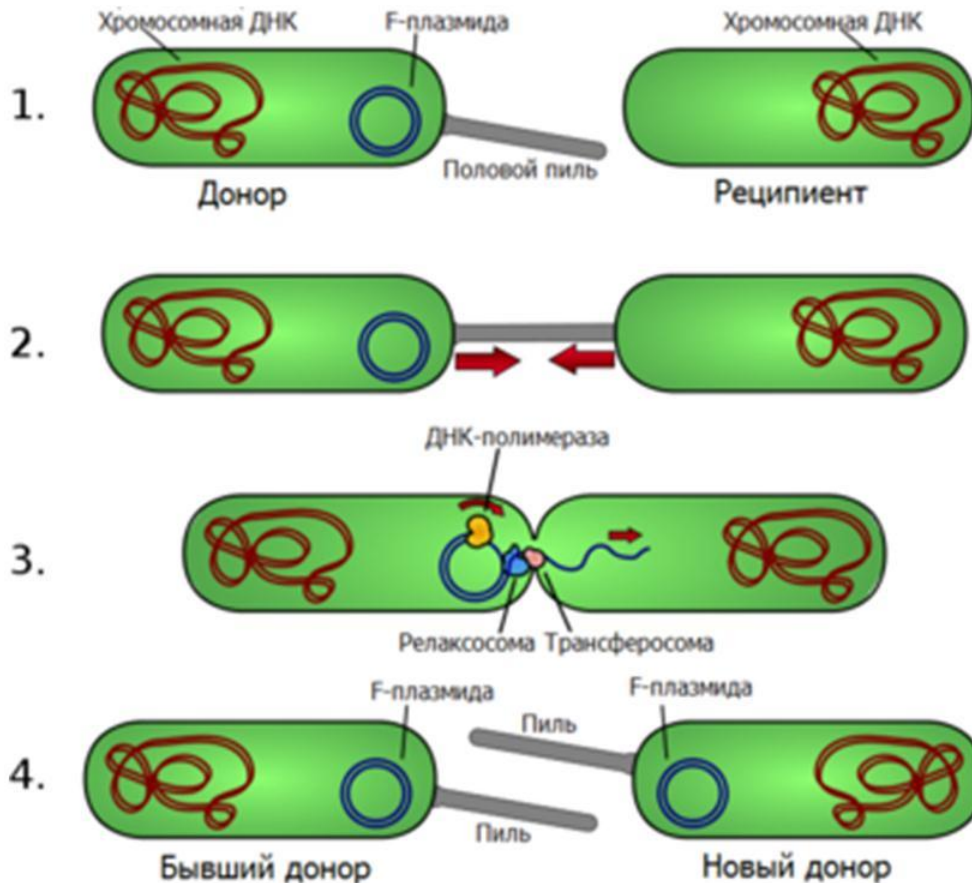
Компетентные клетки – клетки, способные сорбировать экзогенную ДНК на своей поверхности и поглощать ее

Развитие компетентности может идти по каскадному типу: клетки, ставшие компетентными, начинают синтезировать и выделять в среду **низкомолекулярный белок (фактор компетентности)**, который, адсорбируясь на других клетках, делает их также компетентными

Компетентные клетки у различных видов бактерий отличаются от некомпетентных не только способностью к поглощению ДНК, но и другими свойствами:

- обладают **сниженным уровнем метаболизма**;
- **инактивацией некоторых генов**;
- сниженным темпом репликации ДНК или вообще ее отсутствием;
- меньшими размерами, чем некомпетентные;
- **разрушением клеточной стенки** и наличием обнаженных участков цитоплазматической мембраны;
- **повышенной чувствительностью к осмотическому шоку, тепловой обработке**;
- **сниженным поверхностным зарядом**

Конъюгация



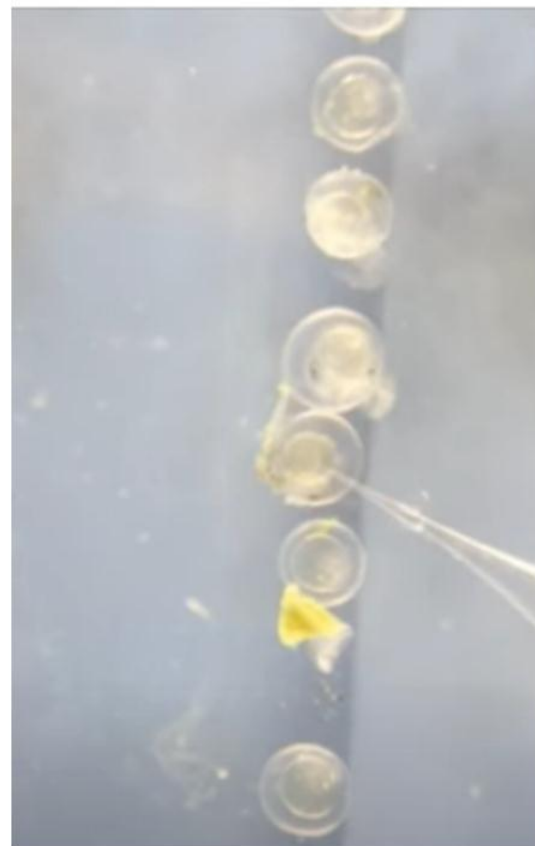
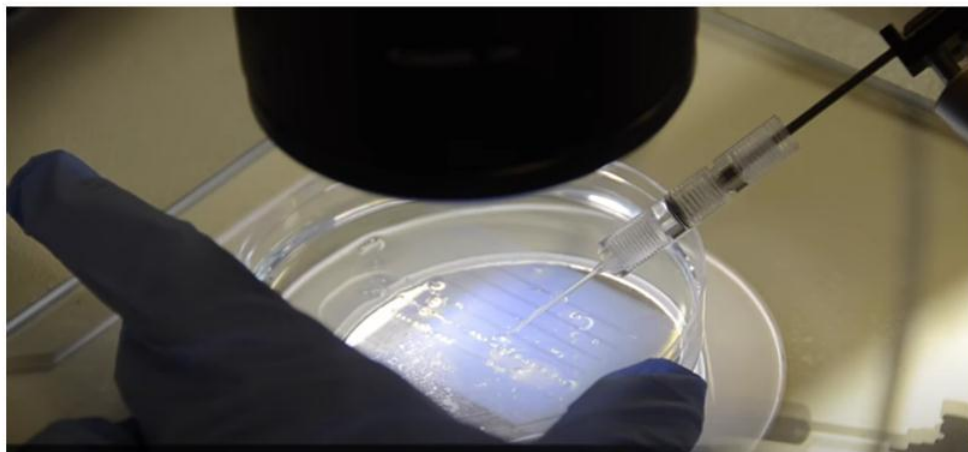
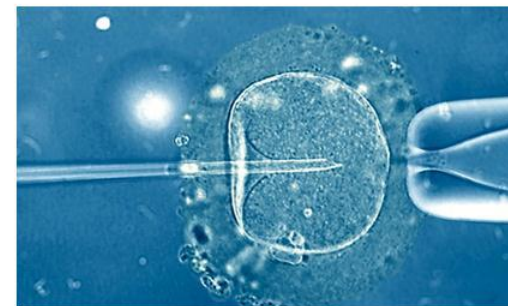
1. Клетка-донор выпускает половой пиль.
2. Пиль прикрепляется к клетке-реципиенту, соединяя две клетки.
3. В мобильной плазмиде происходит односторонний разрыв, и одна цепь ДНК переходит в клетку-реципиент.
4. Обе клетки достраивают вторую цепь ДНК плазмиды, восстанавливая двухцепочечную кольцевую плазмиду, и образуют половые пили. Теперь обе клетки являются полноценными донорами.

Возможен конъюгативный перенос ДНК от бактерий к эукариотам
Перенесенный генетический материал может проникать в ядро и встраиваться в геном реципиента

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТРАНСФЕКЦИИ

□ Микроинъекция ДНК

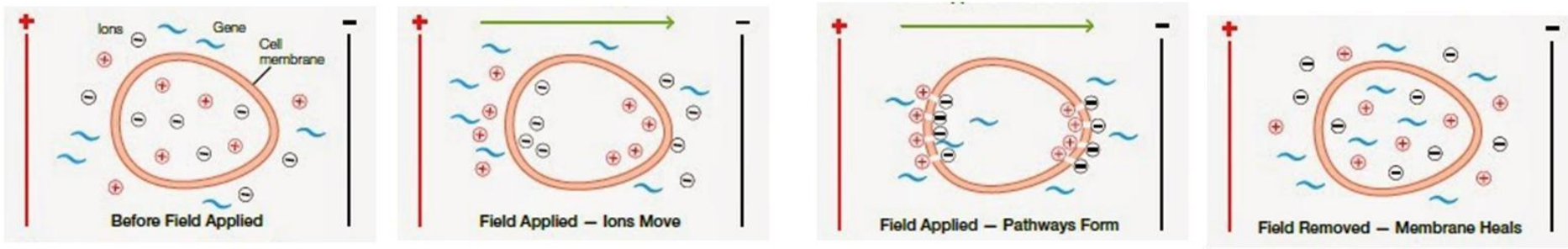
Введение микропипеткой ($d\ 0.5\text{мкм}$) с помощью микроманипулятора



ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТРАНСФЕКЦИИ

□ Электропорация

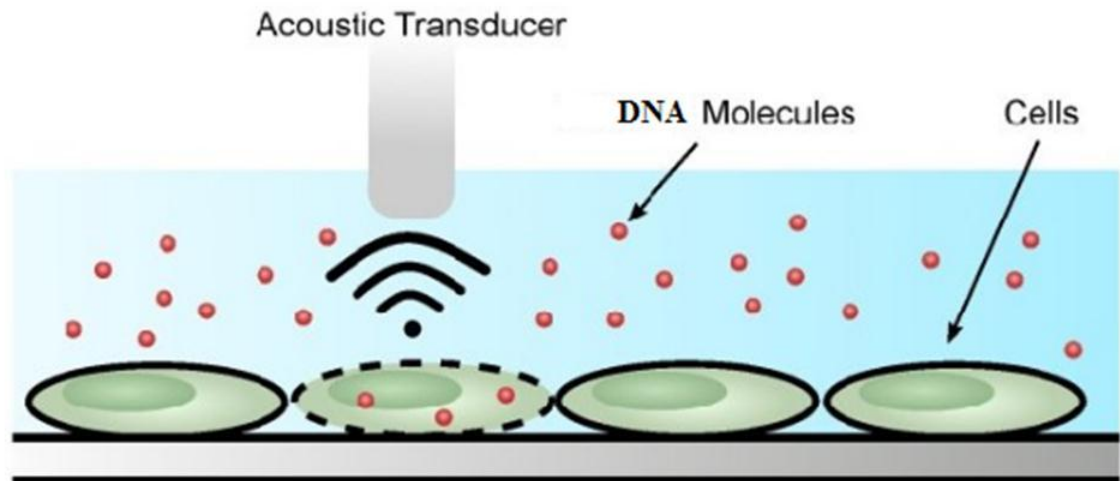
Образование пор под действием высоковольтных электроимпульсов



<http://technologyinscience.blogspot.com/2015/02/transfection-basics-optimization-of.html>

□ Сонопорация

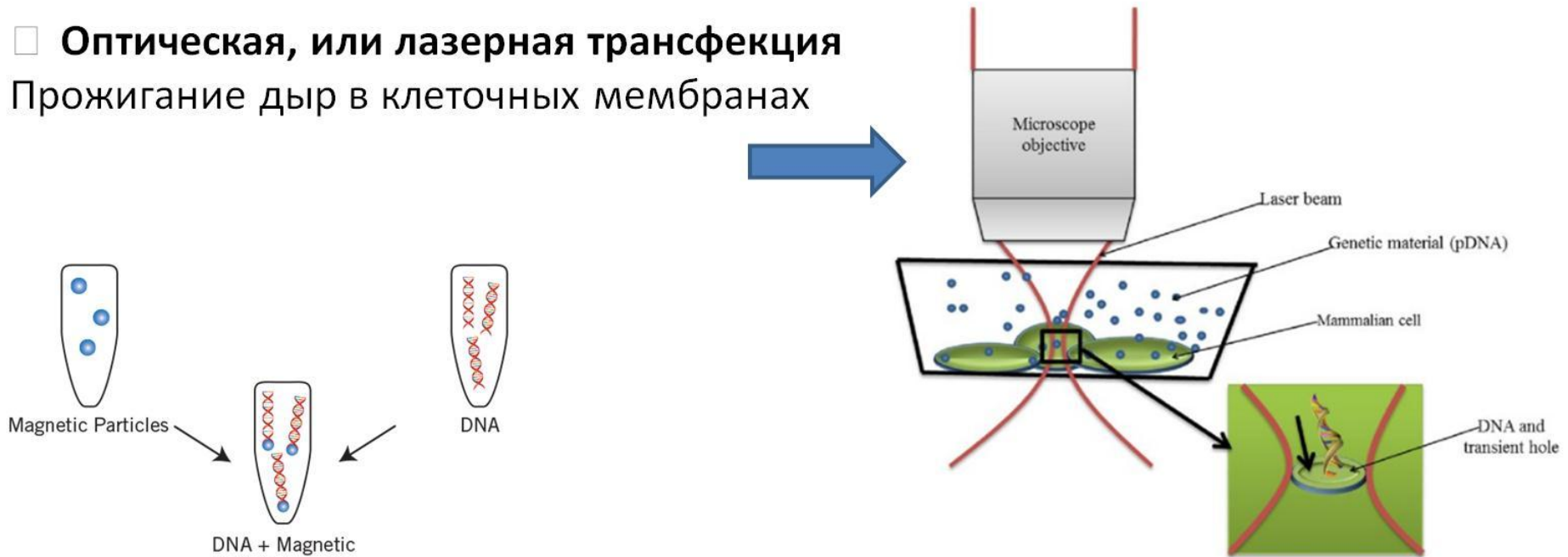
Ультразвук увеличивает проницаемость клеточной мембраны



ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТРАНСФЕКЦИИ

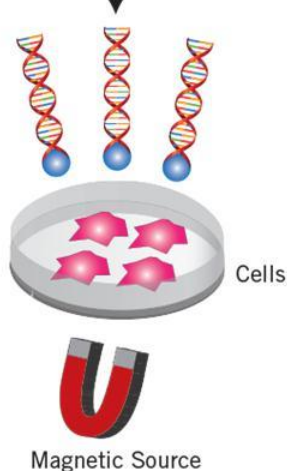
☐ Оптическая, или лазерная трансфекция

Прожигание дыр в клеточных мембранах



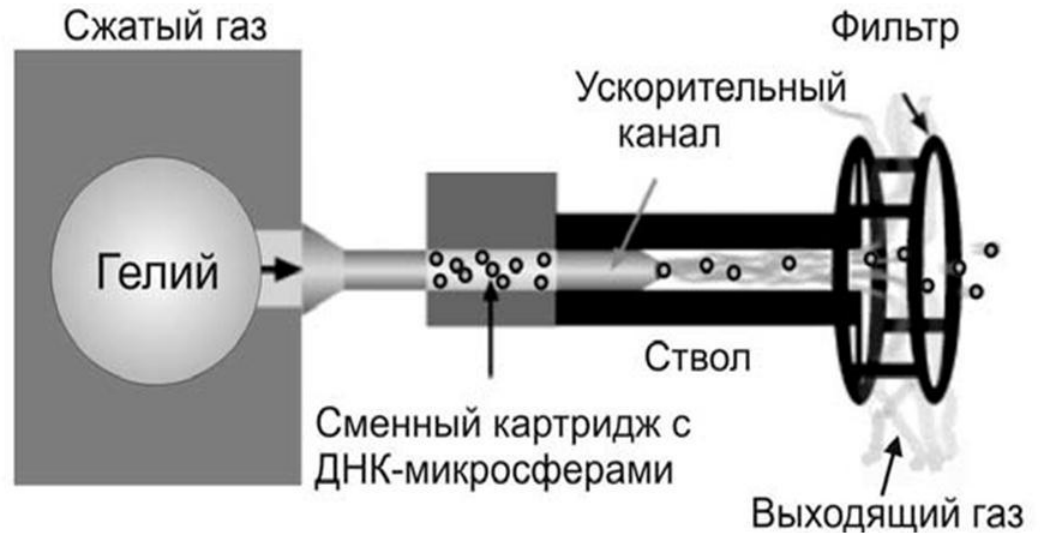
☐ Магнитофекция, или магнитная трансфекция

Вектор присоединяется к магнитным наночастицам, которые транспортируются внутрь клетки с помощью магнитного поля



Баллистическая трансфекция (биобаллистика)

Обстрел клеток микросферами размером 0,6-1,2 мкм, покрытыми ДНК. Применяются микрочастицы золота, вольфрама, или различные синтетические наносферы



«Генный пистолет» (gene gun), или «генная пушка», который был разработан Д. Сенфордом (J. Sanford) в 1987 г. по устройству сходен с пневматическим оружием.

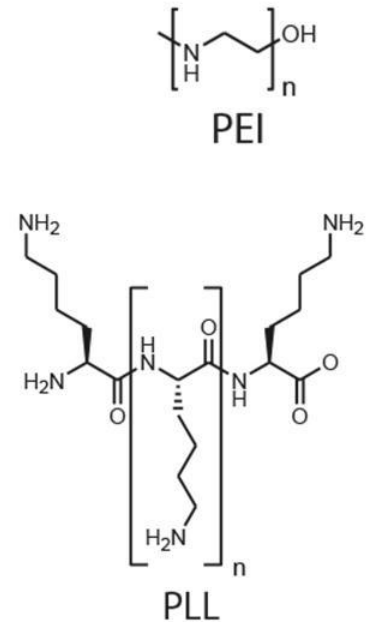
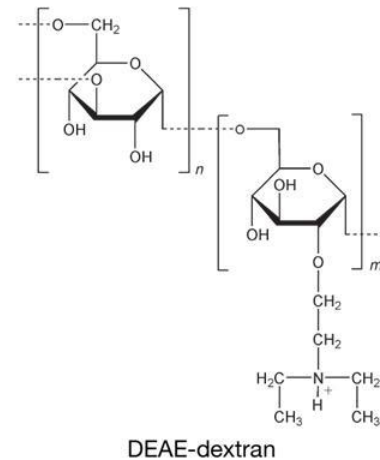
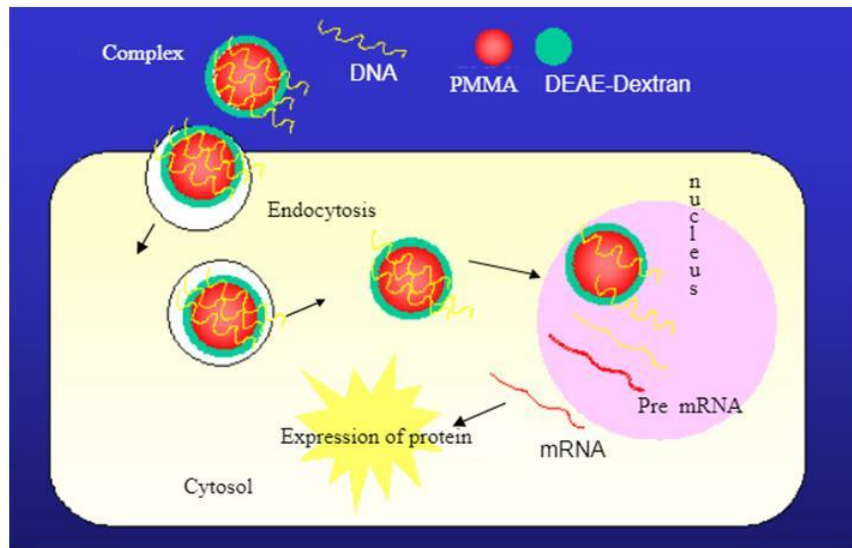
ТРАНСФЕКЦИЯ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ С ПОЛИМЕРАМИ

□ Полиплексы – комплексы ДНК с катионными полимерами

Проникают в клетку путем неспецифического эндоцитоза

Используют катионные белки, синтетические гомополимеры аминокислот (полилизины, полиаргинины), полиэтиленимин, полиэтиленгликоль и др.

Один из первых методов трансфекции - инкубация ДНК с ДЭАЭ-декстраном. ДЭАЭ-декстран связывается с ДНК и с клеточной мембраной, стимулируя пиноцитоз, сам в клетку не проникая

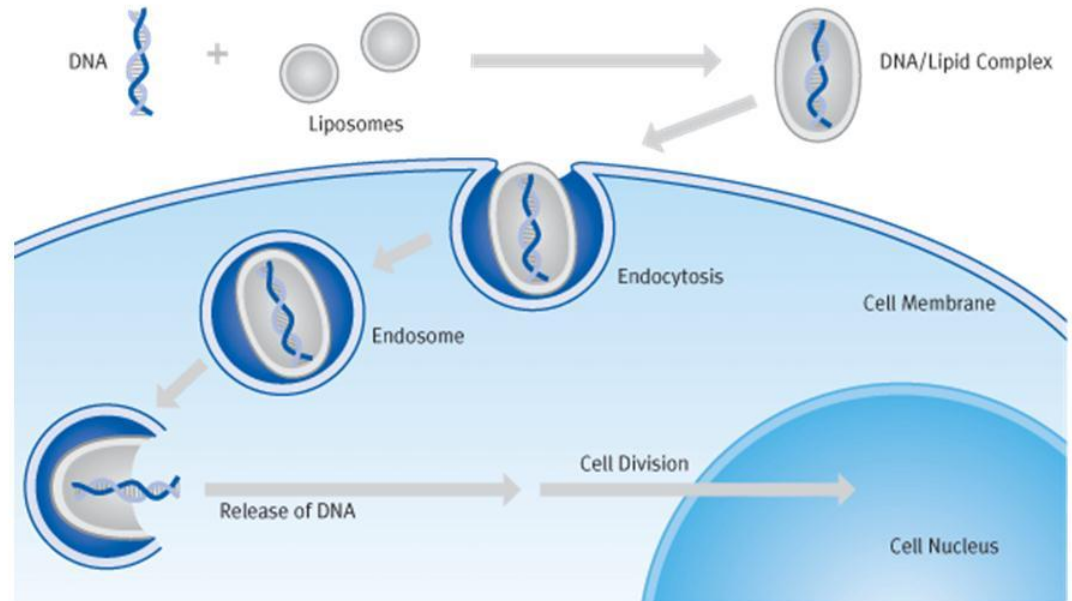
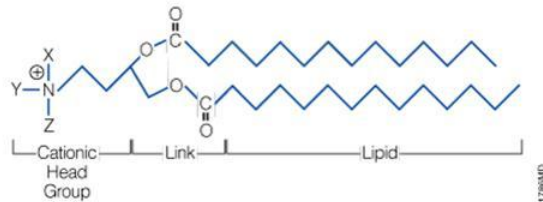


ТРАНСФЕКЦИЯ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ С ЛИПИДАМИ

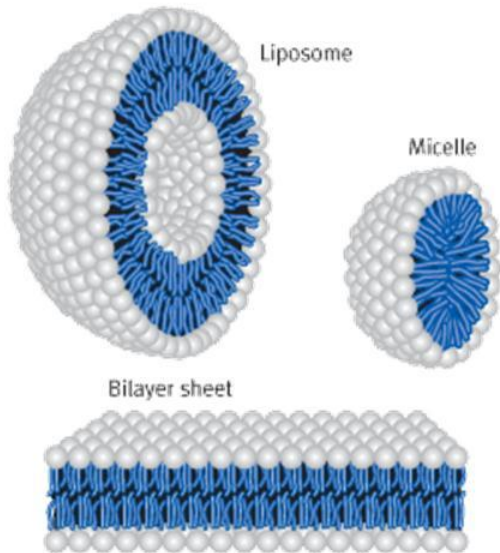
□ Липофекция – упаковка ДНК в липосомы

Способ низкотоксичен по отношению к клеткам

Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина, наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений



<https://www.biontexas.com/en/transfection/>



МЕТОДЫ ОТБОРА ГИБРИДНЫХ КЛОНОВ



Гены устойчивости (к антибиотикам, гербицидам)

Основной принцип – способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток

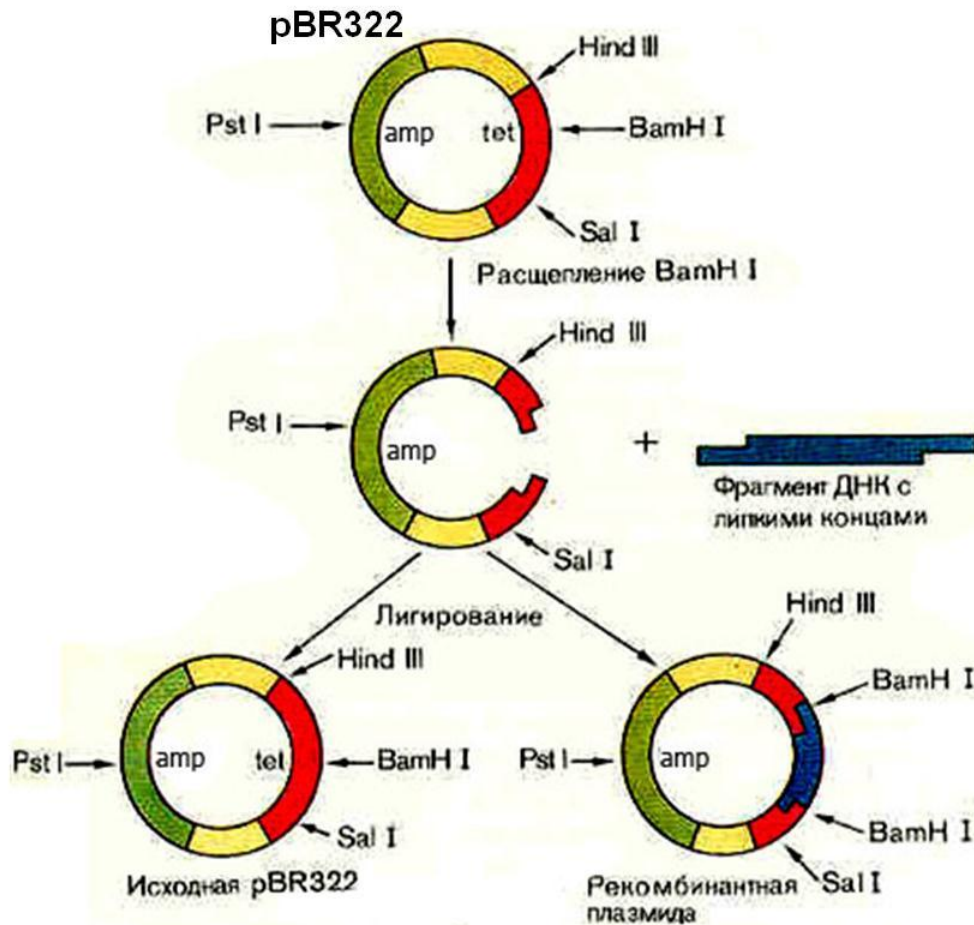
Гены ферментов

Основной принцип – способность проявлять ферментативную активность, которая может быть зарегистрирована (окрашивание субстрата)

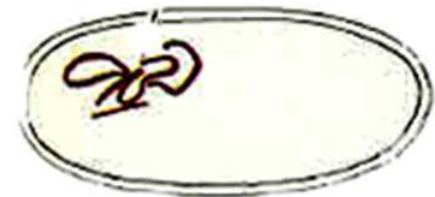
Кодируют нейтральные для клеток белки, наличие которых в может быть легко тестируемо (окрашивание, флуоресценция)

Отбор по чувствительности / устойчивости к антибиотикам

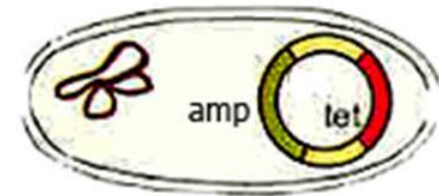
Плазмида pBR322 содержит гены устойчивости к ампициллину (amp) и тетрациклину (tet)



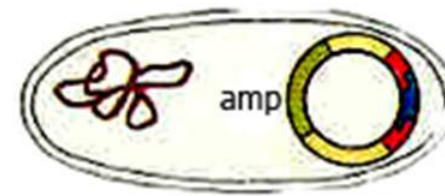
Варианты клеток после трансфекции:



1 - Нетрансформированные

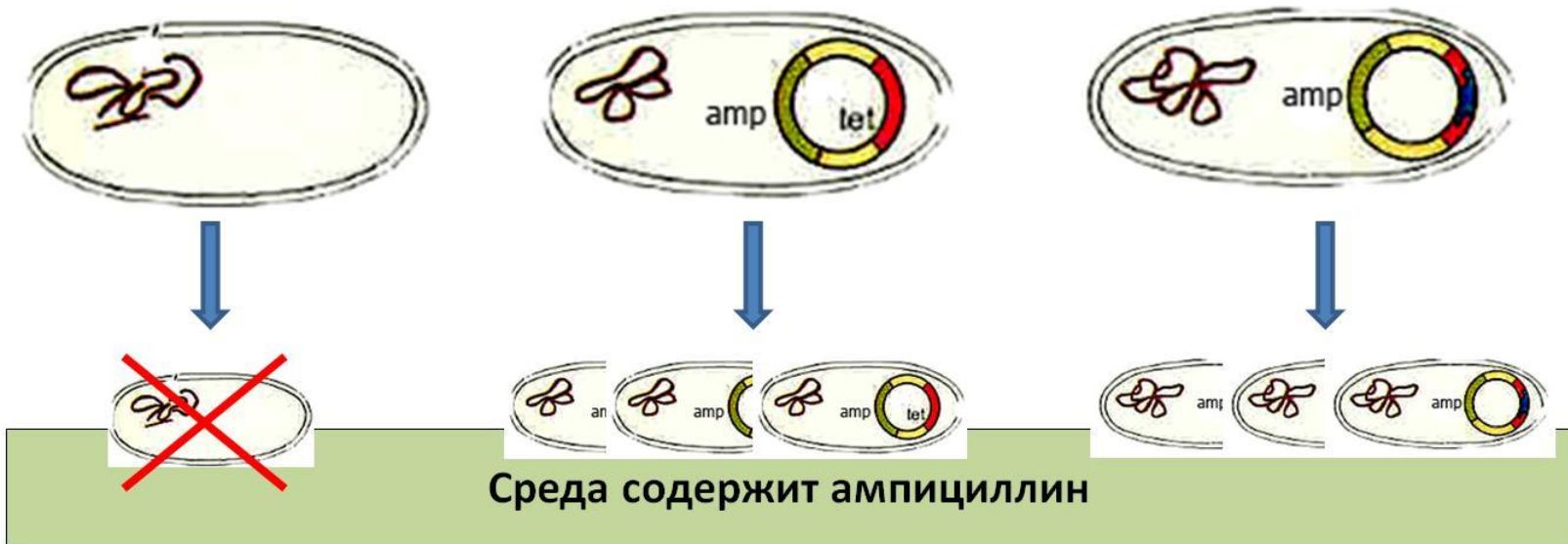


2 - Содержат исходную плазмиду (активны гены amp и tet)



3 - Содержат плазмиду с вставкой по гену tet (активен только ген amp)

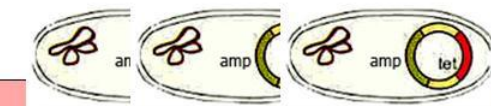
Отбор по чувствительности / устойчивости к антибиотикам



Клетки без плазмиды чувствительны к ампициллину

Клетки с плазмидой устойчивы к ампициллину

Пересев с точным расположением колоний на среде

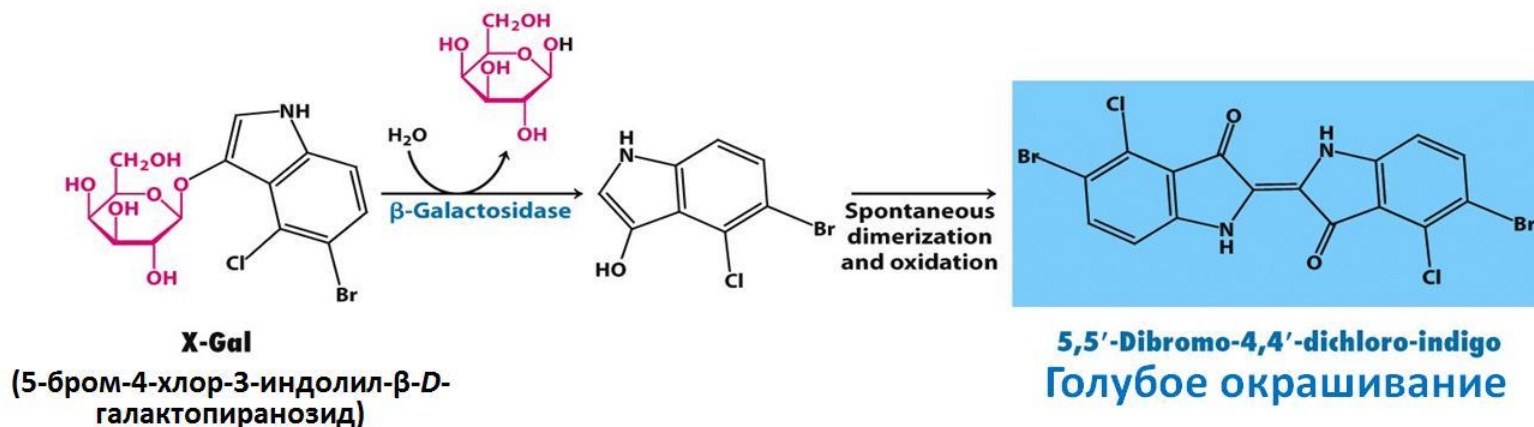


Среда содержит тетрациклин

Клетки устойчивы к тетрациклину

Клетки чувствительны к тетрациклину

Бело-голубая селекция



Хромосома E.coli

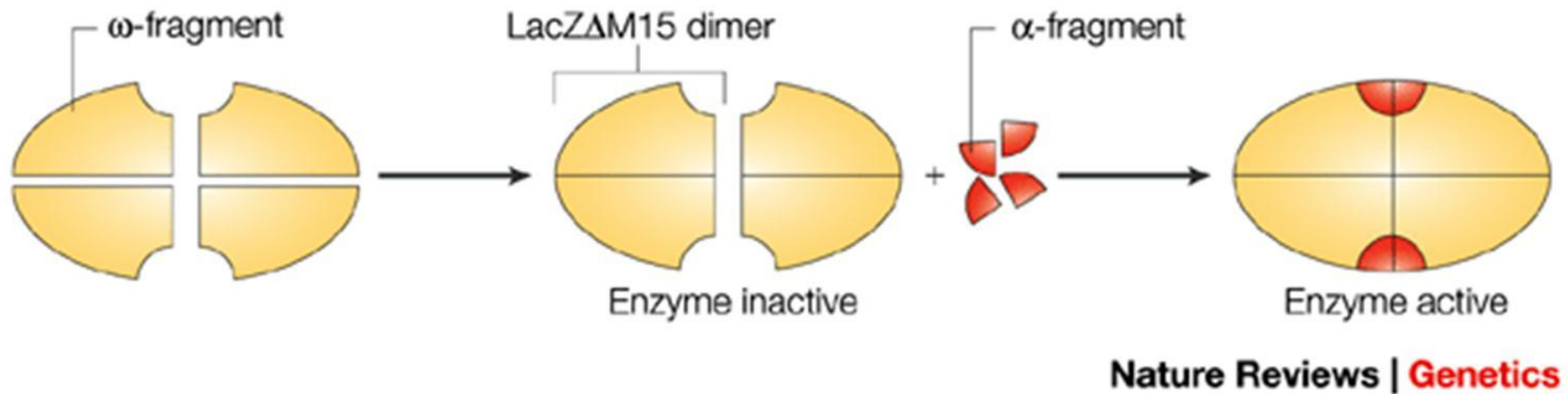
Мутантный ген *lacZ* с делецией по 11-41 а.о.

Неактивная β -галактозидаза
(не способна расщеплять субстрат)

Активная β -галактозидаза
может расщеплять субстрат

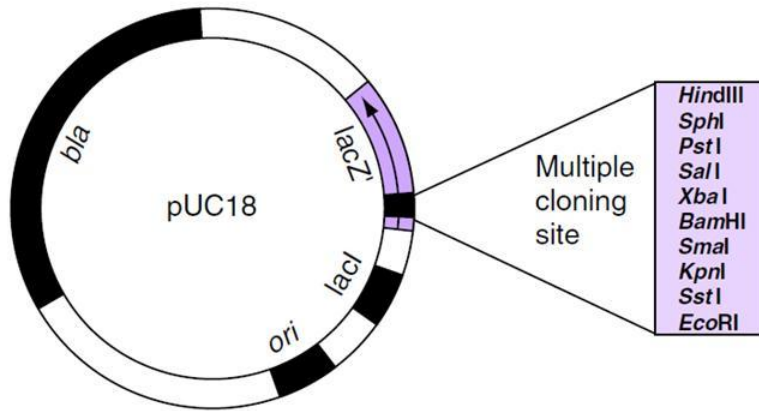
Ген *lacZ'* кодирует **α -пептид**
(59 а.о. N-концевой части β -галактозидазы)

Альфа комплементация



Альфа-комплементация (alpha-complementation or α -complementation) — способность короткого (1–92 аминокислотные остатки) N-концевого фрагмента β -галактозидазы взаимодействовать с ее С-концевым фрагментом, образуя функциональный фермент

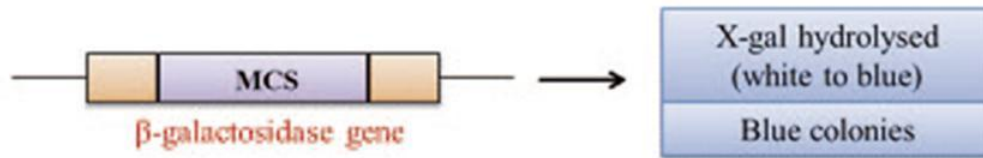
Бело-голубая селекция



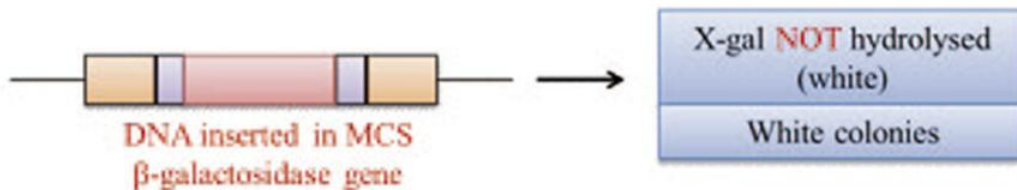
bla – ген β-лактамазы (устойчивость к ампициллину)

lacZ – N-концевая часть гена β-галактозидазы

В питательную среду добавляют ампициллин, X-gal и IPTG (активирует экспрессию гена β-лактамазы):



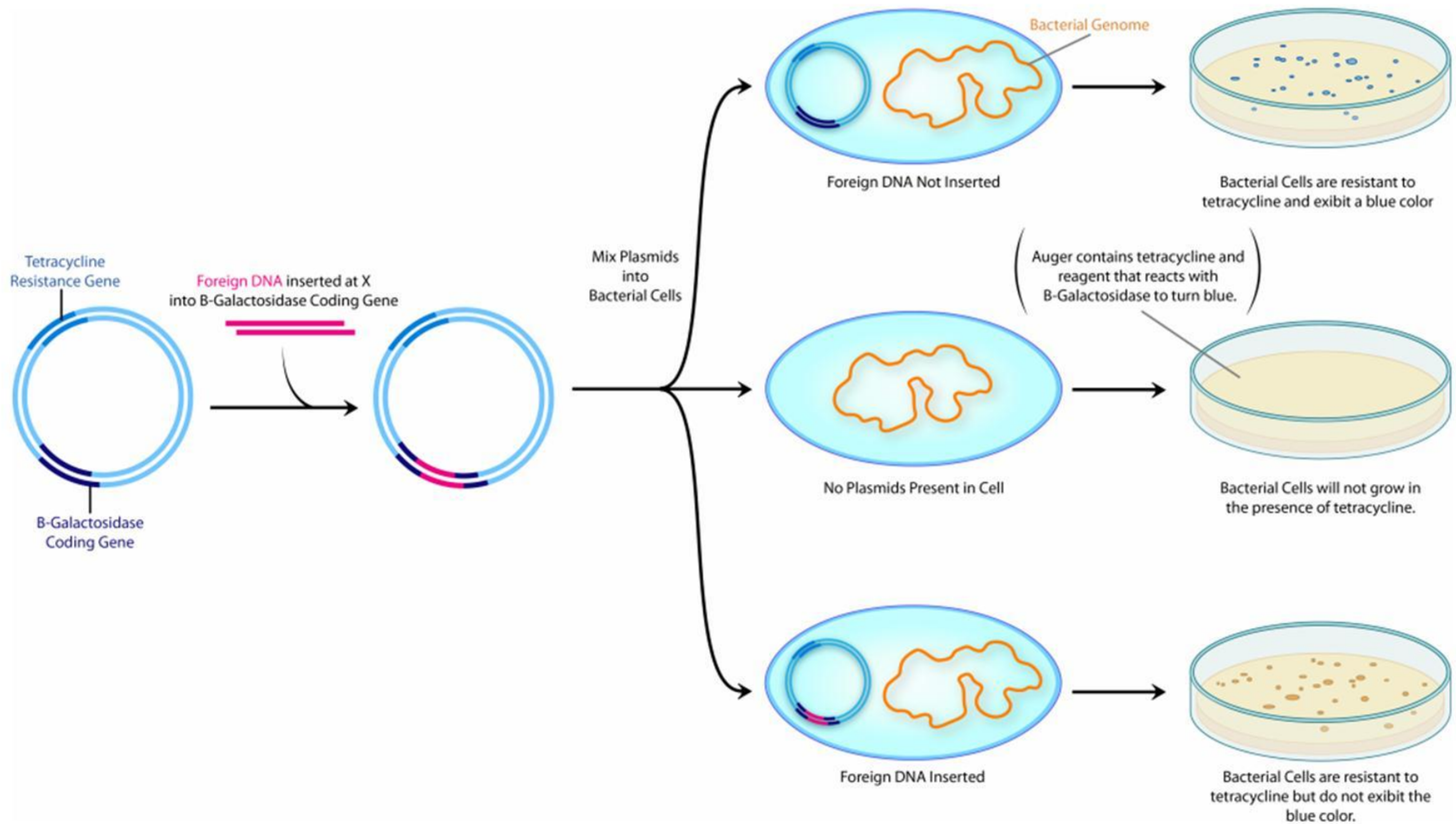
a non-recombinant vector i.e. no insert



b recombinant vector i.e. insert within MCS



Бело-голубая селекция

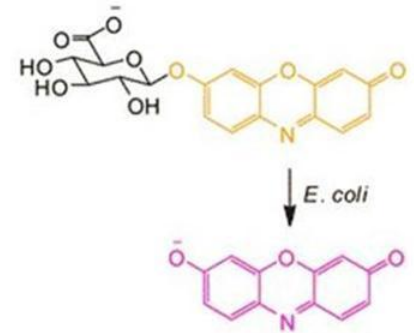


Репортерные гены

Могут быть сшиты с регуляторной областью целевых генов

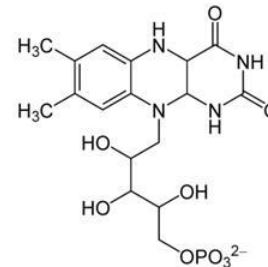
GUS - ген β -глюкуронидазы

Фермент **катализирует гидролиз глюкуронидов**, протекающий с образованием глюкуроновой кислоты и молекулы красителя



LUC – ген люциферазы

Фермент **катализирует окисление люциферина**, сопровождающееся свечением трансформированных клеток (явление хемилюминесценции)



GFP (green fluorescent protein - зеленый флуоресцентный белок)

Входит в качестве метки в состав химерных белков, сохраняя способность к флуоресценции.

Применяется для изучения экспрессии клеточных белков

