

Векторы для клонирования и экспрессии генов

Векторы являются одним из основных инструментов технологии рекомбинантной ДНК и молекулярного клонирования. Под вектором в молекулярной биологии понимают молекулу ДНК, которая используется для переноса определенного генетического материала в клетку-хозяина и обеспечивает его сохранение, размножение или экспрессию. Благодаря векторным системам исследователь может работать не только с целым геномом, но и с конкретным геном или фрагментом ДНК, изучать его структуру и функцию, получать большое количество копий, а также обеспечивать синтез соответствующего белкового продукта.

В самом общем виде принцип работы вектора можно представить следующим образом: интересующий исследователя фрагмент ДНК включается в молекулу вектора, в результате чего формируется рекомбинантная ДНК. Полученная конструкция переносится в подходящую клетку-хозяина. В зависимости от типа вектора и цели эксперимента вставленный фрагмент либо размножается вместе с вектором, либо используется клеточной системой для образования РНК и белка.

Таким образом, необходимо различать две основные задачи. Первая заключается в клонировании ДНК, то есть получении и сохранении большого количества копий определенного генетического фрагмента. Вторая заключается в экспрессии гена, то есть использовании генетической информации для синтеза соответствующего продукта. Для этих целей создаются клонирующие и экспрессионные векторы.

Наиболее известными и широко используемыми векторами являются плазмиды. Плазмиды представляют собой внехромосомные молекулы ДНК, встречающиеся у многих бактерий. В природе они могут содержать различные дополнительные гены, однако для молекулярно-биологических исследований природные плазмиды были модифицированы таким образом, чтобы сделать их удобными для генетического конструирования.

Современный плазмидный вектор содержит несколько функциональных элементов, каждый из которых выполняет определенную задачу. Одним из наиболее важных является *origin of replication*, или *ori*. Это участок ДНК, обеспечивающий начало репликации плазмиды в определенной клетке-хозяине. Наличие подходящего *ori* позволяет вектору поддерживаться и копироваться внутри клетки.

Вторым важным компонентом является селективный маркер. Он позволяет идентифицировать или отбирать клетки, содержащие вектор. В классических бактериальных системах в качестве селективных маркеров широко использовались гены устойчивости к определенным антибиотикам. Однако существуют и другие системы селекции. Основная идея остается одинаковой: необходимо отличить клетки, получившие генетическую конструкцию, от клеток, в которых она отсутствует. Еще одним важным участком является *multiple cloning site* — MCS, или множественный сайт клонирования. Он представляет собой сравнительно короткую последовательность ДНК, содержащую несколько участков, распознаваемых различными рестрикционными эндонуклеазами. MCS позволяет выбрать подходящие участки для включения целевого фрагмента ДНК в вектор.

Если основной задачей является получение большого количества копий определенного фрагмента ДНК, используется клонирующий вектор. Такой вектор должен прежде всего обеспечивать стабильное существование рекомбинантной молекулы в клетке-хозяине и возможность ее размножения

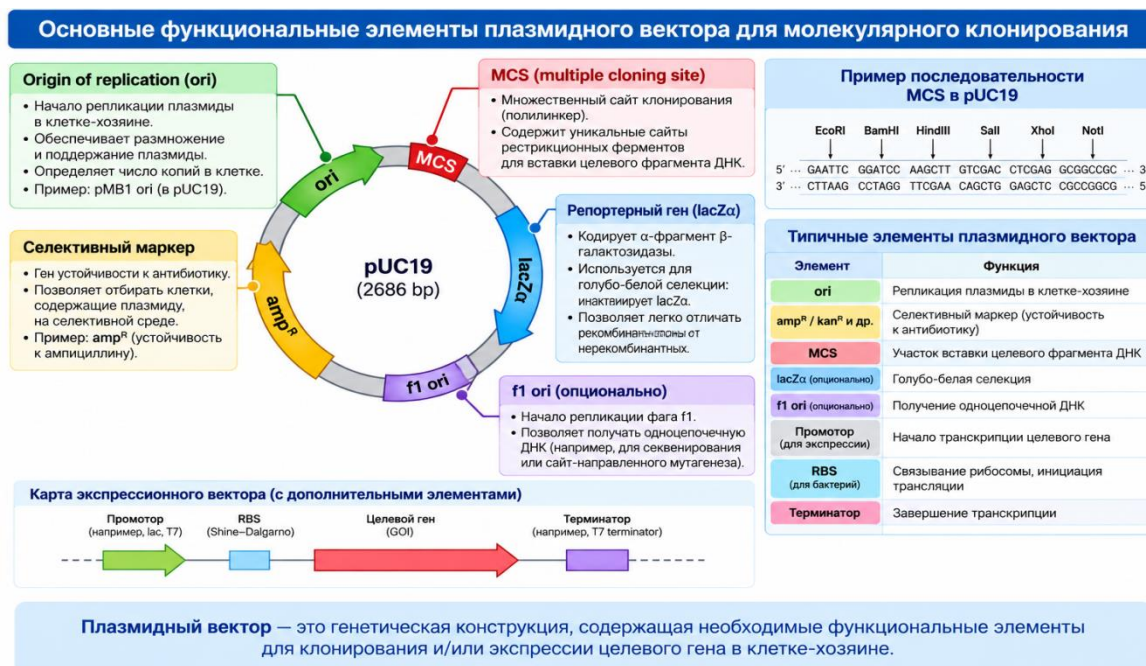


Рисунок 1. Основные функциональные элементы плазмидного вектора для молекулярного клонирования.

Общий принцип применения клонирующего вектора можно представить следующим образом:

целевой фрагмент ДНК → включение во вектор → рекомбинантная молекула → перенос в клетку-хозяина → отбор клеток → размножение → получение большого количества рекомбинантной ДНК.

Для клонирующего вектора особенно важны наличие *ori*, селективного маркера и удобной области для включения вставки. В зависимости от конструкции могут присутствовать и дополнительные элементы, облегчающие скрининг рекомбинантных клонов.

Однако наличие вектора в клетке еще не доказывает, что получена именно необходимая рекомбинантная конструкция. Поэтому после селекции проводится скрининг потенциальных клонов. Для проверки могут использоваться PCR, рестрикционный анализ и секвенирование. Особенно надежным этапом подтверждения является определение нуклеотидной последовательности интересующего участка.

Клонирующие векторы различаются по своей природе и по размеру фрагментов ДНК, которые они способны переносить. Для относительно небольших фрагментов широко применяются плазмиды. Для более крупных последовательностей были разработаны другие векторные системы.

К ним относятся бактериофаговые векторы, космиды, ВАС и YAC. ВАС расшифровывается как bacterial artificial chromosome — бактериальная искусственная хромосома, а YAC — как yeast artificial chromosome — дрожжевая искусственная хромосома. Эти системы исторически имели большое значение при работе с крупными участками геномной ДНК и при создании геномных библиотек.

В общем случае выбор вектора определяется размером интересующего фрагмента, типом клетки-хозяина, необходимой стабильностью конструкции и конечной целью эксперимента. Поэтому нельзя говорить об одном универсальном векторе, оптимальном для всех молекулярно-генетических исследований.

Если исследователю необходимо не просто сохранить и размножить ген, а получить соответствующий РНК или белковый продукт, используется экспрессионный вектор. Такой вектор содержит дополнительные регуляторные элементы, необходимые для эффективной экспрессии целевого гена.

Одним из главных элементов экспрессионного вектора является промотор. Промотор представляет собой участок ДНК, с которым взаимодействует транскрипционный аппарат клетки и который определяет начало транскрипции. Следовательно, наличие соответствующего промотора необходимо для образования РНК с целевого гена.

Промотор должен быть совместим с выбранной клеточной системой. Конструкция, предназначенная для экспрессии в бактериях, может существенно отличаться от вектора для дрожжей, растений или клеток млекопитающих. Регуляторные механизмы разных организмов отличаются, поэтому один и тот же набор генетических элементов нельзя автоматически использовать во всех системах.

Для бактериальной экспрессии большое значение имеет также *ribosome binding site* — RBS, то есть участок связывания рибосомы. Он располагается в соответствующем положении относительно кодирующей последовательности и участвует в инициации трансляции.

После целевого гена обычно располагаются элементы, обеспечивающие правильное завершение транскрипции. Поэтому упрощенная структура экспрессионной кассеты может быть представлена следующим образом:

промотор → регуляторные элементы → участок инициации трансляции → целевой ген → терминатор.

Сам экспрессионный вектор при этом также должен содержать элементы, необходимые для его поддержания и отбора в клетке, например *ori* и соответствующий селективный маркер.

Следовательно, главное различие между клонирующим и экспрессионным вектором связано с конечной целью. В клонирующем векторе основной задачей является получение и поддержание копий определенного фрагмента ДНК. В экспрессионном векторе необходимо дополнительно обеспечить правильное считывание генетической информации и образование соответствующего продукта.

Это различие можно представить очень просто:

Клонирующий вектор: ДНК → множество копий ДНК.

Экспрессионный вектор: ДНК → РНК → белок.

При создании экспрессионной конструкции важно учитывать ориентацию вставки. Ген должен быть расположен относительно промотора таким образом, чтобы транскрипция происходила в правильном направлении. Если кодирующая последовательность объединяется с дополнительными белок-кодирующими элементами, необходимо также сохранить правильную рамку считывания.

В экспрессионные векторы могут включаться последовательности, кодирующие специальные белковые метки, или *tags*. Такие метки помогают обнаруживать, исследовать или очищать рекомбинантный белок. После экспрессии целевой продукт можно отделить от других клеточных белков с использованием соответствующей системы очистки.

Еще одним важным вопросом является регулируемость экспрессии. Постоянная интенсивная экспрессия определенного белка может создавать значительную нагрузку

на клетку-хозяина или отрицательно влиять на ее жизнеспособность. Поэтому во многих экспрессионных системах используются регулируемые промоторы, позволяющие контролировать активность целевого гена.

Общий принцип такой системы заключается в том, что сначала клетки размножаются, а затем при соответствующем экспериментальном сигнале активируется экспрессия интересующего гена. Это позволяет разделить этап накопления клеточной биомассы и этап получения целевого продукта.

Важным этапом является выбор клетки-хозяина. Одной из наиболее распространенных систем является бактериальная. Ее преимуществами являются сравнительная простота, быстрый рост и хорошо изученная генетика. Однако бактериальная клетка подходит не для всех белков.

Некоторые эукариотические белки требуют сложного сворачивания или посттрансляционных модификаций. Поэтому для их получения могут использоваться дрожжи, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Каждая система имеет свои преимущества и ограничения.

При использовании бактериальной системы для получения эукариотического белка необходимо также учитывать наличие интронов. Геномные гены эукариот часто содержат экзоны и интроны, тогда как бактериальная клетка не обладает тем же механизмом сплайсинга, что и эукариотическая клетка.

Поэтому для экспрессии эукариотических генов в бактериальных системах часто используют cDNA, полученную на основе зрелой мРНК. Такая последовательность соответствует уже процессированному транскрипту и не содержит интронов, удаленных при созревании мРНК.

Общая схема в этом случае выглядит следующим образом:

мРНК → обратная транскрипция → cDNA → включение в экспрессионный вектор → клетка-хозяин → экспрессия → рекомбинантный белок.

Помимо плазмид существуют вирусные векторы. Они основаны на способности вирусных систем эффективно доставлять генетический материал в клетки. Для исследовательских и некоторых биомедицинских задач используются модифицированные вирусные системы, из которых удаляются или изменяются определенные природные элементы и добавляется необходимая генетическая конструкция.

При выборе такой системы принципиальное значение имеют тип клеток, особенности доставки, продолжительность экспрессии и требования биобезопасности. Поэтому вирусный вектор рассматривается не просто как средство переноса ДНК, а как специализированная система доставки генетического материала.

Отдельное значение имеют векторы для растений. Одной из известных основ таких систем является природная способность некоторых бактерий переносить участки ДНК в растительные клетки. Эти механизмы были адаптированы для биотехнологических задач. Существуют также другие методы доставки генетических конструкций в растительные клетки.

Таким образом, понятие «вектор» включает большое разнообразие молекулярных систем. Плазмиды особенно удобны для бактериального клонирования и многих лабораторных задач. ВАС позволяют работать с крупными участками ДНК. Дрожжевые векторы предназначены для соответствующих клеток-хозяев. Растительные и вирусные векторы решают специфические задачи доставки и экспрессии.

Современные векторы становятся все более специализированными. Помимо стандартных клонирующих и экспрессионных конструкций существуют репортерные векторы, shuttle-векторы и системы для функционального анализа генов.

Shuttle-вектор способен поддерживаться в двух различных типах клеток-хозяев благодаря наличию соответствующих функциональных элементов. Например, определенная конструкция может сначала размножиться в бактериальной системе, а затем использоваться для исследования в эукариотических клетках.

Репортерные векторы содержат ген, продукт которого можно сравнительно легко обнаружить. Они используются для исследования активности промоторов, регуляторных последовательностей и других процессов. К известным репортерным белкам относится GFP — green fluorescent protein.

Например, исследуемый промотор можно функционально связать с репортерным геном. Если промотор активен, происходит экспрессия репортера и появляется измеримый сигнал. Таким способом можно изучать регуляцию генов в различных экспериментальных условиях.

Векторные системы имеют большое значение и для современных технологий редактирования генома. Для доставки компонентов некоторых экспериментальных систем CRISPR используются соответствующие генетические конструкции. Вектор может обеспечивать экспрессию необходимых компонентов в исследуемой клетке.

Независимо от назначения вектора необходимо подтвердить правильность созданной конструкции. Сначала может проводиться PCR-скрининг предполагаемых положительных клонов. Затем используется рестрикционный анализ или другие методы. Окончательным подтверждением интересующего участка часто служит секвенирование.

Это особенно важно для экспрессионных конструкций. Даже небольшое изменение нуклеотидной последовательности может изменить аминокислотную последовательность белка или привести к нарушению рамки считывания. Поэтому перед функциональными экспериментами необходимо убедиться, что последовательность соответствует запланированной конструкции.

Если объединить весь процесс работы с вектором, получится следующая логическая цепочка:

выбор целевого гена → выбор подходящего вектора → создание рекомбинантной конструкции → перенос в клетку-хозяина → селекция → скрининг → подтверждение конструкции → размножение ДНК или экспрессия гена → анализ полученного продукта.

Таким образом, выбор вектора всегда определяется целью эксперимента. Если необходимо получить большое количество копий определенного фрагмента ДНК, выбирают подходящий клонирующий вектор. Если необходимо получить белковый продукт, требуется экспрессионная система с соответствующими регуляторными элементами. Если необходимо доставить ген в определенный тип клеток, выбирается система, подходящая именно для этой задачи.

Главный принцип можно сформулировать следующим образом: вектор является молекулярным носителем генетической информации, а его функциональные элементы определяют, где и каким образом эта информация будет поддерживаться и использоваться.

Для клонирования особенно важны *ori*, селективный маркер и область клонирования, тогда как для экспрессии дополнительно необходимы промотор и другие регуляторные элементы, обеспечивающие образование РНК и белкового продукта.

Поэтому студент должен понимать не только название конкретного вектора, но и уметь анализировать его карту. Если на карте плазмиды обозначены *ori*, MCS, селективный маркер, промотор, целевой ген и терминатор, необходимо уметь

объяснить функцию каждого элемента и определить, для какой задачи предназначена данная конструкция.

В конечном итоге все разнообразие векторных систем подчиняется одной общей логике: вектор должен доставить необходимую генетическую последовательность в подходящую биологическую систему и обеспечить выполнение той функции, ради которой была создана рекомбинантная конструкция.