



Способы конструирования рекомбинантных молекул ДНК. Селективные и репортерные гены.

**Лектор: Старший преподаватель,
Кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Смекенов И.Т.
Предмет: Рекомбинация ДНК**

(Лекция 3)

ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Ознакомить студентов с принципами и этапами создания рекомбинантных молекул ДНК. Изучить роль селективных и репортёрных генов в отборе трансформированных клеток. Сформировать понимание практического применения этих генов в генной инженерии и молекулярной биологии.

ЗАДАЧИ

- ✓ Изучить основные методы получения рекомбинантных ДНК (рестрикционно-лигазный, гибридизационный, ПЦР-ориентированный и др.).
- ✓ Ознакомиться с ролью векторов (плазмид, фагов, вирусов, космид, ВАС, YAC) при создании рекомбинантных конструкций.
- ✓ Рассмотреть функции селективных генов (гены устойчивости к антибиотикам) и репортёрных генов (например, lacZ, GFP, luciferase).
- ✓ Научиться анализировать схему клонирования гена и принципы отбора трансформантов.

Ключевые термины

рекомбинантная ДНК, рестриктазы, лигазы, вектор, плазида, трансформация, селективный ген, репортёрный ген, маркер, GFP, lacZ, luciferase, ампициллинрезистентность, генная инженерия.

1. Конструирование рекомбинантных молекул ДНК — это процесс искусственного соединения фрагментов ДНК из разных источников для получения новой генетической комбинации.

Основной принцип заключается в разрезании ДНК рестриктазами и сшивании фрагментов с помощью ДНК-лигазы.

2. Основные этапы создания рекомбинантной ДНК:

- ✓ выделение гена-мишени;
- ✓ выбор и подготовка вектора (обычно плазмиды);
- ✓ разрезание ДНК вектора и вставляемого фрагмента одинаковыми рестриктазами;
- ✓ лигирование фрагментов;
- ✓ трансформация клеток-хозяев;
- ✓ отбор клеток, содержащих рекомбинантную ДНК.

3. Селективные гены — это гены, обеспечивающие выживание клеток, содержащих вектор, на селективных средах.

Примеры:

- ❖ amp^R — устойчивость к ампициллину,
- ❖ kan^R — устойчивость к канамицину,
- ❖ tet^R — устойчивость к тетрациклину.

4. Репортёрные гены — гены, кодирующие белки, по активности которых можно судить о работе промотора или успешной экспрессии конструкции.

lacZ (β -галактозидаза, синее окрашивание с X-gal),

- GFP (зелёный флуоресцентный белок),
- luc (люцифераза, свечение).

5. Значение селективных и репортёрных генов:

- I. позволяют быстро идентифицировать успешные трансформанты;
- II. служат индикаторами экспрессии;
- III. применяются в клеточных и *in vivo* исследованиях активности генов.

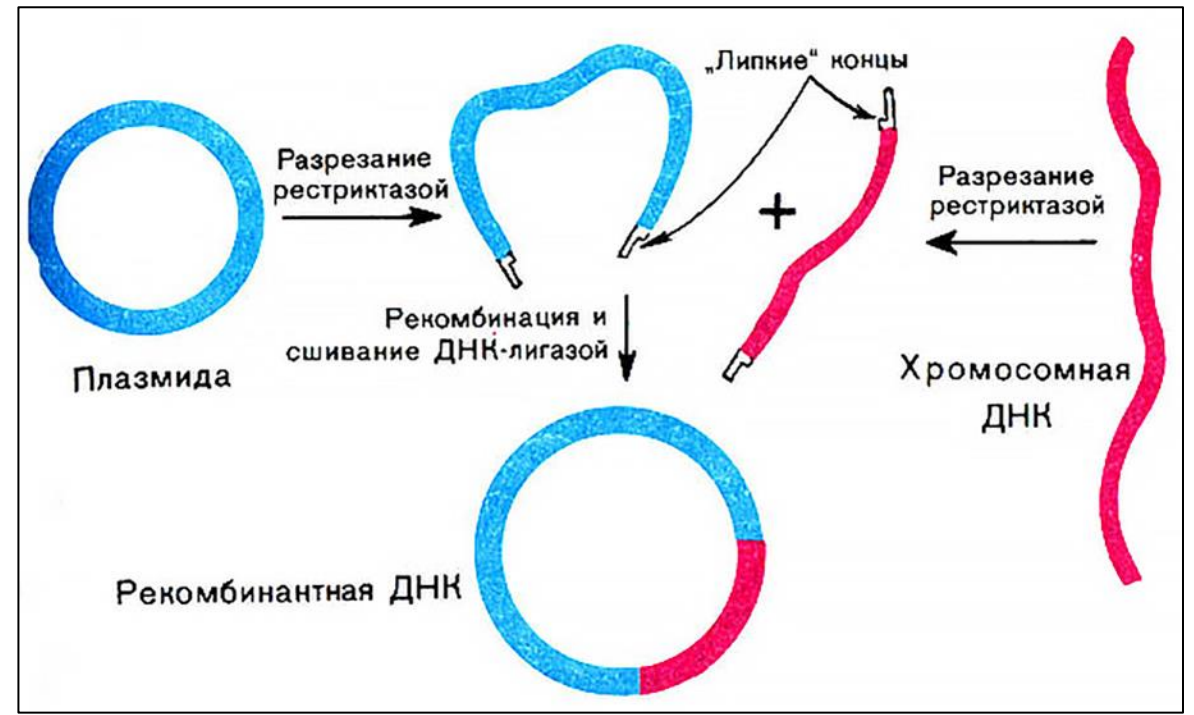
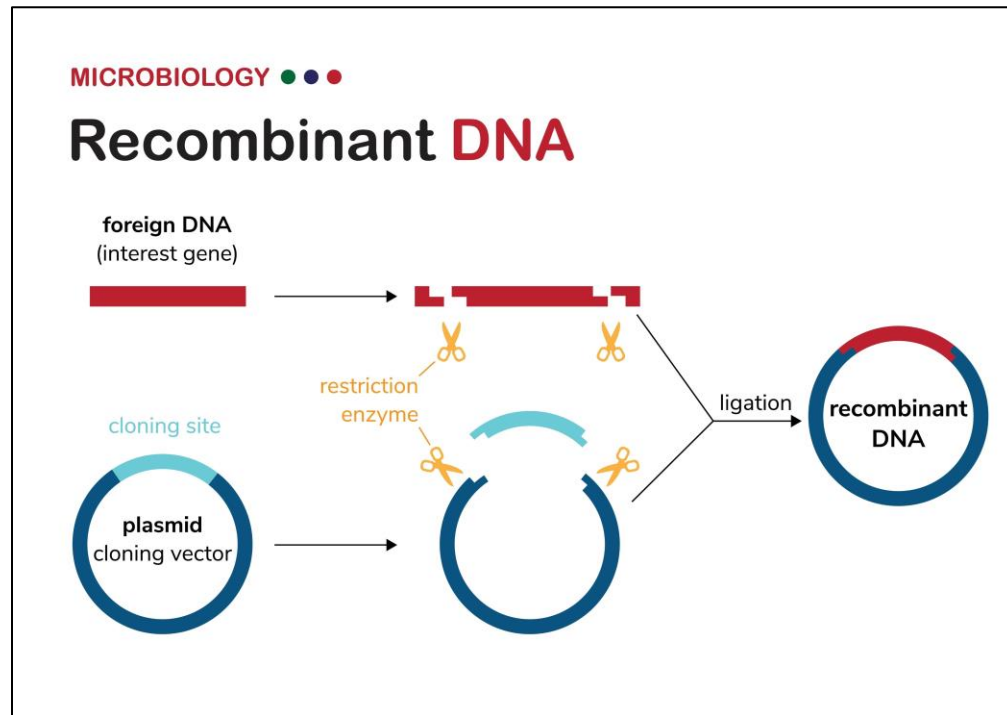


ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Что представляет собой рекомбинантная ДНК и как она создаётся?
- 2) Какие ферменты участвуют в процессе клонирования и какова их функция?
- 3) Какие типы векторов используются для создания рекомбинантных молекул ДНК?
- 4) В чём различие между селективными и репортёрными генами?
- 5) Как осуществляется отбор клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды?
- 6) Почему гены *lacZ* и GFP широко применяются в молекулярной биологии?
- 7) Какую роль играют репортёрные гены при исследовании активности промоторов?

Основы генной инженерии: От идеи к клону

- Рекомбинантная ДНК (рДНК) – это молекула ДНК, созданная *in vitro* путем объединения генетического материала из двух или более разных источников.



Инструменты Конструирования рДНК

• КОНСТРУИРОВАНИЕ РДНК ТРЕБУЕТ ТРЕХ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ:

1) Донорская ДНК (Целевой ген) - Фрагмент ДНК, содержащий ген, который мы хотим клонировать, экспрессировать или исследовать (например, ген инсулина).

Как получить:

Выделение из генома.

Синтез *in vitro* (химический синтез).

Аmplификация (умножение) с помощью ПЦР (Полимеразная цепная реакция).

2) Вектор (Транспортное средство) - Самореплицирующаяся молекула ДНК (обычно плаزمиды или вирус), которая может переносить целевой ген в клетку-хозяина.

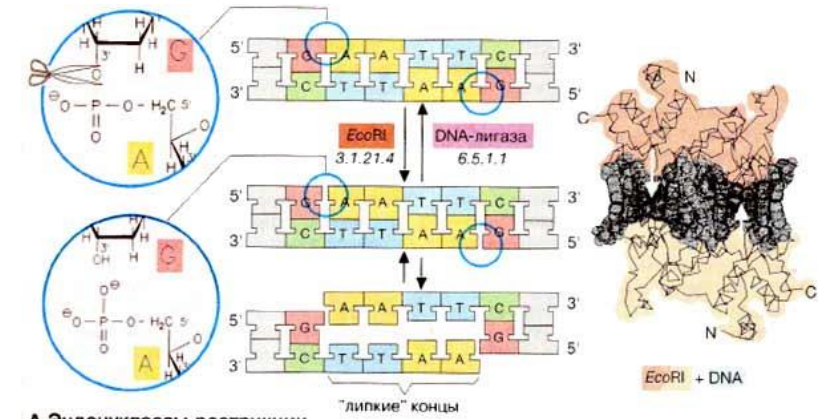
Основные требования:

Наличие точки начала репликации (**ori**).

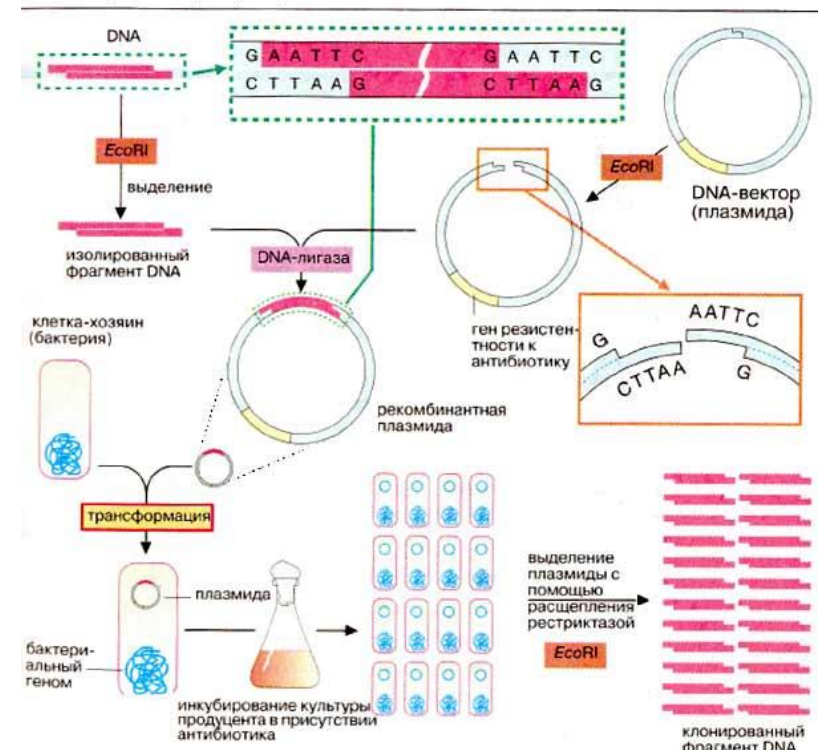
Наличие маркера селекции (например, устойчивость к антибиотику).

Наличие сайта для встраивания (**MCS**) – множественные сайты для рестрикции.

3) Ферменты ("Молекулярные ножницы и клей") - Рестриктазы (Рестрикционные эндонуклеазы): «Ножницы», которые разрезают ДНК в специфических последовательностях, создавая «липкие» или тупые концы; ДНК-лигаза: «Клей», который сшивает (лигирует) фрагменты ДНК (целевой ген и вектор).



А. Эндонуклеазы рестрикции



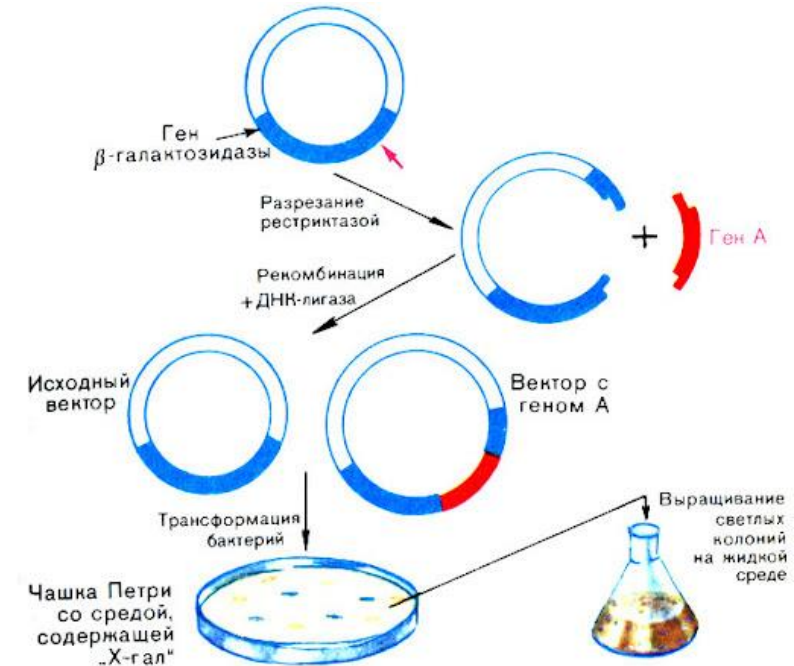
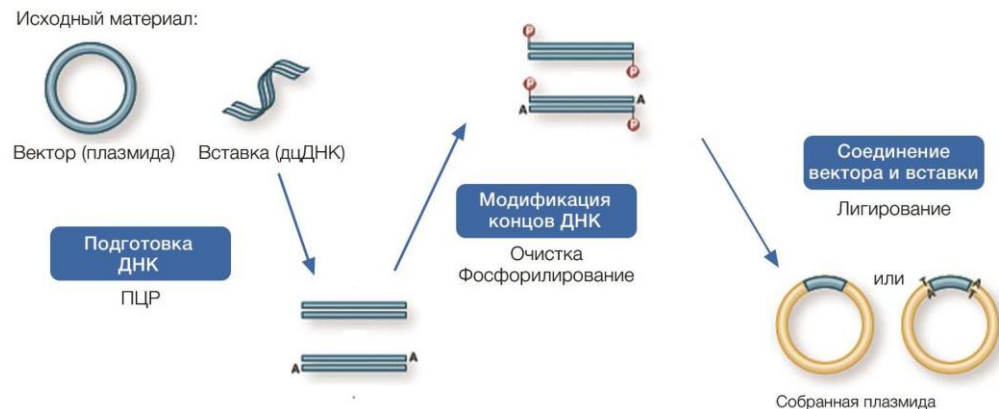
Б. Клонирование ДНК

Основной Классический Метод – Рестрикция и Лигирование

Шаг 1: Рестрикционное расщепление

И донорская ДНК (целевой ген), и вектор обрабатываются одними и теми же рестрикционными ферментами.

Результат: Образуются совместимые (комплементарные) концы (чаще всего "липкие" концы), которые облегчают последующее соединение.



Шаг 2: Лигирование (Сшивание)

Смешивание: Фрагменты целевого гена смешиваются с разрезанным вектором.

Действие: Фермент ДНК-лигаза восстанавливает фосодиэфирные связи между концами вектора и целевого гена.

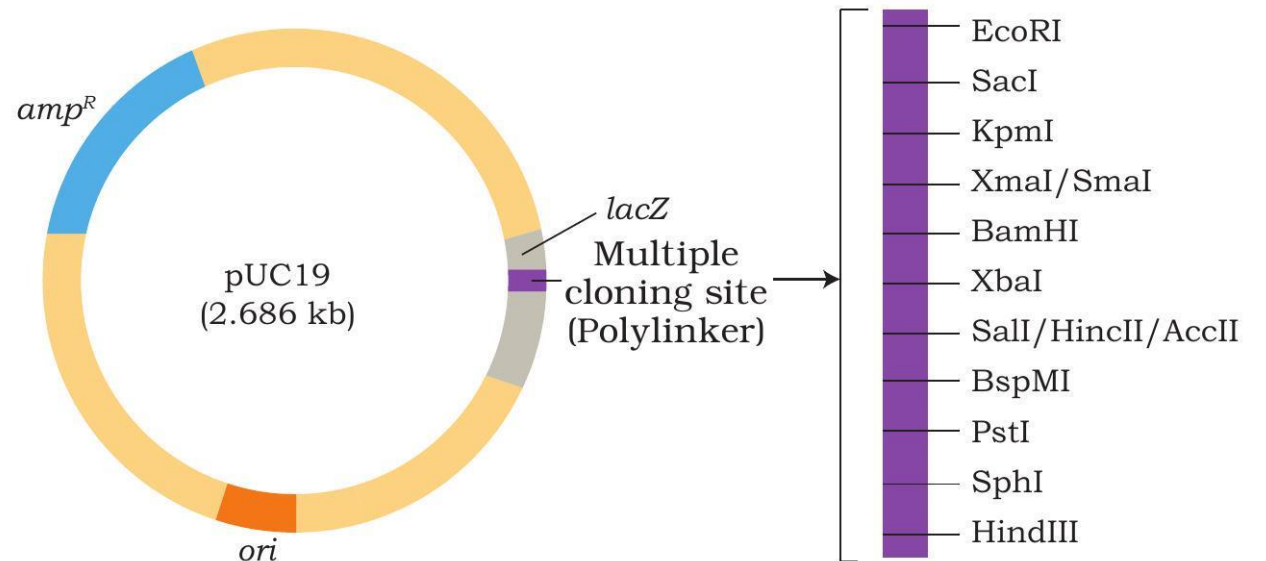
Результат: Формирование ковалентно замкнутой кольцевой рекомбинантной плазмиды.

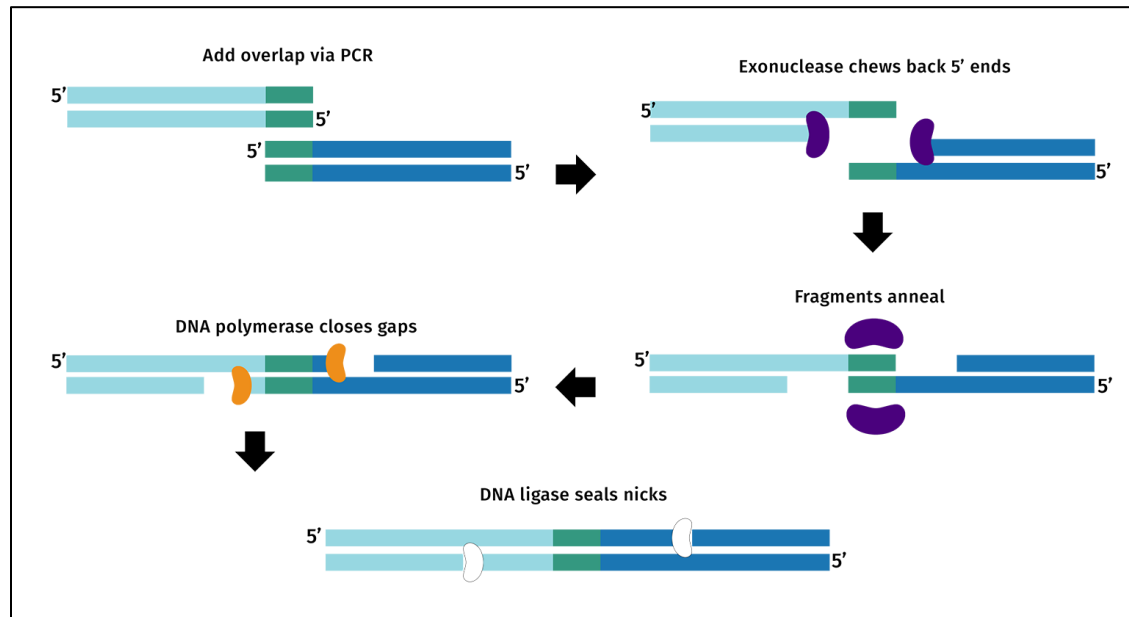
Альтернативные и Современные Методы (Безлигазное Клонирование)

Классический метод рестрикции/лигирования имеет ограничения (необходимость наличия уникальных сайтов рестрикции). Современная генетика использует более гибкие методы:

1. Направленное Клонирование (Directional Cloning)

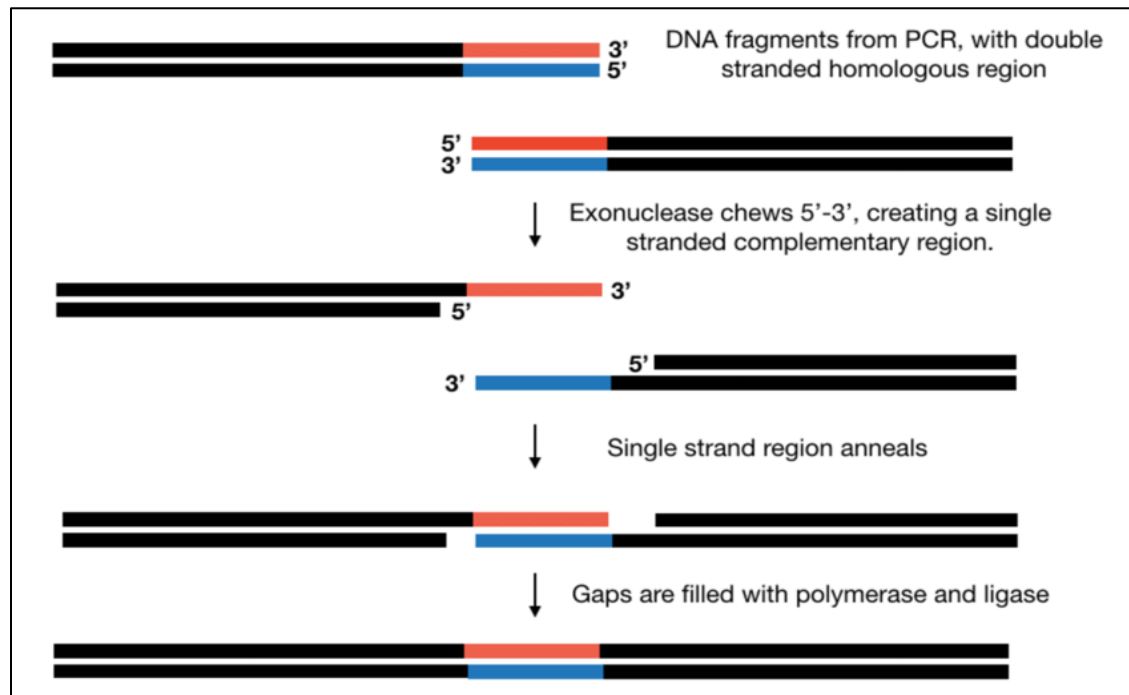
- Использование **двух разных рестриктаз** на концах гена и вектора.
- Это гарантирует встраивание гена в вектор в **правильной ориентации** и предотвращает самозамыкание вектора.





2. Клонирование на основе гомологичной рекомбинации (In-Fusion, Gibson Assembly)

Принцип: Используется способность ДНК к естественной рекомбинации.

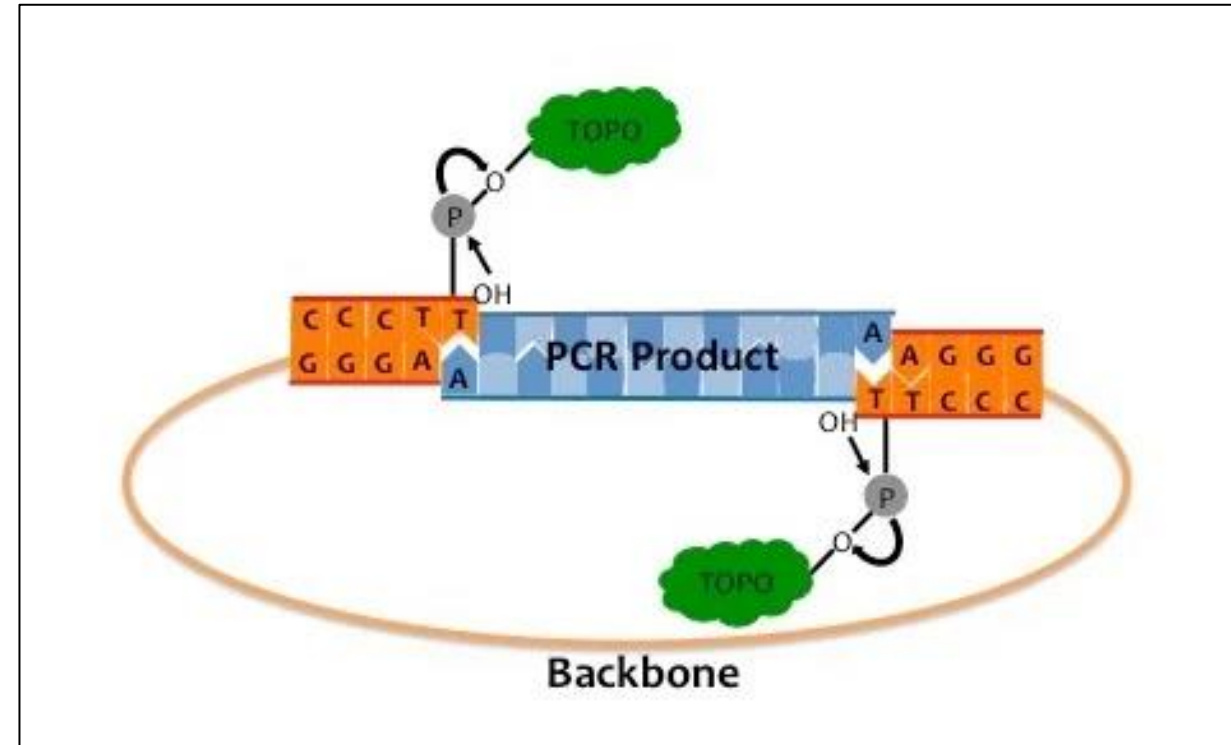
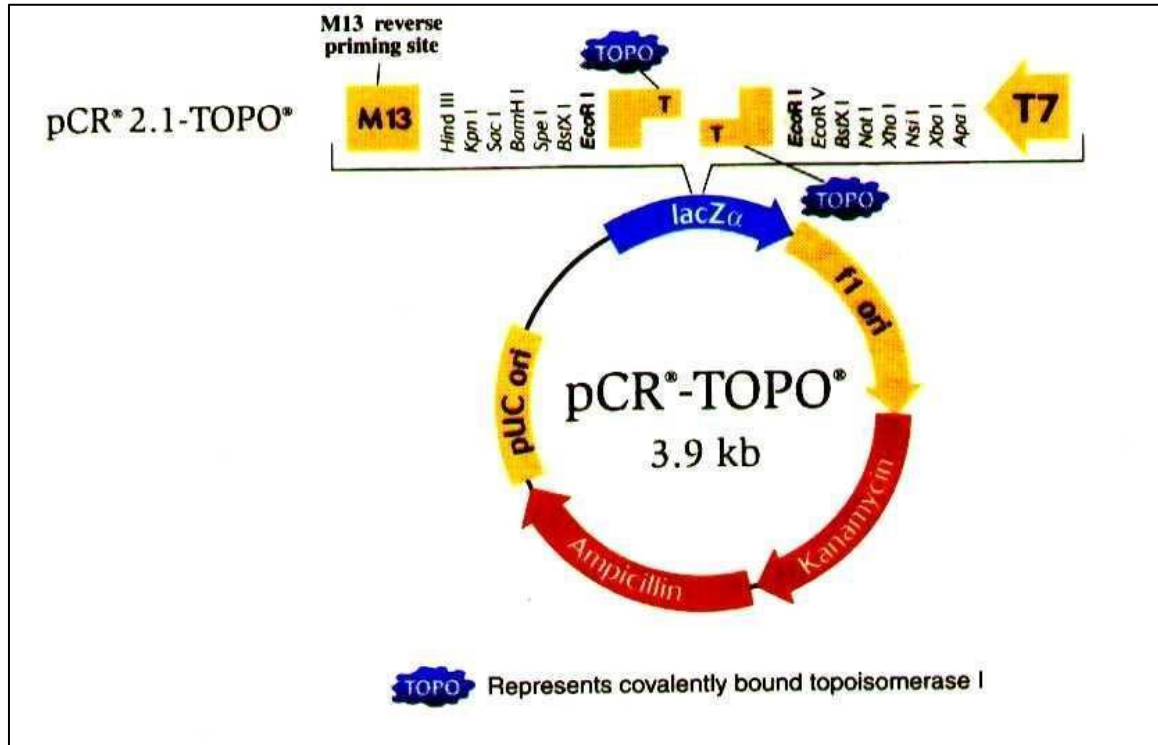


Метод Гибсона (Gibson Assembly): Позволяет одновременно соединять **несколько фрагментов ДНК** в одну реакцию. Используются фрагменты с короткими гомологичными концами, которые "слипаются" и затем восстанавливаются ферментами.

3. ТОПО-клонирование (TOPO Cloning)

Принцип: Использование фермента **ДНК-топоизомеразы I**, который может быстро и эффективно присоединять и лигировать фрагменты ДНК без использования лигазы.

Преимущество: Чрезвычайно быстрый метод, идеален для встраивания ПЦР-продуктов.



4. ТА-клонирование

ТА-клонирование — это метод молекулярного клонирования, основанный на соединении **ДНК-фрагмента с А-концами** (адениновыми) и **вектора с Т-концами** (тиминовыми) без использования рестриктаз.

Принцип метода:

1. Во время амплификации ДНК при помощи Taq-полимеразы (или другой ДНК-полимеразы без корректорной активности)

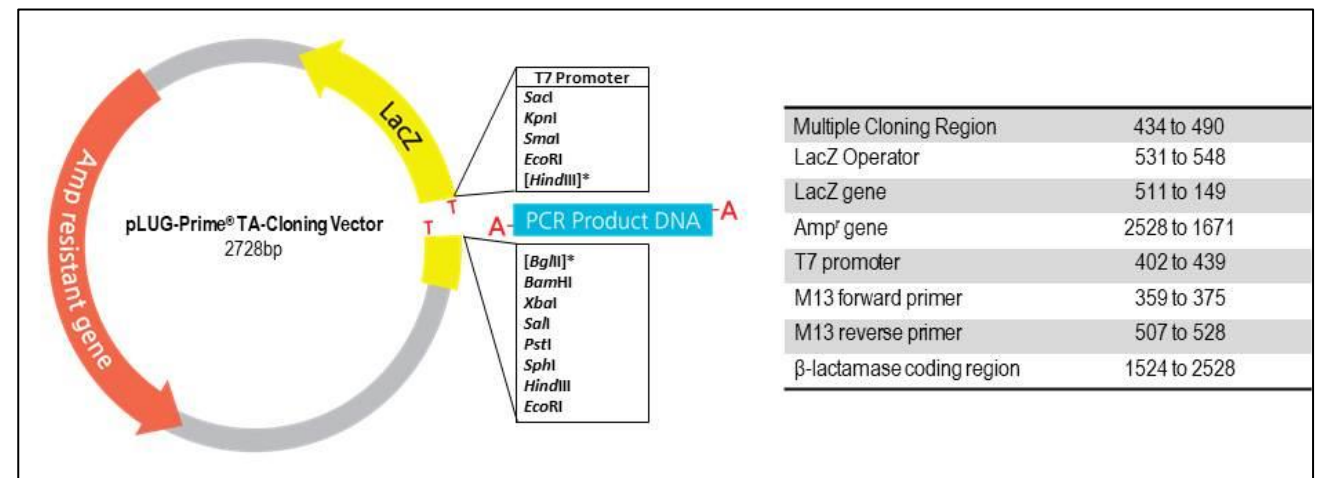
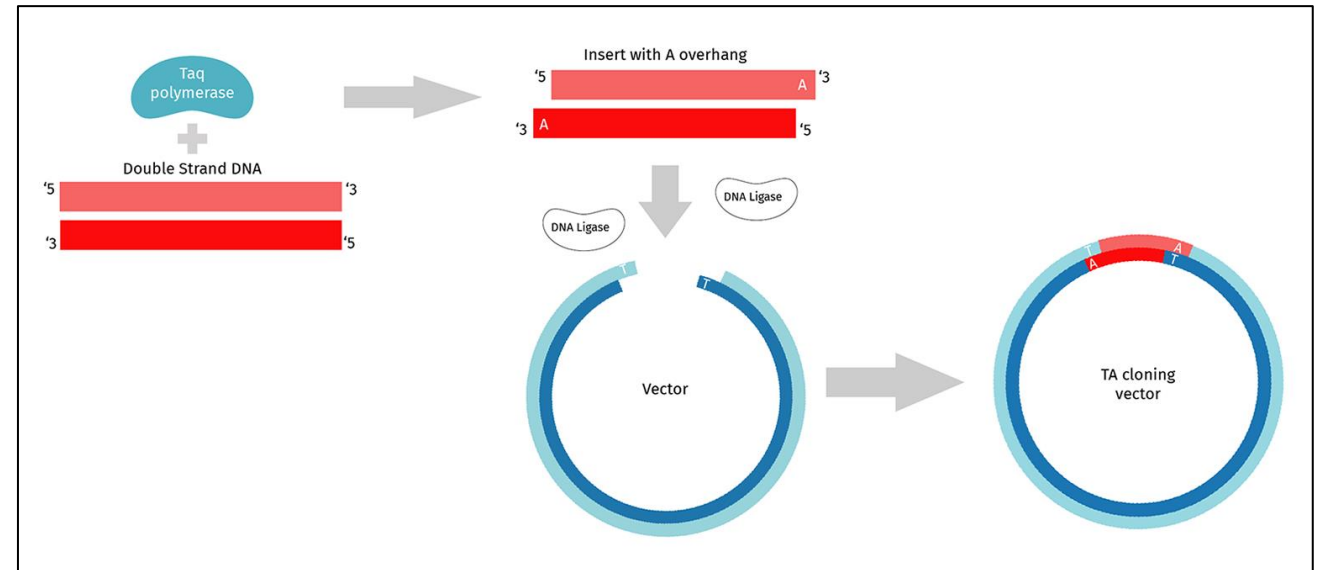
→ на 3'-концах амплифицированной ДНК добавляются **одиночные адениновые остатки (A-overhangs)**.

2. ТА-вектор (обычно производный плазмиды pGEM-T, pCR, pTZ и др.)

→ предварительно содержит **тиминовые остатки (T-overhangs)** на своих 3'-концах.

3. При смешивании фрагмента и вектора

→ А и Т комплементарно соединяются посредством водородных связей,
→ затем **ДНК-лигаза** ковалентно закрепляет соединение, формируя **рекомбинантную молекулу**.



Селективные гены, или селекционные маркеры, — это гены, вводимые в организм-хозяин, чтобы помочь отличить клетки, успешно воспринявшие генетическую конструкцию (например, плазмиду), от тех, которые этого не сделали.

Эти гены часто обеспечивают устойчивость к антибиотикам или другим токсичным соединениям.

Общие характеристики:

Функция: Селективный ген позволяет выживать и расти в присутствии селективного агента только тем клеткам, в которые он успешно встроился.



Genetic Engineering

Можно выделить 2 группы генов-маркеров, которые позволяют различать трансформированные клетки (типы селективных маркеров):

1. Селективные гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам.

Обеспечивают устойчивость к таким антибиотикам, как ампициллин, канамицин или тетрациклин. Эти антибиотики добавляются в питательную среду, и выживают только трансформированные клетки с геном устойчивости.

У бактерий: канамицин, тетрациклин, ампициллин, неомицин и т. д.

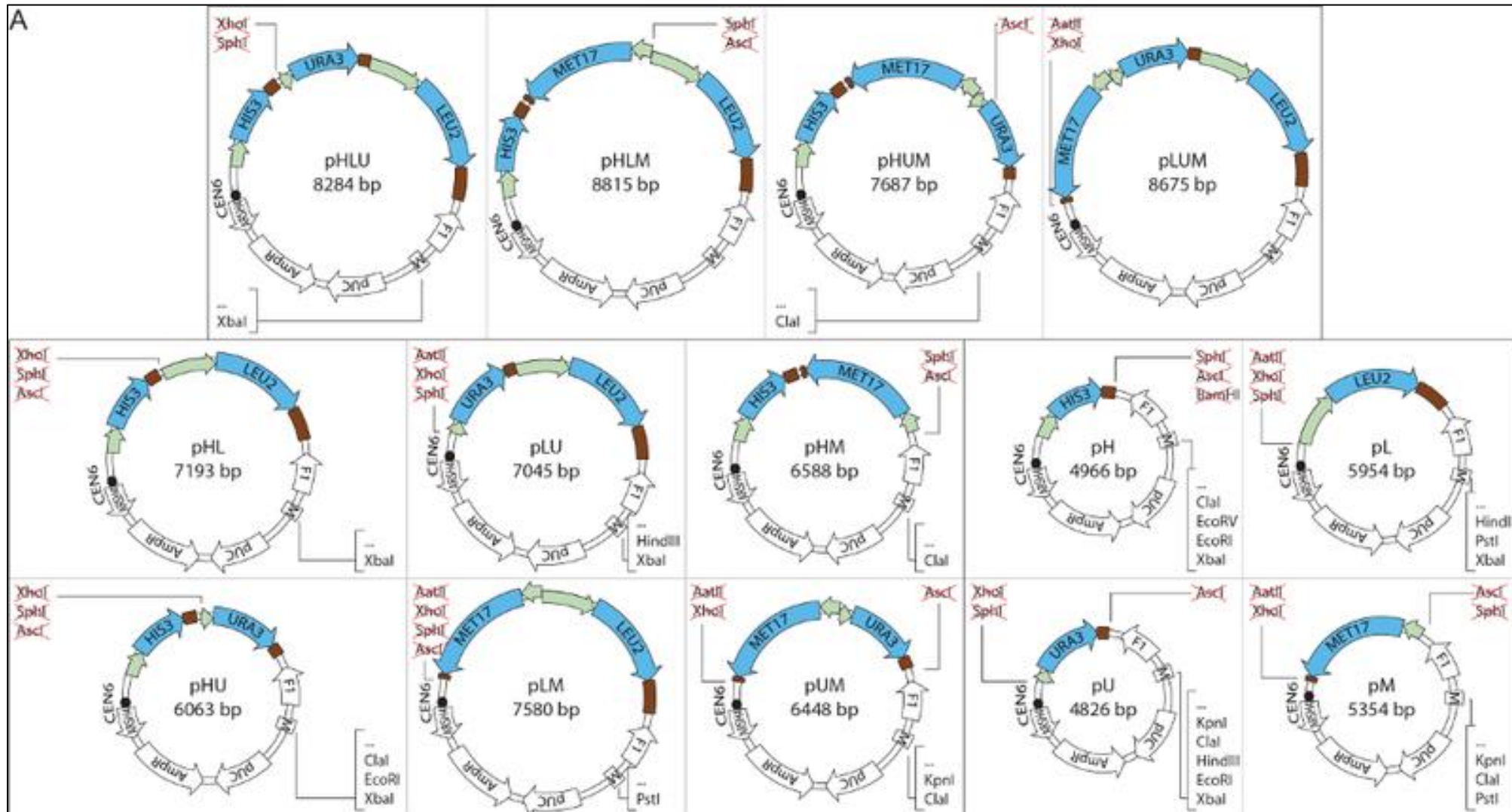
У растений: гербициды и гены, представленные в таблице.

2. Пищевые маркеры (ауксотрофия).

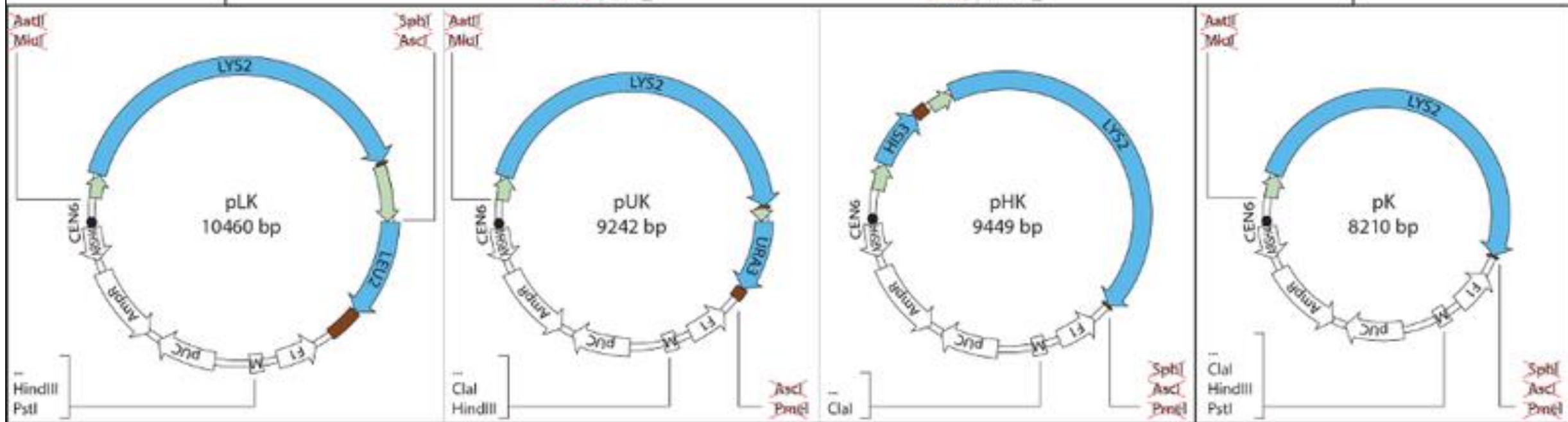
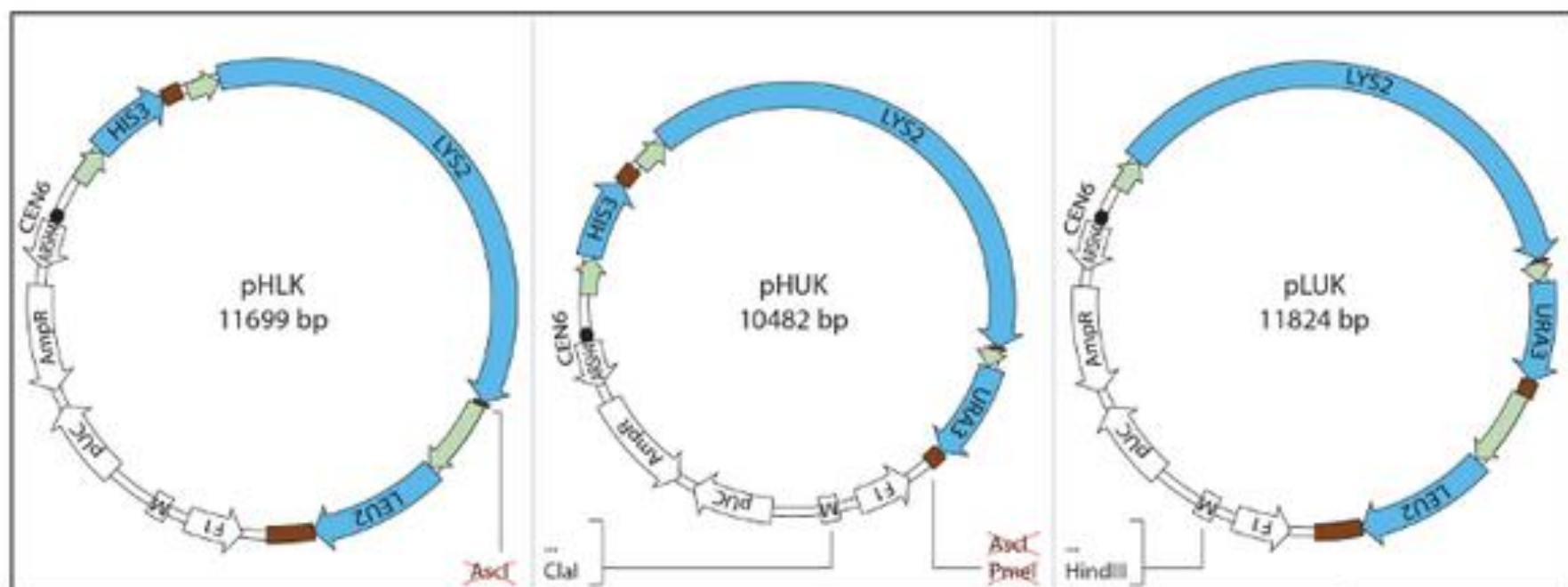
Эти гены, часто используемые в дрожжах и бактериях, позволяют клеткам расти в средах, не содержащих определённые питательные вещества (например, гистидин, лейцин).

<i>Sl. no.</i>	<i>Substrates</i>	<i>Marker genes</i>	<i>Enzyme produced</i>
1.	Antibiotics	Bleomycin	Gene ble (unknown enzyme)
		G418, Kanamycin, Neomycin	Neomycin phosphotransferase (nptII)
		Gentamycin	Gentamycin acetyl transferase (gat)
		Hygromycin B	Hygromycin phosphotransferase (hpt)
		Methotrexate trimethoprim	Dihydrofoate reductase (dfr)
		Streptomycin	Streptomycin phosphotransferase (spt)
2.	Herbicides	Chlorosulfuron imidazolinones	Mutant form of acetolactase synthase (als)
		Bromoxynil	Bromoxynil nitrilase (bnl)
		Glyphosate	5-enolpyruvate shikimate-3 - phosphate (EPSP)-synthase (aroA)
		PPT (L-phosphinothricin, also called bialaphos)	Phosphinothricin acetyltransferase (bar)

Основной принцип действия такого маркера заключается в способности трансформированных клеток расти на селективной питательной среде с добавлением определенных веществ, подавляющих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток, или в отборе мутантных трансформантов.



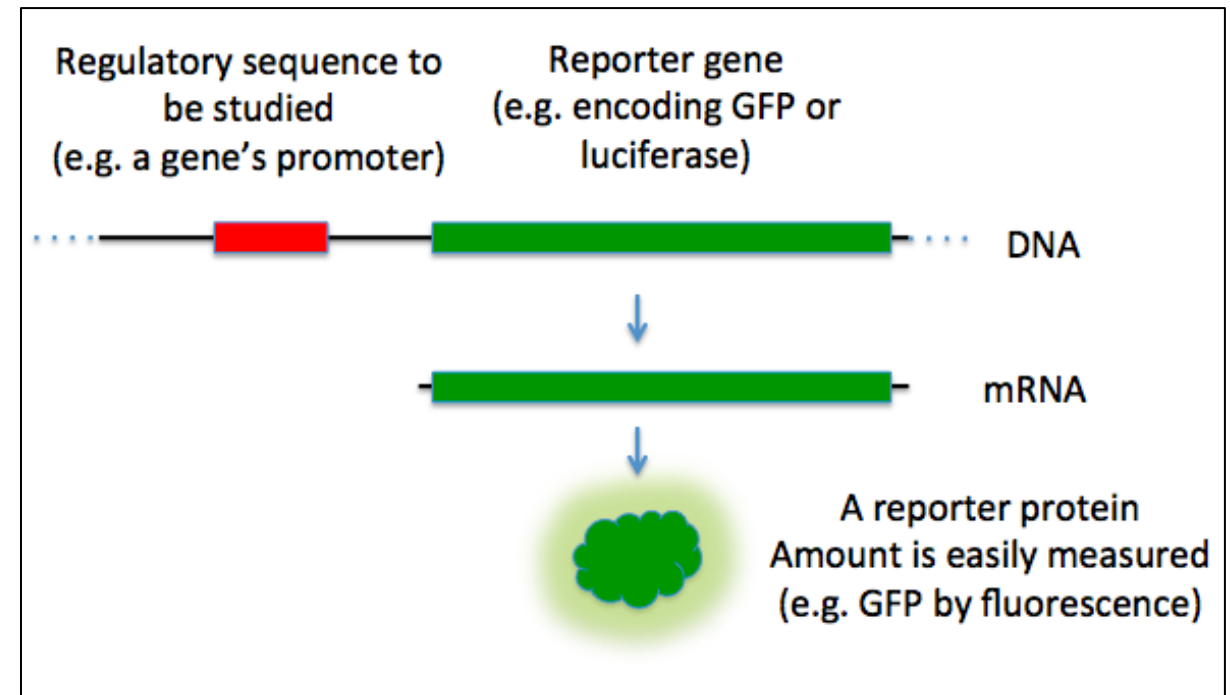
B



РЕПОРТЕРНЫЕ ГЕНЫ, кодирующие нейтральные для клеток белки, присутствие которых в тканях можно легко проверить.

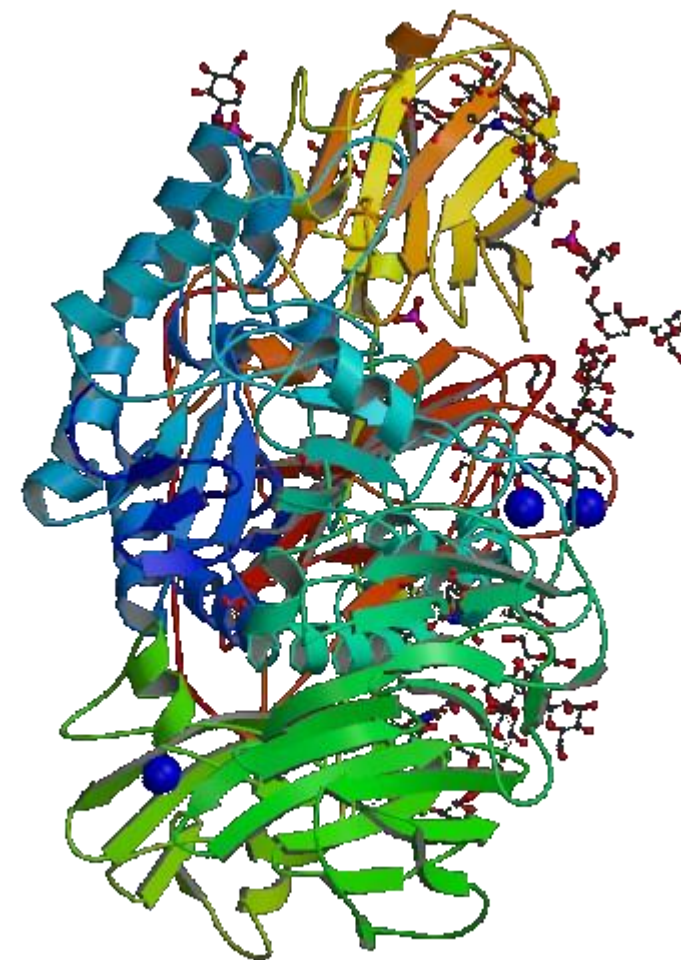
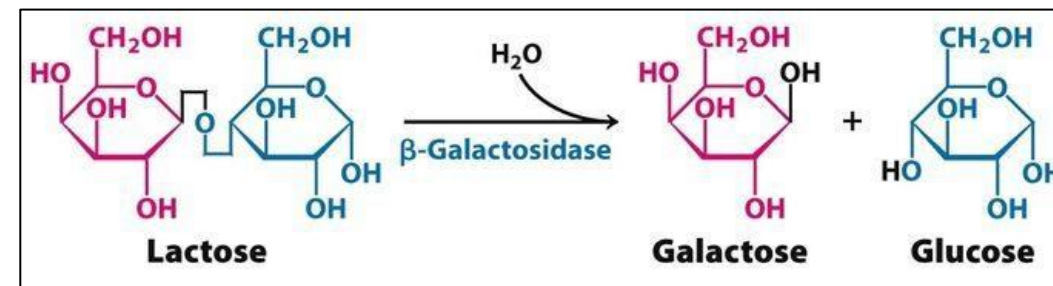
- Наиболее часто используемые репортерные гены — это β -глюкуронидаза (**GUS**), зелёный флуоресцентный белок (**GFP**), люцифераза (**LUC**) и хлорамфениколацетилтрансфераза (**CAT**). На сегодняшний день наиболее часто используемыми генами из этого арсенала являются **GUS** и **GFP**, а также, в меньшей степени, **LUC** и **CAT**.

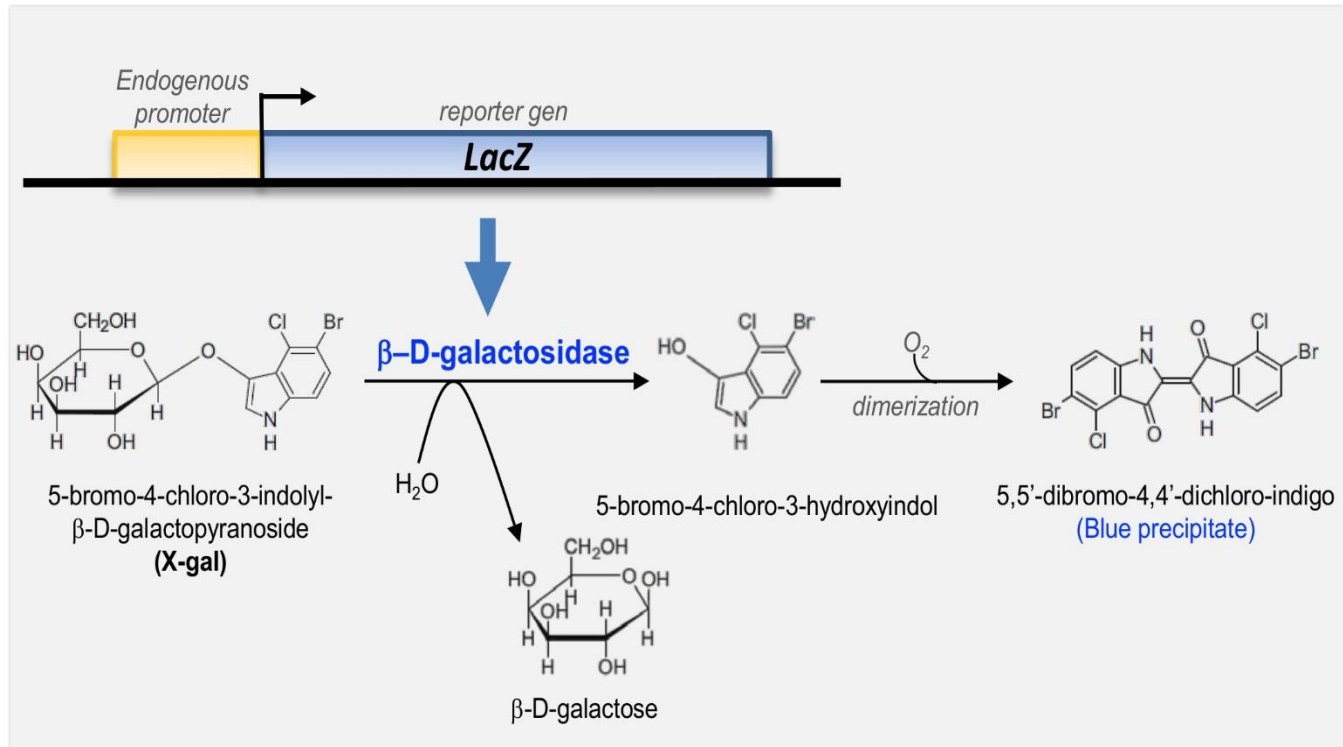
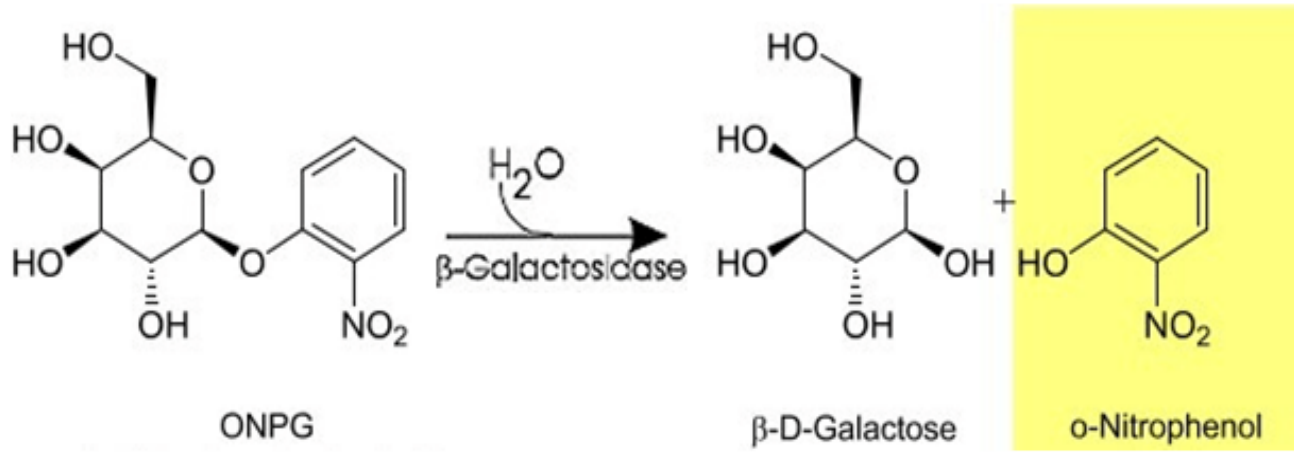
- ✓ **Репортерные гены** кодируют белки, обладающие уникальной ферментативной активностью, и используются для оценки транскрипционных свойств элементов ДНК.
- ✓ Использование репортерных генов в трансгенных животных обеспечивает быстрый метод **обнаружения экспрессии трансгена**, которую можно легко отличить от экспрессии соответствующего эндогенного гена животного.



β-галактозидаза

- ❑ Фермент **β-галактозидаза**, катализирующий гидролиз β-галактозидов, включая лактозу, кодируется геном **LacZ** *E. coli*.
- ❑ Активность фермента измеряется с помощью простого фотометрического метода, измеряющего гидролиз субстрата **о-нитрофенил-Р-о-галактопиранозида (ONPG)** β-галактозидазой в бесклеточных экстрактах.
- ❑ Активность β-галактозидазы также можно контролировать гистохимически, используя субстрат **X-Gal** (5-бром-4-хлор-3-индоил β-D-галактозид).
- ❑ Потенциальным недостатком использования β-галактозидазы в качестве репортерного фермента является наличие эндогенной β-галактозидазной активности в некоторых тканях млекопитающих, включая мозг. Однако оптимальный pH для этого фермента низкий (pH 3,5), тогда как для фермента *E. coli* он составляет 7,3. Ложноположительные результаты можно свести к минимуму, проводя анализ при pH 7,5 и используя экстракт нормальной ткани в качестве контроля.

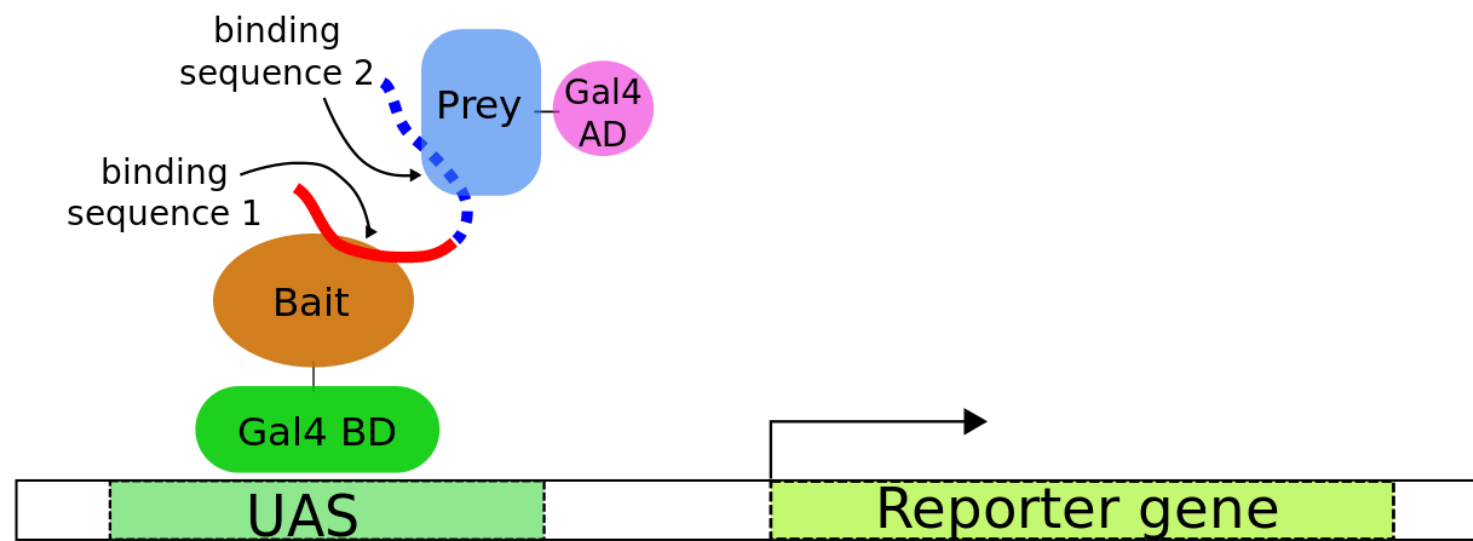




- Технологии генной инженерии позволяют создавать генетические химеры между промоторной областью интересующего гена и репортерным геном в качестве средства изучения регуляции экспрессии эукариотических генов на уровне транскрипции.

Хороший продукт гена-репортера имеет следующие характеристики:

- а) ферментативная активность термостабильна и устойчива к протеазам, а также хорошо соответствует силе промотора;
- б) фоновая и/или мешающая ферментативная активность в клетках отсутствует;
- с) доступны простые, чувствительные, воспроизводимые и удобные ферментативные или иммуноферментные анализы продукта репортерного гена для оценки активности промотора.



A

– Leu

B

+ X-Gal

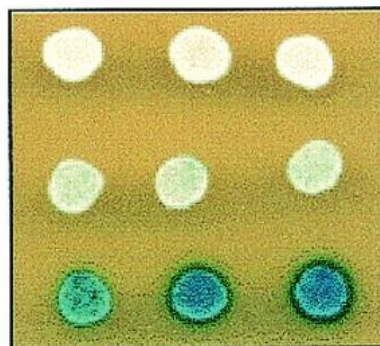
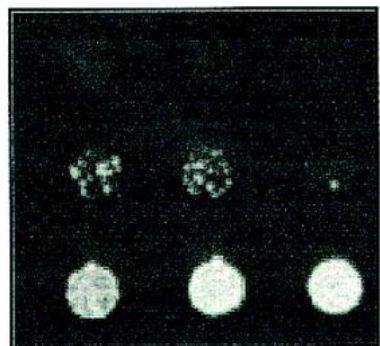
C

β -Galactosidase activity

DBD-GlnB $\times$ AD

DBD $\times$ AD-NtrB

DBD-GlnB $\times$ AD-NtrB



2

9

1388

DDO

QDO

QDO/X/A

BD-AH05NP
AD-PLSCR1

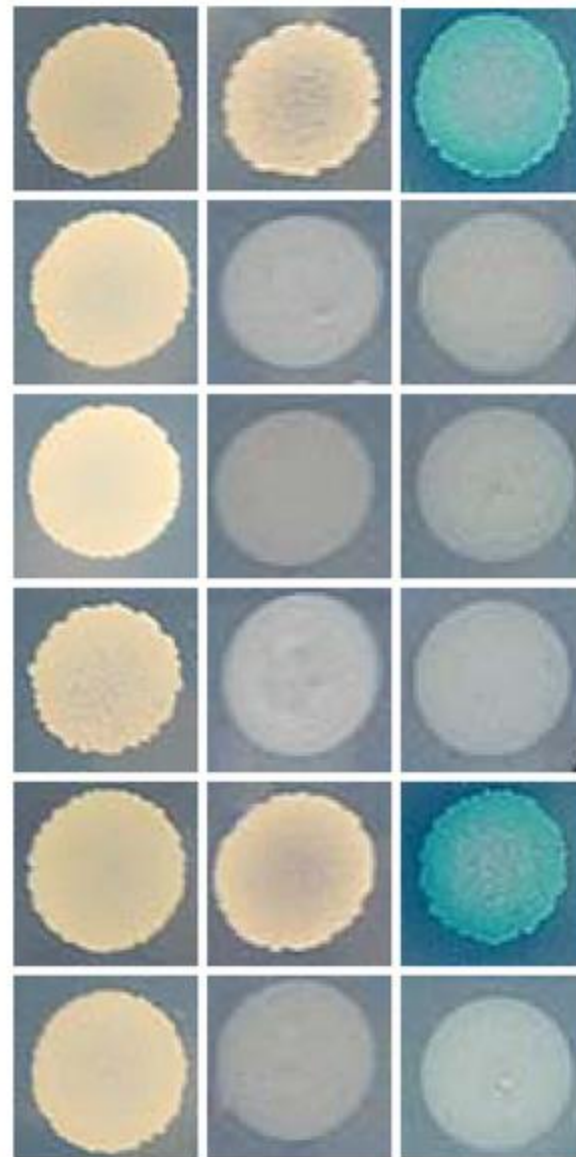
BD
AD-PLSCR1

BD-AH05NP
AD

BD
AD

BD-p53
AD-T

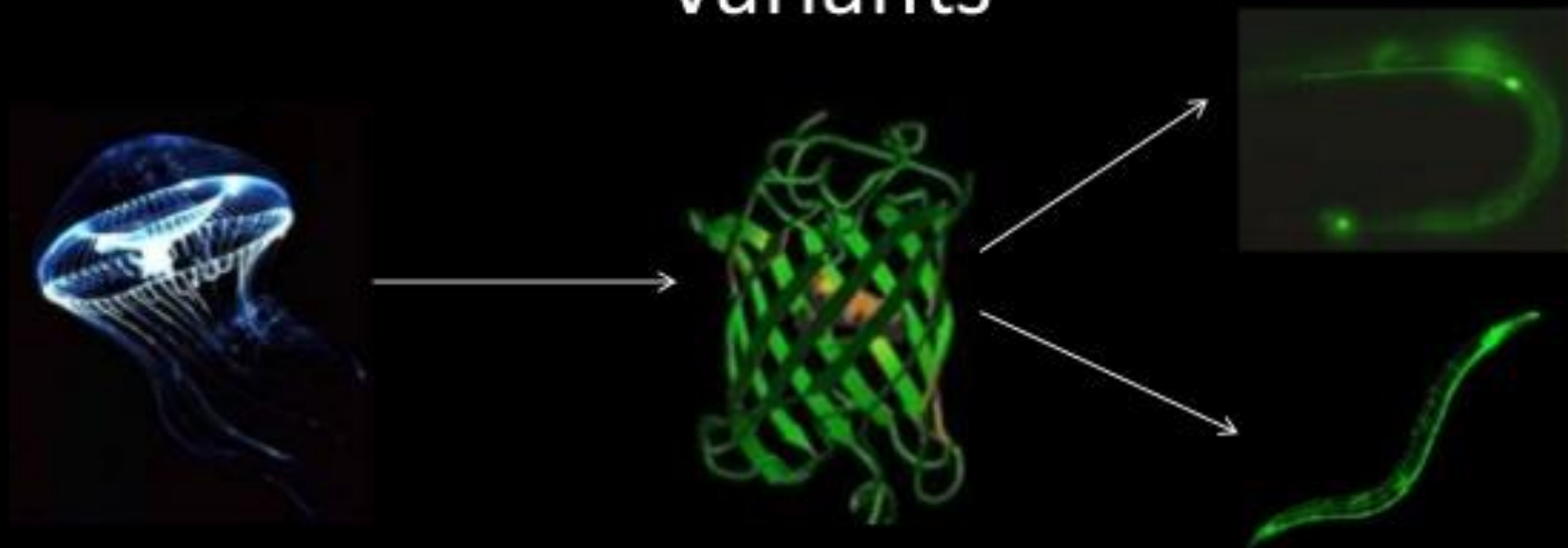
BD-Lam
AD-T

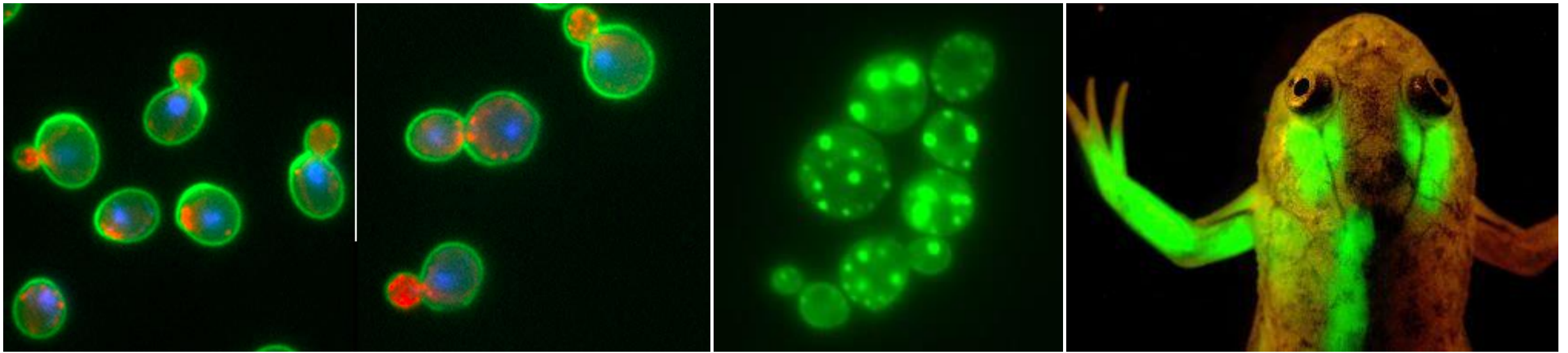


- **Зеленый флуоресцентный белок (GFP)** был открыт Шимомурой и соавторами в 1962 году у светящейся медузы **Aequorea victoria**.
- Ген GFP был клонирован в **1992** году Прашером и соавторами, и через несколько лет этот ген начал активно использоваться в качестве репортерного гена в исследованиях с участием самых разных про- и эукариотических организмов.
- В настоящее время ген GFP используется в сотнях исследований по всему миру, и их число стремительно растёт. Этот стремительный рост обусловлен особыми свойствами белка GFP, а именно его способностью флуоресцировать в видимой (зелёной) области спектра при облучении длинноволновым **УФ-излучением**. Эта флуоресценция вызывается непосредственно самим белком и не требует субстратов или кофакторов для своего проявления.
- Благодаря этому свойству ген GFP является весьма перспективным репортерным геном, позволяющим проводить разнообразные прижизненные (неразрушающие) исследования с трансгенными организмами. Другой белок, **DsRed**, который флуоресцирует в красном свете, недавно был выделен из актинии **Discosoma sp.**



The Green Fluorescent Protein and Variants



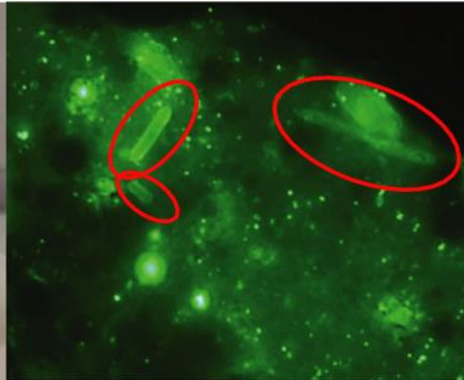


Cheese

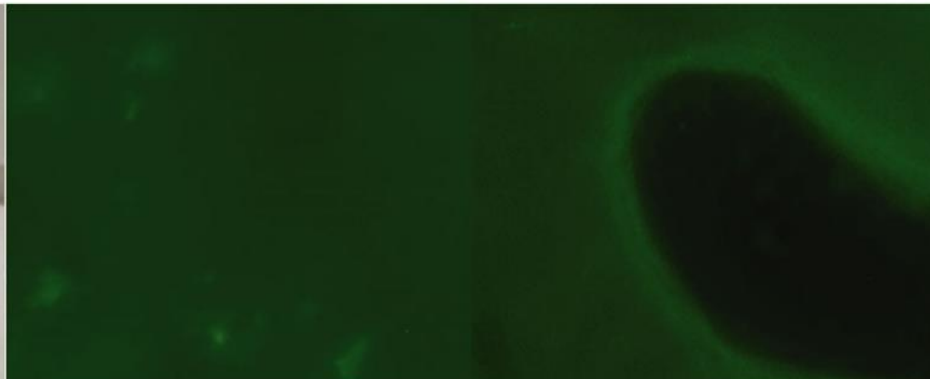
GFP-CBD

GFP-CBD

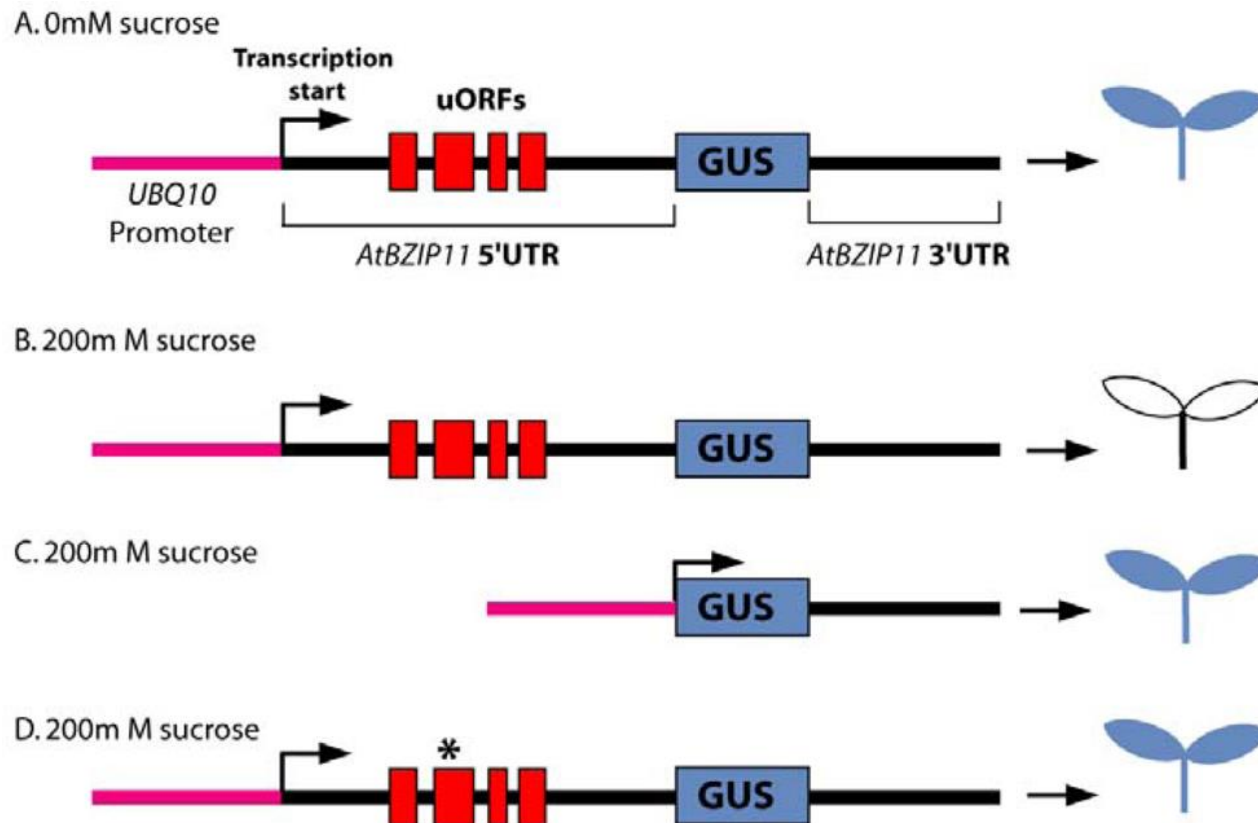
+Ct



-Ct



- Используемый в настоящее время как **репортерный ген GUS** является модифицированным геном из *Escherichia coli*, кодирующим **β -глюкуронидазу** с молекулярной массой **68 кД**.
- GUS активен в широком диапазоне условий среды с оптимумом при pH 5-8 и 37°C. Он может гидролизовать обширный спектр природных и синтетических глюкуронидов, что позволяет подбирать соответствующие субстраты для спектрофотометрического или флюориметрического определения активности фермента, а также для гистохимического окрашивания тканей *in situ* (например, в синий цвет).
- В живых клетках белок GUS также весьма стабилен и активен от нескольких часов до нескольких суток.



Активность фермента определяется по поглощению, флуоресценции или хемилюминесценции.

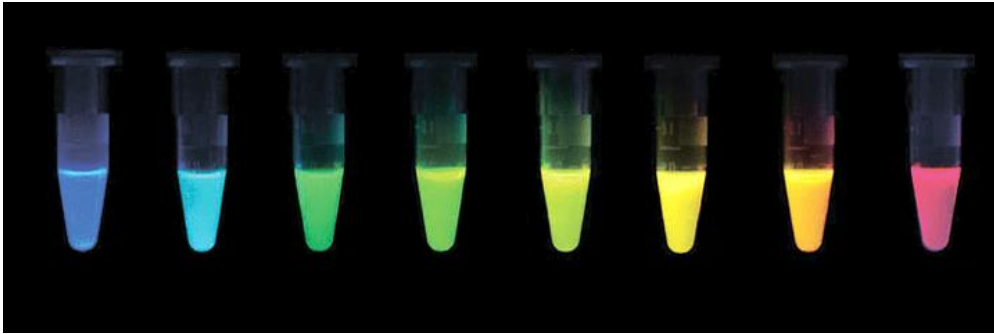
Флуориметрический

Флуоресценция — это процесс, когда молекула испускает свет одной длины волны после поглощения света другой длины волны. Флуориметрические анализы используют разницу в флуоресценции субстрата и продукта для измерения ферментативной реакции. Эти анализы, как правило, гораздо более чувствительны, чем спектрофотометрические, но могут быть подвержены помехам из-за примесей и нестабильности многих флуоресцентных соединений под воздействием света.

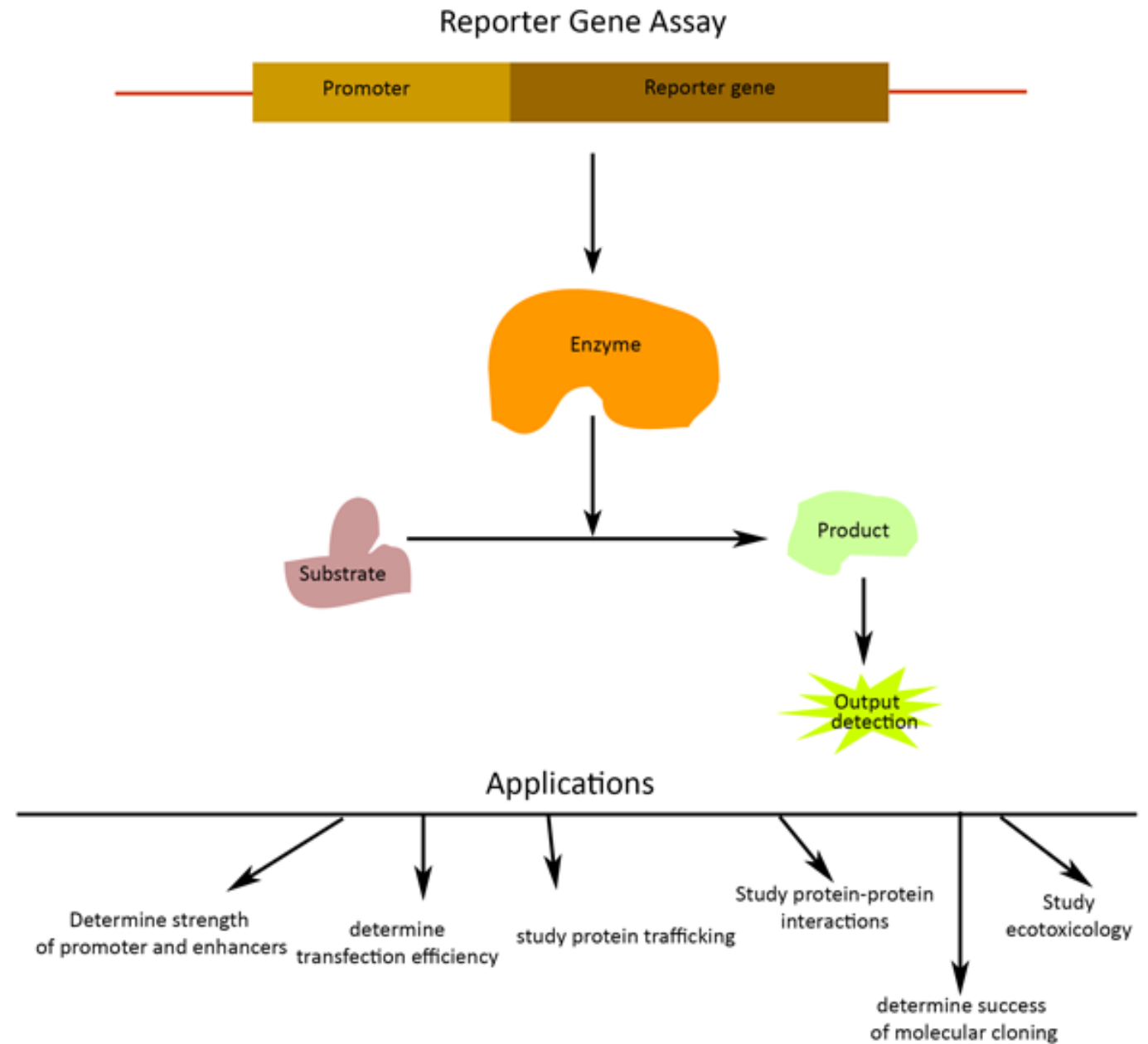
Хемилюминесценция

Хемилюминесценция — это испускание света в результате химической реакции. Некоторые ферментативные реакции генерируют свет, который можно измерить для обнаружения образования продукта. Эти типы анализов могут быть чрезвычайно чувствительными, поскольку испускаемый свет может фиксироваться фотоплёнкой в течение нескольких дней или недель, но их трудно количественно оценить, поскольку не весь свет, испускаемый реакцией, будет обнаружен.

Флуоресценция

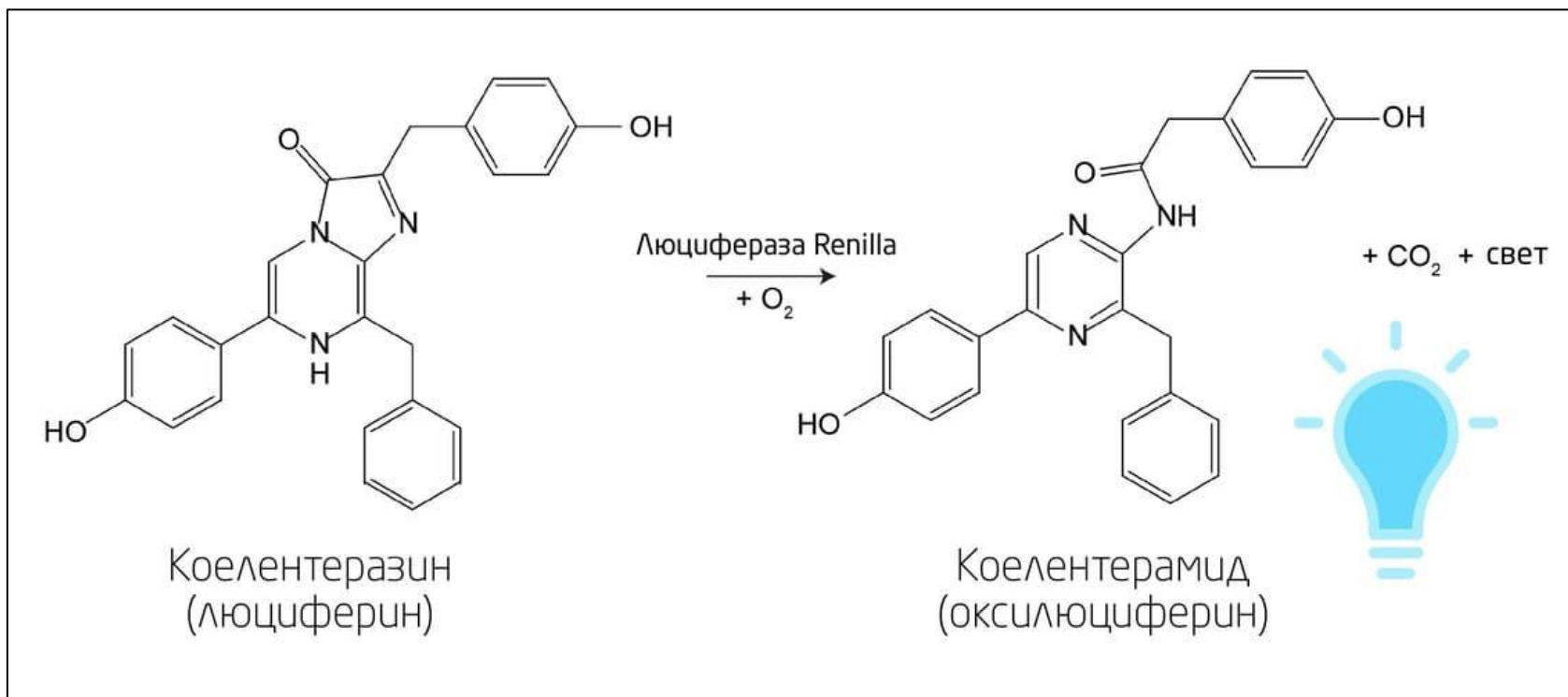


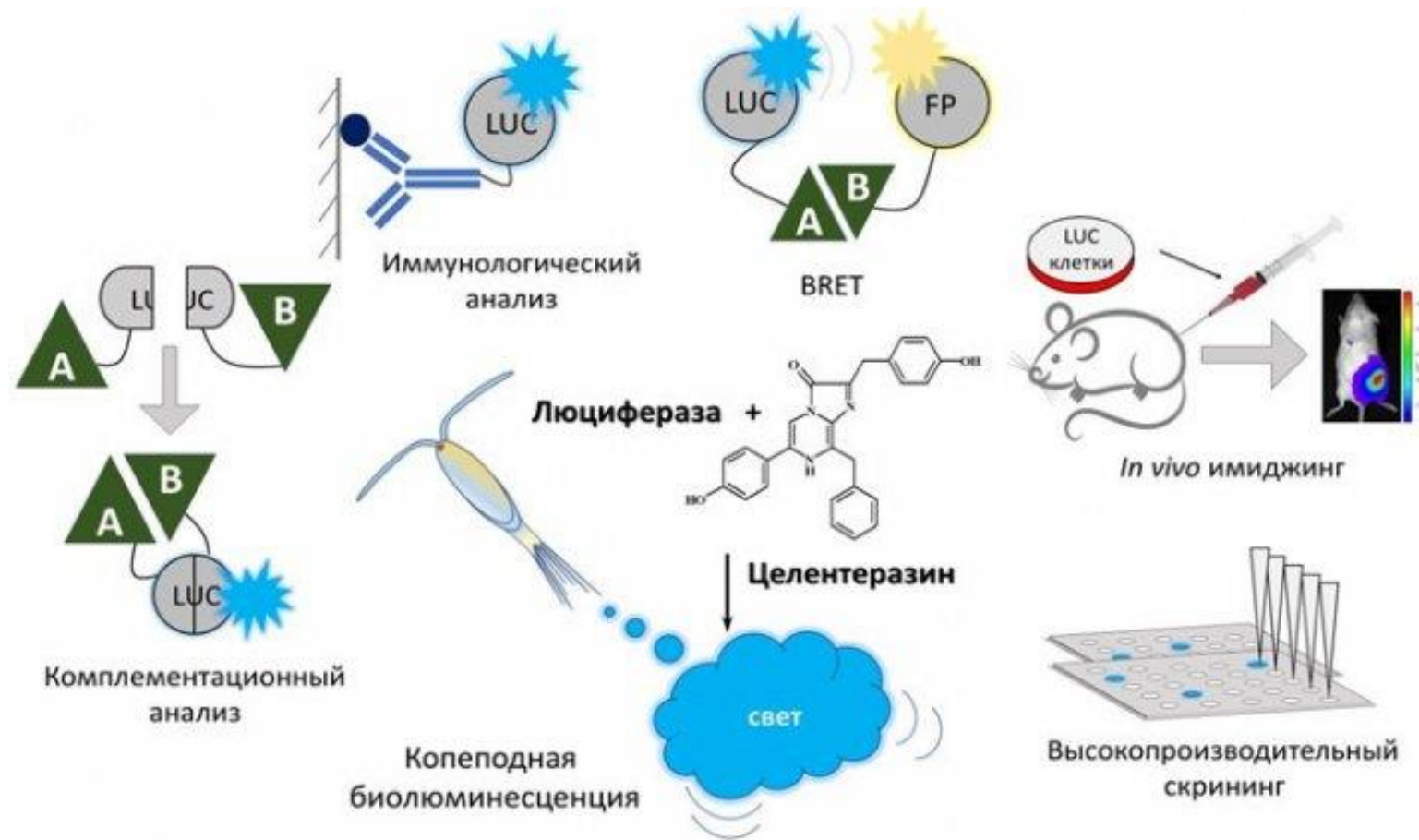
Хемилюминесценция



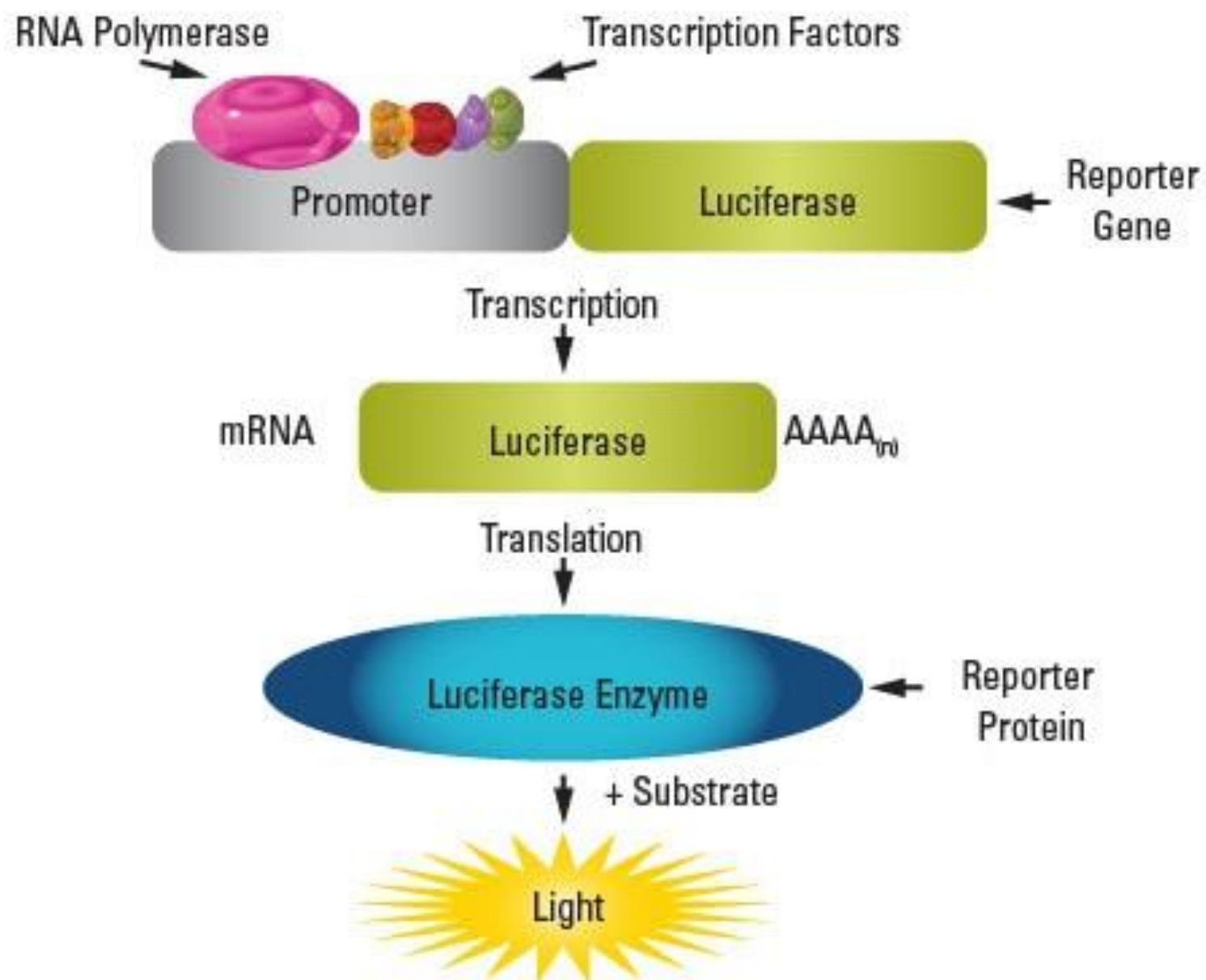
Биолуминесцентные репортерные зонды для визуализации

- В последнее время появились новые методы визуализации, использующие биолуминесцентный белок светлячков — **люциферазу**.
- Главное преимущество использования биолуминесцентных репортёров — их высокая чувствительность в сочетании с минимальным фоном.





Схемы и основные области аналитического применения копеподных люцифераз: высокопроизводительный скрининг различных веществ, биолуминесцентный иммунологический анализ, биолуминесцентный имиджинг мелких животных *in vivo* после введения субстрата, детекция белок-белковых взаимодействий комплементационным анализом и методом безызлучательного резонансного переноса энергии (BRET). При комплементационном анализе неактивные фрагменты люциферазы, способные восстанавливать активность при пространственном сближении, присоединяются к различным белкам А и Б, их взаимодействию приводит к восстановлению активности люциферазы. В случае BRET, к исследуемым белкам присоединяют люциферазу и флуоресцентный белок (ФБ) – далее при взаимодействии белков А и Б люцифераза сближается с ФБ, который становится способным переизлучать ее свет, но с большей длиной волны, что влечет изменение цвета биолуминесценции. Информация взята с портала «Научная Россия»



Light Signal = Luciferase Expression = Promoter Activity

Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза

- Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT, chloramphenicol acetyltransferase) — один из классических **репортерных ферментов**, широко используемых в молекулярной биологии для оценки активности промоторов и регуляторных элементов ДНК.



Как работает CAT-репортер

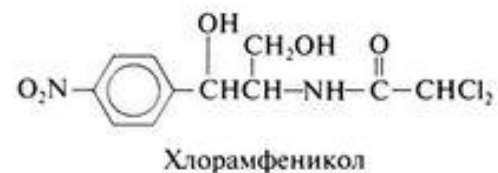
Фермент CAT катализирует **ацетилирование антибиотика хлорамфеникола**, делая его неактивным.

В присутствии ацетил-СоА фермент переносит ацетильную группу на молекулу хлорамфеникола.

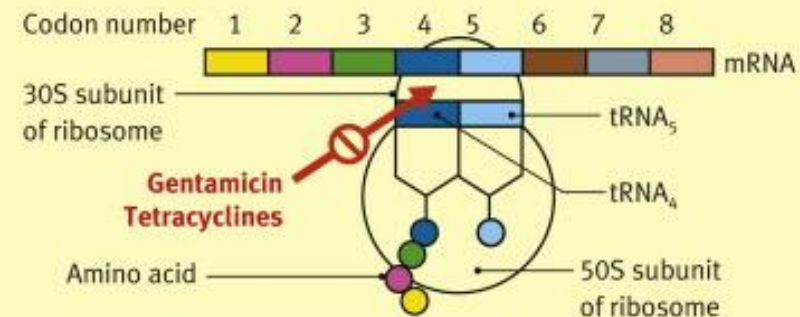


Чем это полезно?

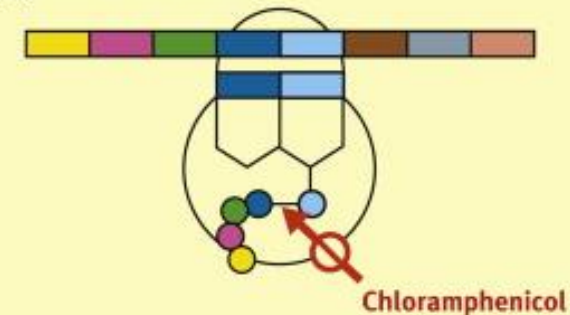
Уровень ацетилирования прямо пропорционален количеству фермента, а значит — силе экспрессии исследуемого гена/промотора.



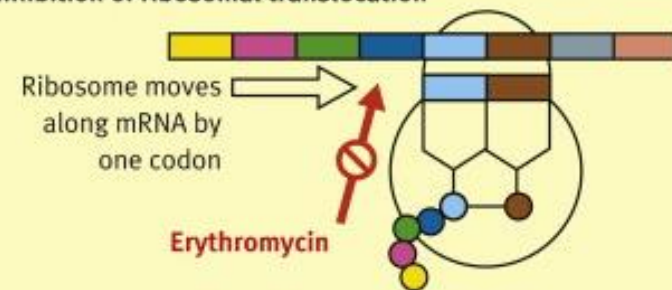
Impairment of function of 30S subunit of ribosome



Inhibition of peptide bond formation



Inhibition of ribosomal translocation



ЛИТЕРАТУРА

1. http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_1.htm
2. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия», Учебно-справочное пособие. 3-е изд. Новосибирск: СУИ, 2008 – 514 с
3. Жимулев И.Ф. «Общая и молекулярная генетика» учебное пособие. Новосибирск: СУИ, 2007.
4. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, NY.
5. Маниатис Т., Фрих Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.
6. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
7. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. Molecular Cell Biology. 9th edition. W.H. Freeman, 2021.
8. Ausubel F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 2002.

Дополнительно:

- 1. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051.
- 2. Sleight, M. J. (1986) A non-chromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in eucaryotic cells. Anal. Biochem. 156, 251-256.
- 3. Fowler, A. V. and Zabin, I. (1983) Purification, structure and properties of hybrid β -galactosidase proteins. J. Biol. Chem. 258, 14354-14358.
- 4. Gorman, D. R., Rossant, J., Clapoff, S., Breitman, M. L., and Tsui, L.-C. (1987) In situ detection of β -galactosidases in lenses of transgenic mice with a β -galactosidase/lacZ gene. Science 235, 456-458.
- 5. Shimohama, S., Rosenberg, M. B., Fagan, A. M., Wolff, J. A., Short, M. P., Breakefield, X. O., Friedmann, T., and Gage, F. H. (1989) Grafting genetically modified cells into the rat brain: characteristics of E Coli β -galactosidase as a reporter gene. Mol. Brain. Res. 5, 271-278.
- 6. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helsinki, D. R., and Subramaniam, S. (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 1, 725-737.
- 7. Brasier, A. R., Tate, J. E., and Habener, J. F. (1989) Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. BioTechniques 7, 1116-1122.
- 8. Nguyen, V. T., Morange, M., and Bensaude, O. (1988) Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. Anal. Biochem. 171, 404-408.