

Основы генной инженерии

Лекция 2

Ферменты (*продолжение*)

Векторы

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 С метилирован;

N-метилирование остатков А – *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* - GGTAС↓C)

❖ *Изокаудомеры*

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

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

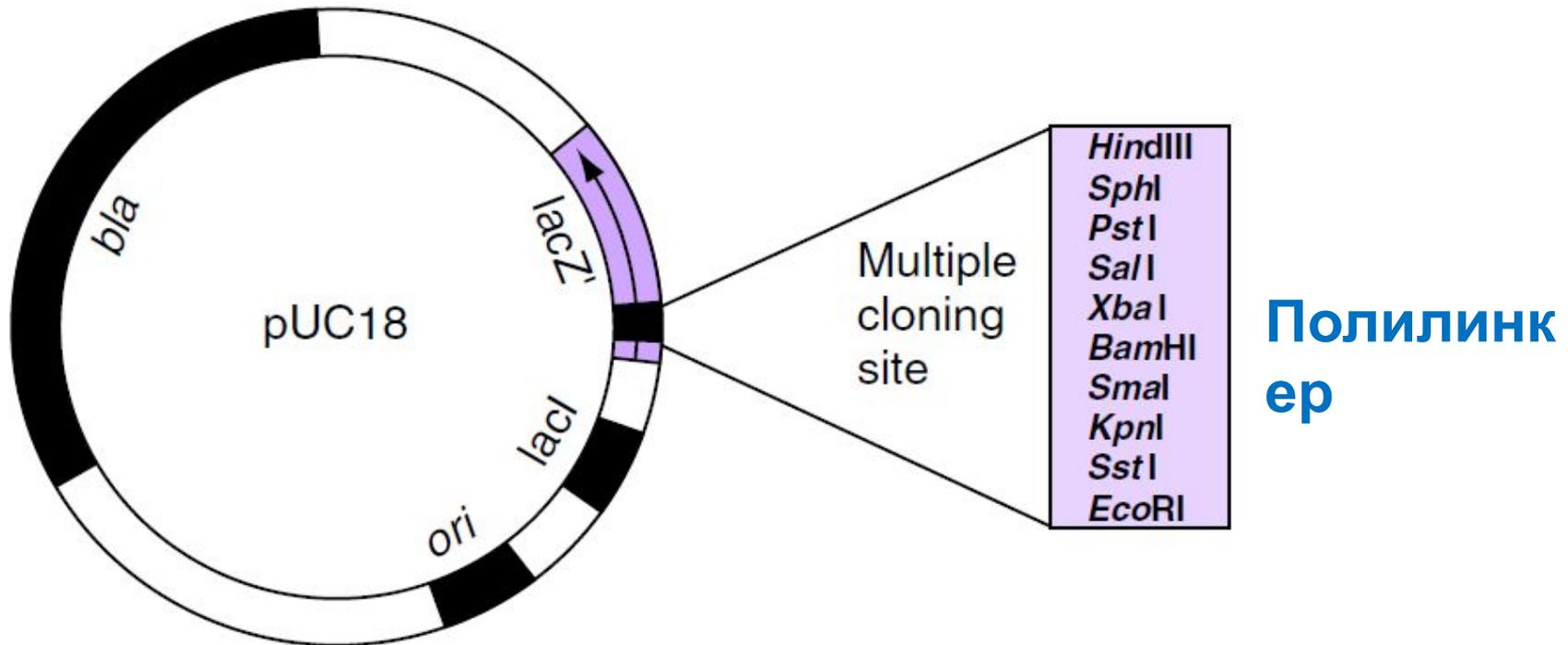
A microscopic image showing numerous circular and linear DNA molecules, likely plasmids, stained with a fluorescent dye. The molecules appear as bright yellow-orange lines against a dark blue background. Some molecules are clearly circular, while others are more irregular or fragmented. The overall appearance is that of a complex mixture of genetic material.

Плазмидные векторы

Биологические свойства бактериальных плазмид, используемые в векторах

- ◆ Молекулярные эндосимбионты – автономная репликация
- ◆ Негативный контроль числа копий
 - ◆ Низкокопийные (1-2 копии на клетку)
 - ◆ Высококопийные (10-100 копий на клетку)
- ◆ Консервативность размера
 - ◆ Минимальный размер определяется элементами внутриклеточной автономии
 - ◆ Ограничения на размер вставки чужеродной ДНК
- ◆ Совместимость разных плазмид в клетке
 - ◆ Группы несовместимости
 - ◆ Случайная сегрегация в дочерние клетки

Плазмидный вектор pUC18



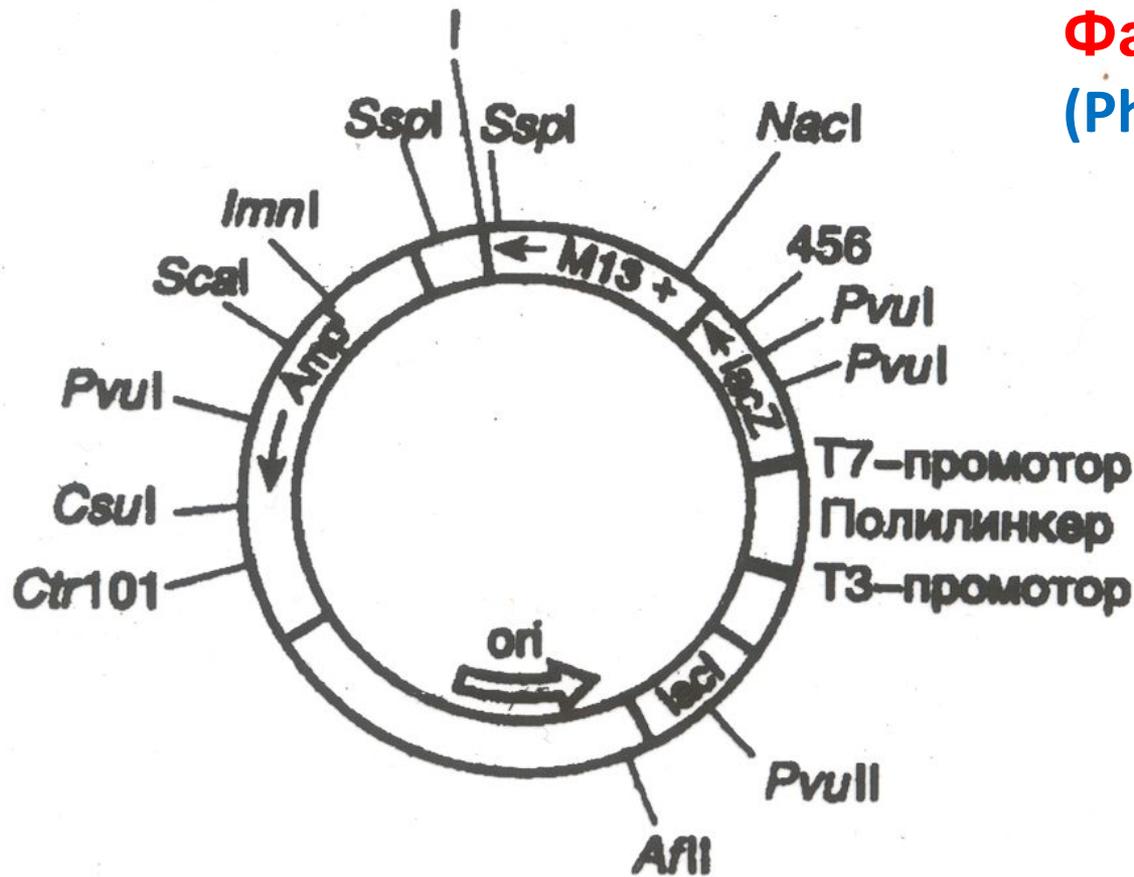
bla – Ген β-лактамазы, **селектируемый маркер** (устойчивость ампициллину)

ori – Точка начала репликации (origin)

lacZ' – N-концевая часть гена β-галактозидазы (кодирует 146 из 1021 АК-остатков), **селектируемый маркер** (хромогенный субстрат X-Gal)

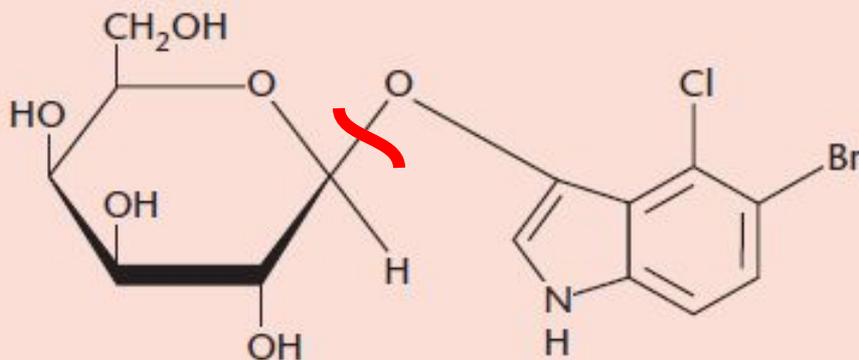
lacI – Ген Lac-репрессора (Индуктор – IPTG)

Плазмидный вектор Bluescript

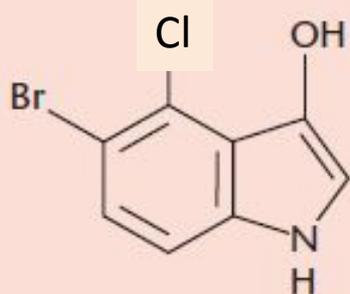
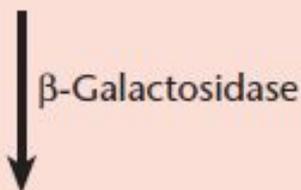


Фагмида
(Phagemid)

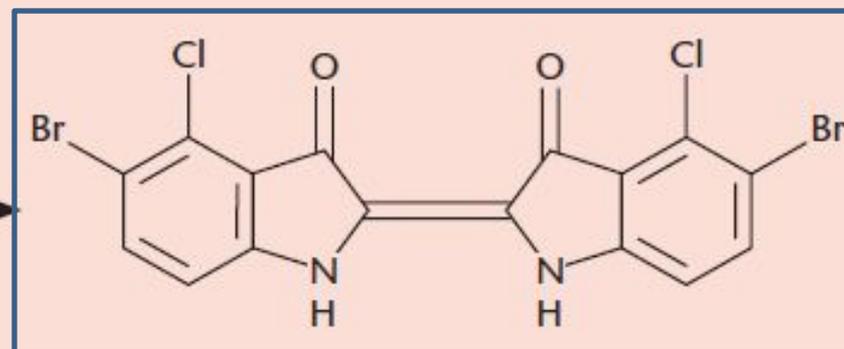
Расщепление Xgal β-галактозидазой



5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (Xgal)

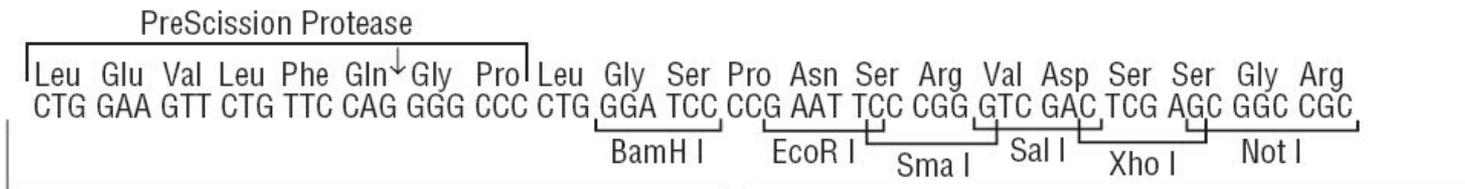


5-Bromo-4-chloroindoxyl

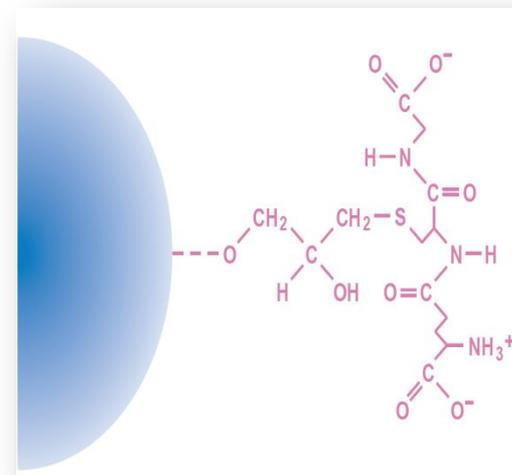
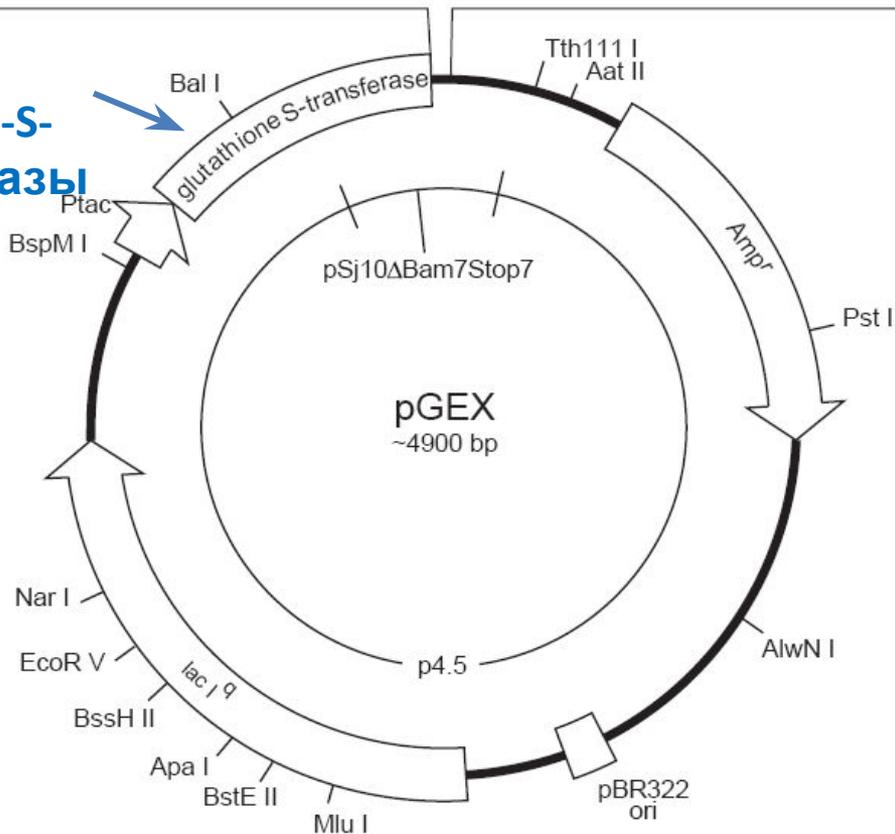


5,5'-Dibromo-4,4'-dichloroindigo

Вектор для слияния генов pGEX-P-3

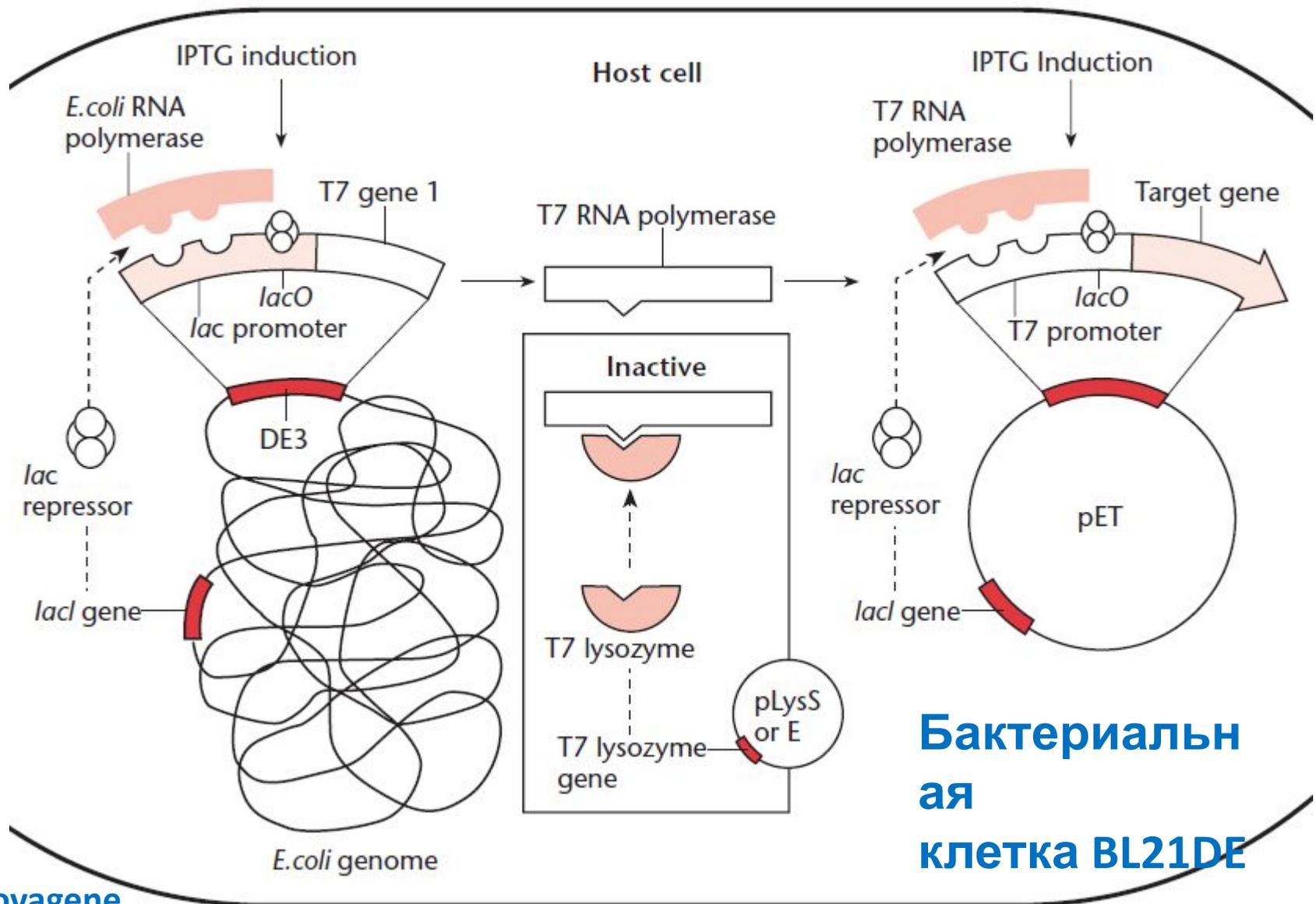


**Ген
глутатион-S-
трансферазы**



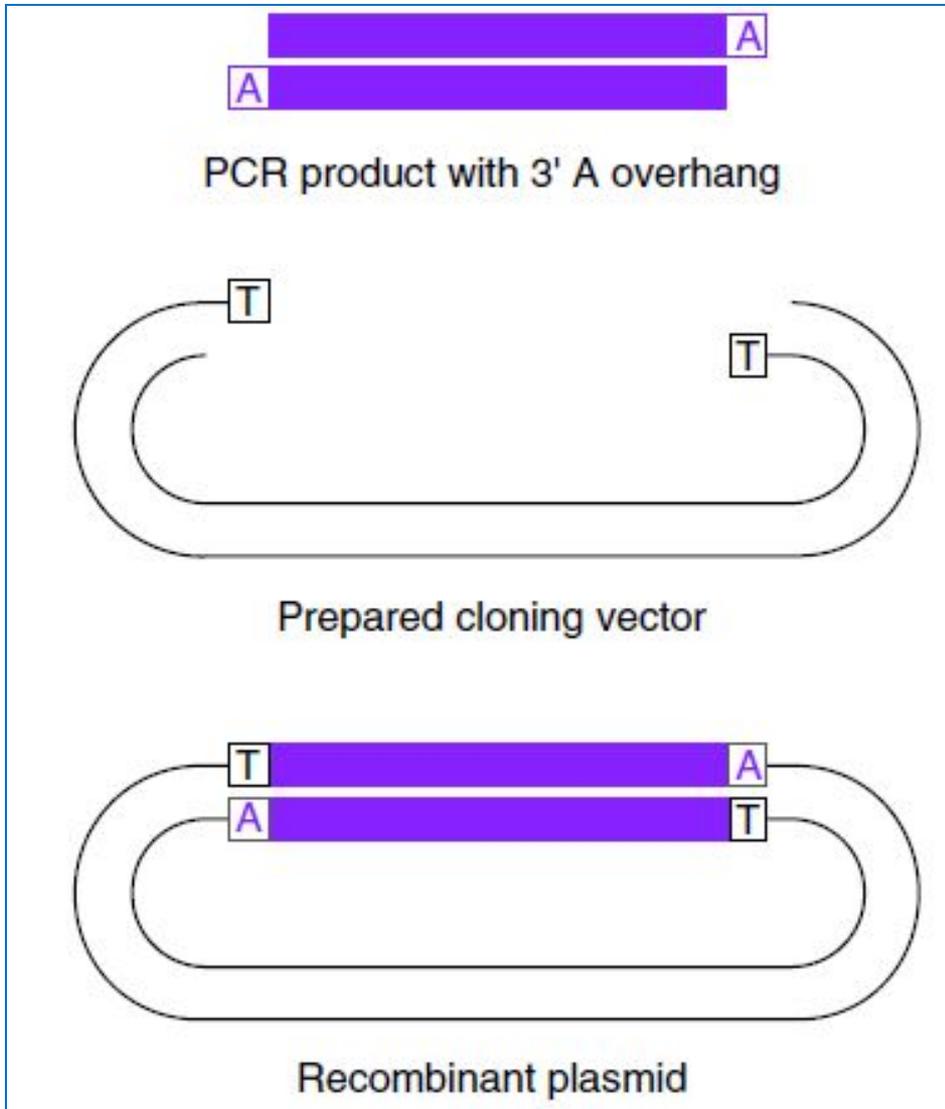
**Иммобилизованный
глутатион**

Регуляция экспрессии генов в БАКТОНЕ nFT



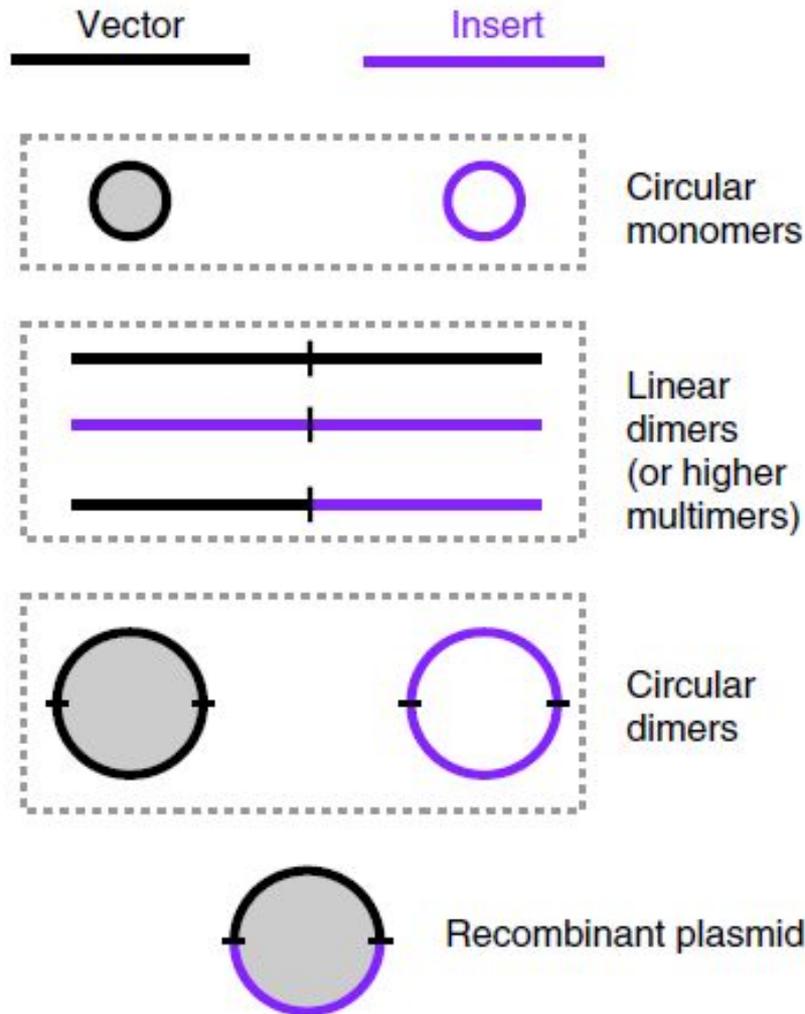
**Бактериальная
клетка BL21DE**

TA-Клонирование продуктов ПЦР



Таq-ДНК-полимераза образует в продукте ПЦР 3'-выступающие А-концы

Побочные продукты лигирования вектора и вставки



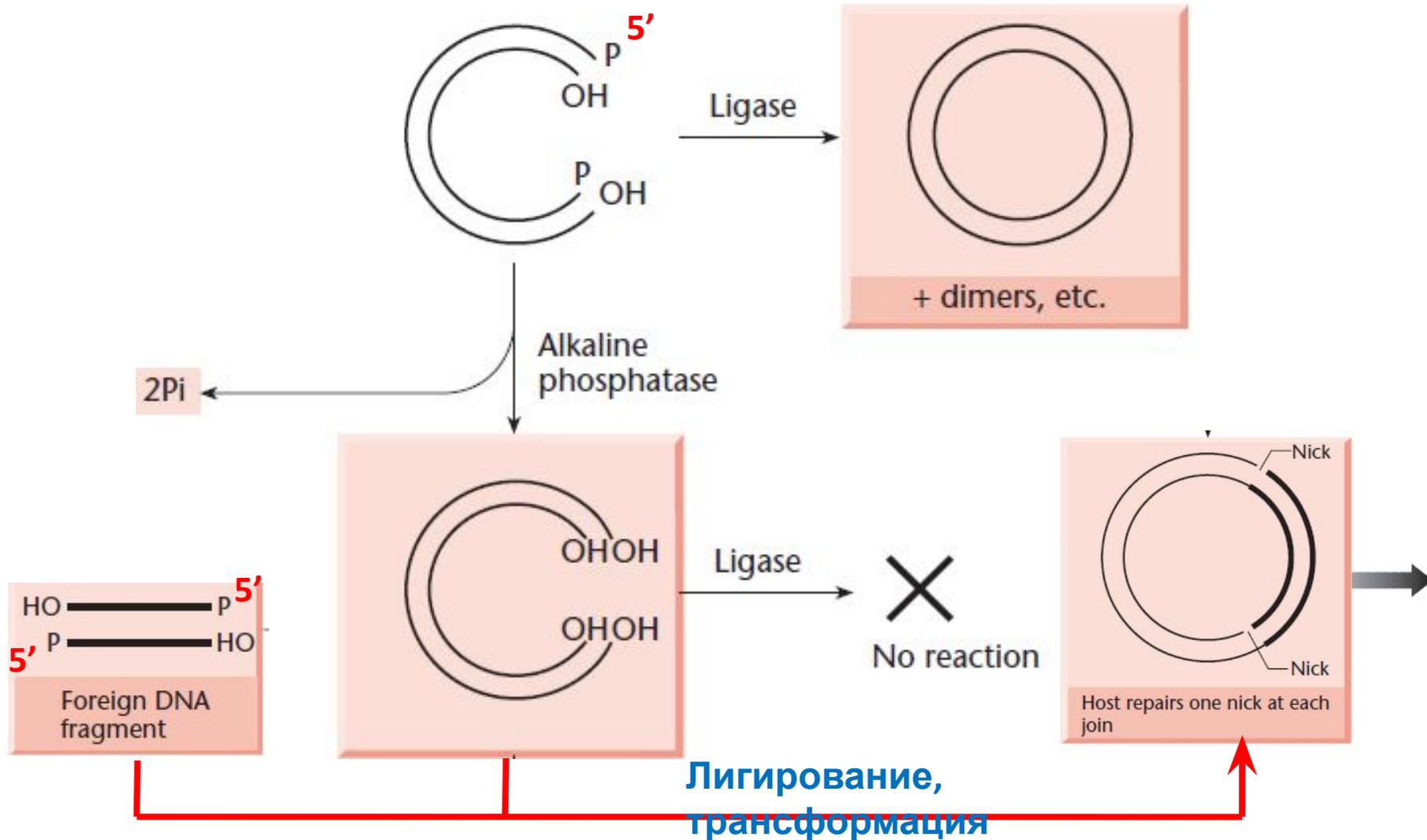
Кольцевые мономеры

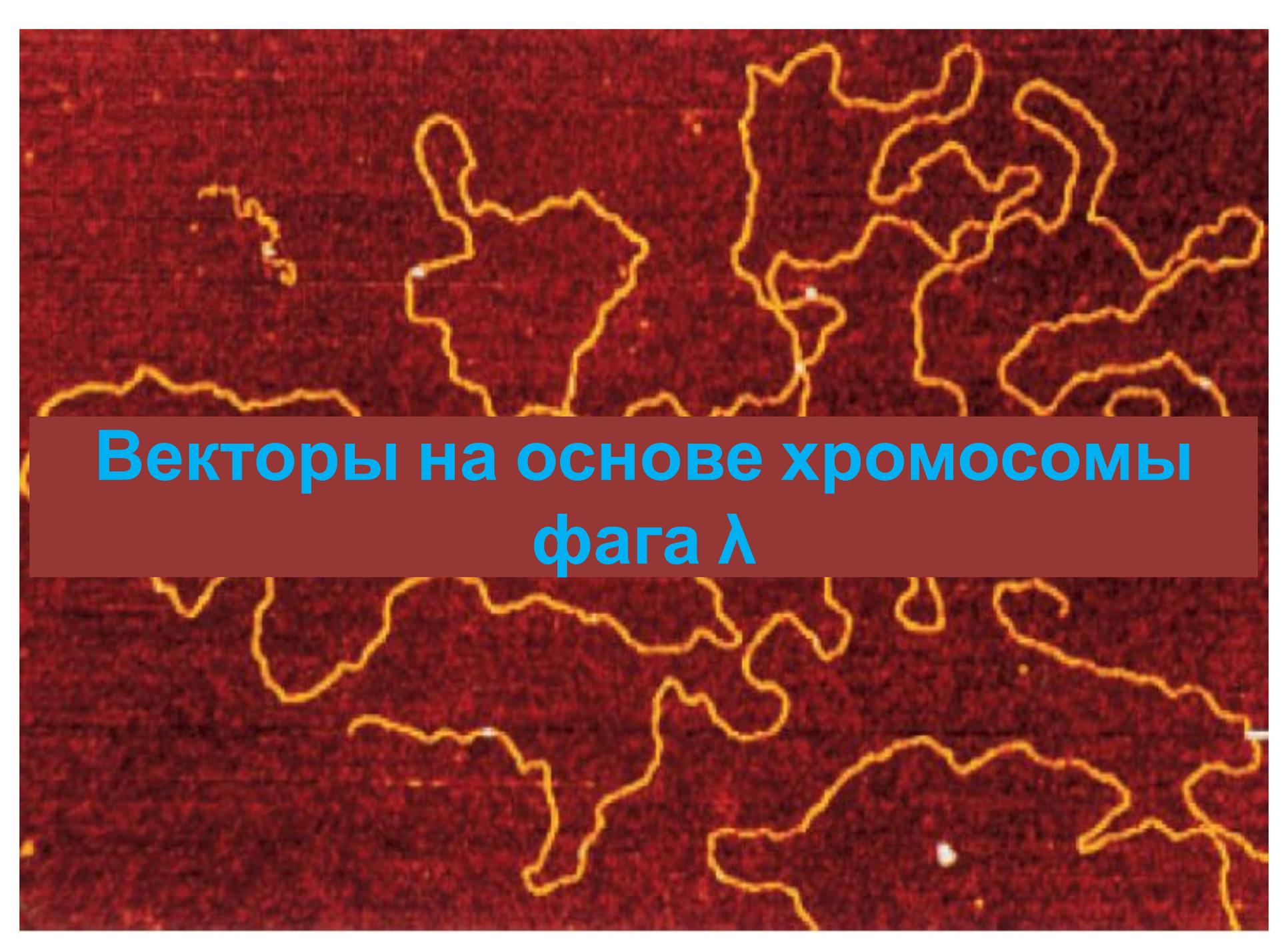
Линейные ди-, три-, ... мультимеры

Кольцевые димеры

Рекомбинантная плазмида

Предотвращение образования плазмидного вектора без вставки с помощью щелочной фосфатазы



The image is an electron micrograph showing several long, thin, and highly convoluted DNA molecules. These molecules are stained and appear as bright yellow-orange lines against a dark, grainy reddish-brown background. The molecules vary in length and complexity, with some showing multiple loops and branches. A semi-transparent dark red horizontal bar is overlaid across the center of the image, containing white text.

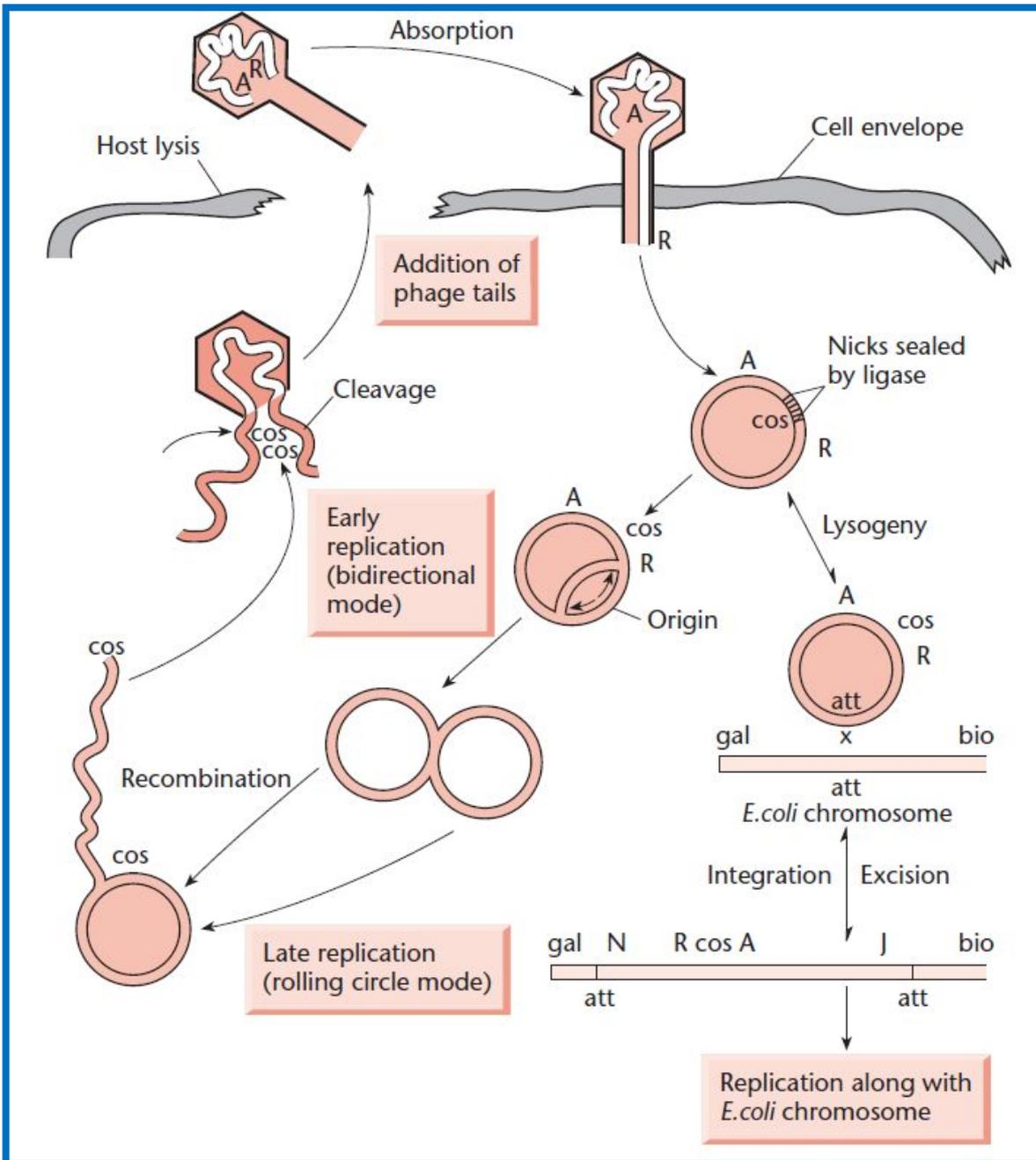
**Векторы на основе хромосомы
фага λ**

Жизненный цикл фага λ

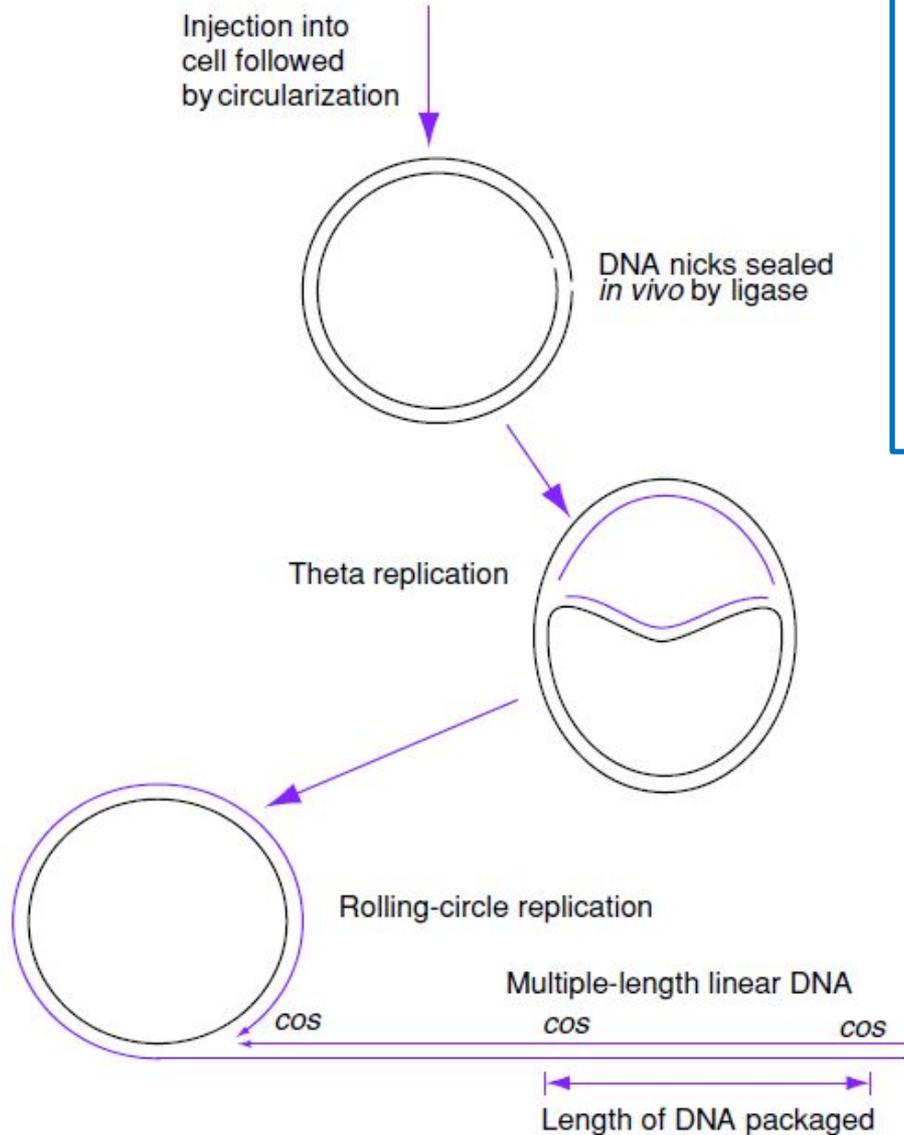
Два пути развития бактериофага:

1. Лизогенный:
интеграция в хромосому хозяина

2. Литический:
а) Двухсторонняя θ-репликация;
б) Катящееся кольцо

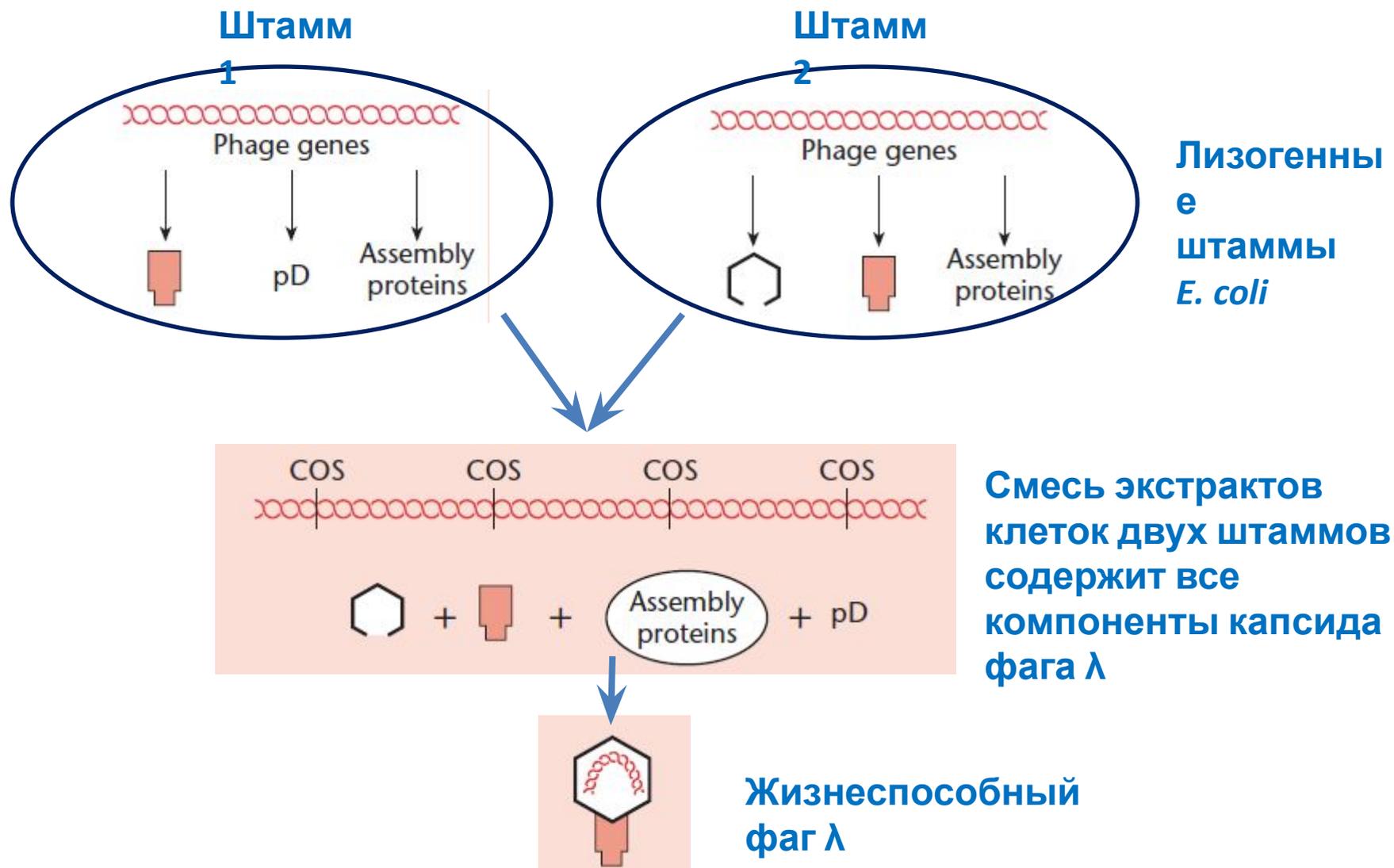


Linear DNA, with sticky ends, in phage particle

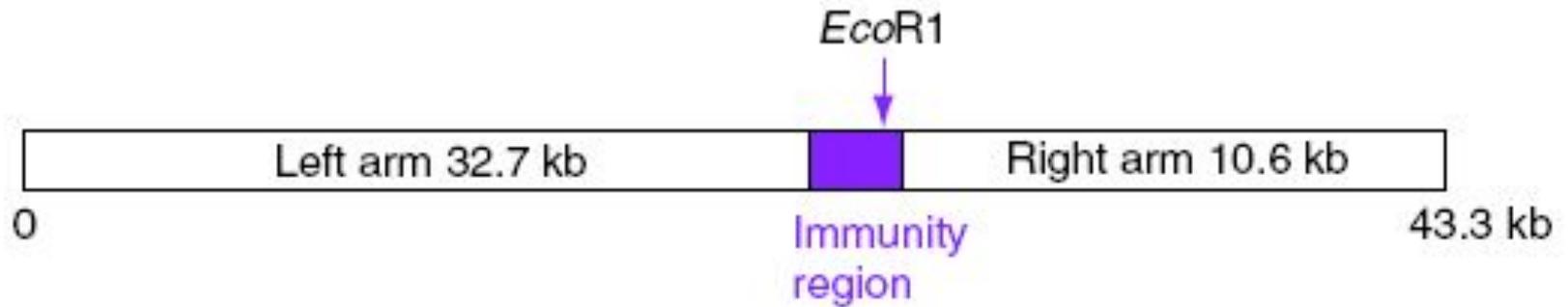


Репликация ДНК фага λ

Упаковка ДНК фага λ *in vitro*

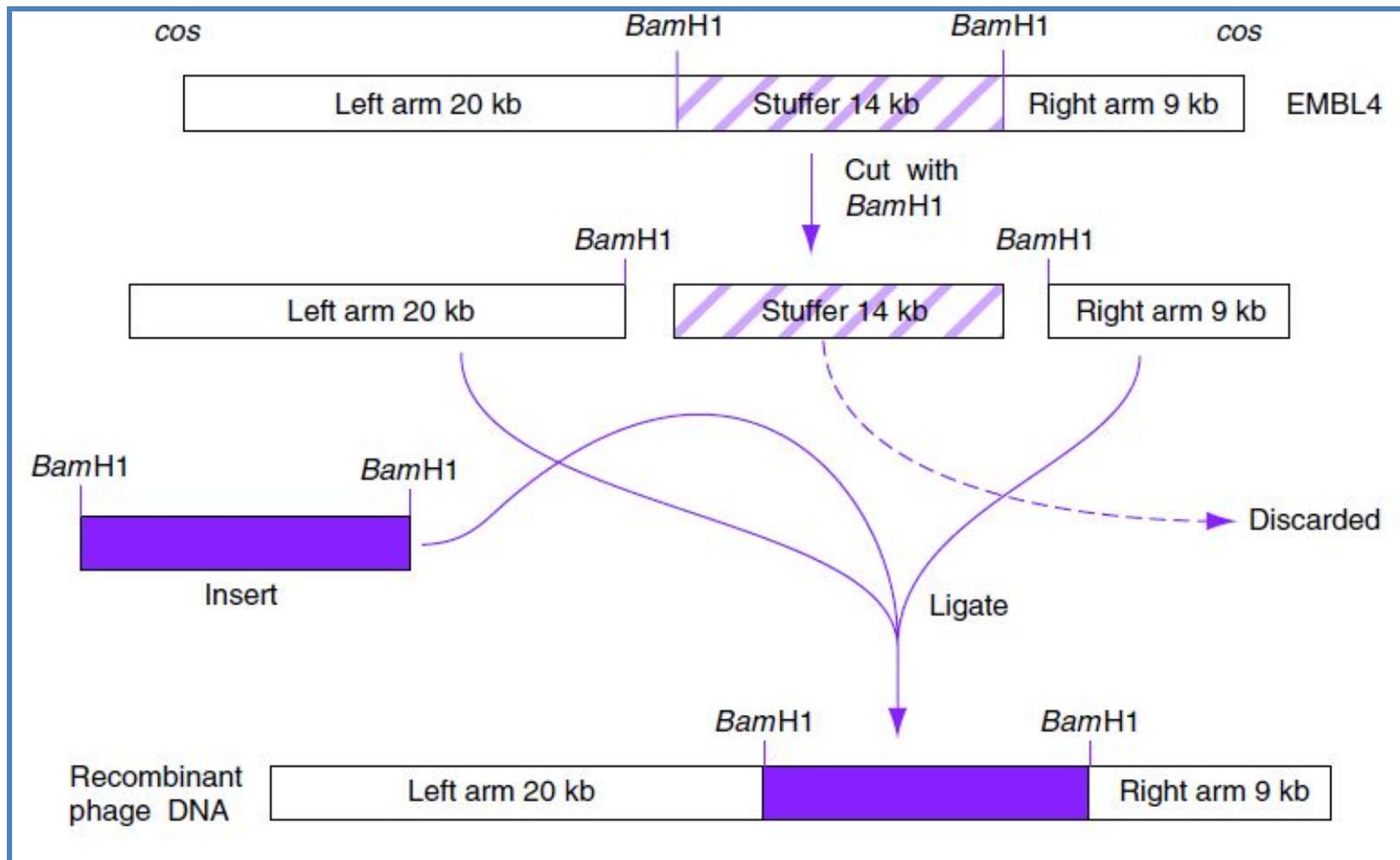


Инсерционный вектор лямбда gt10

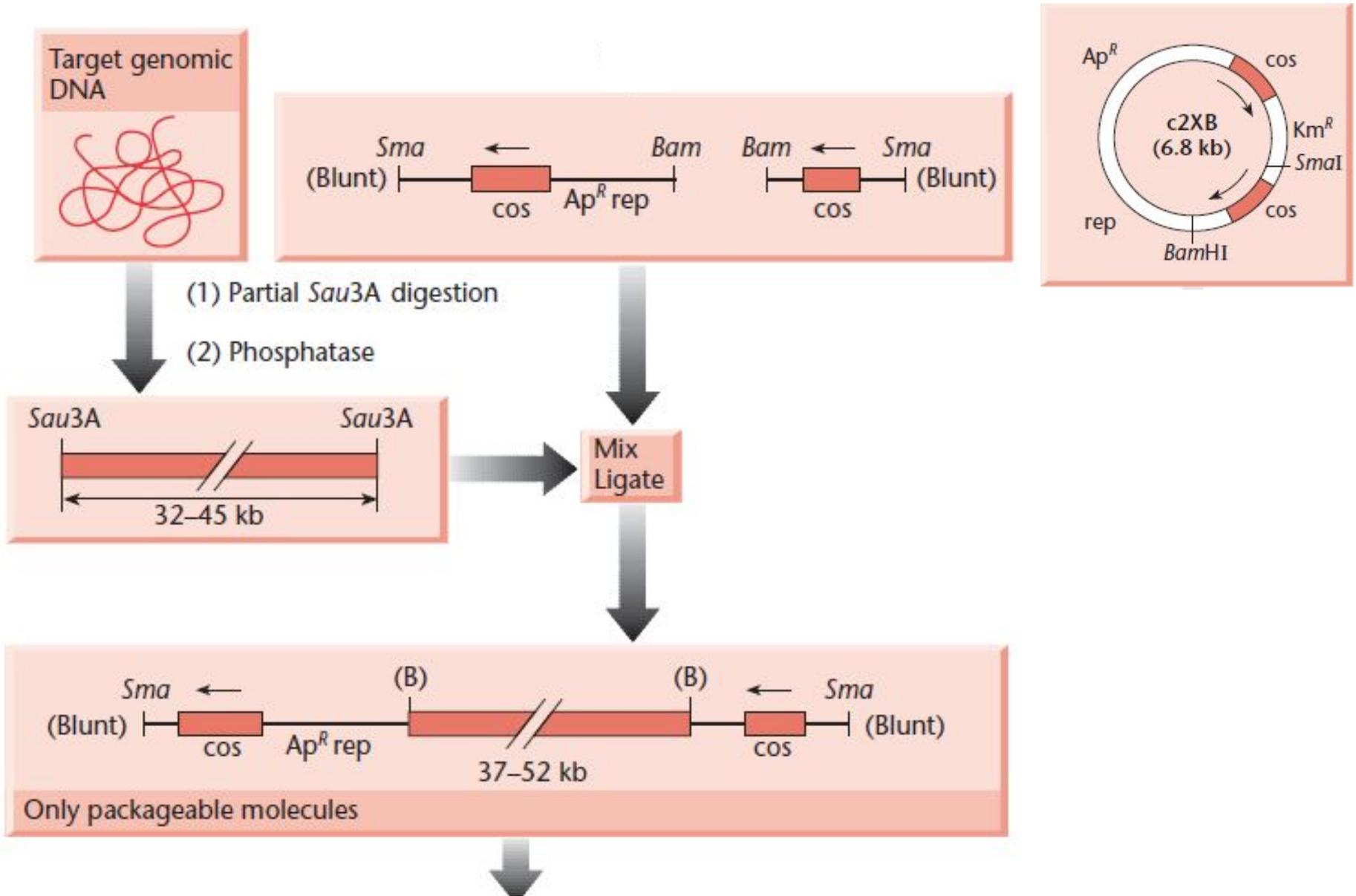


Вставка чужеродной ДНК до **7.6 т.п.о.** по *EcoRI*-сайту

Использование вектора лямбда EMBL4 с замещением внутренней области



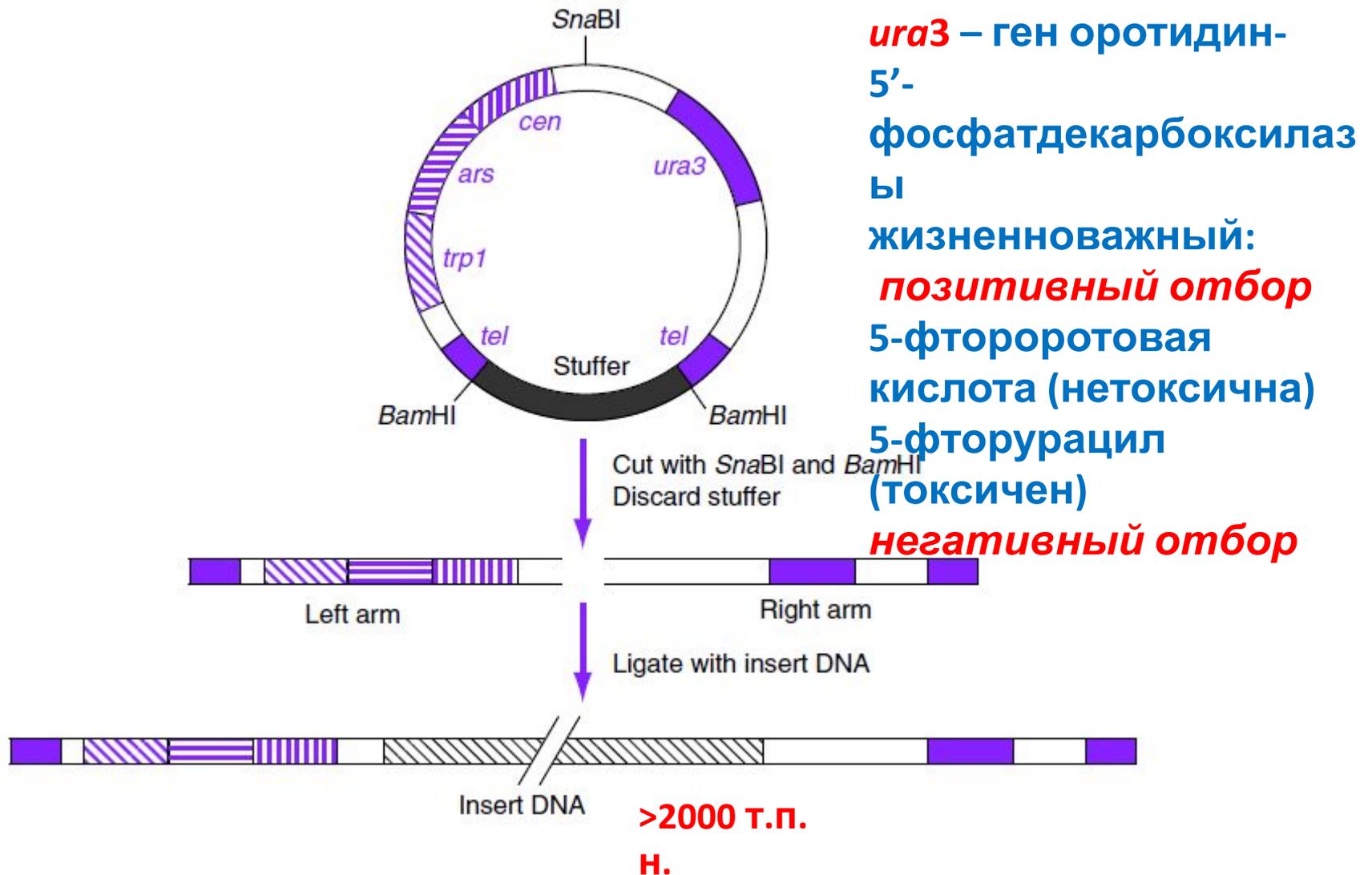
Космидный вектор (космида) c2XB



Искусственные хромосомы



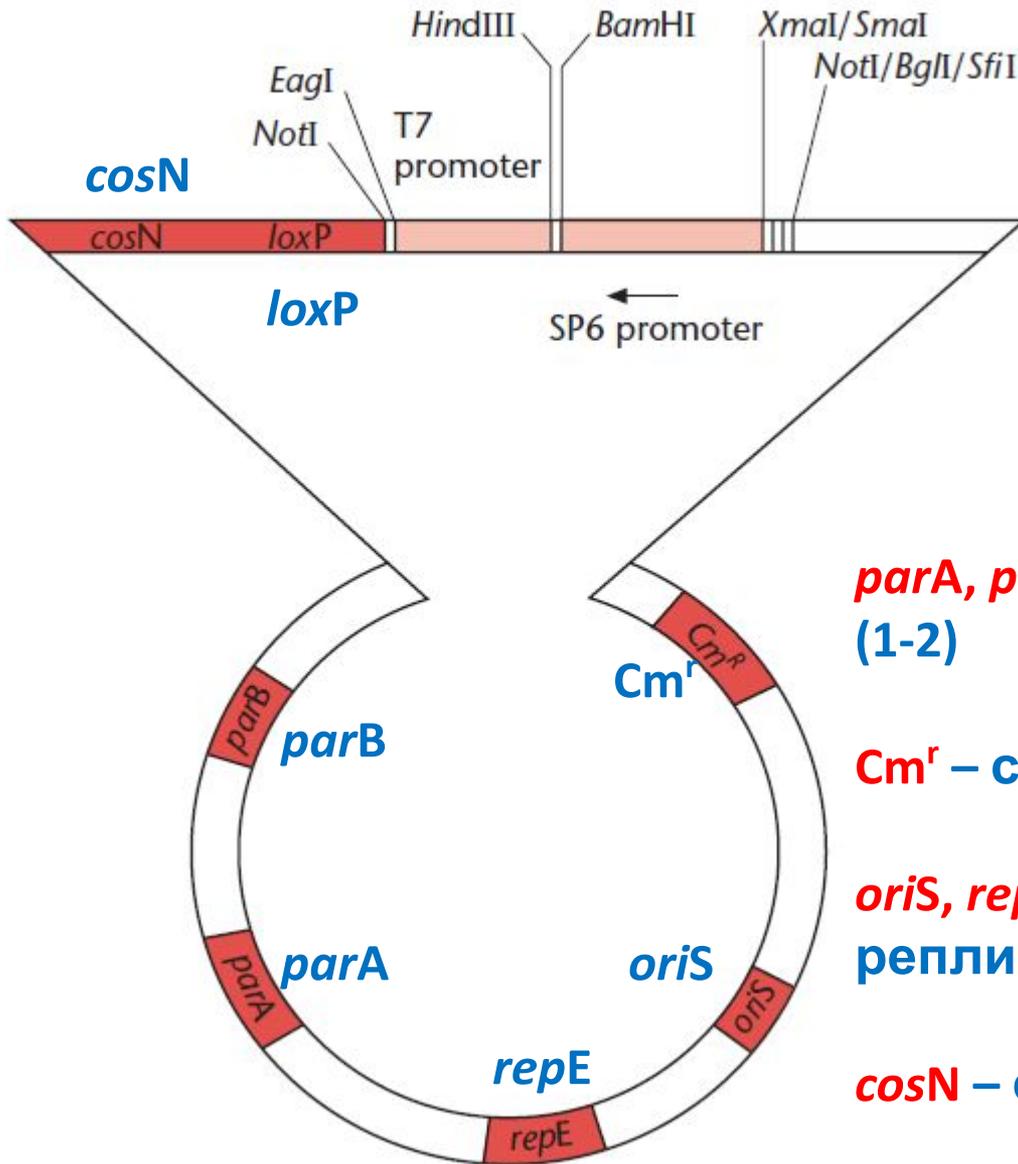
Искусственная хромосома дрожжей YAC (Yeast Artificial Chromosome)



Бактериальная искусственная хромосома (ВАС)

Емкость – 300 т.п.н.

Стабилен на протяжении 100 поколений



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

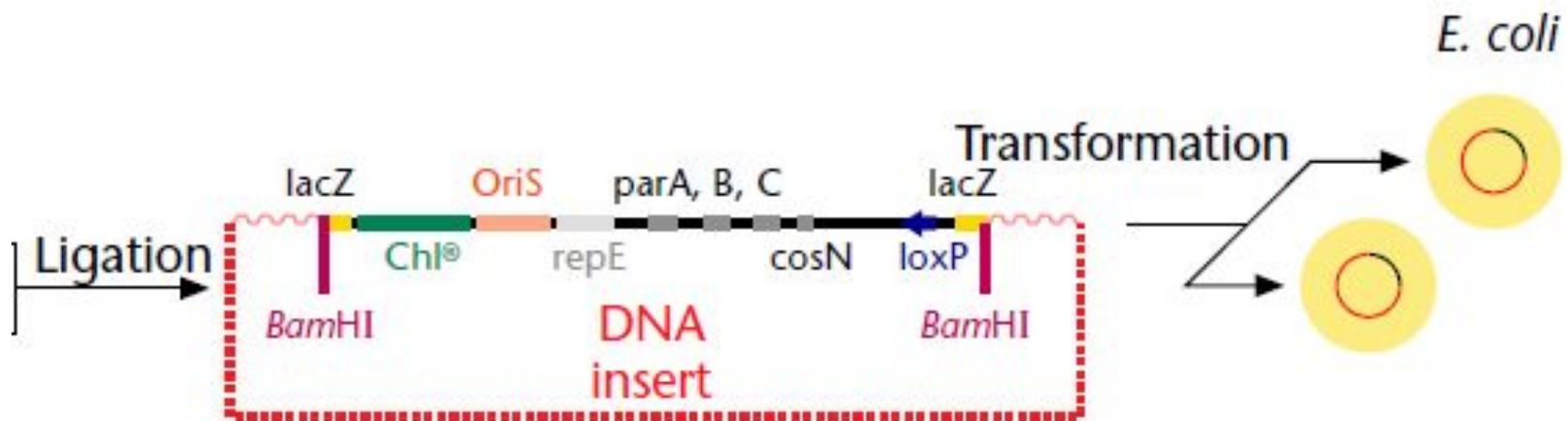
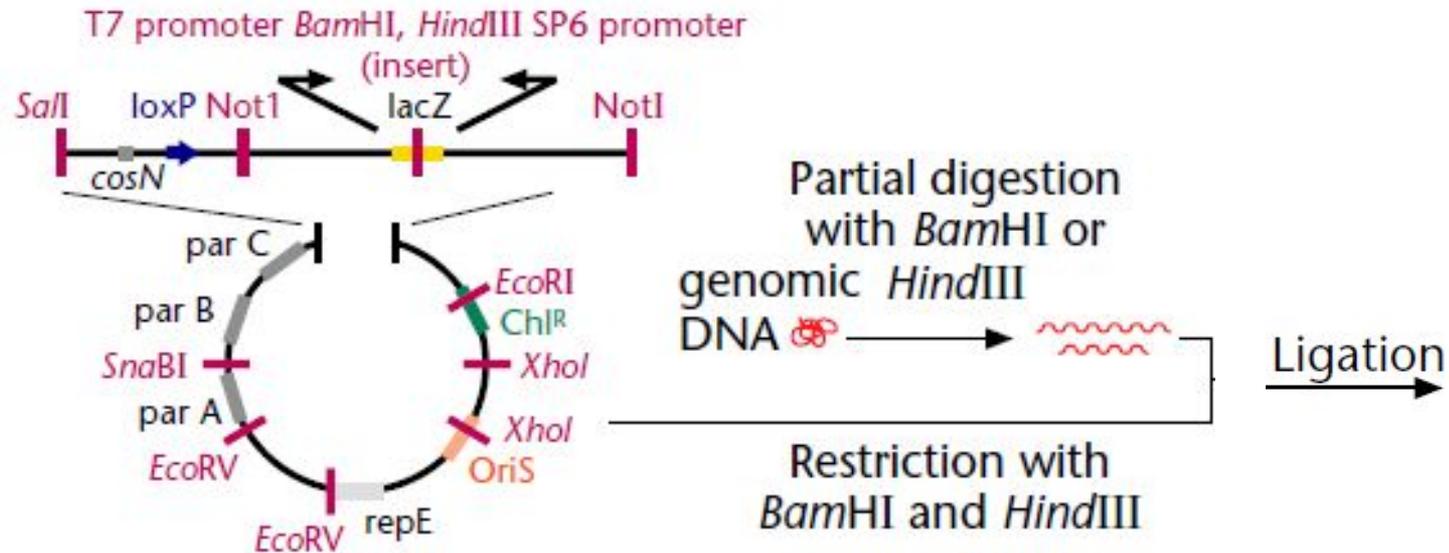
Cm^r – селектируемый маркер

oriS, *repE* – односторонняя репликация

cosN – сайт терминазы λ

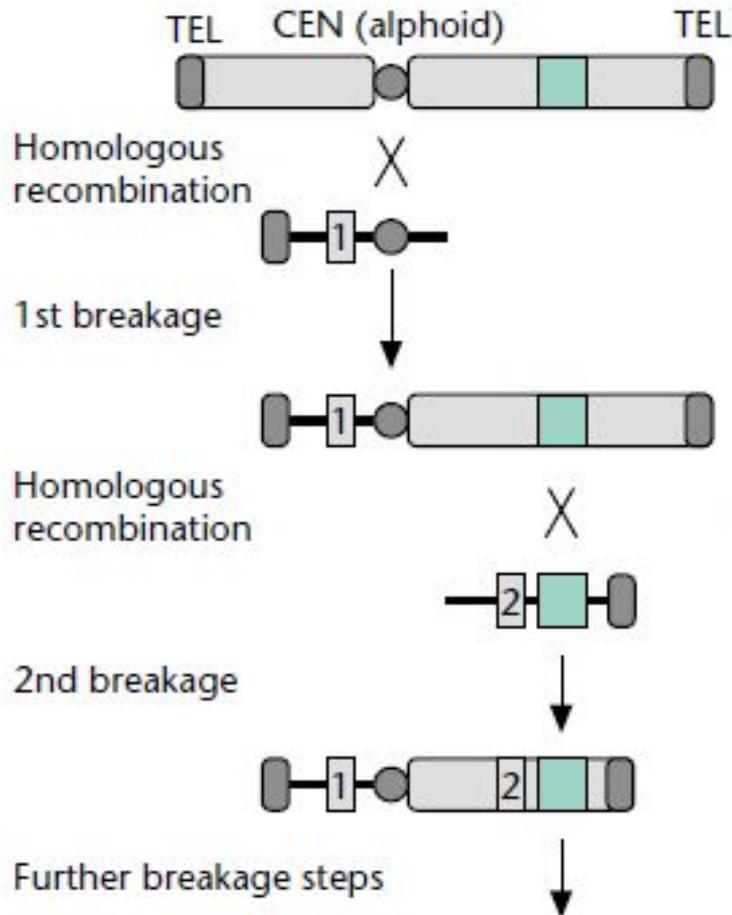
loxP – *cre*-рекомбиназа фага P1

Клонирование ДНК с помощью ВАС

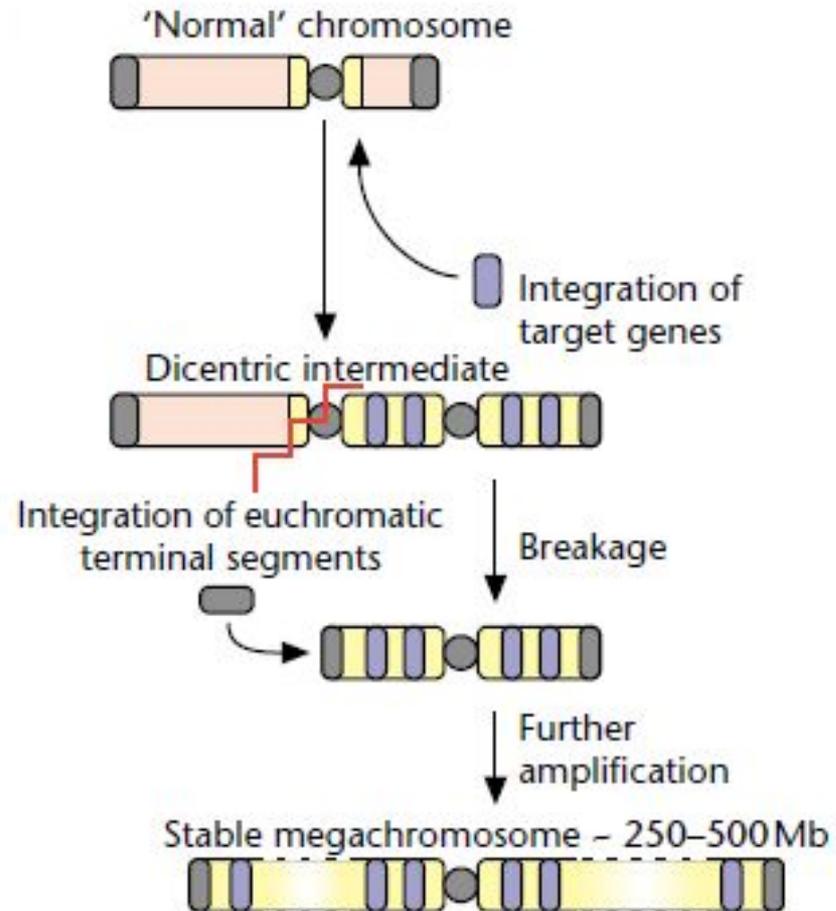


Получение искусственных хромосом животных методом «сверху-вниз»

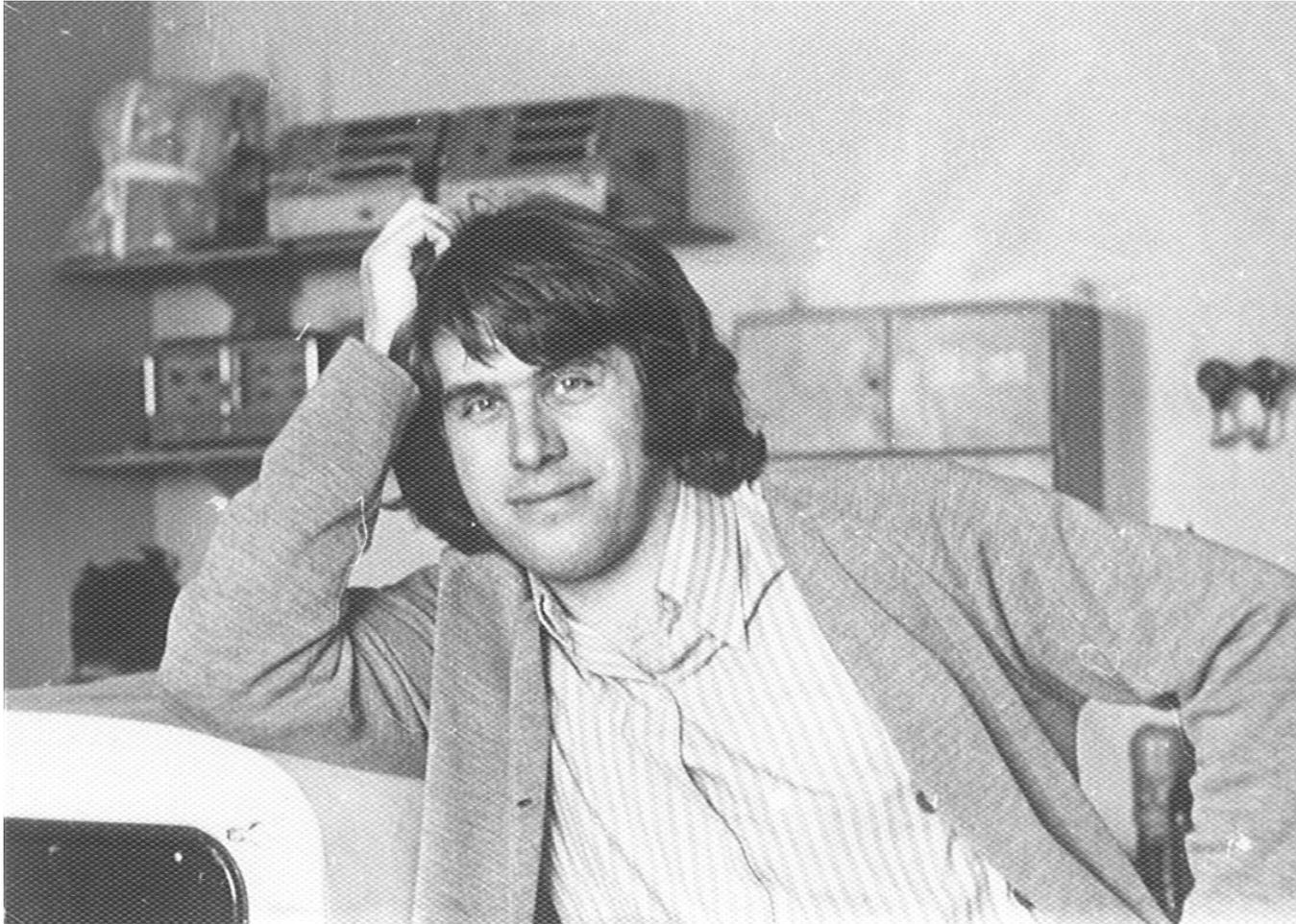
Targeted chromosome
fragmentation (TCF)



Satellite DNA-based Artificial
Chromosome (SATAC)



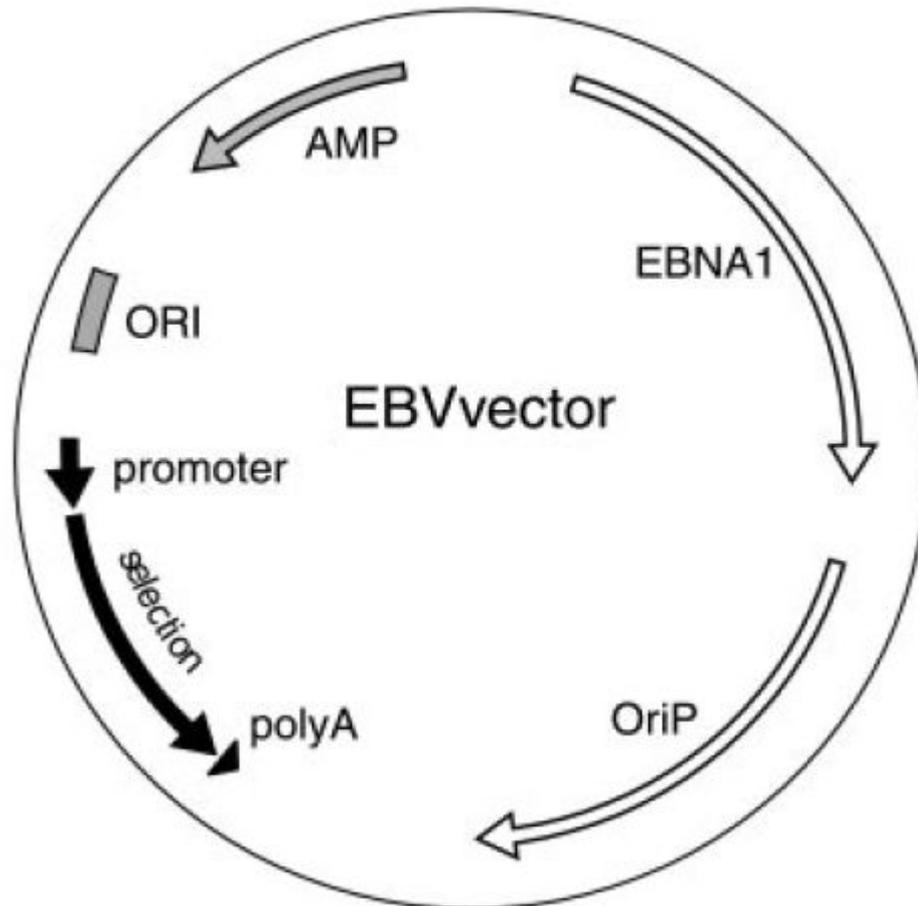
Евгений Витальевич Ананьев, 1970-е



Искусственные
хромосомы
кукурузы

Первооткрыват
ель мобильных
генетических
элементов у
дрозофилы

Внехромосомные (эписомные) векторы для экспрессии рекомбинантных генов в клетках ЖИВОТНЫХ



Челночный эписомный вектор на основе вируса Эпштейна-Барр

EBNA1 – Epstein-Barr nuclear antigen 1

OriP – Область начала репликации в клетках животных

ORI – Область начала репликации в бактериальных клетках

AMP – Ген устойчивости к ампициллину

polyA – сайт

20-300 копий на клетку. Стабильно распределяются между дочерними клетками

полиаденилирования

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 |

Способы введения ДНК в бактериальные клетки

- ❖ Трансформация 10^7 - 10^8 колоний/мкг ДНК
 - ❖ каналы, холодовой шок, ионы магния, рубидия гексаминкобальтхлорид
- ❖ Трансфекция
- ❖ Электропорация 10^9 - 10^{10} колоний/мкг ДНК
 - ❖ шок электрическим полем высокой напряженности (3-5 мс), поляризация мембран, обратимое повреждение