

## Векторные молекулы

### 1. Понятие вектор и их виды

**Вектор** (в генетике и молекулярной биологии) – молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала внутрь клетки, в том числе в клетку живого многоклеточного организма *in vivo*.

Векторы для растений – это молекулы ДНК (чаще всего плазмиды), используемые в генной инженерии для переноса генетического материала в клетки растений с целью создания трансгенных организмов.

Типы векторов:

1. Агробактериальные векторы (*Agrobacterium*-mediated). Наиболее популярный метод, использующий способность бактерии *Agrobacterium tumefaciens* переносить часть своей ДНК (Т-DNA) в геном растения.

2. Бинарные векторы (Binary vectors). Бинарный вектор состоит из двух плазмид, один из которых содержит гены вирулентности (*vir*-гены), а другой – целевой ген между фланкирующими последовательностями (LB и RB).

3. Коинтегративные векторы. Целевой ген встраивается в T<sub>i</sub>-плазмиду через гомологичную рекомбинацию.

4. Вирусные векторы. Используются для быстрой экспрессии генов, основаны на вирусах растений (например, вирус мозаики цветной капусты – CaMV).

Вирусная трансформация растений – это метод введения генетического материала с использованием модифицированных вирусных векторов (на основе вирусов табачной мозаики, мозаики коровьего гороха и др.), обеспечивающий быстрое распространение трансгена, временную (транзистентную) экспрессию, высокую продукцию белков и редактирование генома. Они включают агроинфильтрацию (введение вирусов через бактерии) и прямое заражение РНК/ДНК-транскриптами.

Основные подходы к вирусной трансформации:

1. Использование вирусных векторов (вирусных векторов на основе ДНК/РНК):

2. Создание рекомбинантных вирусов, несущих целевой ген, который встраивается в вирусный геном.

3. Применение вирусов, способных к быстрой репликации и системному движению по растению, что позволяет быстро получить экспрессию гена во всем растении (*in planta*).

Типы вирусных векторов:

1. Векторы на основе РНК-вирусов, которые обеспечивают высокий уровень экспрессии, но не интегрируются в геном растения, обеспечивая транзистентную (временную) экспрессию.

2. Векторы на основе ДНК-вирусов (например, геминивирусы), которые способны к высокой репликации в ядре клетки, используются для трансформации однодольных.

Метод имеет свои преимущества:

1. Высокая экспрессия, т. е. вирусы быстро размножаются, обеспечивая синтез большого количества целевого белка (фарминг).

2. Скорость, т. е. получение результатов (временная экспрессия) занимает несколько дней, а не месяцев, как при получении стабильных трансгенных линий.

3. Транзиентность, т. е. вектор обычно не передается по наследству, что удобно для временных экспериментов.

4. Редактирование генома, т. е. вирусные векторы применяются для доставки компонентов CRISPR/Cas для модификации генома.

Данные типы векторов имеют ограничения, которые связаны чаще всего с тем, что они заражают только определенные виды растений и не всегда интегрируются в хромосому, обеспечивая временную экспрессию.

5. Физические векторы, обеспечивающие прямую доставку ДНК, к ним относятся:

Биолистика (генная пушка), микрочастицы золота или вольфрама с ДНК выстреливаются в растительные ткани.

Электропорация/ПЭГ, введение ДНК в протопласты с помощью электрического тока или полиэтиленгликоля.

## **2. Методы получения рекомбинантных молекул ДНК и введение их в клетки реципиента**

Получение рекомбинантных молекул ДНК – это ключевой метод генной инженерии, включающий создание гибридных ДНК путем соединения фрагментов из разных источников (донорская ДНК и вектор) с помощью ферментов. Основные этапы включают рестрикцию (разрезание), лигирование (сшивание), трансформацию в клетки-хозяева и отбор рекомбинантных клонов.

Основные методы получения рекомбинантных ДНК:

1. Рестрикция (ферментативное расщепление): Использование рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз) для разрезания донорской ДНК и вектора (обычно плазмиды) в специфических сайтах, создавая «липкие» или тупые концы.

2. Лигирование (сшивание): Соединение разрезанного вектора и целевого гена с помощью фермента ДНК-лигазы, которая восстанавливает сахарно-фосфатный остов, создавая единую кольцевую молекулу.

3. Молекулярное клонирование: Введение полученной конструкции (вектор + вставка) в клетки-хозяева (бактерии, дрожжи) для репликации в миллионах копий.

4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР): Амплификация *in vitro* (в пробирке) специфического фрагмента ДНК, который затем встраивается в вектор.

5. Химико-ферментативный синтез: Искусственное создание последовательностей ДНК с использованием автоматических ДНК-синтезаторов.

6. Сборка Гибсона и методы рекомбинации: Современные способы сборки протяженных участков ДНК, позволяющие сшивать несколько фрагментов за одну реакцию.

Процесс получения рекомбинантных ДНК включает:

1. Выделение целевого гена из организма-донора.
2. Выбор и подготовка вектора, которым чаще всего являются плазмиды кольцевые ДНК бактерий.
3. Лигирование, т. е. объединение гена и вектора.
4. Трансформация, которая способствует введению рекомбинантной ДНК в клетку-реципиент.
5. Скрининг (отбор) клеток, содержащих нужную рекомбинантную ДНК.

### 3. Идентификация и отбор

Основные этапы отбора и идентификации

1. Трансформация. Предусматривает введение лигазной смеси (вектор + вставка) в бактериальные клетки (обычно *E. coli*).
2. Первичный отбор (селекция). На данном этапе происходит выращивание клеток на среде с антибиотиком. Выживают только те клетки, которые приняли плазмиду с геном устойчивости.
3. Идентификация рекомбинантных клонов состоит в следующем:
  - а. Если вставка разрывает ген *lacZ* (альфа-комплементация), то рекомбинантные клоны остаются белыми, а «пустые» – синими так называемая бело-голубая селекция.
  - б. Гибридизация колоний, т. е. использование меченых зондов для поиска конкретной последовательности.
  - в. Быстрая проверка колоний на наличие вставки с помощью праймеров – ПЦР-скрининга.
  - д. Плазмиды выделяют, нарезают ферментами и анализируют электрофорезом для подтверждения размера вставки – рестрикционный анализ.
4. Секвенирование. Окончательное подтверждение структуры ДНК.

### 4. Библиотека генов

Библиотека генов (или геномная библиотека) – это упорядоченная коллекция фрагментов ДНК организма, клонированных в специальных векторах (бактериях или вирусах), представляющая весь его геном или часть генов. Она служит для хранения, анализа и выделения отдельных генов для нужд генетической инженерии, диагностики заболеваний и изучения структуры ДНК. Для этого ДНК организма «нарезают» на части и встраивают в векторы (бактериальные плазмиды, космиды, ВАС/УАС), которые затем размножаются внутри бактерий.

Различают два типа библиотек генов:

1. Геномная библиотека, которая содержит всю ДНК организма, включая неактивные участки (интроны).

Библиотека кДНК , которая содержит только копии активных генов, работающих в данный момент (без некодирующих последовательностей).