

Экспрессия чужеродных генов и системы трансформации



Что такое трансформация?

- Это введение ДНК неполовым путем в клетку реципиента, проводящее к наследуемому изменению генотипа
- Основной метод биотехнологии растений и мощнейшая экспериментальная методика
- Убирает барьеры по переноске генов
- Развитие трансформации *E.coli*, а также разрезание и сшивание ДНК *in vitro* дало начало генетической революции в 70-е годы
- Не надо путать с генетической трансдукцией, представляющей собой частный случай переноса генов между хозяином и вирусом

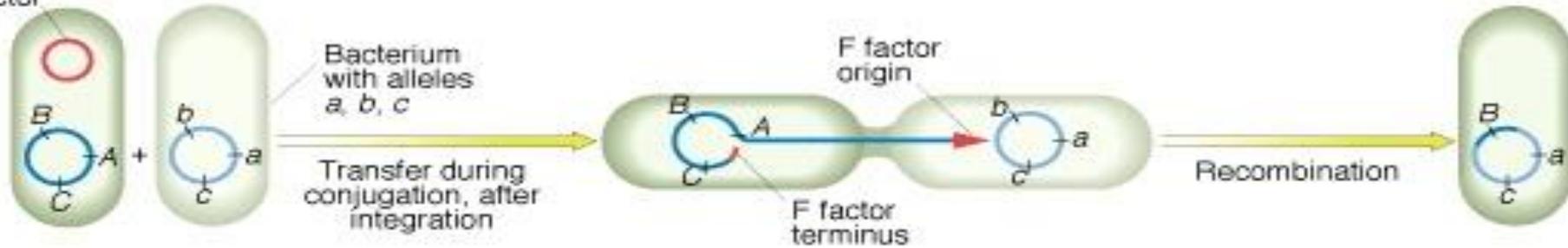
Трансформация происходит в природе

Некоторые примеры:

1. Секвенирование геномов четко показало, что у бактерий существует горизонтальный перенос генов между разными видами при определенных селективных преимуществах (условиях отбора)
2. Формирование раковых клеток у животных под действием онкогенных вирусов, таких как SV40 и аденовирусов. Часть вирусной ДНК интегрируется в ДНК хозяина и вызывает неконтролируемый рост клеток (*в биологии рака существует свое более узкое определение трансформации*)
3. У растений, таких как бананы, табак и кокос tobacco, малые ДНК-вирусы (бадनावирусы и нановирусы) интегрируются в виде множественных копий в ДНК хозяина при стрессе (вызывая потерю стрессоустойчивости). Это является существенной помехой программ селекции бабанов.

Трансформация бактерий

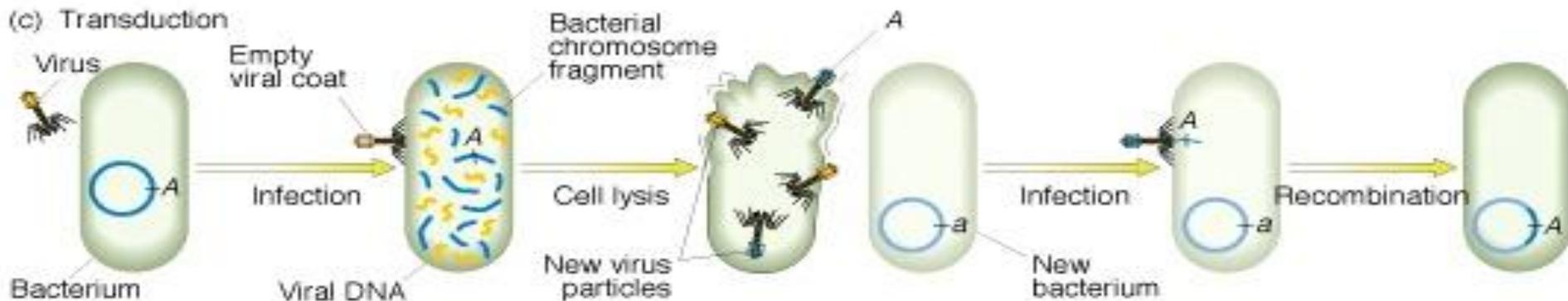
(a) Conjugation
F factor



(b) Transformation



(c) Transduction

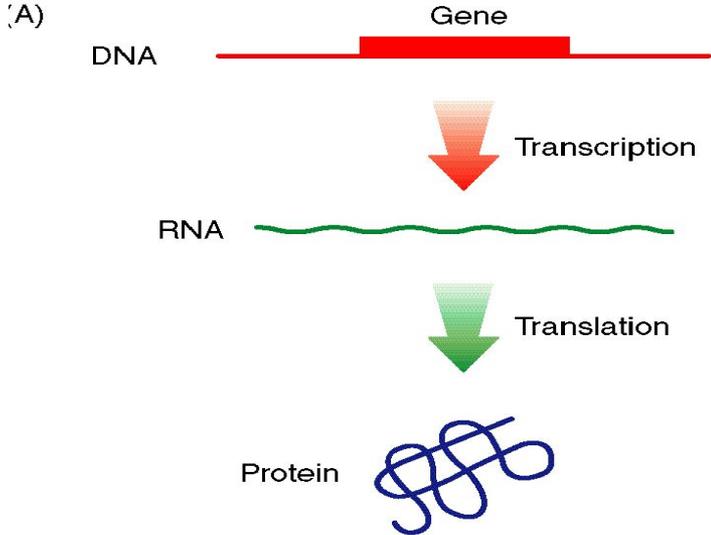


Важные требования к трансформации

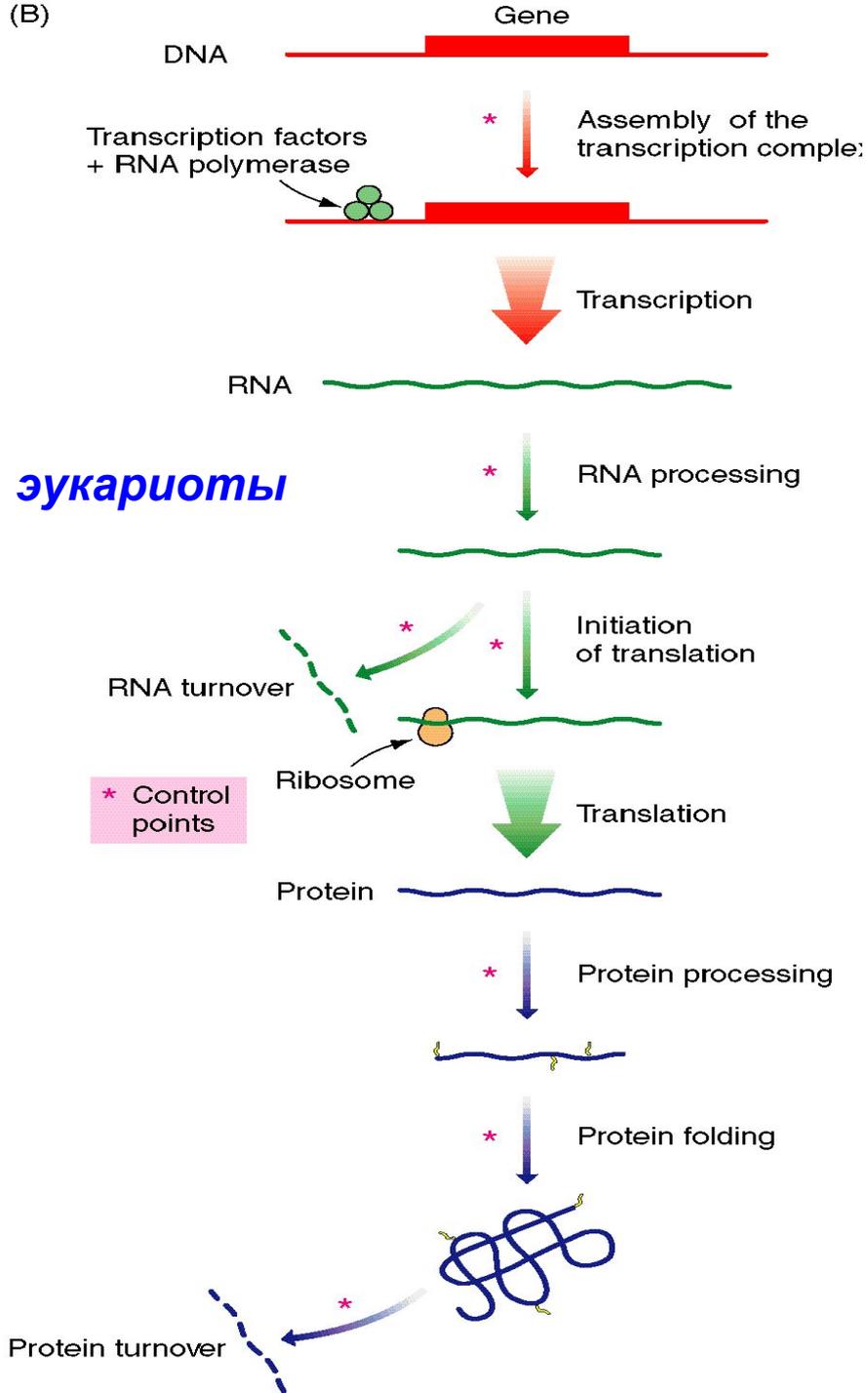
1. **Возможность ДНК экспессироваться в клетках хозяина (реципиента)**
2. **Клетки реципиента часто требуют специальной обработки для того, чтобы сделать их «компетентными» к трансформации**
3. **Система доставки ДНК**
4. **Системы селекции для распознавания и отбора трансформантов**

Что такое экспрессия генов?

Это совокупность реакций, вследствие которых биологическая информация гена становится доступной клетке (работа или активность гена)

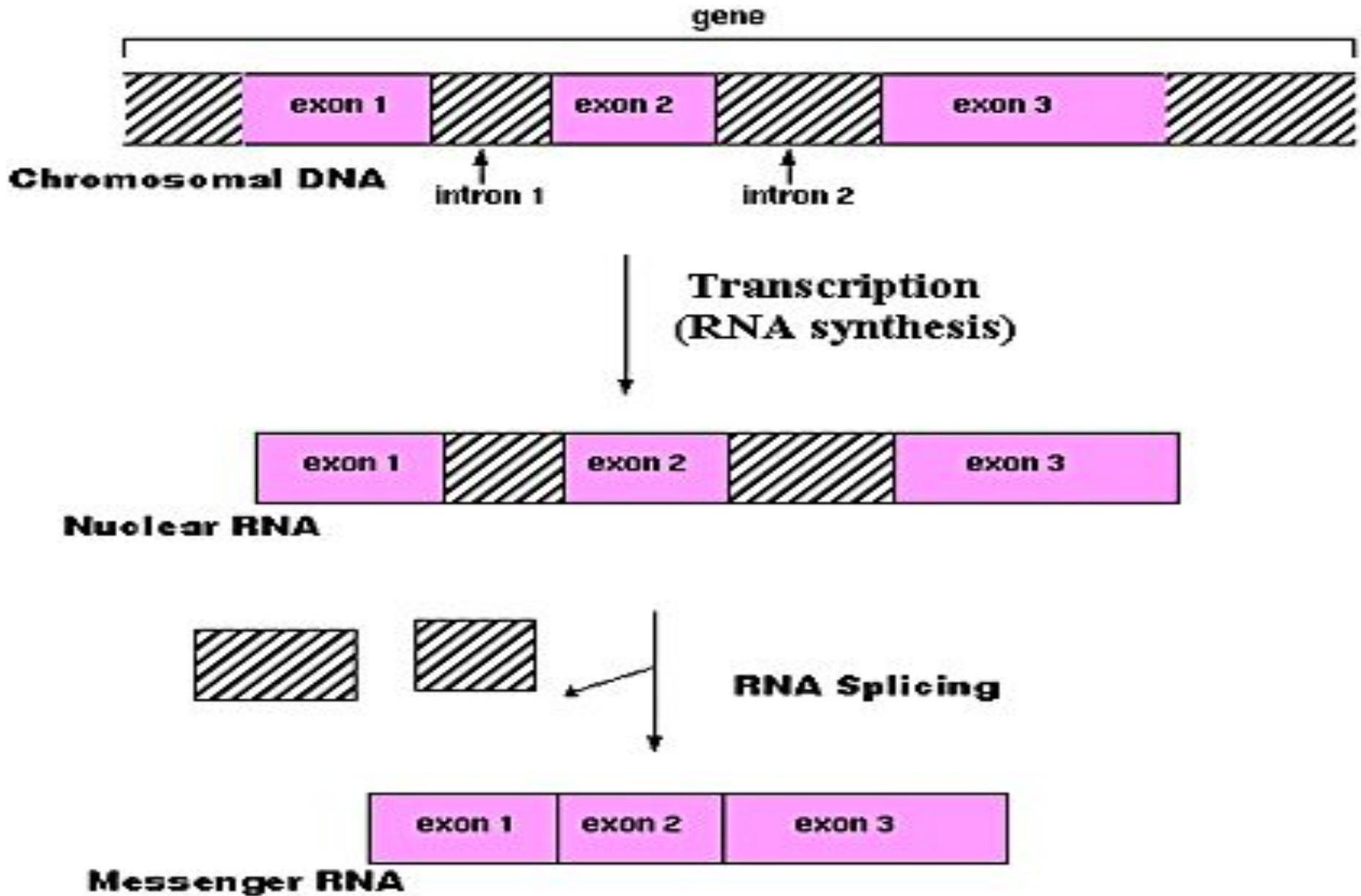


прокариоты



Экспрессия генов

РНК-процессинг у эукариот



Конструирование генов для их экспрессии в других видах

- Нужно знать экспрессируется ли ген (часто уже известно).
- Если ген из того же или близкого таксона, то ожидается, что он будет экспрессироваться точно также как в организме-источнике (доноре).
 - Например, ген из двудольных растений практически всегда будет нормально экспрессироваться в другом двудольном растении*
 - Гены разных энтерических бактерий будут работать в таких же бактериях без дополнительных модификаций*
 - Гены человека «работают» в мышах*
- Если кодирующая последовательность из другого царства, то очень вероятно, что она не будет функционировать. Такая последовательность потребует дополнительной добавки – последовательности совместимости, или промотера.
- Таким образом, часто требуется создание нового гена – химерной последовательности или ХИМЕРЫ, которую можно создать in vitro (предыдущая лекция)
- Все гены (химерные или немодифицированные) пропагируются (наращивается число их копий) при помощи трансформации на плазмидных векторах в бактериях или грибах.

Химера. Что это значит?

Организм, орган или часть организма, содержащая две или более генетические составляющие.

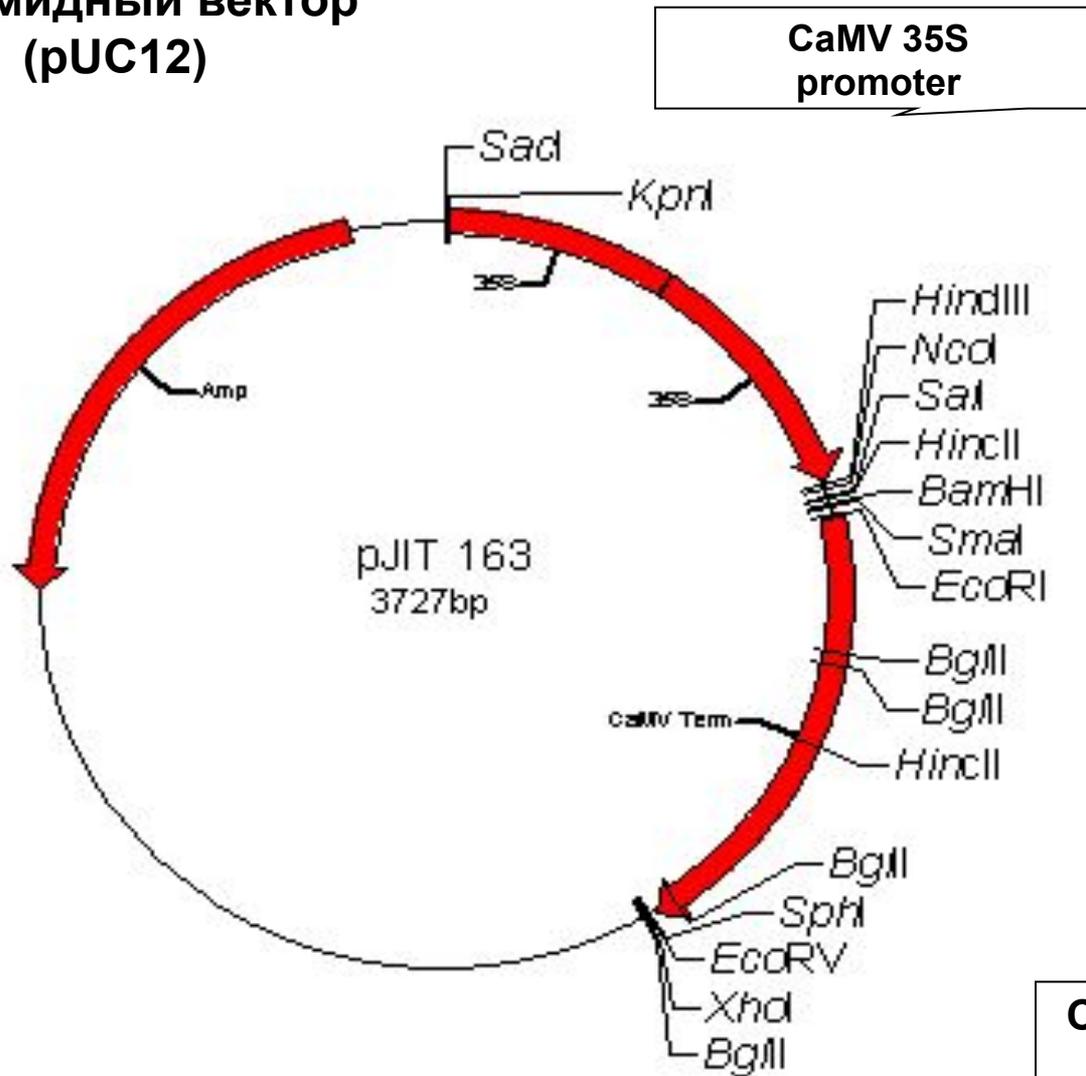
Получается в результате трансплантации органов, пересадок или генетической инженерии.

Вещество, такое как антитела, созданное из белков различных видов.

From Latin chimaera, from Greek khimaira, chimera, she-goat – она-коза – комбинаций двух зверей (чаще козы и льва)

Пример генной кассеты (плазмидной конструкции высокой интенсивности) для трансформации растений

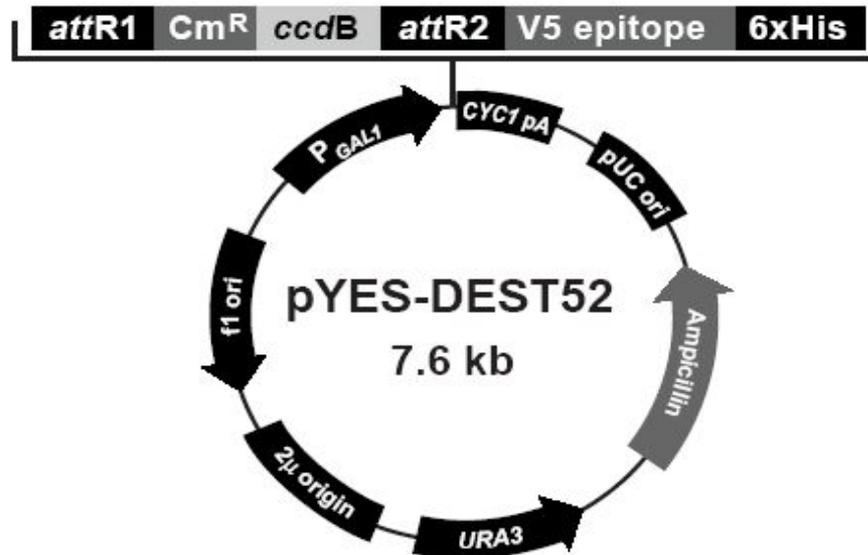
Плазмидный вектор
(pUC12)



CaMV polyadenylation
sequence

Дрожжевая экспрессионная кассета *GAL1*

- Включает сильный индуцибельный промотер *GAL1* (галактоза индуцирует экспрессию, в глюкоза ингибирует)
- Доступна коммерчески (фирма - Invitrogen)
- Содержит рекомбинационную систему Gateway
- Дает высокий уровень экспрессии белка и возможность легкой очистки
- Полиаденилатный сайт из *CYC1*-гена
- Способна экспрессироваться в *E.coli*



Системы трансформации



Гены селективных маркеров

Трансформация происходит у малого числа клеток. Требуется создать преимущество для роста именно трансформированных клеток.

Бактерии:

Гены резистентности к антибиотикам

Ген бета-лактамазы (уст-ть к ампицилину и тетрациклину)

Дрожжи:

Комплементация ауксотрофности

Например URA3 позволяет урацил-ауксотрофному мутанту расти на несодержащих урацил средах.

Ауксотрофы - микроорганизмы, в противоположность прототрофам утратившие способность к самостоятельному синтезу какого-либо метаболита (аминокислоты, витамины и т. д.) в результате мутации и потери способности к образованию соответствующих ферментов.

Гены селективных маркеров

Клетки животных:

Устойчивость к антибиотикам

1. Ген *nptII* на основе гена *E.coli* (резистентность к канамицину путем его фосфорилирования)
2. DHFR: Ген редуктазы дигидрофолата

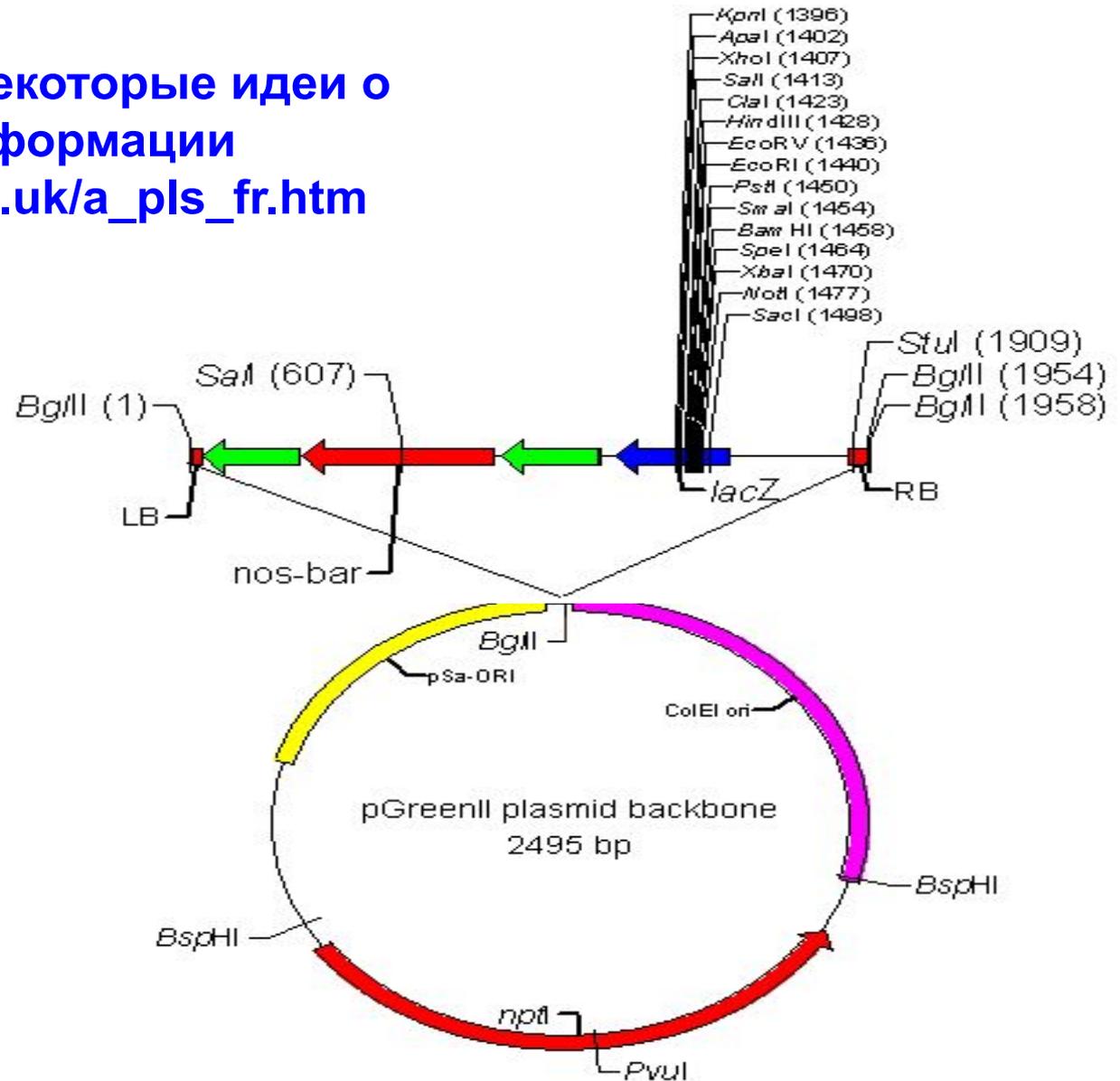
Клетки растений

- Резистентность к антибиотикам и гербицидам
1. Резистентность к канамицину (*nptII*)
 2. Резистентность к гигромицину (гигромицин – тот же «аминоглюкозидный» класс антибиотиков, что и канамицин, что имеет свой ген устойчивости) - *aphIV*
 3. Биалафос/фосфинотрицин/глуфосинат-аммоний – это гербицид, известный под торговыми марками Challenge, Basta, Herbiace. Устойчивость переносится геном из гриба *Streptomyces viridochromogenes* (Bar = резистентность к биалофосу, *bialaphos resistance*, *pat* = фосфинотрицин-ацетил-трансфераза – фермент инактивирующий гербицид посредством ацетилирования).

<http://www.bdt.fat.org.br/binas/Library/cabi/harding.html>

Гены селективных маркеров в случае высших эукариот – это всегда химерные гены

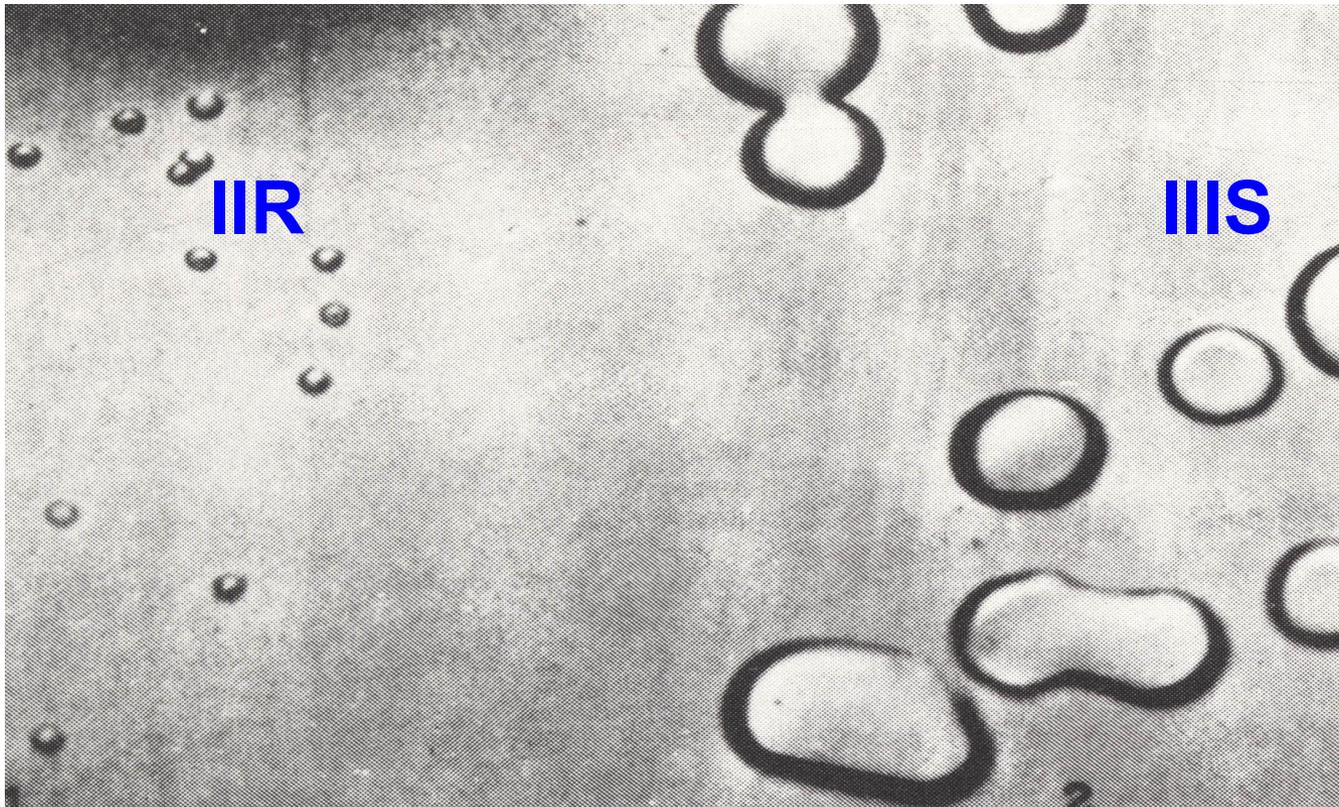
Данный сайт дает некоторые идеи о ресурсах для трансформации
http://www.pgreen.ac.uk/a_pls_fr.htm



Трансформация бактерий

Некоторые бактерии могут быть трансформированы простым добавлением ДНК в культуру.

Непатогенный штамм *Pneumococcus* IIR может быть трансформирован в большие патогенные колонии посредством трансформации с ДНК IIIS-штамма с вероятностью 1 к 10^4 клеток



Метод 1: Химическая трансформация бактерий.

Трансформация *E.coli*

- Вырастить культуру до экспоненциальной фазы, охладить и отцентрифугировать (осадить)
- Клетки ресуспендировать в холодном растворе 50–100 мМ CaCl_2 (при их концентрации 10^{10} мл⁻¹), содержащем плазмидную ДНК
- Инкубировать на льду 30 мин
- Произвести тепловую обработку - 42°C на 1 мин
- Добавить среду и растить клетки в течение 30-60 мин, чтобы они восстановились
- Высеять аликвоты на чашки с селективной средой, содержащей антибиотик
- Вероятность (частота) трансформации – 10^4 - 10^5 $\mu\text{г}^{-1}$ ДНК (1000-10000 клеток на микрограмм добавленной ДНК)
- Сейчас коммерческие компетентные клетки имеют частоту трансформации до 10^7 - 10^8 $\mu\text{г}^{-1}$ ДНК (например, штамм TOP10)
- Соль позволяет ДНК и клетки приклеиться друг к другу. Тепловой шок вызывает вход ДНК в клетки.

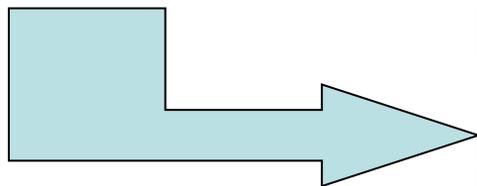
Метод 2: Электропорация

Типичный протокол для *Agrobacterium* или *Rhizobium*

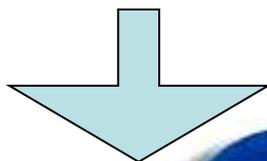
Культуры выращиваются до экспоненциальной фазы, охлаждаются и осаждаются центрифугированием

- Клетки ресуспендируются при 10^{10} мл⁻¹ в холодной стерильной дистиллированной воде
- Вышеуказанный шаг повторяется дважды, чтобы отмыть клетки от солей
- Клетки смешиваются с ДНК (при температуре льда) и переносятся в предварительно охлажденную электропорационную кювету
- Напряжение 4000–8000 Вольт см⁻¹ на несколько миллисекунд подается на кювету.
- Клетки вводятся в среду для восстановления на некоторое время и переносятся на чашки (как в методе 1)
- Высокая частота трансформации - 10^9 $\mu\text{г}^{-1}$ ДНК.
- Годится для любых клеток
- Работает по принципу образования короткоживущих пор в плазматической мембране клеток, через которые проходит ДНК

электропоратор



**Электропорационная
кювета**



Трансформация дрожжей

Эукариотическая генетика и молекулярная биология

- могут эффективно продуцировать эукариотические гены
- *S. cerevisiae* – стандартное орудие для молекулярно-биологических методик
- Высокая стабильность трансформантов
- Дрожжевые шаттл-вектора могут поддерживаться как искусственные хромосомы и как плазмиды в *E.coli*
- Можно получить вставочные мутанты
- Известна рамка считывания
- Дрожжи могут делать сплайсинг генов животных и растений
- Дрожжевая РНК-полимераза распознает многие промотеры животных и растений

Трансформация дрожжей

- Трансформирующая ДНК должна быть линейаризована при помощи ферментов рестрикции (рестриктаз). Помним, что бактериальная ДНК должна быть кольцевой – плазмидой.
- Наиболее эффективный метод – ацетат лития (LiAc)/полиэтиленгликоль/одноцепочая открытая ДНК (ss-ДНК). Технические аспекты:
 1. Клетки выращиваются до экспоненциальной фазы, промываются водой и ресуспендируются в воде. Далее могут храниться охлажденными или замороженными.
 2. Полиэтиленгликоль (PEG - ПЭГ) – ПЭГ-3000 (цифра означает длину молекул) и Li⁺ приводят к тому, что ДНК прилепает к клеткам
 3. Одноцепочная незамкнутая ДНК (ss - single stranded fragmented DNA), изготавливается посредством нескольких актов кипячения и заморозки из обычной ДНК
 4. Обработка температурным шоком - 42°C на 40 мин
 5. Далее высеив на селективную среду, где колонии образуются в течение 3-4 дней.

Трансформация дрожжей

Все первоначальные (старые) методики, которые обязательно включали ферментативную обработку и получение сферопластов (протопласты грибов) уже не используются.

ДНК интродуцируется посредством кальциевого метода, как для бактерий.

Иначе ДНК может упаковываться в липосомы (липидные везикулы, которые могут сливаться с плазматической мембраной)

Часто используется электропорация.



Трансформация растений

Требования:

- способность генерировать целое нормально размножающееся растение (тотипотентность) из одиночной клетки
- требует знание и освоение методов культур клеток и тканей растений (выбор правильного гормонального режима)
- конструкции ДНК обычно содержат:
 - *интересующий нас ген(ы)
 - *ген(ы) селективного маркера
- подбор методов трансформации
- селекционная среда (антибиотик или гербицид)

Два наиболее часто используемых метода трансформации растений: основанный на использовании *Agrobacterium* и прямая доставка генов - Direct gene transfer (DGT): биолистический

Трансформация растений

Разные виды растений и разные их части могут использоваться для трансформации (эмпирический подход в подборе – т.е. берется «то», что лучше трансформируется).

Типичные экспланты для трансформации:

Листовые диски (например, табака)

Диски из столонов (картофель)

Scutellar tissue – скutelла (злаки) С

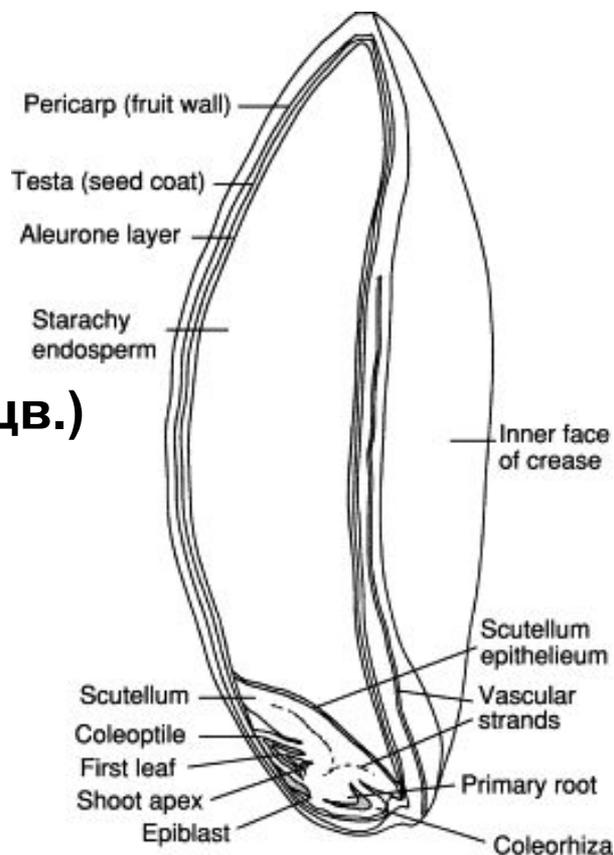
Семядоли (томаты)

Стебли проростков (салат, капуста, крестоцв.)

- Регенерация целого растения обычно достигается на питательной среде, содержащей определенную комбинацию фитогормонов – в частности, ауксинов и цитокининов.

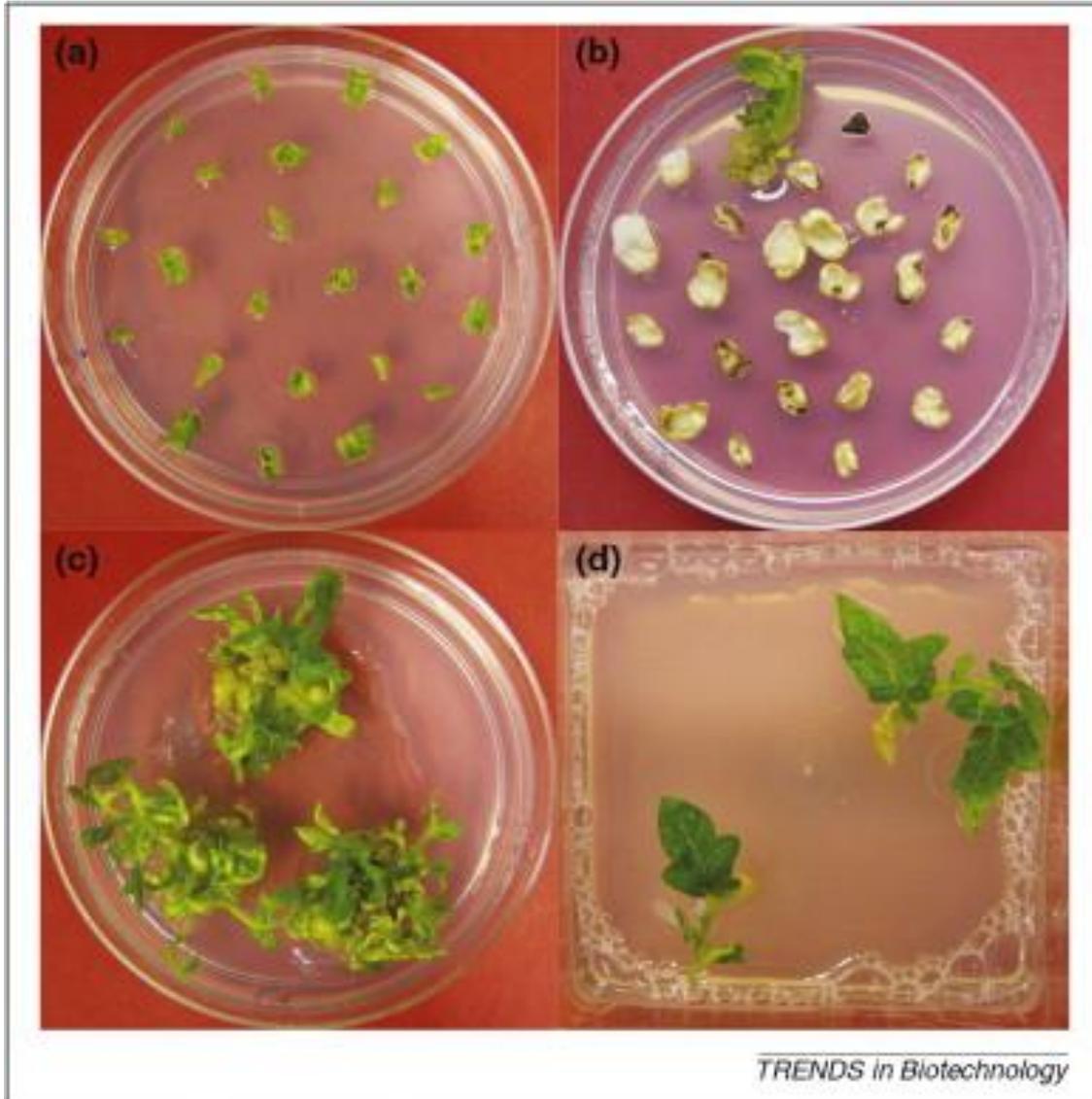
- Два типа регенерации:

1. Органогенез. Формируется стебель-побег, потом корень (например, табак)
2. Эмбриогенез. Образуется эмбрион. Который затем развивается в растение (злаки)



Листовые диски табака, в которых регенерируются побеги

Регенрация томатов из ЛИСТОВЫХ ДИСКОВ И СЕМЯДОЛЕЙ



Табак



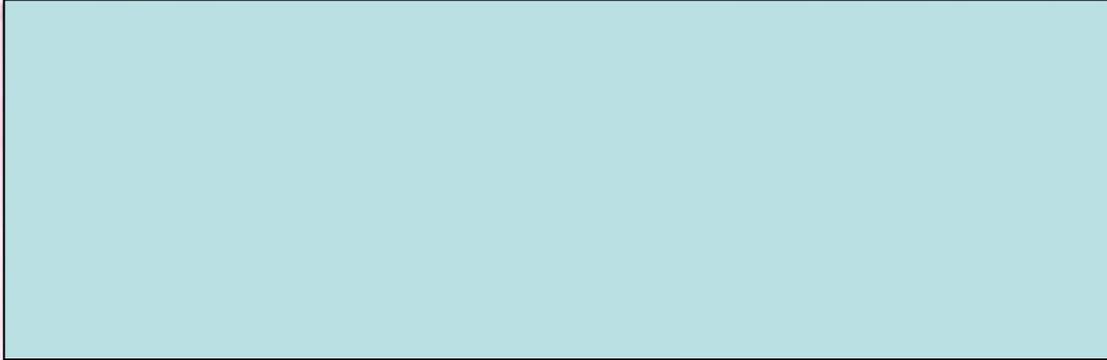
3 месяца



Укоренение



Rice transformation

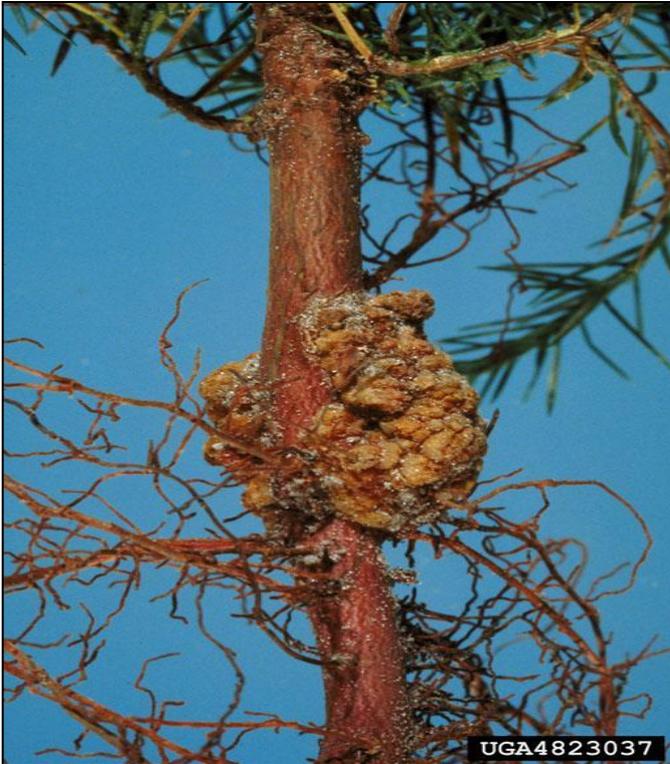


Трансформация на основе *Agrobacterium*

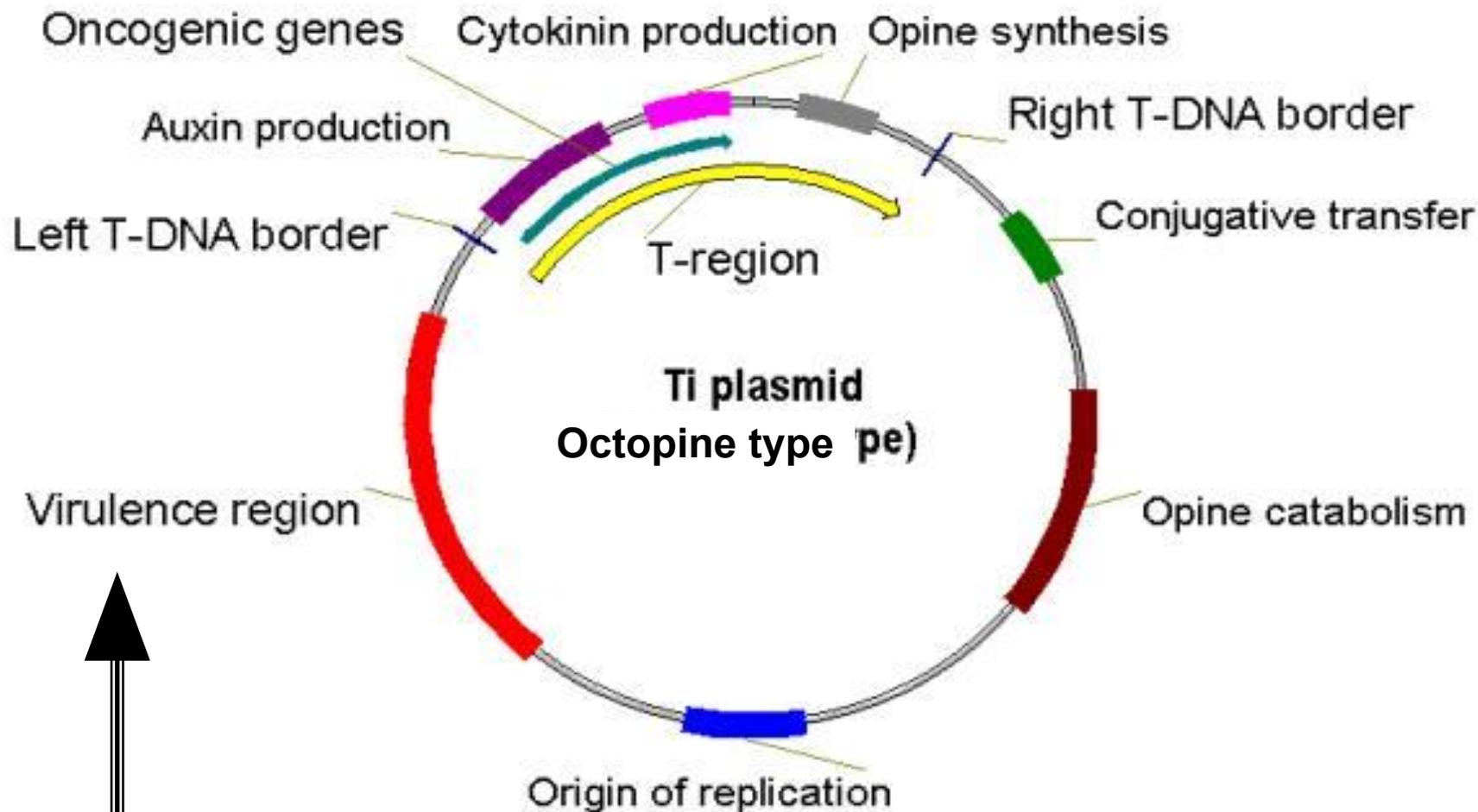
- *Agrobacterium tumefaciens* – природный генный инженер
- «Происходящий» из почвы патоген растений: образуется галлы - опухоли
- Может переносить свою собственную ДНК (Ti-плазмиду) в хромосомы растения
- Растение в результате продуцирует специфические питательные элементы для бактерии
- T-ДНК: ‘левая’ и ‘правая’ границы (граничные сигналы); между ними – онкогенные и опинные гены (первые – чтобы росла опухоль, вторые для выработки питат. прод.)

Патоген (от греч. παθογένεια — греч. πάθος — «страдание» и греч. γίγνομαι — «порождающий»)

**Растительные
опухоли –
гиперплазии,
индуцируемые
Agrobacterium**



Типичная Ti-плазмида и её T-ДНК



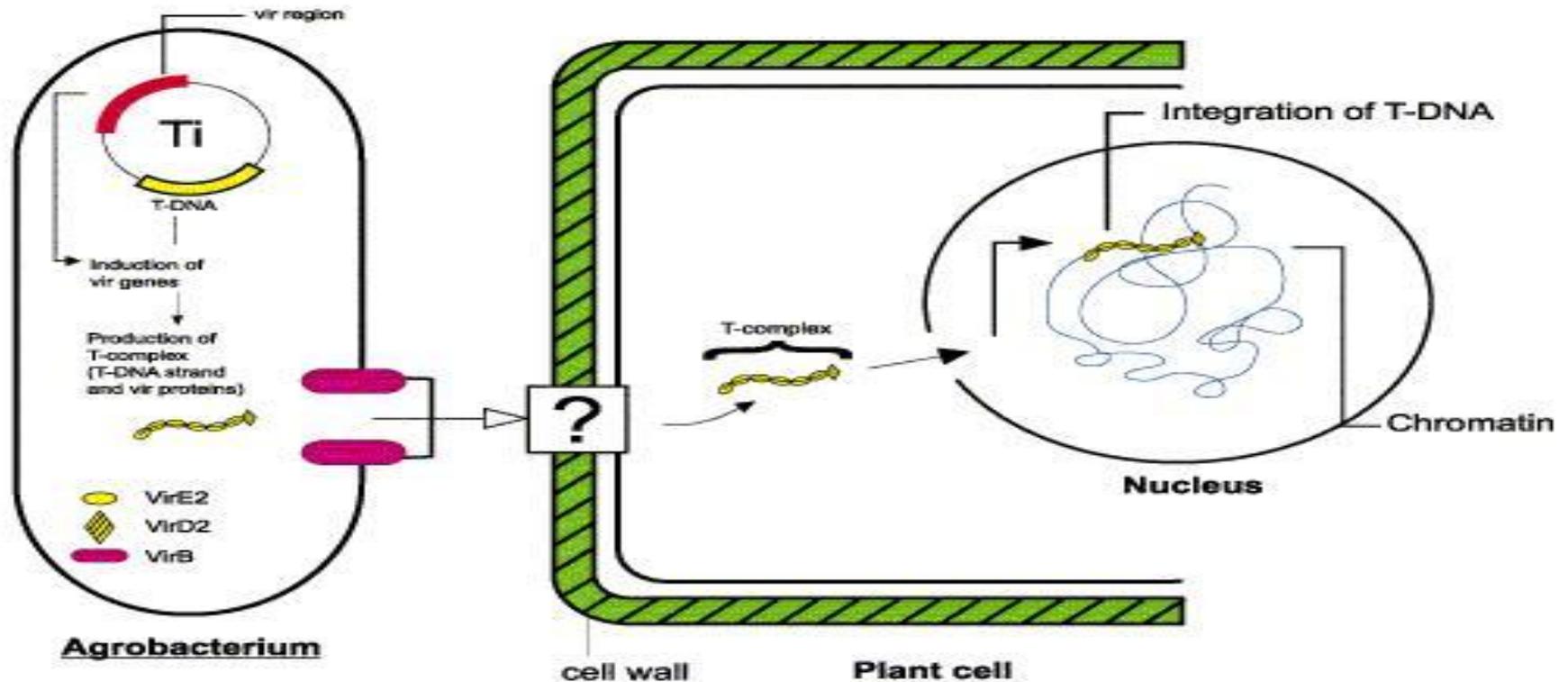
Кодирует все гены, необх. для переноса T-ДНК из бактериума в ядро растения

современные бинарные векторы имеют только правые и левые гнаничные сигналы (границы) T-ДНК, а гены вирулентности могут содержаться в отдельной плазмиде

Ti plasmids (continued)

- *Ti* plasmid 'disarmed': oncogenic and opine genes removed
- Gene of interest (plus antibiotic resistance gene) inserted between T-DNA borders
- Plasmid transferred into *Agrobacterium*
- *Agrobacterium* transforms plant cells
- Transformed cells selected (antibiotic)
- Transgenic plants regenerated
- Advantages
 - low copy number
 - genes integrated into active regions in chromosomes
- Disadvantage: limited by host range

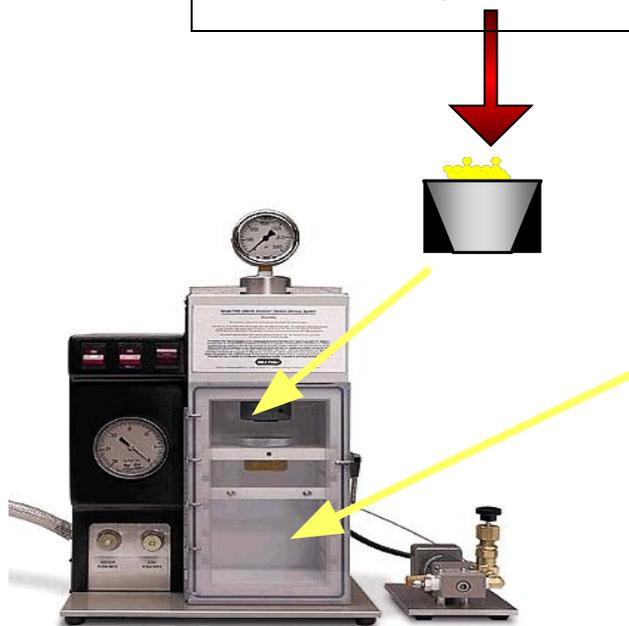
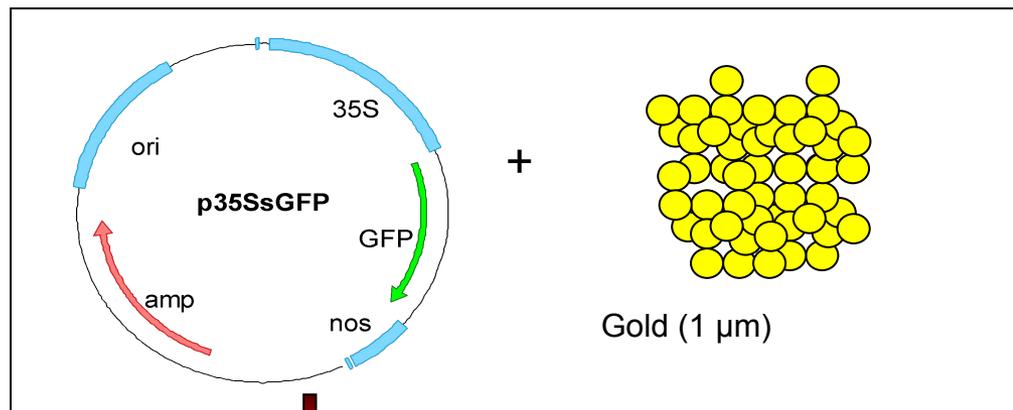
Transformation of plant cells by Agrobacterium



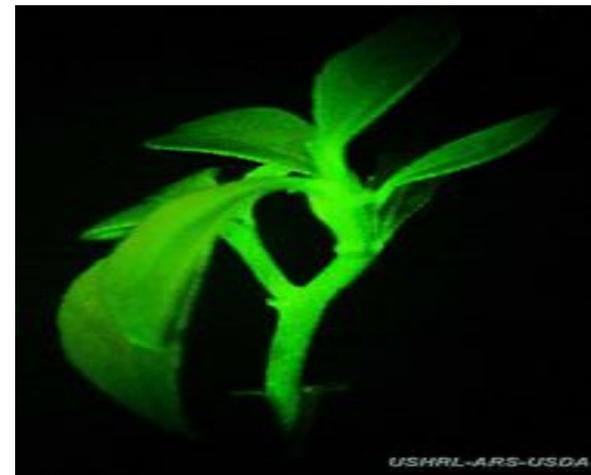
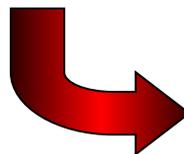
T-DNA transfer into the Plant's Genome

Adapted from Zupan et al 2000

Биолистика



Селекция,
регенерация



Direct Gene Transfer - Biolistics

- DGT – any method using naked DNA delivery to plant cells
- Biolistics most successful technology
- Also known as microprojectile bombardment
- DNA precipitated onto microscopic gold or tungsten particles
- Particles accelerated into plant cells using a ‘gene gun’
- Transgenic cells selected, whole plants regenerated
- Advantage over *Agrobacterium*: not limited by host range
- Disadvantage: higher copy number