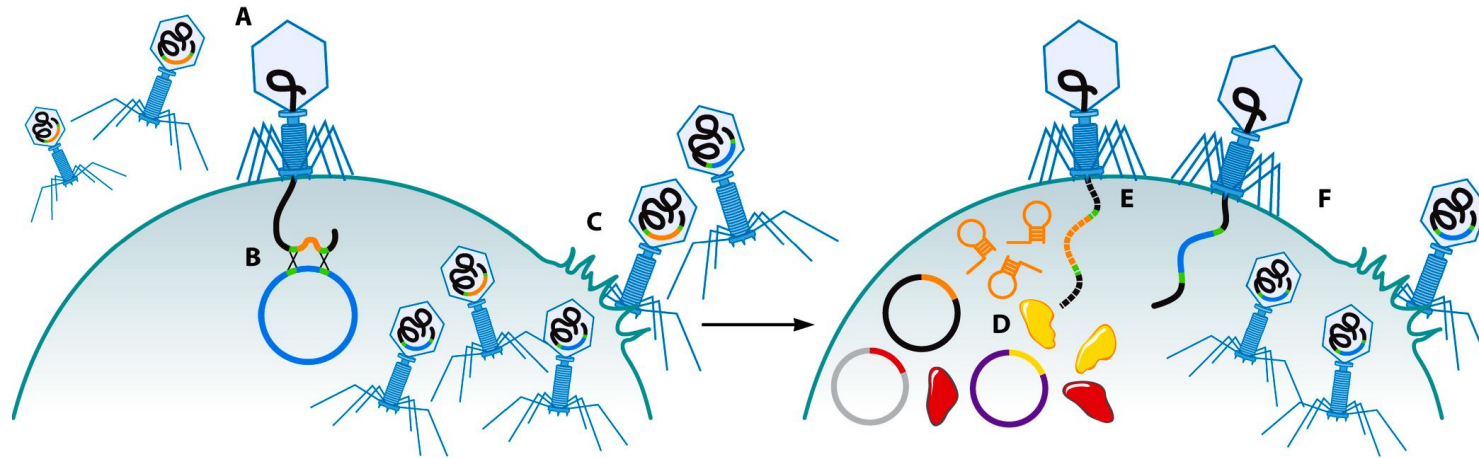


Метод конструирования рекомбинантных бактериофагов и фаговый дисплей.



Преподаватель: старший преподаватель
кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Сmekенов И.Т.

Дисциплина: Рекомбинация ДНК

(Лекция 9)

ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

- Изучить механизм трансдукции как способ горизонтального переноса генетического материала у бактерий.
- Рассмотреть принципы создания рекомбинантных бактериофагов.
- Познакомиться с технологией фагового дисплея и её применением в биотехнологии, медицине и исследовательской практике.

Задачи:

- ✓ Объяснять различие между обобщённой и специализированной трансдукцией.
- ✓ Описывать этапы конструирования рекомбинантных фагов (λ , M13, T7 и др.).
- ✓ Понимать, как реализуется фаговый дисплей и почему фаг используется как носитель пептидов/белков.
- ✓ Интерпретировать схему отбора (panning) фаговых библиотек для поиска лигандов, антител, пептидов.
- ✓ Приводить примеры практического применения:– получение нанотел и антител,– поиск рецептор–лиганда взаимодействий,– разработка диагностических и терапевтических молекул,– создание фаговых вакцин.

Ключевые термины

трансдукция, бактериофаг, обобщённая трансдукция, специализированная трансдукция, рекомбинантный фаг, фаговый дисплей, библиотека фагов, фаг M13, pIII/pVIII белок, panning, биопросеивание, селекция, экспонирование пептидов, нанотела, антитела, горизонтальный перенос генов.

- i. **Бактериофаги** — вирусы, инфицирующие бактерии, способные интегрировать свой генетический материал в бактериальный геном или использовать клетку-хозяина для репликации.
- ii. **Трансдукция** — это горизонтальный перенос генетического материала между бактериями посредством бактериофагов.
- iii. **Рекомбинантный фаг** — генетически модифицированный бактериофаг, в геном которого вставлены чужеродные гены или пептиды для их экспрессии на поверхности фаговых частиц.
- iv. **Фаговый дисплей** (phage display) — метод, при котором пептиды или белки экспонируются на поверхности фага и сохраняют связь с кодирующей их ДНК. Используется для отбора молекул с нужной специфичностью (например, антител или нанотел).
- v. **Библиотека фагов** — коллекция рекомбинантных фагов, каждый из которых экспрессирует на своей поверхности уникальный пептид или белок. Позволяет проводить скрининг миллионов вариантов одновременно.
- vi. **Фаг M13** — нитиформный бактериофаг, часто применяемый для фагового дисплея.
- vii. **Panning** (биопэнинг, биопросеивание) — процесс отбора фагов, связывающихся с целевым антигеном.
- viii. **Горизонтальный перенос генов** через трансдукцию играет важную роль в эволюции бактерий, распространении антибиотикорезистентности и патогенности.

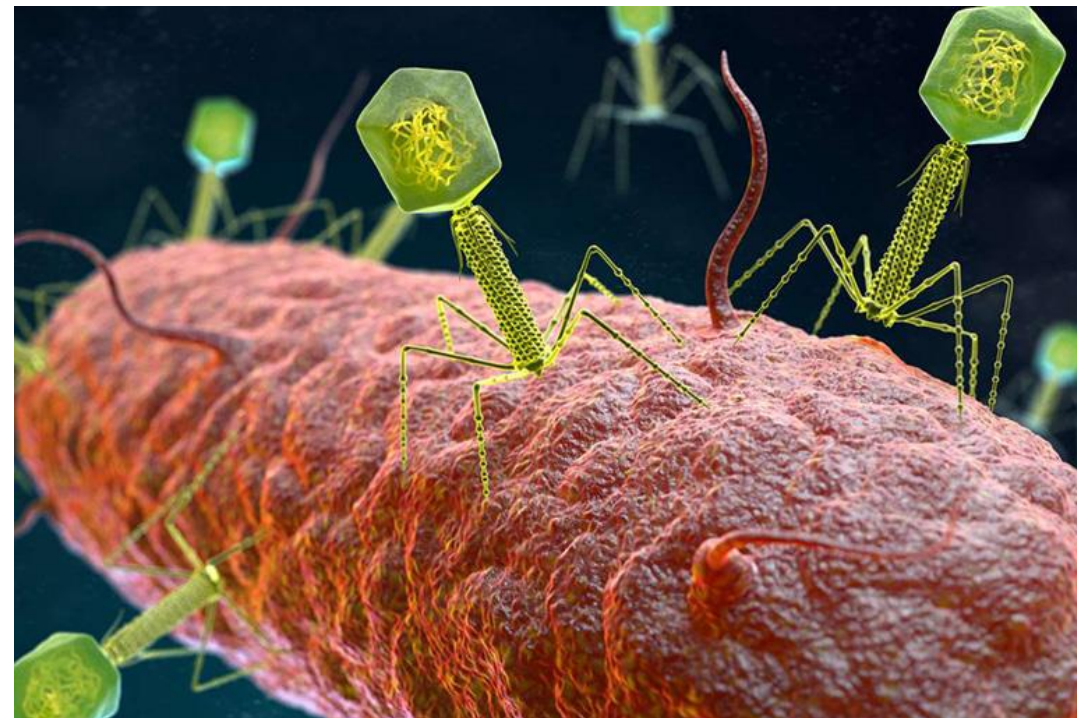


ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Что такое бактериофаг и каково его строение и жизненный цикл?
- 2) В чём состоит суть трансдукции как механизма горизонтального переноса генов?
- 3) Чем отличается обобщённая трансдукция от специализированной?
- 4) Как образуется рекомбинантный фаг и для чего он используется?
- 5) В чём заключается принцип метода фагового дисплея?
- 6) Какие белки фага M13 используются для экспонирования пептидов, и чем различаются pIII и pVIII?
- 7) Что такое библиотека фагов и как она создаётся?
- 8) Что означает термин rapping и какие этапы включает процесс биопросеивания?
- 9) Как осуществляется селекция фагов, несущих нанотела или антитела, специфичные к целевому антигену?
- 10) Какова роль фаговой трансдукции в горизонтальном переносе генов и эволюции бактерий?
- 11) Какие преимущества фагового дисплея по сравнению с другими методами отбора антител?

Бактериофаг или коротко **фаг** - это вирус, поражающий бактерии. Как и другие типы вирусов, фаги отличаются друг от друга не только по форме и величине, но и по химическому составу.

✓ Содержать от четырех до нескольких сотен генов



Основные направления использования бактериофагов в генной инженерии

1. Генетический перенос (трансдукция)

Фаги способны переносить участки бактериальной ДНК от одной клетки к другой.

Используется для:

- внесения новых генов в бактериальный геном,
- создания мутантных штаммов,
- изучения бактериальной регуляции и метаболизма.

◆ Пример: фаг P1 — для обобщённой трансдукции у *E. coli*.

2. Векторы для клонирования и экспрессии

Некоторые фаги модифицированы и используются как плазмидоподобные векторы.

Фаг	Особенности	Использование
λ-фаг	большой объём вставки (до 20 kb)	геномные библиотеки
M13	однократно-цепочечная ДНК, не разрушает клетку	секвенирование, фаговый дисплей
Фаг T7	высокая скорость экспрессии белков	экспрессия токсичных и крупных белков

3. Фаговый дисплей

Технология, при которой пептиды или белки экспонируются на поверхности фага (обычно M13).

Используется для:

- получения антител и нанотел,
- поиска пептид-лигандов и ингибиторов,
- направленной эволюции белков,
- разработки вакцин.

4. Создание фаговых библиотек

Фаги позволяют хранить огромные коллекции генетических вариантов (10^9 – 10^{11} клонов).

Применяются в:

- селекции антител,
- эволюционном отборе энзимов,
- исследовании белок–белковых взаимодействий.

5. Фаговые вакцины и терапия

Генно-инженерные фаги могут экспрессировать антигены патогенов → формировать иммунный ответ.

Примеры:

- фаги, экспонирующие антигены SARS-CoV-2, вируса гепатита В, сибирской язвы,
- терапевтические фаги с модифицированными лизинами.

6. Редактирование бактериальных геномов

Фаги используются как переносчики CRISPR-систем.

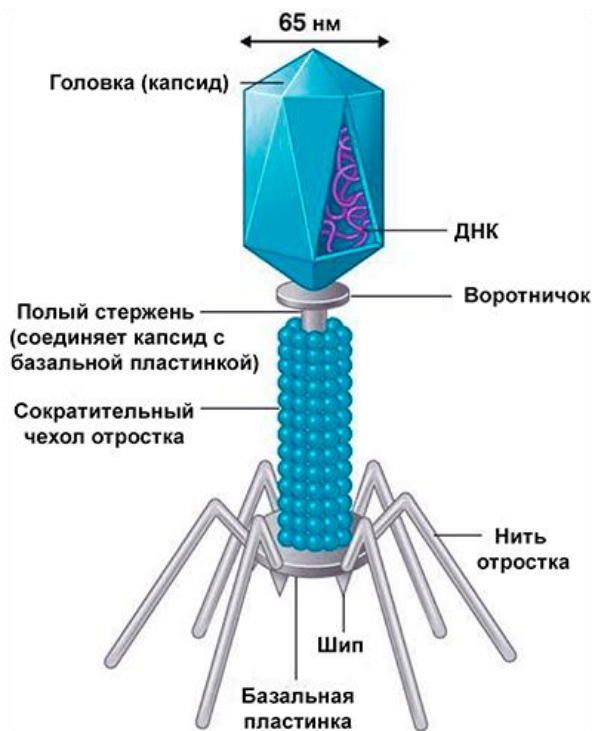
Пример:

фаговые частицы, доставляющие **CRISPR-Cas3** или **CRISPR-Cas9** для селективного уничтожения резистентных бактерий.

Бактериофаги имеют кубическую, нитевидную или форму головастика. Головка бактериофага содержит нуклеиновую кислоту (ДНК или РНК), заключённую в белковую оболочку.

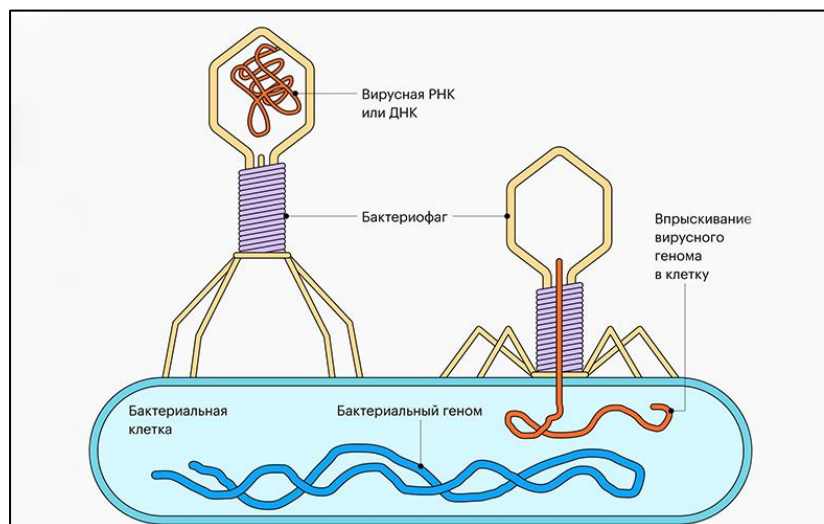
Ниже расположен хвостовой отросток, состоящий из внутреннего стержня и сократительного чехла.

Передвигается бактериофаг с помощью ножек-фибрилл, скреплённых в центре базальной пластиной. Размер бактериофага в сотни и тысячи раз меньше микробных клеток.

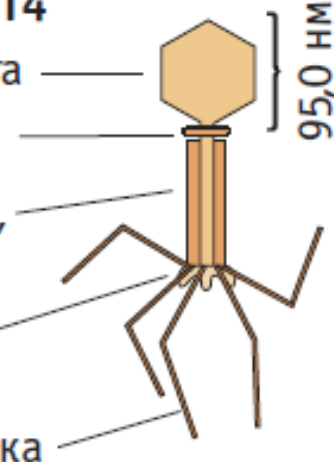


🔑 Преимущества фагов как инструмента

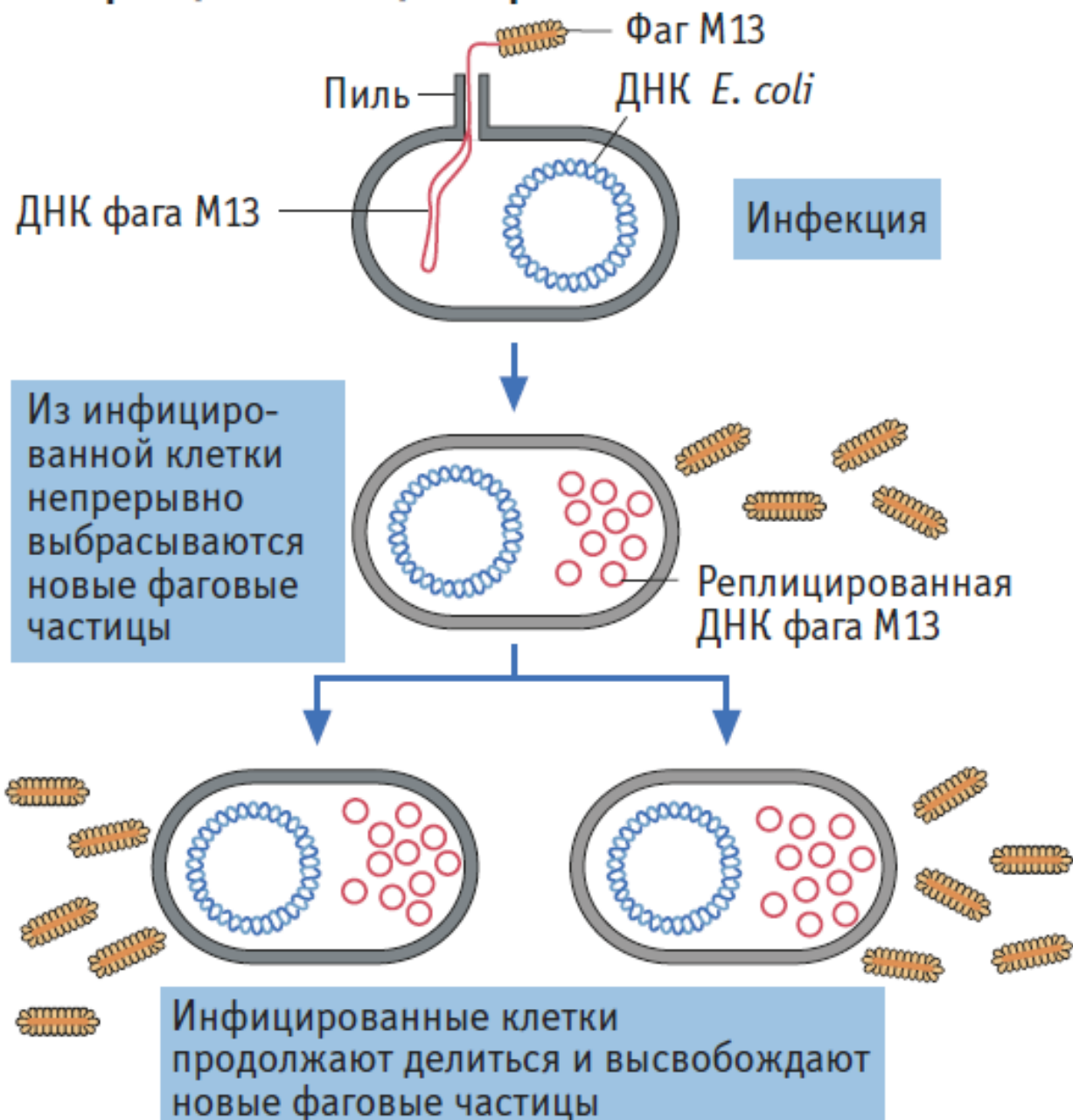
1. высокая специфичность к бактериальным клеткам,
2. возможность переносить большие фрагменты ДНК,
3. не требуют электропорации или химической трансформации,
4. высокая эффективность инфицирования,
5. могут производиться в больших количествах.



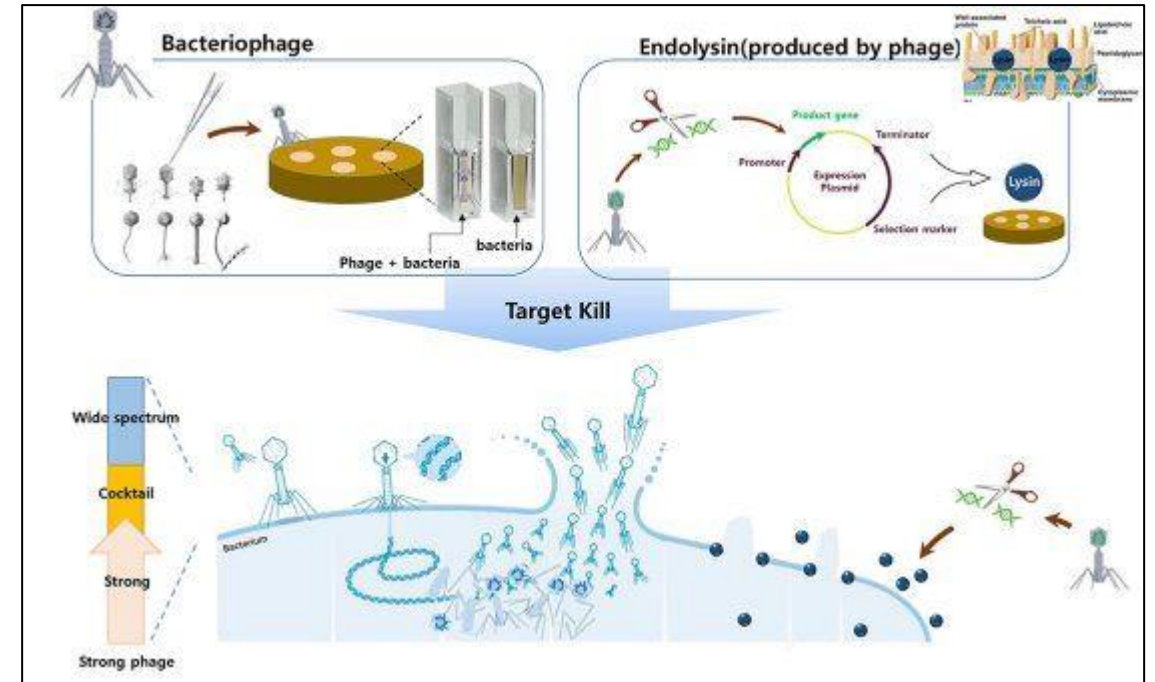
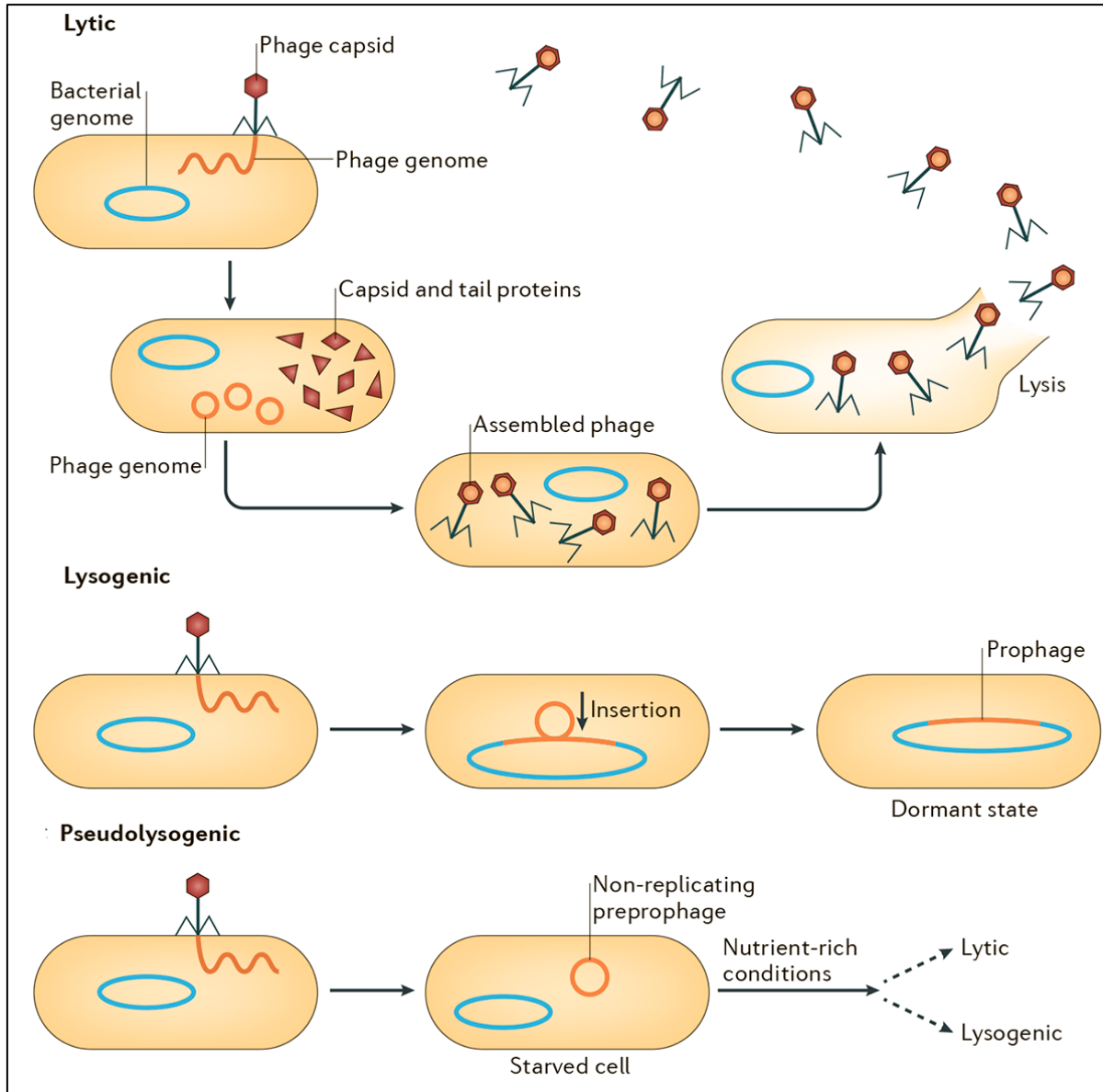
Некоторые фаги *Escherichia coli*

Название и форма фага	Генетический материал
Фаг T2 или T4  Головка фага Воротничок Хвост (ядро, оболочка) Базальная пластинка Нить отростка 95,0 нм	ДНК (двух-цепочечная)
Фаг λ 	ДНК (двух-цепочечная)
Фаг M13  6 нм 900 нм	ДНК (одно-цепочечная)
Фаг MS2 	РНК

Инфекционный цикл фага M13

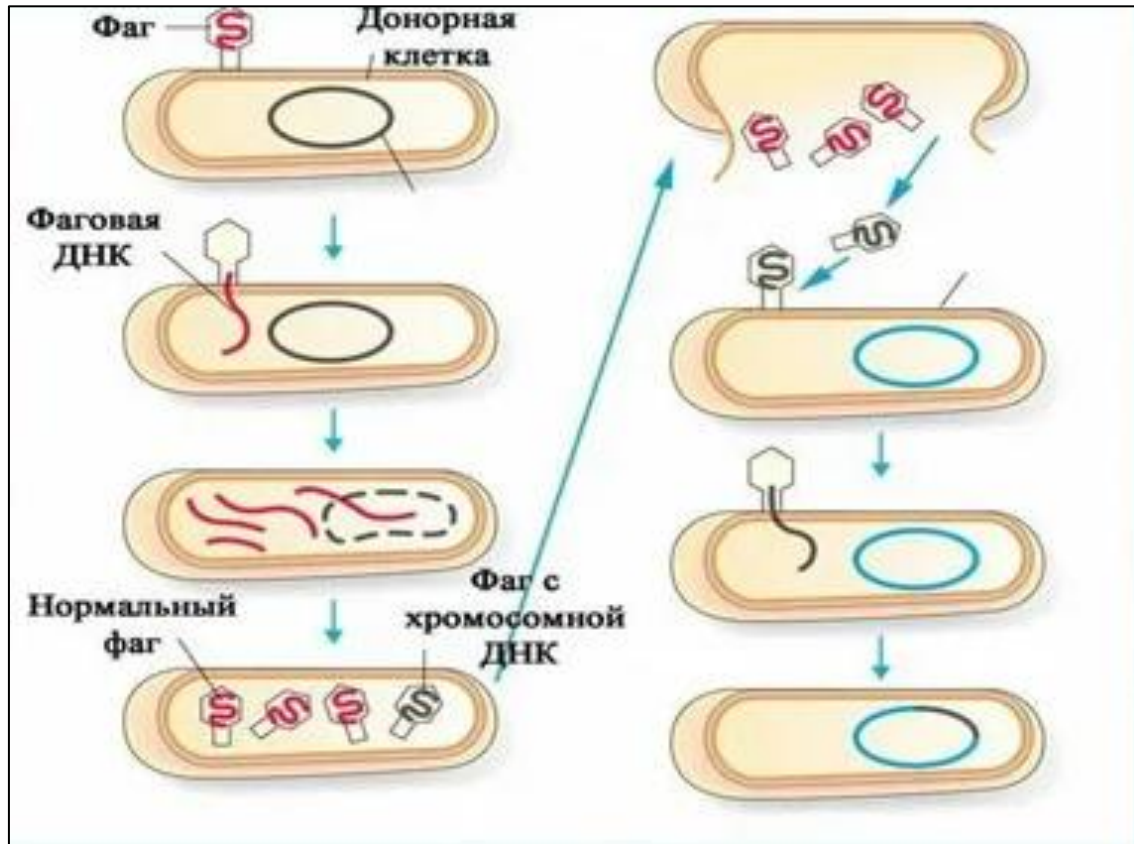


Жизненные циклы фагов

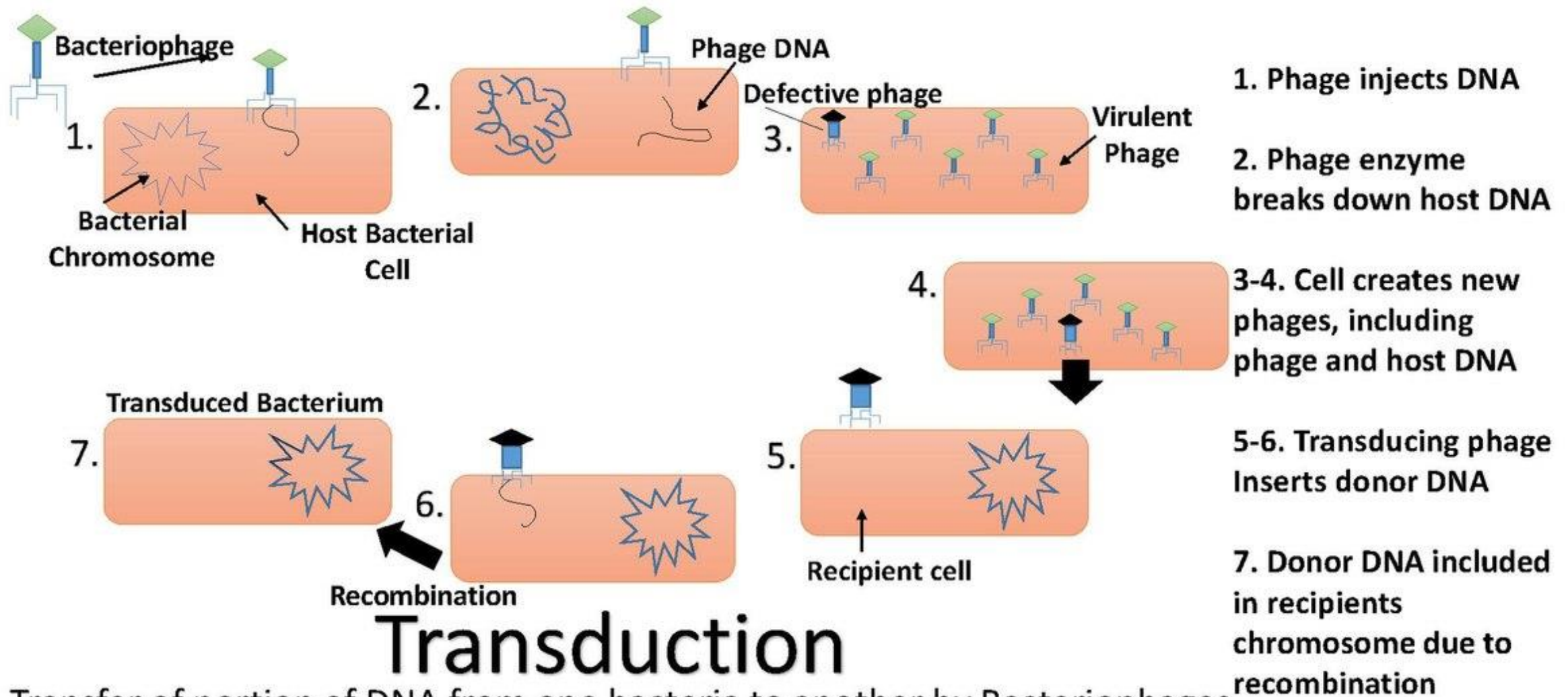


Использование бактериофагов (фагов) как препаратов против бактерий называется фаготерапией. Это альтернативный или дополняющий метод лечения бактериальных инфекций, основанный на способности фагов избирательно инфицировать и уничтожать бактерии, не затрагивая клетки человека и полезную микрофлору.

Трансдукция (от лат. transductio — перемещение), перенос генетического материала из одной клетки в другую с помощью *вируса*, что приводит к изменению наследственных свойств клеток-реципиентов.



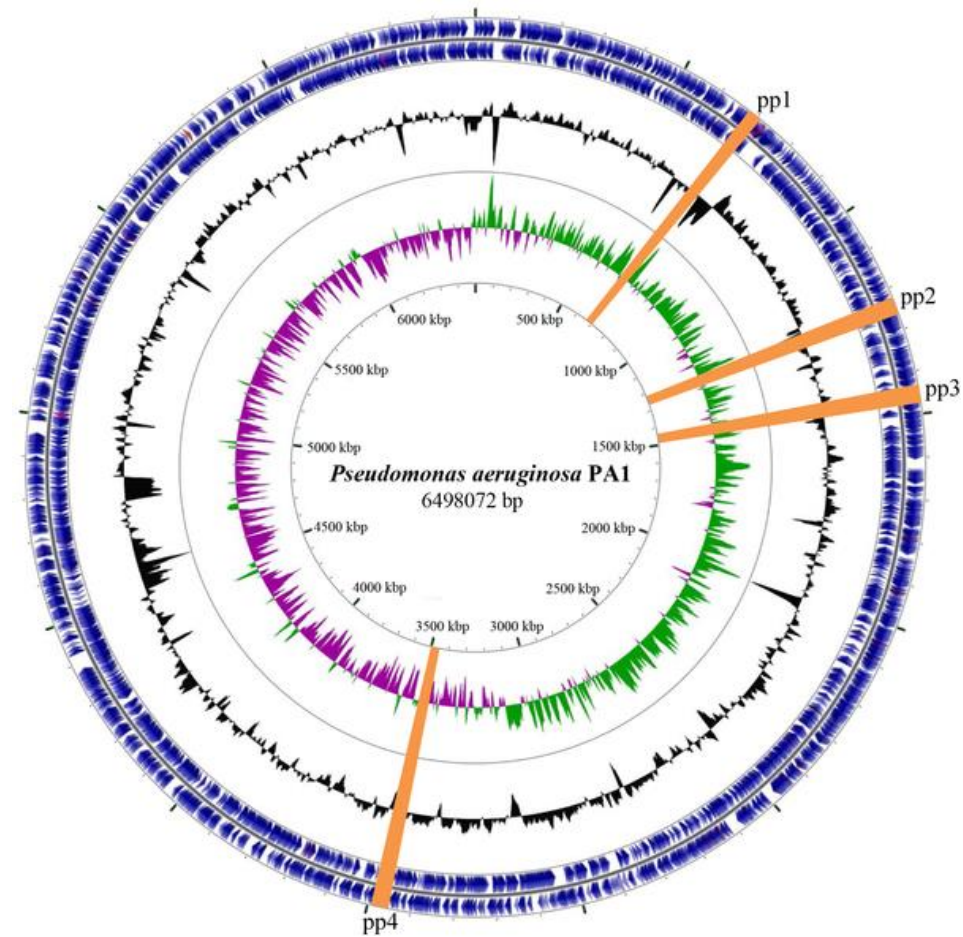
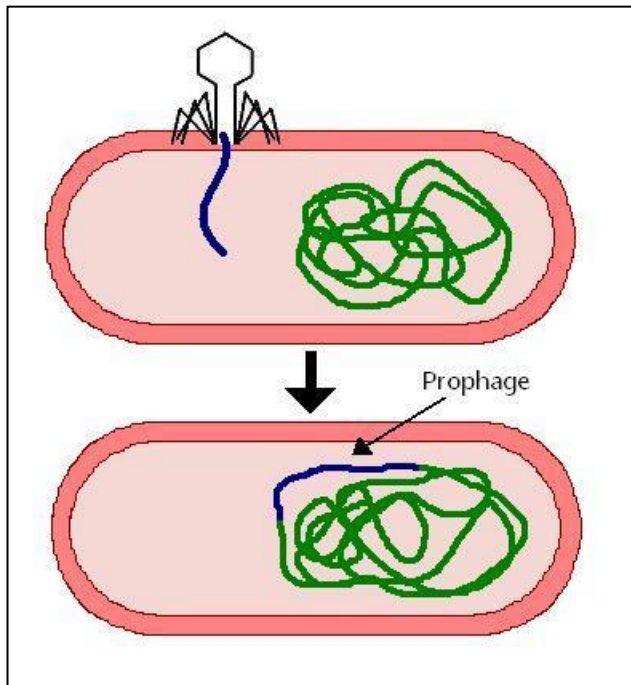
- Явление **Трансдукции** было открыто американскими учёными Д. Ледербергом и Н. Циндером в 1952.
- Особые **бактериальные вирусы** — умеренные фаги в процессе вегетативного размножения способны случайно захватывать и переносить в др. клетки любые участки ДНК лизируемых, то есть разрушаемых ими, бактерий. Длина переносимого (трансдуцируемого) отрезка ДНК определяется размером белковой оболочки фаговой частицы и обычно не превышает 1—2% бактериального генома.



Transduction

Transfer of portion of DNA from one bacteria to another by Bacteriophages

- Внесённый фрагмент может существовать в клетке в виде дополнительной генетического элемента, обладающего функциональной активностью. Поскольку такой фрагмент не способен воспроизводиться, при каждом клеточном делении он передаётся лишь в одну из дочерних клеток. За исключением этой клетки свойства всего остального потомства остаются без изменений.
- В дальнейшем фрагмент может быть либо разрушен, либо включен в хромосому бактерии, заменив в ней гомологичный участок ДНК. В последнем случае новые признаки, приобретённые клеткой-трансдуктантом, будут свойственны всему потомству этой клетки.



Интегрированная ДНК фага называется **профагом**. Она неактивна: ее гены не экспрессируются, и она не стимулирует выработку новых фагов. Однако, каждый раз, когда клетка-хозяин делится, ДНК фага копируется вместе с ДНК клетки-хозяина. Лизогенный цикл не такой явный (и менее "кровопролитный"), чем литический, но в итоге это просто еще один способ размножения фага.

Метод конструирования рекомбинантных бактериофагов

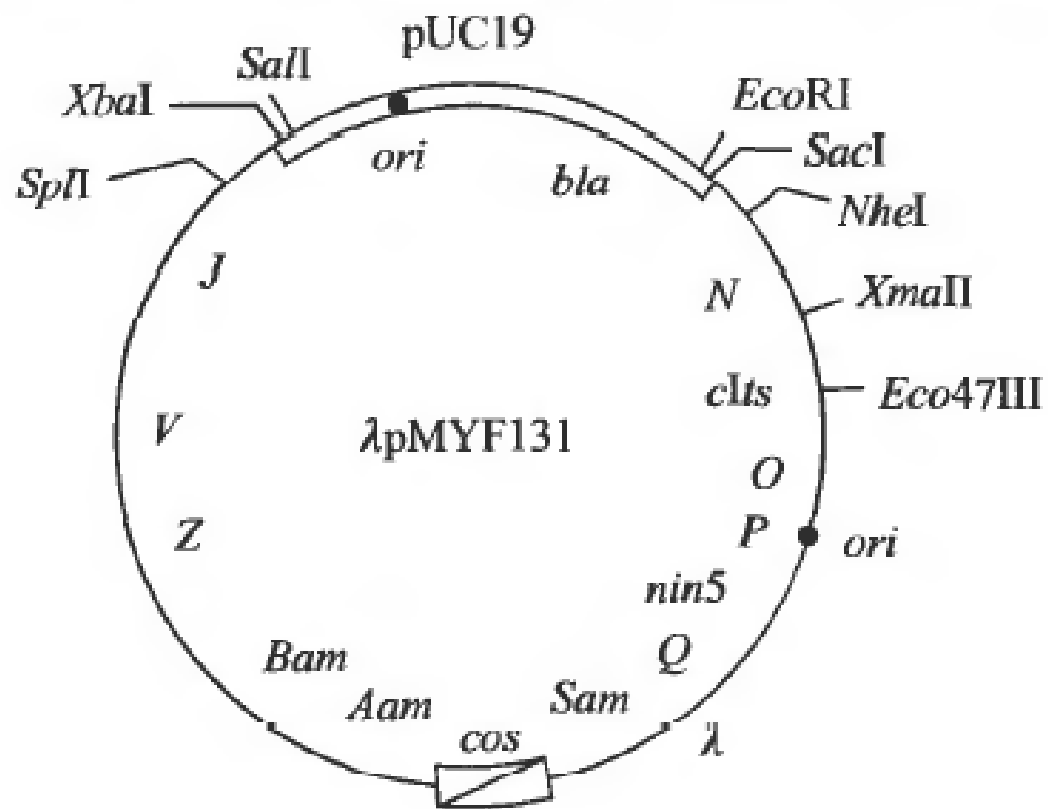


Рис. 2.24. Карта фазмиды λ pMYF131

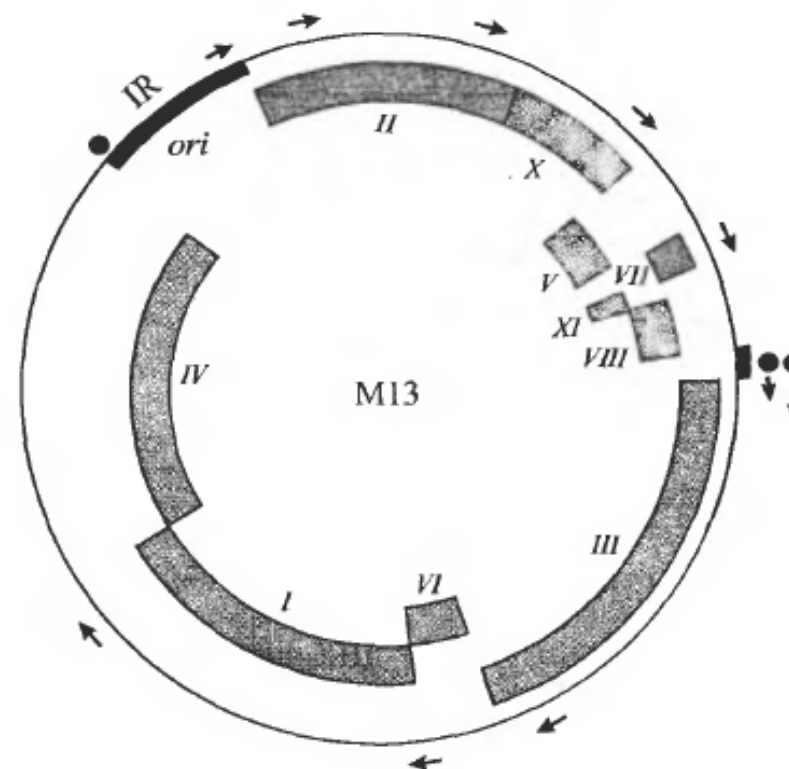
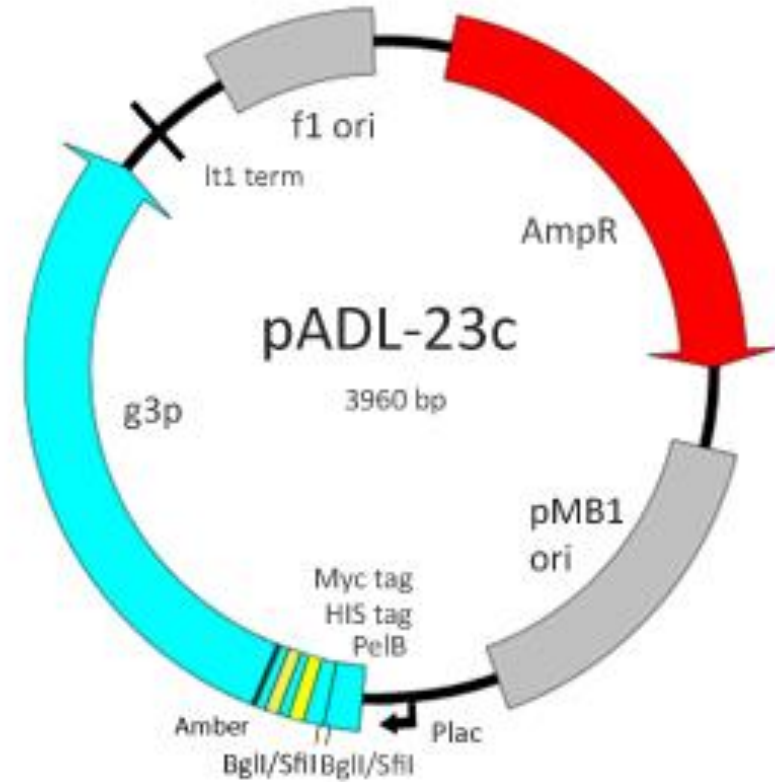
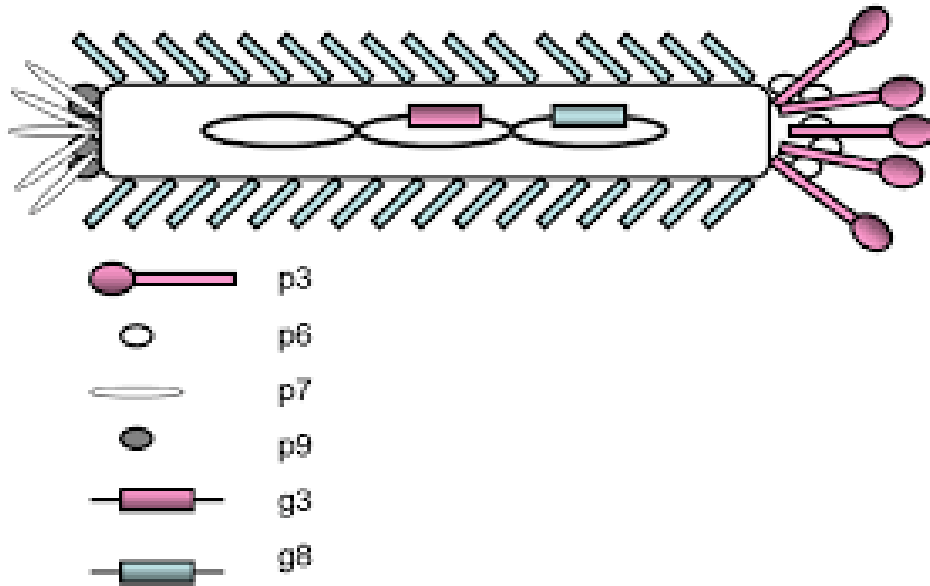


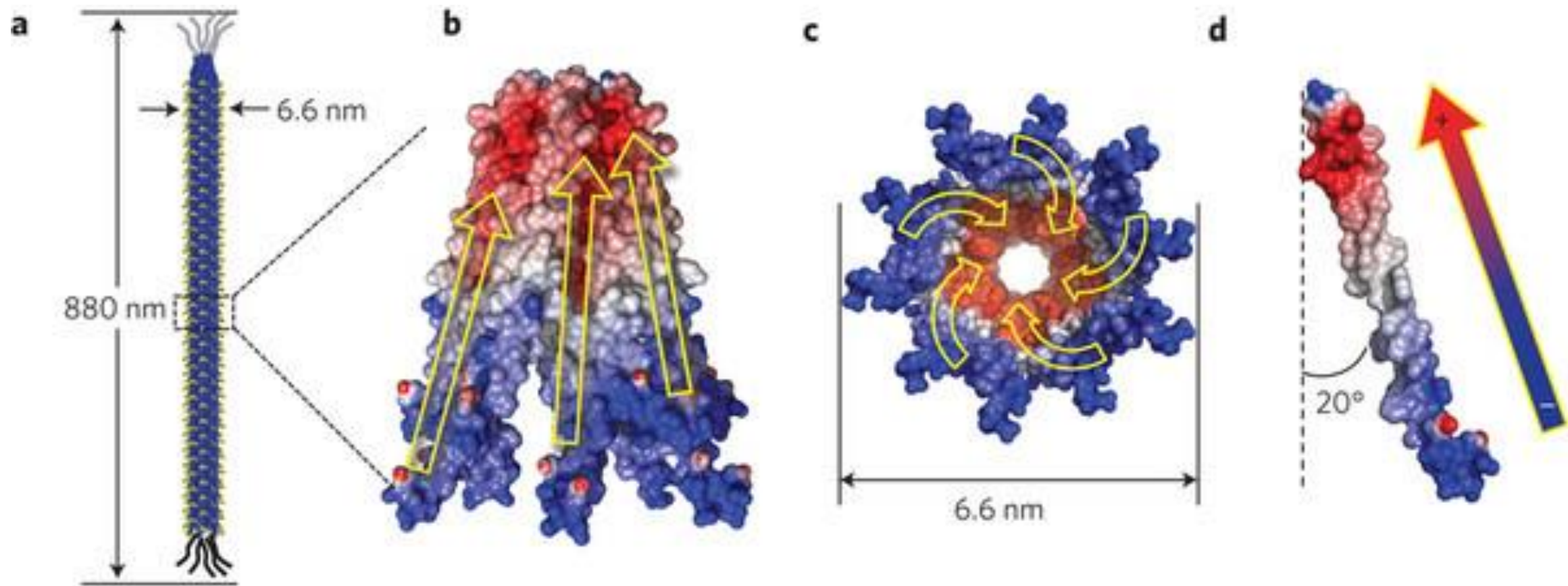
Рис. 2.26. Генетическая организация нитевидного фага M13.

Гены обозначены серыми блоками и римскими цифрами, межгенные области — черными блоками. Стрелками показаны промоторы и направление транскрипции, черными кружками — терминаторы транскрипции

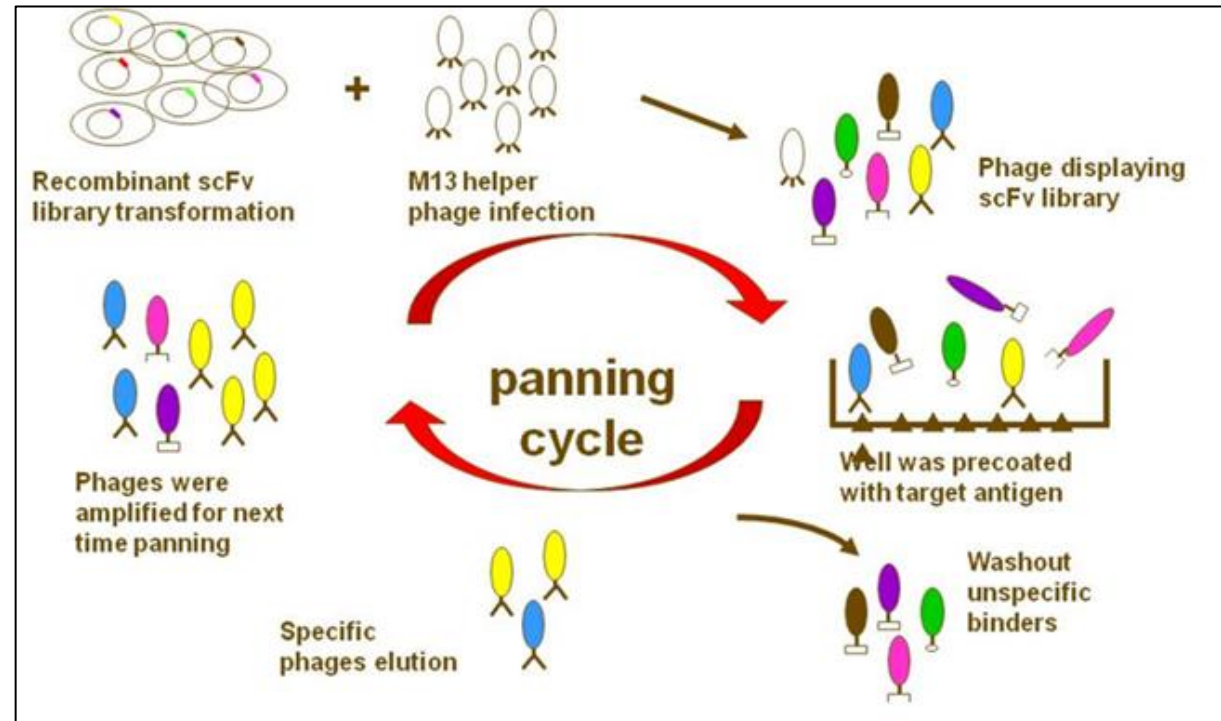
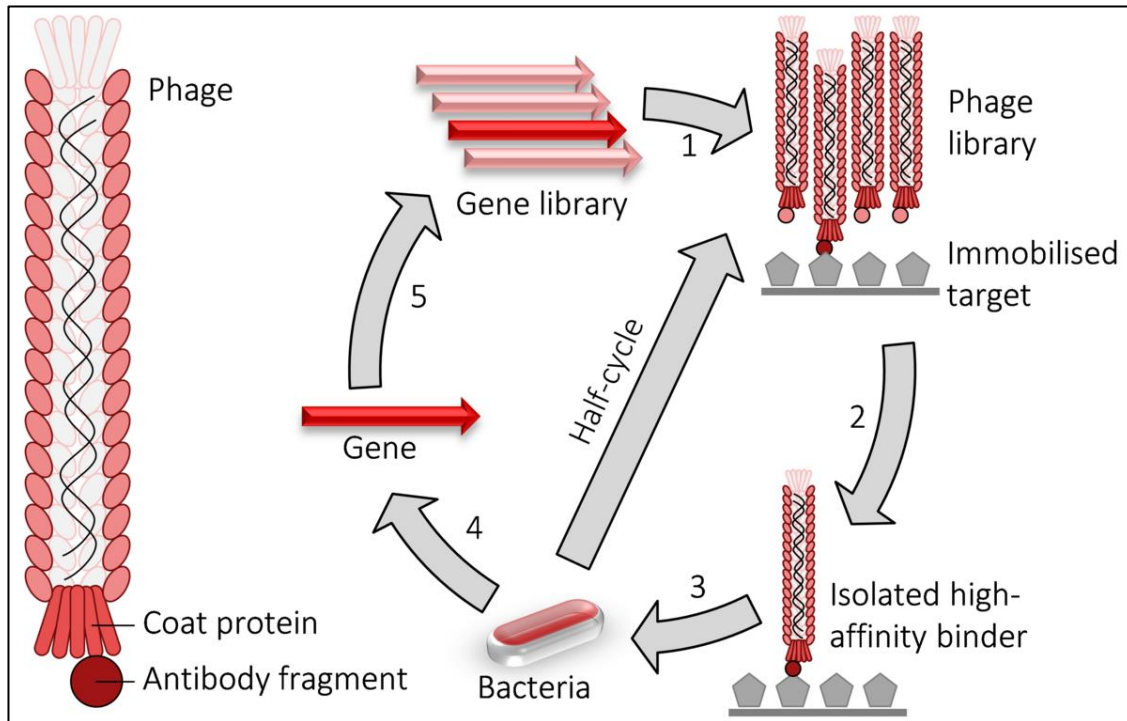
Фаговый дисплей



- **M13 – нитевидный бактериофаг**, состоящий из кольцевой одноцепочечной ДНК (ssDNA) длиной 6407 нуклеотидов, которая помещена в «чехол» из приблизительно 27 копий большого покровного белка Р8, а на концах покрыта 5 копиями различных малых покровных белков (Р9, Р6, Р3).
- Инфицирование нитевидным бактериофагом не летально, однако вызывает развитие стерильных пятен на газоне *E. coli*. Нитевидные фаги – группа невирулентных (нелитических) фагов, содержащих кольцевую одноцепочечную ДНК. Семейства Ff, M13, fd и f1 – это невирулентные фаги, используемые в методе фагового дисплея, из них M13 используется наиболее часто.
- Плазмиды M13 применяются во многих операциях с рекомбинантной ДНК. Кроме того, изучалось использование этого бактериофага в наноструктурах и нанотехнологиях.



- **Фаговый дисплей (phage display)** — это метод молекулярной биологии, при котором пептиды, белки или их фрагменты **экспонируются (представляются)** на поверхности бактериофага, обычно *M13*, *T7* или λ -фага. При этом ген, кодирующий белок, находится внутри фага, а его продукт — на поверхности капсида. Такая организация позволяет напрямую связывать **фенотип (белок)** с **генотипом (ДНК)**, что делает метод мощным инструментом для отбора молекул с заданными свойствами.



Область	Пример использования
Антитела и нанотела	получение гуманизированных антител, поиск высокоаффинных VHH
Поиск лигандов и ингибиторов	подбор пептидов к рецепторам, белкам опухоли, токсинам
Направленная эволюция белков	улучшение активности, стабильности, селективности ферментов
Диагностика и биосенсоры	создание специфичных маркеров и зондов
Разработка вакцин	экспозиция антигенов на фагах для стимуляции иммунитета
Изучение взаимодействий белок–белок	идентификация партнёров связывания

Суть метода

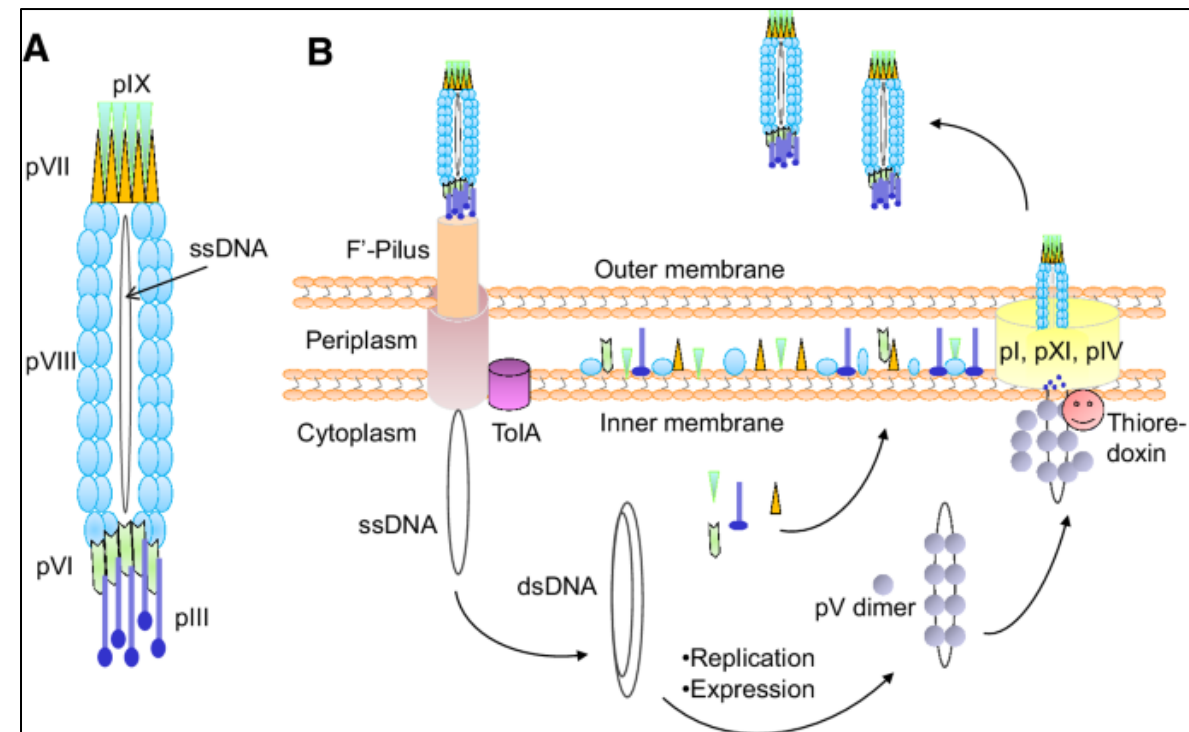
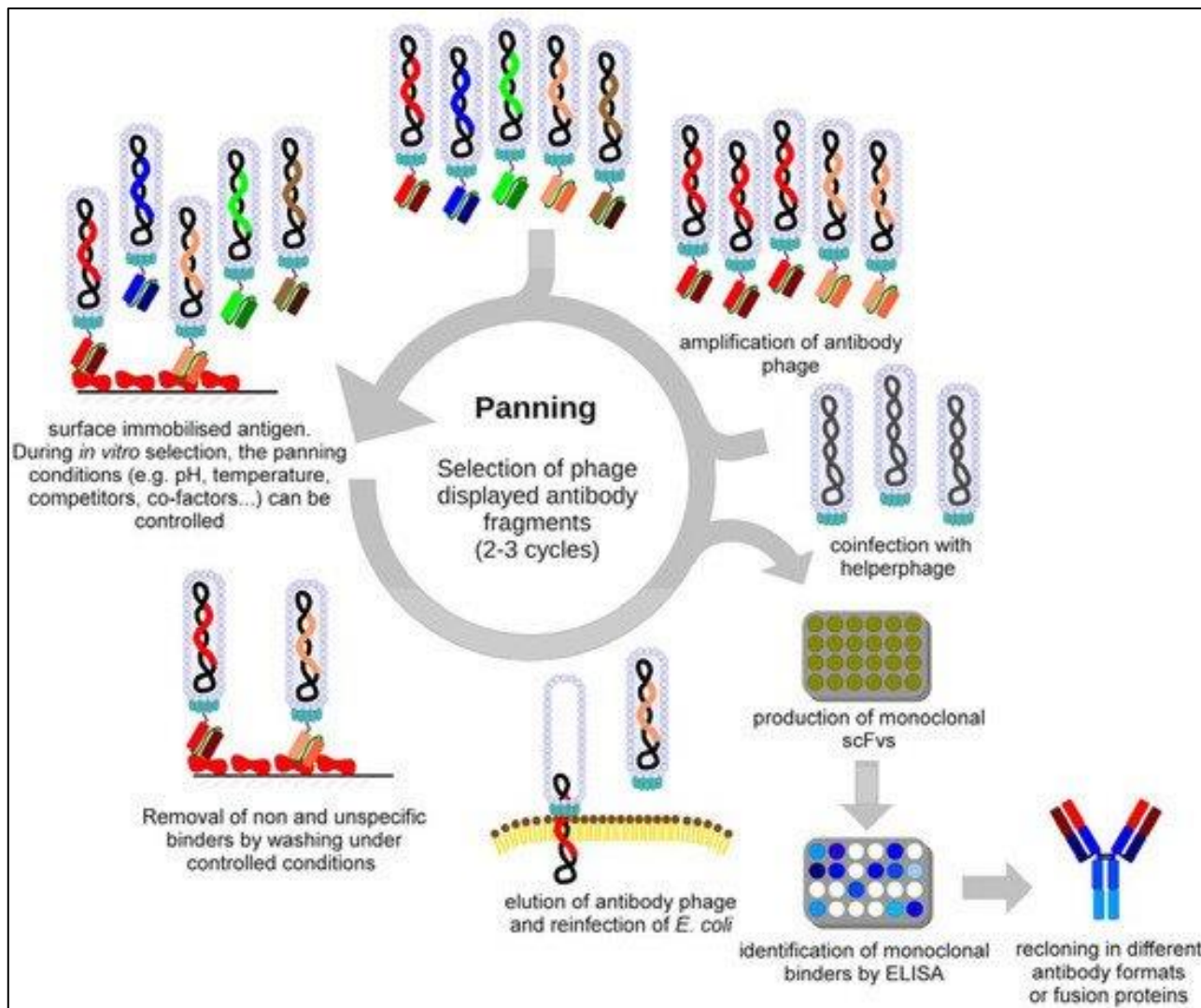
1. Создаётся **библиотека фагов**, где каждый фаг экспонирует на своей поверхности уникальный пептид/белок.
2. Библиотеку пропускают через мишень (например, антитело, рецептор, фермент).
3. Те фаги, которые связались с мишенью, **отбирают (panning)**.
4. Выжившие фаги размножают в бактериях, и цикл повторяют для усиления селекции.
5. В итоге получают клоны фагов, несущие **пептиды/белки с высокой аффинностью** к нужной мишени.

Преимущества метода

- ✓ Колоссальный размер библиотек (10^9 – 10^{11} вариантов)
- ✓ Прямая связь ген–фенотип
- ✓ Легкое масштабирование
- ✓ Возможность направленной эволюции (мутагенез + отбор)
- ✓ Относительная дешевизна и простота (по сравнению с клеточными системами)

Ограничения

- ✓ Не все белки могут корректно сворачиваться на поверхности фага
- ✓ Ограничения по размеру вставки (особенно в M13, pIII)
- ✓ Возможна «эволюция» фагов в сторону увеличения жизнеспособности, а не нужного связывания
- ✓ Нужна оптимизация условий panning (жесткость отмывки, блокирование фона и т.д.)



Фаг M13 — это филаментозный бактериофаг, инфицирующий *Escherichia coli* штаммы, содержащие F-плазмиду (F⁺ клетки). Его особенность — нелитический цикл репликации: он не разрушает бактериальную клетку, а выходит из неё путём секреции, сохраняя жизнеспособность и деление клетки-хозяина.

Этапы секреции фага: 1) **Прикрепление к клетке** - Белок pIII фага связывается с F-пили *E. coli* → ДНК фага проникает внутрь клетки. 2) **Репликация генома** - Фаговая ssDNA превращается в двуцепочечную репликативную форму (RF), затем по механизму rolling circle синтезируется новая ssDNA. 3) **Сборка фага** - Новая одноцепочечная ДНК связывается с белком pV и направляется к мембране. 4) **Экструзия (секреция) через мембрану** - Сборка фага происходит во время выхода через клеточную оболочку, без лизиса.

Phage plasmid



Ab DNA library

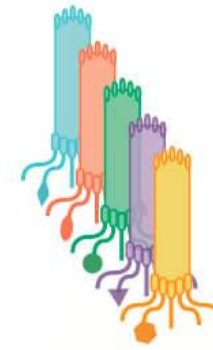


Recombinant
phagemid

E. coli



Amplify



Phage
display library



**Antibody
Production**



**Drug
Discovery**



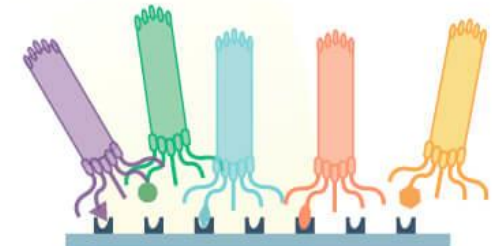
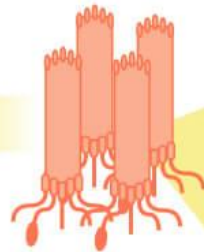
Diagnostics

2-3 Rounds

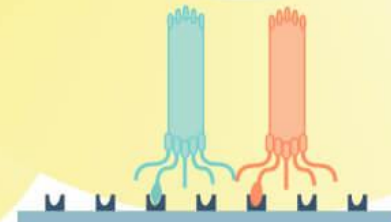


Eluting

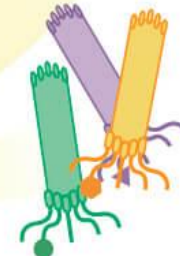
High affinity mAb



Affinity screening



Binding and Wash



Weak
affinity Abs

ЛИТЕРАТУРА

1. **Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки.** В 3-х томах. 4-е издание. Москва: Мир; Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2013.
2. **Сингер М., Берг П. Гены и геномы.** В 2-х томах. Москва: Мир, 1998.
3. **Филдс Б. Н., Найп Д. М., Каслмен У. и др. Вирусология.** В 3-х томах. Перевод с англ. под редакцией В. И. Бухтиярова, А. А. Смородинцева. Москва: Мир, 1989.
4. **Smith G. P., Petrenko V. A. Phage Display.** In: **Encyclopedia of Life Sciences (eLS).** John Wiley & Sons, Ltd, 2013. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000452.pub3.
5. **Марков А. В. Рождение сложности: Эволюционная биология сегодня: неожиданные открытия и новые вопросы.** Москва: Астрель: CORPUS, 2010.