

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ПРИНЦИПЫ И ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Учебное пособие

Составители:
В.Н. Попов,
О.С. Машкина

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета
2009

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Рестриктазы – основные ферменты генетической инженерии	5
2. Этапы создания трансгенных организмов. Векторная трансформация.	6
2.1. Понятие о векторе. Типы векторов, их конструирование	7
2.2. Методы переноса генов в клетки различных организмов	14
2.3. Клонирование генов	15
3. Создание и скрининг банка генов	16
3.1. Принципы создания банка генов	16
3.2. Выбор нужного гена из клонотеки (скрининг банка генов). Блот-гибридизация	18
4. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)	24
4.1. Принципы ПЦР	24
4.2. Визуализация и учет результатов реакции	27
4.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	28
5. Области применения и примеры использования ПЦР	28
5.1. Диагностические технологии на базе ПЦР	28
5.2. Поиск гомологичных генов	33
5.3. Идентификация маркерных генов	33
5.4. Применение ПЦР в медицинской диагностике	34
Рекомендуемая литература	36

гут гибридизироваться между собой. Это обеспечивает возможность объединения различных молекул ДНК и создание рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Рестриктазы были названы биологическими ножами, которыми манипулируют генные инженеры или хирурги.

Примером рестриктаз, образующих «липкие концы», являются широко используемые в генно-инженерных работах ферменты бактериального происхождения – *EcoRI* (присутствует у *E.coli*) и *BamHI* (обнаружена в клетках *Bacillus amyloliquefaciens*). Например, *EcoRI* распознает последовательность из 6 нуклеотидов (GAATTC), делая ступенчатые разрезы между нуклеотидами G и A (рис. 1), *HaeIII* – узнает 4 нуклеотида (GGCC), делая прямые разрезы и образуя «тупые» концы. Для соединения «тупых» концов к ним ферментативным путем присоединяют «липкие» концы. Ферменты рестрикции обозначают по названию организмов, из которых они изолированы. Используют три буквы из названия вида бактерии, например, *EcoRI* из *E.coli*, *HindIII* – из *Haemophilus influenzae*, *HaeIII* – из *Haemophilus aegyptius* и т.д. После трех букв курсивом следуют определенный буквенный символ, обозначающий генетическую линию или штамм, и римская цифра. В настоящее время известно более 400 рестриктаз, способных расщеплять ДНК в различных сайтах.

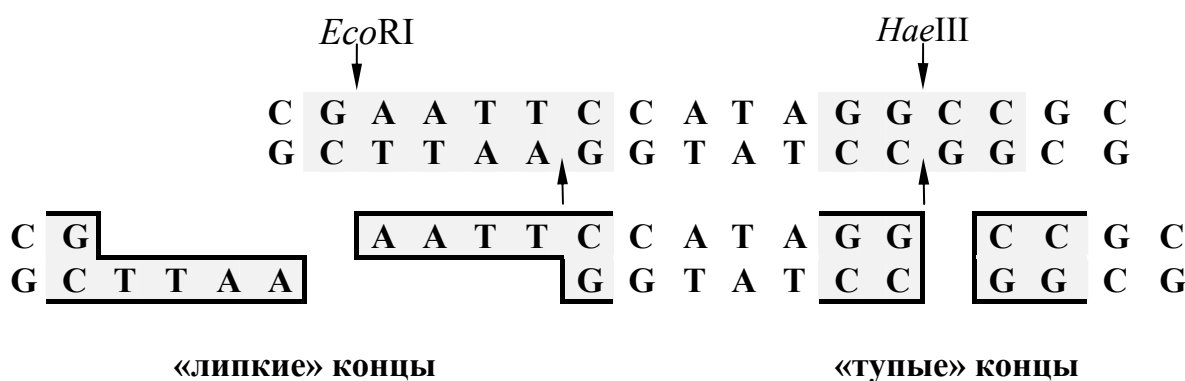


Рис. 1. Последовательность нуклеотидов, которая содержит сайты (сайты рестрикции), распознаваемые различными рестриктазами

2. ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ. ВЕКТОРНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Основными этапами создания трансгенных организмов являются следующие.

1. Получение нужного гена (трансгена), намеченного для переноса. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома) или геномной библиотеки. Он может быть синтезирован искусственно: химическим путем (по имеющейся последовательности нуклеотидов)

или ферментативным путем с использованием механизма обратной транскрипции (синтез кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы), получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Создание специальных генетических конструкций – векторов (переносчиков), в составе которых гены (трансгены) будут внедряться в геном другого вида или клонированы в клетках про- или эукариот. Клонирование предполагает получением большого числа копий фрагментов ДНК, идентичных исходному.

3. Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение генетических векторов (рекДНК) в клетки-мишени хозяина (реципиента).

4. Молекулярная селекция – отбор клонов, несущих рекДНК, что осуществляется с использованием различных маркерных генов, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

5. Выращивание измененных клеток в целые трансгенные организмы. Рассмотрим подробнее некоторые из этих процедур.

2.1. Понятие о векторе. Типы векторов, их конструирование

Обязательной генетической конструкцией, используемой в экспериментах по генной инженерии, является *вектор*. *Векторы* – это молекулы ДНК, способные переносить включенные в них чужеродные гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом (хромосомой). Таким образом, векторы используются в генной инженерии для переноса трансгена от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования генов. Однако нельзя ввести чужеродный фрагмент ДНК сразу в клетку эукариот или некоторых бактерий (без вектора). Это связано с тем, что при обычном введении ДНК в клетку она, как правило, подвергается атаке ферментов, которые разрезают ее на отдельные фрагменты. Для того, чтобы рекДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться в ее геном (интегрировать в хромосому) и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации.

Вектор должен обладать следующими свойствами.

1. Способность к автономной (т.е. независимо от хромосомы реципиента) репликации в клетке реципиента. Например, для репликации в клетке бактерии вектор должен содержать сайт *ori* (участок инициации репликации).

2. Наличие сайта, в котором возможно встраивание желаемого фрагмента ДНК. Для этого вектор должен содержать один, или самое большое – два участка (сайта рестрикции), чувствительных к определенной рестриктазе, которая расщепляет вектор и позволяет встроить желаемый трансген.

3. Наличие одного или нескольких маркерных генов, благодаря которым клетка-реципиент будет обладать новыми признаками, позволяющими

отличить трансформированные клетки (т.е. содержащие рекДНК) от исходных. Это могут быть *селективные гены*, которые придают клеткам селективное преимущество (устойчивость к антибиотикам, гербицидам). Такие гены кодируют ферменты, разрушающие или модифицирующие антибиотики, гербициды. В этом случае трансформанты отбирают на питательных средах с высоким содержанием этих веществ. Например, в присутствии гена лактомазы бактериальная клетка приобретает устойчивость к пенициллину и на среде с этим антибиотиком образует клон (несущий данный ген), тогда как обычные клетки (без этого гена) на данной среде погибают. В качестве маркерных используют и так называемые *репортерные* гены, экспрессия которых не дает селективных преимуществ, но продукты генов удобны для тестирования, например, по изменению окраски. Так, ген *GFP* контролирует синтез зеленого флюоресцирующего белка из медузы. При облучении трансгенных растений, содержащих этот белок, УФ-лучами появляется зеленое свечение. Гены *luxA* и *luxB* выделяют из ДНК светлячков. Они контролируют синтез люциферазы, которая обеспечивает переход люциферинов из окисленной формы в основную, что и обеспечивает свечение трансгенных растений, накапливающих этот белок. Широко используемым в настоящее время репортерным геном является ген β -глюкоронидазы (*GUS*). Трансгенные клетки, экспрессирующие этот ген, при помещении их на специфический субстрат окрашиваются в голубой цвет.

4. Кроме того, чтобы чужеродный ген экспрессировался, необходимо его поместить под соответствующий промотор. У эукариотических организмов механизм регуляции транскрипции более сложный, чем у прокариот. Регуляторные последовательности эукариотических генов отличаются от прокариотических, и бактериальная РНК-полимераза не узнает их. Поэтому для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот нужно, чтобы гены находились под контролем бактериального промотора (т.е. промотора клетки-хозяина). В качестве промотора широко используется промотор гена β -лактомазы (ген устойчивости к ампициллину), локализованного в векторе pBR322, *lac*-промотор *E. coli* и др.

То есть создается целая генетическая конструкция, в состав которой, помимо трансгена, вводятся маркерные гены и соответствующие регуляторные последовательности.

В качестве векторных молекул могут быть использованы плазмиды бактерий или дрожжей (простых эукариотических организмов), ДНК бактериофагов или вирусов, искусственные хромосомы дрожжей (YAK) и бактерий (BAK). Созданы также гибридные (искусственные) векторы – космиды, объединяющие преимущества плазмид и фагов.

Плазмиды – внехромосомные генетические элементы про- и эукариот, которые автономно реплицируются в клетке. Природные плазмиды часто содержат гены, полезные для бактерий: придающие устойчивость к анти-