

Лекция 7

Способы генетического конструирования штаммов-продуцентов *in vitro*

Энзимология генетической инженерии. Векторы и способы их введения в клетку. Дрожжевые векторы.

Векторная система грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*. Клонирование плазмидных векторов. Молекулярные векторы на основе ДНК фага лямбда. Космиды. Искусственные бактериальные хромосомы. Фазмиды. Клонирование векторов на основе нитевидных фагов. Фагмиды. Векторные плазмиды, обеспечивающие прямой отбор гибридных ДНК. Векторы, обеспечивающие экспрессию чужеродных генов в клетках *E.coli*. Векторы *E.coli*, детерминирующие секрецию чужеродных белков.

Генно-инженерная система грамположительных бактерий. Введение молекул ДНК в клетки *Bacillus*. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий. Трансформация компетентных клеток. Универсальные методы введения плазмид. Трансфекция. Молекулярные векторы *Bacillus*. Векторные плазмиды, реплицирующиеся в *B. Subtilis* и в *E.coli*. Плазмидные интегративные векторы. Фаговые векторы.

Генно-инженерная система иных грамположительных бактерий. Бактерии рода *Streptococcus*. Бактерии рода *Streptomyces*. Коринеформные бактерии.

Конструирование *in vitro* преследует целью создание клеточных клонов, несущих рекомбинантные молекулы ДНК с заданными свойствами. Для создания таких организмов разработаны специальные методы манипулирования генами *in vitro*. Основными инструментами генно-инженерных манипуляций являются:

- 1) ферменты, действующие на ДНК;
- 2) векторы на основе плазмид и фагов;
- 3) искусственные олигонуклеотиды (линкеры, адаптеры, праймеры, промоторы, зонды и т. д.), с помощью которых объединяют, синтезируют, обнаруживают и анализируют гены.

7.1 ЭНЗИМОЛОГИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Наиболее важными ферментами, используемыми в генной инженерии, являются специфические эндонуклеазы (рестриктазы), ДНК-лигазы и ДНК-полимеразы.

7.1.1 Рестриктазы

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) являются компонентом ферментативных систем рестрикции-модификации бактериальной клетки, основной функцией которых является защита резидентной ДНК от внедрения чужеродной. В настоящее время системы рестрикции-модификации, охарактеризованные в 1968 г. В. Арбером, обнаружены практически у всех исследованных бактерий и некоторых дрожжей.

В соответствии с современной номенклатурой (предложена в 1973 г. американцами Х. Смитом и Д. Натансом) различают три основных класса рестриктаз: I, II и III. Название фермента определяется первой буквой рода и двумя первыми буквами вида микроорганизма, из которого выделили фермент. Например, рестриктазы, выделенные из штаммов *E. Coli*, обозначаются как Eco, рестриктазы, выделенные из *B. subtilis* – Bsu, из *S. Aureus* – Sau и т. д. Если гены системы рестрикции располагаются на плазмиде или фаге, то после родового названия указывается символ соответствующего внехромосомного элемента. Например, EcoRI, EcoPI. Все рестриктазы узнают на двухцепочечной молекуле ДНК строго определенные нуклеотидные последовательности, однако разрезают ДНК в различных сайтах.

Рестриктазы I порядка (типа EcoK и EcoV, выделенные из штаммов *E. Coli K* и *E. Coli B*) представлены одним ферментом, состоящим из трех субъединиц и обладающим тремя активностями: рестрикционной, метилирующей и сенсibilitивной, ответственной за узнавание сайта-мишени ДНК. Активности R и M взаимно исключают друг друга. Сайт узнавания рестриктаз I порядка представлен короткой двусторонней последовательностью. Сайт рестрикции – неспецифическая последовательность оснований, расположенная на расстоянии 400-7000 пар нуклеотидов от сайта узнавания. Такие рестриктазы режут ДНК в произвольных точках и образуют сплошной спектр рестриктов. Эти рестриктазы в генной инженерии не используются, поскольку с их помощью невозможно получить фрагменты ДНК заданных размеров.

Рестриктазы III порядка (EcoP1, EcoP15) также представлены одним ферментом, состоящим из двух субъединиц. Одна субъединица ответственна за рестрикцию, другая – за модификацию и узнавание сайта-мишени ДНК. Сайт узнавания – несимметричные последовательности из 5-6 пар оснований. Сайт рестрикции отделен от участка узнавания на расстоянии 24-27 пар нуклеотидов. При рестрикции образуются фрагменты с одноцепочечными 5' концами длиной 2-3 нуклеотида. Для этих рестриктаз характерно то, что система рестрикции и модификации включаются одновременно и конкурируют за субстрат реакции.

Рестриктазы II порядка представлены двумя отдельными белками, один из которых выполняет функцию рестрицирующей эндонуклеазы, а другой – модифицирующей метилазы. Поэтому можно выделить отдельный фермент, который будет обладать только эндонуклеазной активностью. Рестриктазы II порядка узнают и разрезают немодифицированную двухцепочечную молекулу ДНК по специфическим нуклеотидным последовательностям. Сайт узнавания для этих рестриктаз – короткая последовательность нуклеотидов, имеющая ось симметрии 2-го порядка – палиндром. Наиболее часто используются рестриктазы, узнающие гекса- и тетрануклеотидные палиндромы.

Примеры таких рестриктаз – EcoRI (GAATTC) и MboI (GATC). Обнаружено, что ферменты, выделенные из различных микроорганизмов, могут узнавать одну и ту же последовательность нуклеотидов. Такие рестриктазы были названы изошизомеры. Однако такие рестриктазы могут по-разному расщеплять молекулу ДНК. Ферменты, выделенные из различных микроорганизмов, узнающие одну и ту же последовательность нуклеотидов и одинаково ее расщепляющие называются истинными изошизомерами.

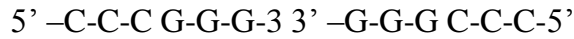
Некоторые из применяемых в генно-инженерной практике рестриктаз II порядка приведены в табл. 1.

Таблица 1

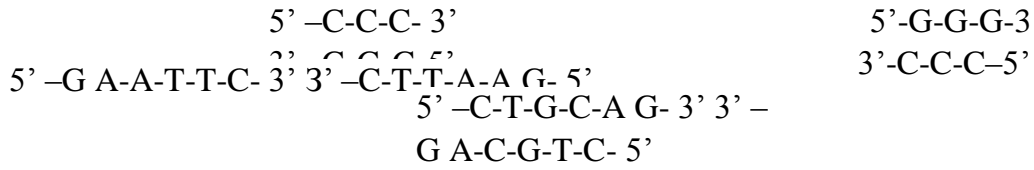
Некоторые рестриктазы, используемые в генетической инженерии

Фермент	Сайт узнавания
E ^h R I	C A-A-T-T-C
Bat H I	G G-A-T-C-C
Mbo I	GATC
Pst I	C-T-G-C-A ^u
Pvu II	C-A-G C-T-G
Hpa I	C-T-T A-A-C
Hae III	G-G C-C
Not I	G C-G-G-C-C-G-C-
Bgl II	A G-A-T-C-T
Hind III	A A-G-C-T-T
Kpn I	G-G-T-A-C C
Sal I	G T-C-G-A-C
Sma I	C-C-C G-G-G
Xho I	C T-C-G-A-G
Xma I	C C-C-G-G-G
EcoR V	G-A-T A-T-C

Рестрикция происходит либо в пределах сайта узнавания, либо очень близко от него. По способу разрыва цепей ДНК различают два типа рестриктаз. Если рестриктазы разрезают двухцепочечную ДНК строго по оси симметрии последовательности сайта узнавания, то образуются фрагменты с «тупыми» концами.



SmaI



Если рестриктазы разрезают двухцепочечную ДНК не по оси симметрии, то тогда образуются «липкими» концами, т. е. с выступающими (5'-NNNCTGCA-3', 5'-GNNN-3') или «липкими» концами (3'-NNNG-5', 3'-ACGTCNNN-5') или 3' (PstI) концами.

PstI

или 3' (PstI) концами.

Размер сайта узнавания рестриктазы определяет частоту встречаемости этой последовательности в ДНК. Чем меньше нуклеотидов включает сайт узнавания, тем чаще он будет встречаться в последовательности ДНК. Так, например, рестриктаза Mbo I имеет сайт узнавания из четырех нуклеотидов. Эта последовательность будет очень часто встречаться в ДНК и поэтому при рестрикции ДНК рестриктазой Mbo I будет образовываться большое количество мелких фрагментов. Такие рестриктазы были названы мелкощепящими. Рестрикты, полученные при разрезании ДНК ферментами, узнающими гексануклеотидную последовательность, например, EcoR I, имеют средний размер. Поэтому такие рестриктазы называют среднещепящими. К крупнощепящим рестриктазам относятся ферменты, имеющие сайт узнавания большой протяженности, такие как Not I. Для получения вставок большего размера обычно используют либо неполный гидролиз ДНК мелкощепящей рестриктазой, либо рестрикцию крупнощепящей рестриктазой.

7.1.2 Модифицирующие метилазы

Сайт-специфические метилазы используют для модификации сайтов узнавания с целью защиты их от действия рестриктаз. Достаточно модифицировать одну нить ДНК, чтобы придать сайту узнавания устойчивость в отношении рестриктазы. Молекулярный механизм действия метилаз заключается в переносе метильных групп с S-аденозил-L-метионина на определенные остатки цитозина или аденина в сайтах узнавания, в результате чего соответствующие рестриктазы не могут связаться с ДНК в этих модифицированных сайтах и осуществить ее рестрикцию. Метилазы разделяют на те же классы, что и соответствующие им рестриктазы. Метилазы II класса используют для модификации *in vitro* сайтов узнавания для невозможности осуществления реакции рестрикции соответствующими рестриктазами.

7.1.3 Полимеразы

ДНК-полимераза I обладает тремя активностями:

- 5'-3'-полимеразная активность обуславливает синтез цепи ДНК. Субстратом служит одонитевая матрица ДНК.
- 5'-3'-экзонуклеазная активность, вызывающая отщепление нуклеотидов от свободного 5'-Р-конца. Субстратом реакции служит двухнитевая ДНК.
- 3'-5'-экзонуклеазная активность, обеспечивающая отщепление со свободного 3'-ОН-конца. Субстратом служит как одно-, так и двухнитевая молекула ДНК, причем на двухнитевой ДНК эта активность подавляется полимеразной активностью фермента.

ДНК-полимераза I одновременно может вести реакцию полимеризации и гидролиз нуклеотидной цепи в направлении 5'-3' (процесс носит название ник-трансляции). При этом ник перемещается вдоль цепи ДНК в направлении 5'-3', что используется для введения радиоактивной метки *in vitro*.

В генной инженерии часто используется большой так называемый «кленовский» фрагмент ДНК-полимеразы I, у которого сохранены только полимеразная и 3'-5'-экзонуклеазная активность. Кленовский фрагмент используют:

- для заполнения нуклеотидами выступающих однонитевых 5'-концов, которые образуются при разрезании ДНК соответствующими рестриктазами;
- для введения радиоактивной метки в концы фрагментов ДНК;
- для введения радиоактивной метки в рестрикты с ровными концами. В этом случае используется свойство полимеразы отщеплять 3'-концевой нуклеотид и подставлять из реакционной среды новый, если он присутствует в избытке;

- для синтеза второй нити кДНК;
- для определения последовательности нуклеотидов в ДНК по методу Сэнгера;
- для сайт-специфического мутагенеза ДНК.

• ДНК-полимераза фага T4. Этот фермент обладает теми же активностями, что и «кленовский» фрагмент. Однако обнаружено, что у него 3'-5'-экзонуклеазная активность более выражена, чем у «кленовского» фрагмента. Поэтому для введения метки в рестрикты с «тупыми» и выступающими однонитевыми 3'-концами лучше использовать именно этот фермент.

- ДНК-полимераза фага T7. Фермент обладает 5'-3'-полимеразной активностью и 3'-5'-экзонуклеазной активностью. В состав фермента входит тиоредоксин, который увеличивает процессивность полимеразы почти в 1000 раз за счет повышения стабильности комплекса фермент-матрица. Благодаря этому фермент используют для копирования относительно длинных матриц. Для секвенирования ДНК по методу Сэнгера используют полимеразу, у которой экзонуклеазная активность подавлена (секвеназы).

- Таq-полимераза. Этот фермент выделен из термофильных бактерий *Thermits aquaticus*, поэтому он термостабилен и способен реплицировать ДНК при 74 °С. Таq-полимераза сохраняет половину своей функциональной активности после прогрева при 95 °С в течение одного часа. Она используется при ПЦР, а так же как секвеназа.

- РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза). Этот фермент состоит из двух субъединиц. РНК-зависимая ДНК-полимераза синтезирует ДНК на РНК- и ДНК-матрицах. Обратную транскриптазу *in vitro* используют для синтеза кДНК (комплементарной цепи). При этом получают полноразмерной копии гена ДНК с мРНК. В качестве праймера используют олигонуклеотид поли (ёТ), комплементарный полиадениловой цепочке на 3'-конце мРНК.

- Олигонуклеотид должен включать не менее 12 звеньев. Реакция проходит с образованием однонитевой петли на 3'-конце, которая служит праймером для синтеза второй нити ДНК. Полимеризацию ведут последовательно «кленовским» фрагментом ДНК- полимеразы I и обратной транскриптазой. Затем с помощью нуклеазы гидролизуют петли и получают двухцепочечную молекулу.

С помощью обратной транскриптазы можно синтезировать копию любой части мРНК, выбрав для этого подходящий праймер. Эта возможность облегчает анализ строения какого-либо специфического участка гена. Но можно получить и набор генных фрагментов, если использовать в качестве праймеров произвольные олигонуклеотиды. Их разнообразие столь велико, что среди них имеются комплементарные последовательности к любому из участков мРНК. Добавление в реакционную смесь таких праймеров дает возможность получить в наборе ДНК копии всех участков анализируемого гена, что дает возможность для использования их в качестве гибридизационных зондов.

Поли(А)-полимераза. Этот фермент способен образовывать на 3'-конце любых однонитевых молекул РНК полиадениловые цепочки длиной до нескольких тысяч звеньев.

Он также способен добавлять к РНК полицитидиловые и полиуридиловые цепочки, но с гораздо меньшей эффективностью. Полимеразу используют для подготовки РНК в качестве матрицы при синтезе ДНК, а также для введения в РНК 3'-концевой метки.

РНК-полимеразы фагов. РНК-полимеразы фагов Т3 и Т7 и др. высокоспецифичны. На молекулах ДНК они узнают только «свои» промоторы и синтезируют только определенные молекулы мРНК. Это свойство РНК- полимераз фагов используют для приготовления меченых гибридизационных зондов и полноразмерных транскриптов для синтеза белков *in vitro*.

7.1.4 Лигазы

ДНК-лигазы. Эти ферменты способны объединять разорванные цепи путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. Причем эти ферменты могут связывать даже цепи ДНК с РНК, при этом матрицами служат комплементарные нити ДНК и РНК. В генной инженерии эти ферменты используются в основном для сшивания рестриктов, имеющих «липкие» (ДНК-лигаза *E. Coli* и ДНК-лигаза фага Т4) и «тупые» концы (ДНК-лигаза фага Т4).

РНК –лигазы. Они используются в генной инженерии для синтеза олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотидов, а также для введения метки в 3'-конец РНК. Механизм действия этих ферментов аналогичен действию ДНК-лигаз, только для активации РНК-лигаз не требуется комплементарной матрицы, поскольку донорный и акцепторный концы объединяемых молекул фиксируются непосредственно в активном центре фермента. Это свойство делает РНК-лигазу универсальным ферментом для синтеза олигонуклеотидов. Установлено, что структура донорного фрагмента как субстрата для РНК-лигазы не имеет значения. Однако акцепторный конец (его размер и структура) играют решающую роль в лигазной реакции.

7.1.5 Нуклеазы

Нуклеаза S1. Фермент обладает высокой экзо- и эндонуклеазной активностью и используется для удаления любых одностранных структур.

Нуклеаза Bal S1. Фермент обладает высокой эндонуклеазной активностью в отношении одностранных ДНК, а также экзонуклеазной активностью в отношении двухстранных ДНК. Поэтому он катализирует отщепление олиго- и мононуклеотидов с 5'- и 3'-концов ДНК. Субстратом для реакции служат двухстранные фрагменты ДНК как с прямыми, так и с выступающими концами. Скорости гидролиза обеих нитей ДНК с обоих концов приблизительно одинаковы и их можно регулировать путем изменения условий реакции. Это позволяет использовать данную нуклеазу для укорочения двухстранных фрагментов на заданную величину.

Экзонуклеаза фага X. Субстратом реакции для данного фермента является преимущественно двухстранный ДНК. Он катализирует отщепление 5'-нуклеозидмонофосфата от 5'-конца цепи. Экзонуклеазу фага X используют для получения одностранных выступающих 3'-ОН-концов путем последовательного удаления нуклеотидных остатков с 5'-конца нити.

Экзонуклеаза III *E. coli*. Фермент катализирует удаление мононуклеотидов с 3'-ОН-конца двухстранный молекулы ДНК. Экзонуклеаза III совместно с нуклеазой S1 используют для укорочения фрагментов ДНК, а совместно с ДНК-полимеразой - для введения радиоактивной метки.

ДНКаза и РНКаза. Эти ферменты используются для гидролиза ДНК и РНК соответственно.

7.1.6 Полинуклеотидкиназа фага T4

Этот фермент осуществляет перенос γ -фосфат с АТФ на дефосфорилированные 5'-ОН-концы ДНК или РНК. Субстратом для него служит одно- или двухнитевая молекула ДНК с дефосфорилированными 5'-концами. Этот фермент используют для мечения 5'-концов фрагментов ДНК при определении последовательности нуклеотидов, для фосфорилирования синтетических линкеров и других фрагментов ДНК с дефосфорилированными 5'-концами.

7.1.7 Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза

Фермент способен образовывать на двухнитевых фрагментах ДНК одонитевые участки путем последовательного присоединения нуклеотидов к 3'-ОН-концам обеих нитей. Наиболее эффективно фермент удлиняет одонитевые 3'-ОН-концы, сформировавшиеся при действии рестриктаз. Терминальную транскриптазу используют для создания на соединяемых фрагментах ДНК искусственных «липких» концов.

7.1.8 Щелочная фосфатаза

Щелочная фосфатаза *E. coli* обладает низкой специфичностью действия, гидролизуя различные эфиры фосфорной кислоты. В генетической инженерии используется для дефосфорилирования одно- и двухнитевых молекул ДНК или РНК на 5'- и 3'-концах.

7.2 ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ВВЕДЕНИЯ В КЛЕТКУ

Для введения в клетку чужеродной ДНК используют векторные молекулы ДНК или просто векторы.

Векторами называют молекулы ДНК, способные переносить и стабильно поддерживать в реципиентных клетках чужеродную генетическую информацию. Вектор должен отвечать следующим обязательным требованиям:

- 1) вектор должен быть реликоном, чтобы стабильно существовать в клетке;
- 2) нести селективный маркер;
- 3) иметь хотя бы один уникальный сайт рестрикции для внедрения в него чужеродной ДНК, который должен быть локализован в области, не существенной для репликации.
- 4)

Требования «необязательные», но облегчающие работу с вектором:

1) желательно, чтобы вектор имел большое число уникальных сайтов рестрикции для различных рестриктаз, по которым можно осуществлять введение фрагментов чужеродной ДНК;

2) векторная молекула была небольшая по размеру и имела значительное число копий на клетку, что обеспечивает большую амплификацию чужеродных генов при введении в клетку рекомбинантных молекул ДНК, сконструированных на основе данного вектора;

3) свойства вектора позволяли различать клоны, несущие исходные и рекомбинантные молекулы вектора.

В качестве векторов обычно используют:

- ДНК собственных плазмид;
- ДНК фага А;
- производные фага А (фазмиды и космиды);
- ДНК бактериофага М13.

Выбор вектора определяется целью, которую ставит перед собой экспериментатор.

Есть векторы для амплификации, секвенирования генов, а также интегративные, или челночные, и т. д. Векторы могут иметь большое число копий ДНК, мощные промоторы, расположенные рядом с сайтами клонирования генов, широкий круг клеток-реципиентов.

7.2.1 Плазмидные векторы

Как уже отмечалось ранее, плазмидные векторы для клонирования ДНК в бактериальных клетках создаются на основе ДНК собственных плазмид. Некоторые природные плазмиды могут обладать основными свойствами, которые позволяют использовать их как векторные молекулы. Однако почти всегда они не отвечают требованиям, которые предъявляются к векторам, поэтому плазмидные векторы создаются на основе природных плазмид с помощью генной инженерии.

Плазмидные векторы могут включать фрагменты ДНК любых размеров, однако рекомбинантные молекулы размером более 15 т. п. н. теряют свою стабильность. Поэтому плазмидные векторы используют для клонирования небольших фрагментов ДНК.

Лучше всего система клонирования с использованием плазмидных векторов разработана для клеток *E. Coli*. Она подходит для энтеробактерий, родственных *E. Coli*, однако для других родов, скажем, *Pseudomonas*, ее применение ограничено.

Первые плазмидные векторы pSC101 и ColE1 были созданы в 1970-х гг.

Свойства плазмидных векторов pSC101 и ColE1

Свойства	Плазмида ColE1	Плазмида pSC101
Копийность	Мультикопийная	Низкокопийная
Селективный маркер	Устойчивость к тетрациклину	Синтез колицина
Отбор рекомбинантов	Устойчивость к тетрациклину	Отсутствие синтеза колицина
Сайт узнавания рестриктазы	EcoR1	EcoR1

Плазмида pSC101 имеет размер 9,1 т. п. н. и является низкокопийной. Данная плазмида несет ген устойчивости к одному антибиотику – тетрациклину и вставка чужеродной ДНК по EcoR1-сайту не приводит к изменению фенотипа так как исходная и рекомбинантная плазмида имеют фенотип Tc^R. Поэтому прямой отбор рекомбинантов можно осуществить только по селективному маркеру клонированного гена. В настоящее время плазмида в качестве вектора практически не используется.

Как видно из табл. 2, вектор ColE1 маркирован по устойчивости к колицину, поэтому клонируемый с помощью рестриктазы EcoR1 фрагмент ДНК, нарушает синтез колицина. Бактериальные клетки, несущие исходную плазмиду, узнают по устойчивости к колицину, а клоны с рекомбинантной плазмидой выделяют по отсутствию его синтеза. Несмотря на то что плазмида ColE1 является мультикопийной и число ее копий в клетке достигает 3000, она не отвечает всем требованиям, предъявляемым к современным векторам. Поэтому в настоящее время плазмида в качестве вектора практически не используется, но на ее основе созданы плазмидные векторы серии pBR, из которой наиболее часто используют pBR 322.

Вектор pBR 322 имеет размер 4361 п. н. Он сохранил от плазмиды ColE1 мультикопийность и способность амплифицироваться в присутствии хлорамфеникола. Вектор маркирован устойчивостью к тетрациклину и ампициллину. Наличие в векторе двух детерминант устойчивости значительно расширяет возможности при клонировании. В данном векторе есть несколько уникальных сайтов для различных рестриктаз. Так, сайты узнавания рестриктаз Hind III, Sal I, BamH I располагаются в гене, кодирующем Tc^R, а сайт Pst I – в Ap^R (рис. 3), что позволяет вести отбор трансформантов по устойчивости к одному антибиотику, а поиск среди них клонов с рекомбинантными молекулами – по появлению чувствительности клеток к другому антибиотику.

Так, например, если клонирование осуществлялось по BamH I сайту, то отбор трансформантов осуществляют по устойчивости к ампициллину. Затем, среди полученных трансформантов, отбирают рекомбинанты как варианты, имеющие Ap^R Tc^S – фенотип.

Если клонирование осуществлялось по сайту Pst I в Ap^R ген, то для поиска Ap^R -клеток разработан метод прямой селекции. Он основан на том, что лактаза, кодируемая этим геном, превращает пенициллин в пеницилловую кислоту, которая способна связывать йод. Трансформанты отбирают на среде, содержащей тетрациклин и крахмал как Tc^R -варианты. Затем эти клоны опрыскивают раствором, содержащим пенициллин и йод, при этом клоны, несущие исходную плазмиду, обесцвечивают индикаторный раствор, а рекомбинантные Ap^R -колонии – не обесцвечивают.

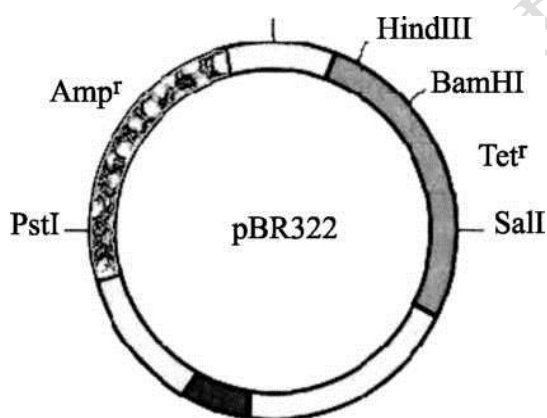


Рис. 3. Карта плазмидного вектора pBR322

Кроме того, клонирование в Hind III-сайт приводит к инактивации тетрациклинового промотора вектора, вследствие чего полученные трансформанты имеют фенотип Ap^R Tc^S . Это обстоятельство используют для поиска фрагментов ДНК, содержащих промоторподобные структуры.

На основе плазмиды pBR 322 сконструированы векторы различного назначения:

- вектор pBR 325 образуется при добавлении маркера устойчивости к Cm;
- вектор pAT153 получен путем делеции из pBR322 генов, контролирующих число копий плазмиды, поэтому размер генома pAT153 сокращается на 20 %, а число копий возрастает в 3 раза.

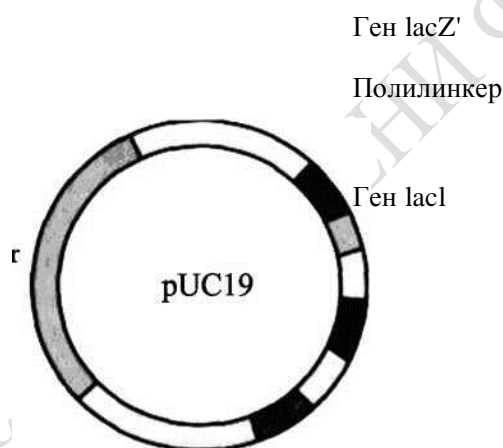
Основным недостатком этого вектора для клонирования фрагментов ДНК является небольшое количество сайтов рестрикции, а также невозможность прямого отбора трансформантов, полученных при клонировании по BamH I-сайту. Были сконструированы другие плазмидные векторы, лишённые этих недостатков.

Вектор pUC19. Плазмида pUC19 имеет размер 2686 п. н. и является мультикопийной (до 500 копий на клетку). Этот вектор предназначен для клонирования и экспрессии генов и выполняет следующие функции:

- несет ген устойчивости к ампициллину от плазмиды pBR322;
- часть гена в-галактозидазы (*lacZ'*) лактозного оперона *E. coli*;
- ген *lac I*, кодирующий репрессор гена *lacZ'*;
- полилинкер, включающий уникальные сайты для многих рестриктаз;
- *ori*-сайт от плазмиды pBR322 (рис. 4).

Сайт инициации репликации и ген устойчивости к ампициллину были взяты от вектора pBR322.

Полилинкер вектора включает уникальные сайты узнавания для следующих рестриктаз: *EcoRI*, *Sac I*, *Kpn I*, *Xma I*, *Sma I*, *BamH I*, *XbaI*, *Sal I*, *Hinc II*, *Acc I*, *Pst I*, *Bsp I*, *Sph I* и *Hind III*).



Инициация репликации

Рис. 4. Карта плазмидного вектора pUC19

Вектор pUC19 позволяет проводить прямой отбор клонов, несущих рекомбинантные молекулы.

Вещество изопропил-β-D-тио-галактопиранозид (ИПТГ) является индуктором lac-оперона и запускает его процесс транскрипции.

Если клетки, содержащие плазмиду pUC19, выращивать в присутствии ИПТГ, то белок-репрессор, продукт гена lac I не сможет связаться с промоторно-операторной областью гена lacZ', и поэтому будут происходить его транскрипция и трансляция. Продукт этого фрагмента свяжется с белком, кодируемым хромосомной ДНК, и в результате образуется активная β-галактозидаза. Если в среде присутствует 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид (X-Gal), то он будет гидролизоваться под действием β-галактозидазы, образуя продукта синего цвета, в результате чего выросшие клоны будут окрашены. Полилинкер встроен в ген lacZ' так, что он не влияет на продукцию функциональной β-галактозидазы. При клонировании фрагмента ДНК по сайтам рестрикции, расположенным в полилинкере, происходит сдвиг рамки считывания в кодирующей последовательности гена lacZ'. В результате чего не будет транскрибироваться активная форма полипептида. Такой полипептид не может связаться с белком, кодируемым хромосомной ДНК, и в результате не образуется активная β-галактозидаза. В этом случае при наличии в среде X-Gal не будет происходить его гидролиза, поэтому выросшие клоны не будут окрашены.

Таким образом, при клонировании фрагментов ДНК в полилинкер вектора pUC19 мы имеем возможность выявить рекомбинантные клоны с помощью прямого отбора: клоны, несущие исходные молекулы, будут синего цвета, а рекомбинанты – белого.

Сконструированные плазмидные векторы вводят в реципиентные клетки методом генетической трансформации. С помощью этого метода можно ввести плазмиды не во все виды бактерий, а только в те, которые могут быть компетентными. Для некоторых родов бактерий, например *Bacillus*, характерна природная компетентность, но в большинстве случаев это состояние создается искусственно. Самый распространенный способ – обработка клеток на холоде раствором хлорида кальция. Выход трансформантов зависит от свойств штамма, размеров ДНК плазмидного вектора, структуры трансформирующей ДНК, условий эксперимента и в целом является невысокой (обычно трансформируется не более одной клетки из тысячи). Однако низкая эффективность трансформации не является серьезным препятствием при клонировании.

Создать состояние компетентности клеткам можно при воздействии на них кратковременного электрического импульса. Такая обработка приводит к образованию в клеточной стенке пор, через которые ДНК проникает внутрь клетки. Этот метод называется **электропорация**. Эффективность данного метода введения плазмид может достигать 10^9 трансформантов на 1 мкг ДНК pBR322. С помощью электропорации можно получать трансформанты у бактерий, для которых не разработаны подходы для получения компетентных клеток.

7.2.2 Векторы для грамположительных бактерий

В последние годы достигнуты значительные успехи в конструировании плазмидных векторов для клонирования в клетках *B. subtilis*. Это промышленно ценный вид, обладающий хорошо развитым аппаратом секреции метаболитов. Кроме того, большинство штаммов обладает высокой протеазной активностью. Основной сложностью для создания плазмидных векторов для этих бактерий является то, что большинство плазмид, обнаруженных в этих клетках, не несет селективных маркеров и генетически нестабильны. Однако некоторые мультикопийные плазмиды *Staphylococcus* и *Streptococcus*, имеющие гены устойчивости к антибиотикам, могут трансформировать клетки *B. subtilis*, стабильно в них реплицироваться и экспрессировать гены.

Одной из них является мультикопийная плазида pUB110, выделенная из *Staphylococcus aureus*. Она имеет размер 4,5 т. п. н. и несет гены устойчивости к неомицину и флеомицину (рис. 5).

Помимо плазмиды pUB110 есть другие мультикопийные плазмиды, которые способны реплицироваться и стабильно поддерживаться в клетках грамположительных бактерий: pE194 (3,7 т. п. н.; Em^R), pT127 (4,5 т. п. н.; Tc^R), pC 194 (2,8 т. п. н.; Cm^R).

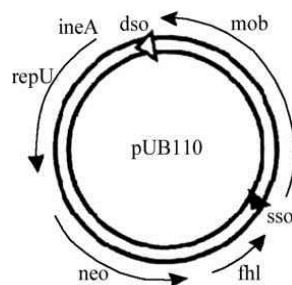


Рис. 5. Строение плазмиды pUB110 (В. Н. Рыбчин, 1999): neo – устойчивость к неомицину; fhl – устойчивость к флеомицину

Однако, несмотря на то что эти плазмиды мультикопийны и имеют небольшой размер, практически все они несут только один маркер устойчивости к антибиотикам. Для клонирования фрагментов ДНК удобно использовать такие векторы, которые имеют два селективных маркера, причем хотя бы в одном из них должен содержаться единственный рестрикционный сайт. Такие векторы были созданы на основе некоторых из рассмотренных выше плазмид.

Был сконструирован вектор рНVI 1. В Hind III-сайт плазмиды рС 194 внесли маркер тетрациклинрезистентности из плазмиды рТ127 с сайтом клонирования по KpnI сайту рестрикции (рис. 6).

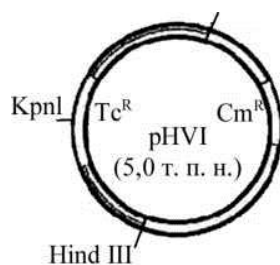


Рис. 6. Строение вектора рНVI (В. Н. Рыбчин, 1999)

Вектор рPL608 был сконструирован на основе плазмиды рUB 110, в которую вставлен ген *cat* (Cm^R) из хромосомы *B. Pumilus* (рис. 7). Данный вектор имеет в гене *cat* единственные сайты рестрикции – PstI и HindIII. Это позволяет отбирать среди неомицинустойчивых клеток клоны, содержащие рекДНК, по их чувствительности к хлорамфениколу.

Гибридные плазмиды рBD9 и рSA2100 имеют по 2 маркера, причем их детерминанты содержат единственные сайты узнавания для различных рестриктаз. Гибридная плазида рBD9 была получена путем объединения природных плазмид рUB110 и рE194 через сайт *Xba* 1.

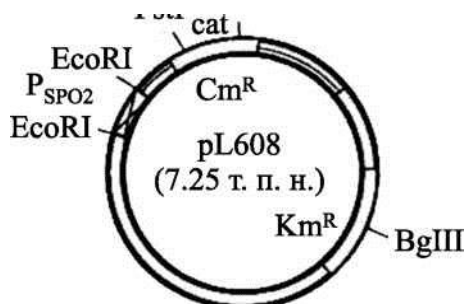


Рис. 7. Строение вектора рPL608 (В. Н. Рыбчин, 1999)

Для генно-инженерных целей наиболее интересны двурепликонные (челночные) гибриды, чьи системы репликации принадлежат плазмидам, имеющим разных хозяев. Они способны реплицироваться в различных клетках: например в *E. Coli* и клетках дрожжей или животных. Так, в 1980 г. сконструировали на базе плазмид pBR322 и pUB 110 бирепликонный вектор pJJ 10. Этот плазмидный вектор трансформирует оба типа клеток, однако экспрессия их генов неравнозначна. Устойчивость к аннамицину проявляется как в *E. Coli*, так и в *B. subtilis*. Гены Cm^r и Km^r бациллярных плазмид проявляются как в колях, так и в бациллах, тогда как ген Ap^r экспрессируется только в естественном хозяине – в *E. Coli*.

К сожалению, эти векторы не отличались функциональной и структурной нестабильностью, которая была связана тем, что использовались репликаторы, не специфичные для *B. Subtilis*.

Бирепликонный вектор pHP13 обладает всеми признаками современных векторов (рис. 8/ Из плазмиды pUC9 был взят локус, несущий часть гена в-галактозидазы ($lacZ'$) лактозного оперона *E. coli*, что позволяет реплицироваться в клетках и вести в них поиск клонов, содержащих рекДНК. Селективные маркеры Cm^* и Em^{\wedge} взяты из плазмид pC194 и pE194 соответственно, поэтому они экспрессируются в обоих видах клеток. Число плазмидных копий в клетках *B. Subtilis* – 5, а в *E. coli* – около 200. На основе вектора pHP13 сконструирован вектор прямой селекции pHP59, который позволяет отбирать трансформанты *B. Subtilis*, содержащие только рекДНК. Дополнительный элемент у этого вектора – конститутивно экспрессирующийся ген из хромосомы *B. Pumilus*, который находится в одной трансляционной рамке с фрагментом $lacZ'$ (рис. 8) и поэтому обеспечивает в клетках *B. Subtilis* синтез функционального а-пептида в-галактозидазы в составе гибридного белка.

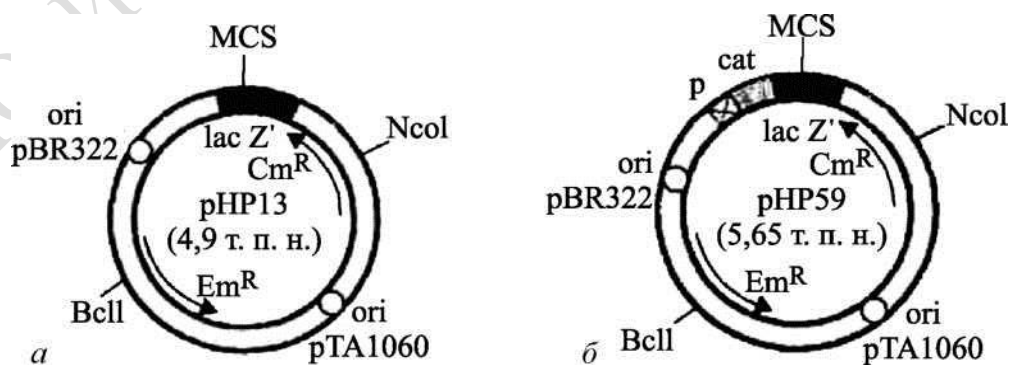


Рис. 8. Строение бирепликонных векторов pHP13 (а) и pHP59 (б), предназначенных для клонирования в клетках *B. Subtilis* и *E. coli* (В. Н. Рыбчин, 1999)

7.2.3 Особенности клонирования генов в стрептомицетах

Методы клонирования генов в *Streptomyces* разработаны в 1980 г. и связаны с бурным ростом исследований в области генетики актиномицетов. *Streptomyces* – грамположительные почвенные микроорганизмы, геном которых представлен одной кольцевой хромосомой и составляет 10^4 т. п. н. Наиболее изученный вид – *Streptomyces coelicolor*. Для этого штамма разработана подробная генетическая карта, на которой картированы наиболее существенные ауксотрофные мутации.

Стрептомицеты являются основными природными продуцентами антибиотиков (более 60 % всех известных антибиотиков синтезируются этими микроорганизмами). Причем они отличаются уникальной способностью синтезировать антибиотики различных видов. Так, например, *S. Coelicolor* производит 4 различных вида антибиотиков, а *S. Clavuligerus* – свыше 30. Поэтому данный объект занимает центральное место в исследовательской работе фармацевтических лабораторий.

Многие представители р. *Streptomyces* имеют активные системы рестрикции. В особенности это касается промышленных штаммов, которые отбирают с учетом их защиты от фаговой инфекции при культивировании в больших ферментерах.

Еще один важный аспект, который необходимо учитывать, - наличие ДНКазной активности. Некоторые стрептомицеты продуцируют высокоактивные ДНК-азы, которые выделяются в среду интактными протопластами и накапливаются там. В случае внесения плазмидной ДНК последняя разрушается или утрачивает свою трансформирующую активность. ДНКазную активность протопластов оценивают в агарозном геле с помощью электрофореза. Если ДНКазная активность оказывается высокой, то к суспензии протопластов до введения плазмидной ДНК прибавляют гетерологичную ДНК (например, ДНК тимуса телят), которая обеспечивает частичную защиту плазмидной ДНК.

В настоящее время описано чрезвычайно много плазмид стрептомицет, отличающихся по своим свойствам: высоко- и низкокопийные, транс- и нетрансмиссивные, криптические и лекарственной устойчивости и т. д.

Среди мультикопийных векторов предпочтение отдают векторам на основе рJ101, поскольку они хорошо изучены и обладают высокой трансформирующей активностью. Эта плазида *Streptomyces* обладает самой широкой хозяйской специфичностью и дает 40-300 копий на клетку.

Плазид рUC6 является криптоической и выделена из клеток *S. Espinosus*. Она представлена в клетке 30-40 копиями, хотя получен ее делеционный вариант, имеющий до 600 копий (самый высококопийный вектор *Streptomyces*).

Низкокопийные векторы имеют один существенный недостаток: сложность получения большого количества ДНК. Из таких плазмид у *Streptomyces* наиболее широко используют SLP1.2, представленную 4-5 копиями. Получены производные этой плазмиды, несущие селективные маркеры устойчивости к тиострептон и неомицину. Плазмида несет уникальные сайты для рестриктаз *VamHI* и *PstI*. Клонирование в этих сайтах приводит к экспрессии чувствительного к неомицину фенотипа.

7.2.4 Векторы широкого круга хозяев

В настоящее время интенсивно разрабатываются системы для клонирования генов в клетках *Pseudomonas*. Использование этих микроорганизмов очень перспективно. Во-первых, это промышленно ценные бактерии, во-вторых, они несут плазмиды биodeградации. Наибольший интерес представляют плазмиды, обладающие широким кругом хозяев, например, RK2 и RSF1010 (рис. 9).

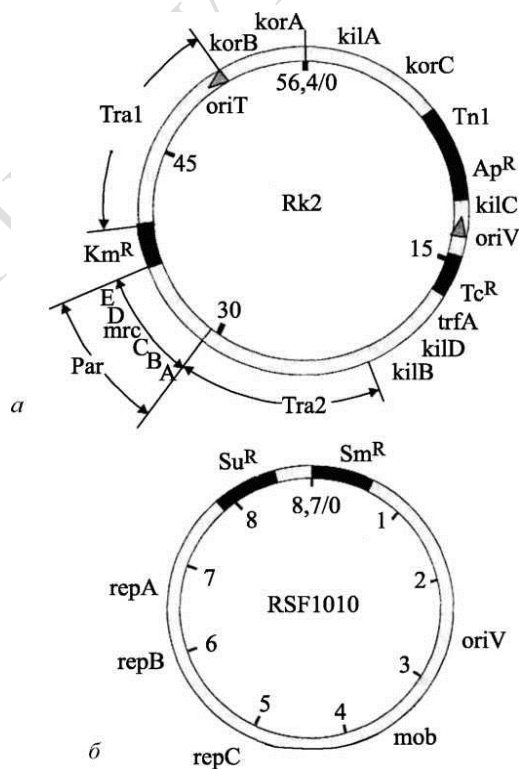


Рис. 9. Генетические карты плазмид с широким кругом хозяев: а – плазмида RK2; б – плазмида RSF1010. Координаты даны в т. п. н. (В. Н. Рыбчин, 1999)

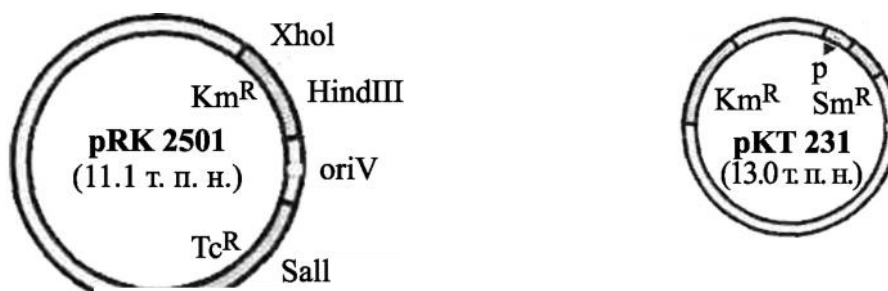


Рис. 10. Структура векторов pRK2501 и pKT231, сконструированных на базе плазмид с широким кругом хозяев RP4 (а) и RSF1010 (б) (В. Н. Рыбчин, 1999)

Плазмида RK2 является конъюгативной и имеет размер 60 т. п. н. Она малокопийна и несет детерминанты устойчивости к канамицину и ампициллину.

Плазмида RSF1010 является неконъюгативной и имеет небольшой размер 8,68 т. п. н. Она мультикопийна и несет маркеры устойчивости к стрептомицину и сульфонидами. Данная плазмида с помощью конъюгативной плазмиды может эффективно мобилизоваться во многие виды бактерий, включая грамположительные.

На основе этих плазмид сконструированы векторы серии pKT и pRK, позволяющие проводить клонирование в сайтах EcoR1, SstI, HindIII, BamHI и др. Эти векторы способны реплицироваться в грамотрицательных бактериях *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *P. Putida* и др. (рис. 10).

7.2.5 Векторы на основе бактериофагов

Клонирование генов в плазмидных векторах эффективно, если размер вставки не превышает 10 т. п. н. С увеличением размера клонируемого фрагмента выход рекомбинантов резко падает. Поэтому для клонирования крупных фрагментов ДНК необходимо использовать другие векторные молекулы, например на основе бактериофагов.

Векторы на основе бактериофага X.

Геном фага X представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК размером 48,5 т. п. н. Она упаковывается в головку фага в виде линейной молекулы, которая имеет два односторонних «липких» конца размером 12 п. н. После проникновения ДНК фага в клетку эти «липкие» концы соединяются, молекула ДНК становится кольцевой.

Первые векторы на основе бактериофага X были созданы в 1974 г. Необходимым этапом работы при использовании в качестве вектора фага X является удаление из его ДНК «лишних» сайтов рестрикции. В капсид фага может упаковываться ДНК размером не менее 38 т. п. н. и не более 52 т. п. н. Самые простые фаговые векторы содержат в своем составе уникальный сайт рестрикции для крупнощепящей рестриктазы. Именно по этому сайту и происходит внедрение чужеродной ДНК. Такие векторы получили название «векторы внедрения». Максимальный размер вставки составляет 15,2 т. п. н.

Для увеличения емкости векторов были сконструированы векторы замещения. Геном фага X можно условно разделить на три фрагмента:

- L-фрагмент (левое плечо) содержит информацию о головке и отростке фага;
- R-фрагмент (правое плечо) – о репликации ДНК и лизисе;
- I/E-фрагмент (средний фрагмент) – о процессах интеграции и исключения.

При создании векторов замещения средний фрагмент генома фага X удаляется и замещается на клонированный фрагмент. Емкость таких векторов составляет 24 т. п. н.

ДНК, предназначенную для клонирования, обрабатывают рестриктазой. Затем ДНК фага X также подвергают действию рестриктазы для удаления I/E-фрагмента. Оба препарата соединяют и лигируют с помощью лигазы. К полученной смеси добавляют головки и отростки фага и образуются инфекционные фаговые частицы. Причем L и R-фрагменты без вставки имеют слишком короткую ДНК и не могут упаковываться в головки фага.

При клонировании генов с использованием векторов на основе бактериофагов вектор вводится в клетку путем трансфекции. Эффективность этого способа значительно превышает таковую при использовании трансформации. Так, как уже отмечалось выше, трансформируется только одна клетка из 1000, а инфицируется одна клетка из 10.

Для поиска рекомбинантов используют ДНК-зонды или иммунологические методы.

Векторы на основе бактериофага X удобны для создания клонотек, но на таких векторах сложно проводить тонкие манипуляции с клонированными генами.

Векторы на основе бактериофага M13.

Геном вектора представлен одноцепочечной ДНК размером 6407 нуклеотидов. В ДНК фага находится спейсерный участок, в который можно осуществлять вставку чужеродной ДНК. Размер вставки может достигать 15 т. п. н. После проникновения фага в клетку синтезируется вторая нить ДНК и молекула становится двухцепочечной. Такую ДНК выделяют из клеток и используют в качестве вектора.

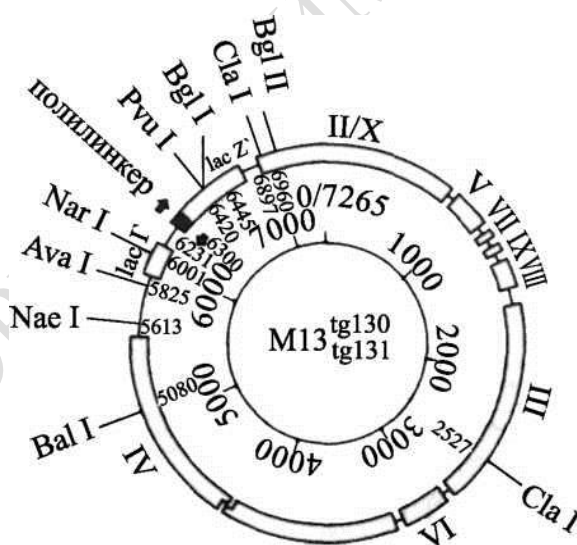


Рис. 11. Векторы на основе фага M13: арабскими цифрами указана нумерация нуклеотидов; римскими – гены фага (М. Кисп и др., 1983)

Когда в инфицированной клетке накапливается 100-200 копий двухцепочечной ДНК, синтез становится ассиметричным и синтезируется лишь одна нить ДНК, которая и входит в состав зрелого фага. Частицы зрелого фага постоянно выделяются в среду, где их титр может составлять до 10^{12} в 1 мл. При создании вектора в спейсерный участок вставляют последовательности ДНК, несущие единичные сайты рестрикции (полилинкер) и селективные маркеры. На рис. 11 представлен один из таких векторов, у которого в спейсерный участок вставили λ cZ'-ген и полилинкер. Отбор рекомбинантных фагов ведут на средах с X-Gal. При инфекции клеток интактным вектором образуются колонии синего цвета, а рекомбинанты будут бесцветные.

Таким образом, при использовании таких векторов частицы зрелого фага в составе вектора содержат клонированный фрагмент ДНК в одноцепочечной форме, который непосредственно может быть использован для секвенирования последовательности ДНК.

7.2.6 Космиды

Космиды представляют собой плазмиды, которые имеют в своем составе cos-сайты («липкие» концы) ДНК фага λ . Наличие cos-сайтов дает возможность упаковываться ДНК в капсид и передаваться бактериальным клеткам путем инфекции. Размер фрагментов ДНК, которые можно клонировать в космидах, составляет 33-49 т. п. н. Таким образом, емкость векторов этого типа значительно превышает таковую у плазмидных векторов и фага λ . Один из космидных векторов pLFR-5 представлен на рис. 12.

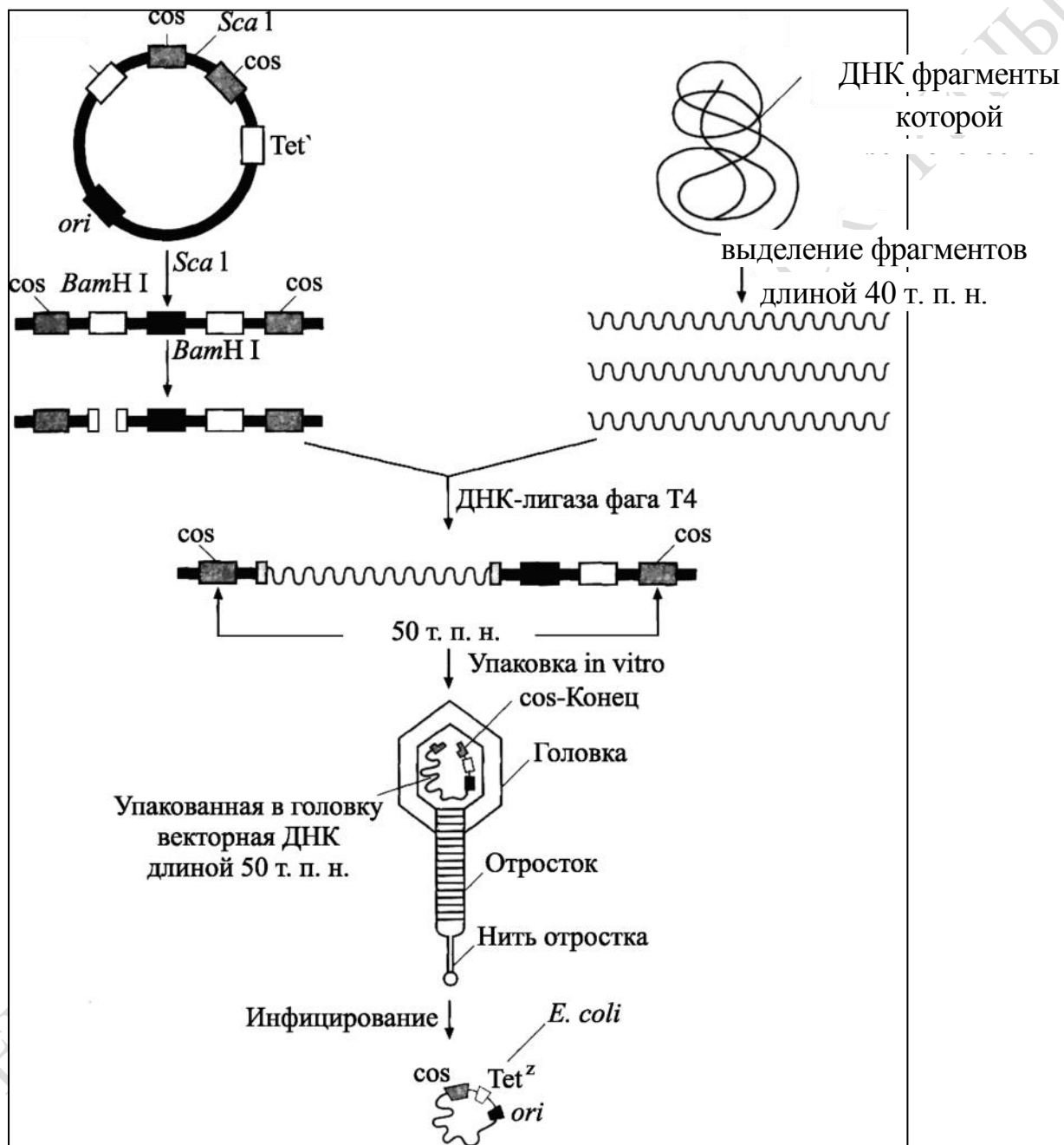


Рис. 12. Клонирование с помощью космидного вектора (Б. Глик и Дж. Пастернак, 2002).

Вектор несет в своем составе два *cos*-сайта фага X, которые разделены сайтом рестрикции для *Sca I*, полилинкер с шестью уникальными сайтами рестрикции, точку начала репликации ДНК и ген устойчивости к тетрациклину. Предназначенные для клонирования ДНК расщепляют рестриктазой *BamH I*. Вектор сначала обрабатывают рестриктазой *Sca I*, а затем *BamH I*. Препараты ДНК смешивают и лигируют. Те продукты лигирования, которые содержат вставку длиной 40 т. п. н., имеют 25суммарный размер, близкий к 50 т. п. н., и, следовательно, могут упаковываться *in vitro* в головки фага X.

7.2.7 фазмиды

Фазмиды представляют собой гибриды между плазмидами и фагами, которые способны развиваться в клетке и как фаг, и как плаزمид, т. е. они содержат в своем составе все гены, необходимые для репликации фага и плазмиды. Размер ДНК фазмид очень мал для того чтобы упаковаться в капсид, поэтому упаковываться могут только такие векторные молекулы, которые несут вставку.

Используя в качестве вектора фазмиду, не требуется процедура последующего переклонирования гена из фага в плазмиду для дальнейших манипуляций, так как сама фазмида может быть представлена в клетке как фаг и как плазмид.

7.2.8 Векторные системы для клонирования очень крупных фрагментов ДНК

Векторные системы, способные интегрировать крупные вставки (>100 т. п. н.), используются для создания геномной библиотеки эукариотических геномов. В отличие от библиотек с небольшими вставками, в такой библиотеке будет представлен весь генетический материал организма. Кроме того, в этом случае уменьшается число клонов, которые нужно поддерживать. Для клонирования фрагментов ДНК размером от 100 до 300 т. п. н. был сконструирован низкокопийный плазмидный вектор на основе бактериофага P1, называемый искусственной хромосомой на основе фага P1. Был создан также очень стабильный вектор, способный интегрировать вставки длиной от 150 до 300 т. п. н., на основе F-плазмиды с селекционной системой *lacZ'*. Эта конструкция называется бактериальной искусственной хромосомой (BAC, от *bacterial artificial chromosomes*).