

На правах рукописи

САМАТОВ ТИМУР РУСТЭМОВИЧ

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ВНЕ КЛЕТКИ

03.00.03 – Молекулярная биология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва - 2006

Работа выполнена в Институте белка РАН

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук

Четверин Александр Борисович

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор

Лукьянов Сергей Анатольевич

доктор биологических наук, профессор

Степанов Александр Семенович

Ведущая организация:

Институт молекулярной генетики

РАН

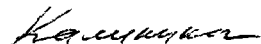
Защита состоится «1» июня 2006 года в 10⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 501 001 76 при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «19» апреля 2006 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор биологических наук



Н.О. Калинина

2006А
7911

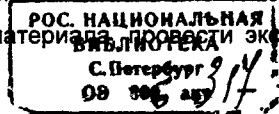
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. На сегодняшний момент все большее применение находят и большее значение приобретают методы *in vitro*. По сравнению с подходами *in vivo*, они имеют существенные преимущества: позволяют исследователю в большей степени менять и контролировать условия эксперимента, они быстрее и их проще автоматизировать, они позволяют избежать ограничений, накладываемых живыми клетками и векторами, соответственно, здесь меньше выражен естественный отбор и, наконец, они позволяют работать с большим разнообразием последовательностей нуклеиновых кислот и белков.

Однако среди всего многообразия подходов *in vitro* нет метода, который позволил бы провести экспрессию наборов РНК и ДНК, их скрининг по свойствам синтезированного продукта и в результате получить индивидуальные последовательности (то есть выделить клоны).

Истинные молекулярные клоны можно получить *in vitro* с помощью метода молекулярных колоний, экспоненциально размножая нуклеиновые кислоты в пластинке геля. В результате потомство каждой исходной молекулы концентрируется в ограниченной зоне вокруг родительской молекулы, образуя колонию. Такая колония по сути и является молекулярным клоном. Ранее в Лаборатории биохимии вирусных РНК Института белка РАН при помощи размножения Q β репликазой в пластинке агарозного геля были получены молекулярные клоны реплицирующихся РНК в виде колоний и показана точность и количественность этого метода, названного «методом молекулярных колоний». Использование ПЦР в качестве системы размножения позволило бы получать клоны на уровне ДНК, при этом специфичность размножения была бы ограничена лишь используемыми олигонуклеотидными праймерами.

Цель и задачи работы. Целью данной работы является создание бесклеточного метода клонирования генов, позволяющего проводить скрининг клонов по свойствам кодируемых продуктов. В связи с этим были поставлены следующие задачи: разработать ПЦР-версию метода молекулярных колоний и исследовать ее возможности на примере клонирования гена с использованием биологической ткани в качестве стартового материала, провести экспрессию



(транскрипцию и трансляцию) генов в молекулярных колониях и детектировать синтезированный *in situ* белок по его функциональной активности.

Научная новизна и практическая значимость. Разработана ПЦР-версия метода молекулярных колоний. Найдены условия для размножения полноразмерных генов в виде колоний ДНК, содержащих до 100 миллионов копий исходной матрицы. На примере кДНК гена люциферазы светляка *Luciola mingrelica* впервые осуществлено истинно молекулярное клонирование и последующее размножение *in vitro* индивидуальных последовательностей из библиотеки кДНК. Показано, что клонирование может быть осуществлено с использованием генетического материала, эквивалентного содержанию всего одной клетки.

Разработана методика транскрипции и транскрипции-трансляции генов в молекулярных колониях. Продемонстрировано, что синтезированный в молекулярных колониях белок является функционально активным. Разработанный метод может быть использован для скрининга генов по функции продуктов экспрессии, то есть для прямой селекции РНК и белков с заданными свойствами. Таким образом, создан первый бесклеточный генетический дисплей, который позволяет получить истинные молекулярные клоны; при этом связь ДНК с соответствующими РНК и белками осуществляется за счет того, что они находятся в составе одной и той же молекулярной колонии.

Апробация работы и научные публикации. Работа прошла апробацию на открытом семинаре Лаборатории биохимии вирусных РНК Института белка РАН. Результаты работы опубликованы в 2 статьях в международных научных журналах и доложены на 6 международных научных конференциях, а также на 2 ежегодных научных конференциях Института белка РАН.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного генетическим дисплеям, описания методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 113 страницах машинописного текста и содержит 18 рисунков. Библиография включает 113 названий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка ПЦР-версии метода молекулярных колоний

Выбор иммобилизованной среды. Полимеразная цепная реакция

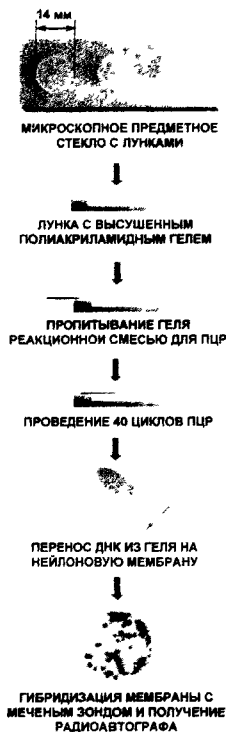


Рис. 1. Выращивание и детекция колоний ДНК.

включает в себя многократный нагрев образца до высокой температуры, поэтому в качестве иммобилизованной среды для проведения реакции нами был выбран термоустойчивый полиакриламидный гель. После серии предварительных экспериментов была разработана следующая схема выращивания и детекции колоний ДНК (рис. 1).

Молекулярные колонии формируются за счет того, что полиакриламидный гель препятствует диффузии продуктов реакции. Однако при этом он также затрудняет подвижность компонентов реакционной смеси, в особенности высокомолекулярных (например, ДНК-полимеразы или такой огромной молекулы, как рибосомы, имея в виду дальнейшую экспрессию клонов *in situ*). Для того, чтобы в конечном счете стала возможной детекция продуктов экспрессии единичных колоний, необходимо было добиться максимальной эффективности

всех проводимых в геле реакций.

Первым шагом в данном направлении стало сравнение гелей с разными концентрациями акриламида и сшивающего агента (рис. 2). Нас интересовал наименее концентрированный гель, колонии в котором оставались бы компактными. Мы остановились на 5% геле с

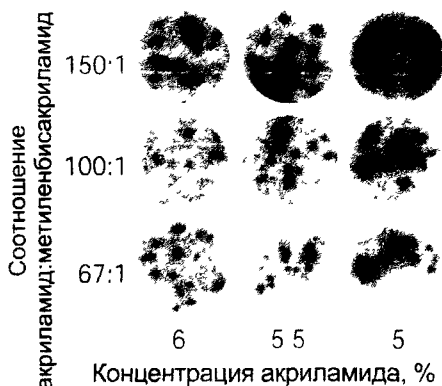


Рис. 2. Зависимость размера колоний от концентрации полиакриламидного геля. В каждый гель внесли по 30 молекул гена GFP

соотношением акриламид:метиленабисакриламид 100:1. Несмотря на низкую концентрацию, этот гель обладал приемлемой механической прочностью и был способен выдержать без повреждений манипуляции, проводимые в процессе эксперимента. В то же время, колонии в нем были яркими, что отражало содержание продукта ПЦР.

Смесь термостабильных ДНК-полимераз. Для более точного и эффективного размножения целых генов при помощи ПЦР используют смесь термостабильных ДНК-полимераз из *Thermus aquaticus* и экстремального термофильного организма, например, *Pyrrococcus woesei*. Нами была исследована зависимость эффективности размножения гена GFP в геле от концентрации Pwo-полимеразы, добавленной к Taq-полимеразе. На рисунке 3 представлено сравнение выбранной оптимальной концентрации Pwo-полимеразы (0,02 нг/мкл) с исходной смесью для ПЦР. Как можно видеть, использование смеси термостабильных ДНК-полимераз действительно привело к заметному увеличению яркости колоний.

Taq Taq+Pwo



Рис. 3. Pwo ДНК-полимераза увеличивает эффективность ПЦР в геле. Сравнение геля с исходной смесью для ПЦР («Taq») и геля с добавленной Pwo-полимеразой до 0,02 нг/мкл («Taq+Pwo»). В каждый гель внесли по 30 молекул гена GFP.

Эффективность переноса ДНК из геля на мембрану. Схема проведения ПЦР в геле включает в себя стадию переноса новосинтезированной ДНК из геля на мембрану с целью дальнейшей гибридизации и выявления колоний (рис. 1). Для количественной оценки эффективности ПЦР в геле необходимо знать, какая при этом доля ДНК оказывается на мембране. Эффективность переноса ДНК из геля на мембрану позволил выяснить следующий эксперимент (рис. 4). Плазмиду с геном GFP

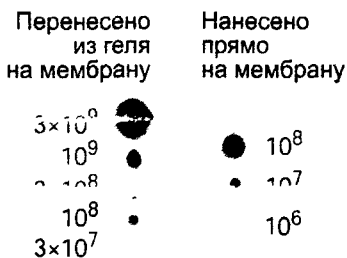


Рис. 4. Эффективность переноса ДНК из геля на нейлоновую мембрану. Левая панель: указанные количества молекул плазмиды, из которой путем обработки рестриктазой PvuII был вырезан фрагмент, соответствующий продукту ПЦР с геном GFP, нанесли на сухой гель, затем гель пропитали буфером до полного восстановления его объема и ДНК перенесли на мембрану. Правая панель: указанные количества такой же ДНК нанесли непосредственно на мембрану. Далее обе мембраны гибридизовали с радиоактивным зондом и получили их радиоавтографы.

обработали рестриктазой PvuII и получили фрагмент, соответствующий продукту ПЦР. Указанные на рисунке 4 количества молекул этого фрагмента нанесли на сухой гель, затем добились полного восстановления объема геля, пропитав его буфером. Далее провели перенос ДНК из геля на мембрану. Эту мембрану вместе с другой, на которую указанные количества той же ДНК нанесли непосредственно, гибридизовали с зондом и получали радиоавтограф. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в результате переноса на мембрану оказывается не более 10% от всей ДНК, находящейся в геле.

Размножение генов обелина и GFP в виде молекулярных колоний. В геле с выбранной концентрацией акриламида и с использованием смеси *Taq*- и *Pwo*-полимераз мы размножали гены обелина и GFP (рис. 5). В качестве матрицы были использованы линейаризованные плазмиды. В случае гена обелина длина размножаемого продукта составляла 756 п.о. и он включал в себя T7 промотор и кДНК фотопротеина обелина из гидроидного полипа *Obelia longissima* вместе с природной 5'-нетранслируемой областью, которая усиливает синтез белка в бесклеточной системе на основе экстракта из зародышей пшеницы. При размножении гена GFP продукт длиной 1570 п.о. включал в себя под контролем T7 промотора ген GFP, окруженный 5'-нетранслируемой областью мРНК обелина и 3'-нетранслируемой областью сателлитного вируса некроза табака, также усиливающей синтез белка в

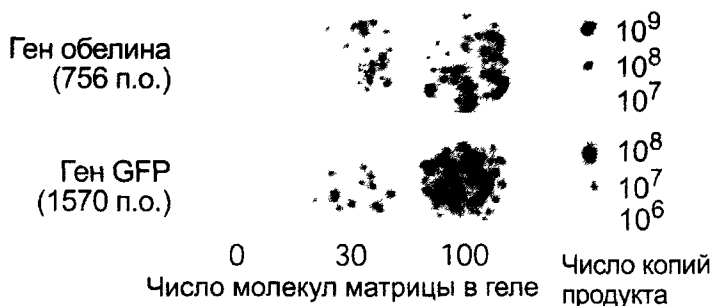


Рис. 5. Размножение генов при помощи ПЦР в геле. Гены обелина и GFP размножили в 5% полиакриламидном геле (соотношение акриламид метиленбисакриламид 100:1) колонии ДНК перенесли на мембрану и выявили гибридизацией с радиоактивным зондом. Число молекул продукта ПЦР в колонии можно определить, сопоставляя с известным числом плазмидных матриц, непосредственно нанесенным на мембрану и принимая во внимание эффективность переноса ДНК из геля на мембрану (около 10%).

бесклеточной системе на основе экстракта из зародышей пшеницы. В гели вносили указанные на рисунке 5 количества молекул матрицы.

Как можно видеть, число колоний пропорционально и близко к числу добавленных молекул матрицы. Иными словами, в виде колонии выявляется почти каждая исходная молекула гена. В то же время, при клонировании *in vivo* с использованием векторов и трансформации клеток, выход клонов обычно составляет от 0,0001% до 0,01%. Таким образом, разработанный нами подход позволяет исследователю избежать значительных потерь содержимого геной библиотеки. Кроме того, при клонировании *in vitro* изучаемые последовательности в меньшей степени подвержены естественному отбору, обусловленному живыми клетками.

По сопоставлению с известными количествами плазмидных матриц, непосредственно нанесенными на мембрану, мы определили содержание продукта ПЦР в колонии. С учетом эффективности переноса ДНК из геля на мембрану (около 10%) можно сделать вывод о том, что колонии с геном обелина содержат порядка 10^9 копий продукта ПЦР (то есть около 1 нг), а с геном GFP – 10^8 (около 0,2 нг). Это количество легко детектируется при помощи гибридизации с меченым зондом и, как было нами показано в дальнейшем, вполне пригодно для дальнейшей работы, например, для экспрессии *in situ*. При этом молекулярные колонии представляют собой чистые препараты генов, свободные от примесей клеточных ДНК и РНК. В традиционном же подходе *in vivo* интересующие гены размножают в составе вирусов или клеток, поэтому необходимо выделять и очищать ДНК полученных клонов для анализа и дальнейших манипуляций.

Клонирование *in vitro* κДНК люциферазы

Получение и размножение κДНК люциферазы в жидкой среде и в геле.
С целью демонстрации возможностей разработанного метода мы клонировали κДНК гена люциферазы *Luciola mingrelica*. В этом случае в качестве исходного материала для клонирования использовали не очищенный препарат плазмидной ДНК, как для генов обелина и GFP, а «фонарики» светляка. Из них выделили суммарную РНК и с олиго(dT)₁₂₋₁₈ в качестве праймера для обратной

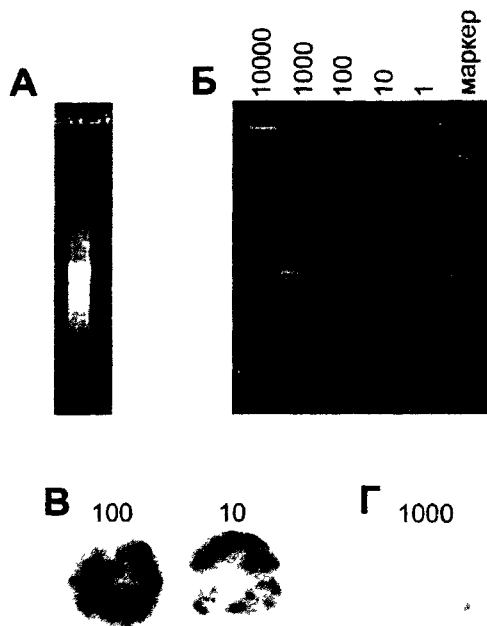


Рис. 6. Клонирование гена люциферазы. Числами указаны количества суммарной РНК в пикограммах, взятой в образец (А) Препарат суммарной РНК светляка *Luciola mingrelica* 1% агарозный гель, окрашенный бромистым этидием (Б) Продукты размножения кДНК полученной путем обратной транскрипции суммарной РНК светляка с использованием олиго(dT)₁₂₋₁₈ ПЦР проводили в жидкой среде с праймерами, специфичными к гену люциферазы В качестве маркера использовали продукт размножения кДНК люциферазы клонированной в составе плазмиды 1% агарозный гель, окрашенный бромистым этидием (В) Продукты размножения суммарной кДНК при помощи ПЦР в геле с праймерами, специфичными к гену люциферазы (Г) Контрольная ПЦР в геле, где для размножения брали суммарную РНК после стадии обратной транскрипции, проведенной в присутствии одного лишь dTTP.

транскрипции создали библиотеку кДНК, которую использовали для дальнейшего размножения с геноспецифичными праймерами. Длина размноженной с помощью ПЦР кДНК люциферазы составляла 1702 п.о.

На рисунке 6Б представлены продукты размножения кДНК при помощи ПЦР в жидкой среде. Как видно из рисунка, полоса, соответствующая размножаемому гену, появляется, когда в смеси для ПЦР присутствует 100 пг суммарной РНК, и уверенно видна при 1000 пг. В то же время, при размножении суммарной кДНК в геле (рис 6В) существенное число колоний образовалось уже при использовании 10 пг РНК. О том, что эти колонии специфичны и действительно являются клонами кДНК люциферазы, говорит их отсутствие на рисунке 6Г. На нем представлен результат ПЦР в геле, когда для размножения брали суммарную РНК после стадии обратной транскрипции, проведенной в присутствии одного лишь dTTP вместо всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

Следует отметить, что 10 пг РНК приблизительно соответствует содержанию животной клетки. Это означает, что предлагаемый нами метод может быть использован для клонирования генетического материала из

единичных клеток напрямую, то есть без предварительного размножения. Более того, становится возможным осуществлять отбор материала из разных частей одной клетки (ядра, различных участков цитоплазмы) и анализировать матричные или иные РНК на разных стадиях созревания. Кроме того, открывается перспектива с высокой точностью анализировать уровень экспрессии определенных генов на разных стадиях клеточного цикла или в ответ на какое-либо внешнее воздействие на клетку.

Отбор молекулярных клонов из геля. Клонирование подразумевает получение отдельных клонов и возможность их использования в дальнейшей работе. Мы попытались их выделить из геля следующим образом: наконечником, содержащим реакционную смесь для ПЦР, прикасались к месту геля, соответствующему молекулярной колонии. Далее проводили ПЦР в жидкой среде и анализировали продукты при помощи Саузерн-блот анализа (рис. 7). При этом в качестве контрольного варианта проводили такую же процедуру, но с местом геля, где нет колонии. Рисунок 7 демонстрирует, что продукт размножения извлеченного из колоний материала по электрофоретической подвижности соответствует кДНК люциферазы. Более того, он гибридизуется с радиоактивно меченным зондом, которым является антисмысловая мРНК люциферазы. В то же время, такой продукт отсутствует в контрольном варианте. Это свидетельствует в пользу того, что индивидуальные клоны, полученные в виде молекулярных колоний, можно выделить из геля в чистом виде и размножить при помощи ПЦР в жидкой среде, что позволит проводить с ними дальнейшие манипуляции.

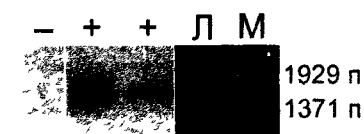


Рис. 7. Результат эксперимента по извлечению ДНК из колоний гена люциферазы. Саузерн-блот анализ продуктов размножения при помощи ПЦР в жидкой среде со специфичными к гену люциферазы праймерами. В качестве матрицы использовали ДНК, извлеченную из мест геля, соответствующих двум разным молекулярным колониям (дорожки «+»), и из пустого места (дорожка «-»). На дорожке «Л»

представлен продукт размножения кДНК люциферазы (1702 п.о.). В качестве маркера (дорожка «М») использовали ДНК фага λ , обработанную рестриктазой BstEII. Левая часть рисунка – радиоавтограф, правая часть – 1% агарозный гель, окрашенный бромистым этидием.

Транскрипция в молекулярных колониях

Первой стадией экспрессии генов является их транскрипция, то есть синтез мРНК. Мы проводили транскрипцию *in situ* по следующей схеме. Сначала кДНК люциферазы под T7 промотором размножали в виде колоний ДНК, затем гель высушивали. Далее гель пропитывали реакционной смесью для транскрипции, содержащей РНК-полимеразу фага T7. После набухания геля (1 час при 4°C) и транскрипции (2 часа при 37°C) проводили анализ на наличие колоний РНК. На рисунке 8 представлен результат этого эксперимента. Видно, что в результате транскрипции *in situ* существенно увеличился сигнал после гибридизации с зондом. Это усиление говорит о том, что синтез РНК действительно произошел, и по крайней мере 10 молекул транскрипта длиной около 1700 нуклеотидов синтезировалось с одной молекулы матричной ДНК. При этом колонии остались четкими и компактными, сохранив высокую разрешающую способность метода молекулярных колоний.

Полученный результат говорит о том, что с использованием данного метода можно проводить прямую селекцию молекул РНК с заданными свойствами, таких как рибозимы или аптамеры. Преимуществом предлагаемого нами подхода является то обстоятельство, что молекулярная колония, содержащая интересующую нас РНК, уже содержит соответствующий клон ДНК. Это



Рис. 8. Усиление сигнала за счет транскрипции в молекулярных колониях. Радиоактивно меченную антисмысловую мРНК люциферазы гибридизовали с молекулярными колониями после ПЦР в геле (левая часть рисунка) и после ПЦР с последующей транскрипцией (правая часть). Время экспонирования при авторадииграфии было оптимальным для просмотра варианта с транскрипцией.

позволяет избежать необходимости осуществления обратной транскрипции отобранной РНК и клонирования полученной кДНК *in vivo*. Кроме того, значительное усиление гибридационного сигнала в результате проведения транскрипции *in situ* можно использовать для повышения чувствительности обнаружения в геле молекулярных колоний.

Синтез белка в молекулярных колониях

Выбор системы транскрипции-трансляции. Прежде чем приступить к синтезу белка в молекулярных колониях, необходимо было выбрать подходящую бесклеточную систему транскрипции-трансляции. Дело в том, что экспрессия генов в молекулярных колониях имеет ряд особенностей. В частности, в колонии в качестве матрицы будет выступать продукт ПЦР, количество которого существенно меньше, чем обычно используют для бесклеточной экспрессии в жидкой среде. Кроме того, после синтеза белка и его детекции *in situ* предполагается извлечь из геля целостную ДНК искомого клона. Таким образом, бесклеточная система транскрипции-трансляции должна быть высокоэффективной и содержать как можно меньше нуклеазных примесей. Мы сравнили две распространенные системы - на основе S30 экстракта *E.coli* и экстракта зародышей пшеницы (рис. 9).

В случае бактериальной системы мы использовали в качестве матрицы генетическую конструкцию, содержащую ген GFP в окружении эффективных для *E.coli* нетранслируемых усилителей синтеза белка. Эта конструкция присутствовала в трех вариантах: в виде продукта ПЦР, а также в виде линейаризованной и кольцевой плазмиды. Во всех случаях в реакционную смесь вносили эквимоллярные количества ДНК. Необходимо отметить, что в бесклеточной системе на основе S30 экстракта *E.coli* в качестве матричной ДНК обычно используют кольцевую плазмиду. Как видно из рисунка 9А,

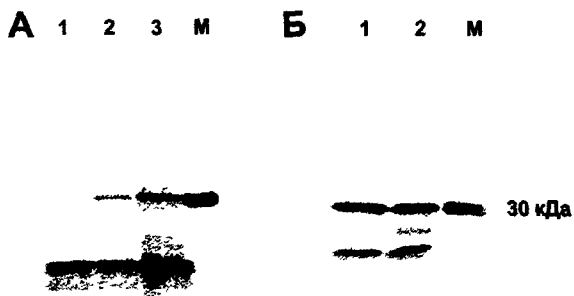


Рис. 9. Сравнение продуктивности бесклеточных систем транскрипции-трансляции на основе S30 экстракта *E.coli* и экстракта зародышей пшеницы. Результаты синтеза GFP (молекулярный вес около 27 кДа) в присутствии [14 C]-лейцина с использованием бесклеточной системы транскрипции-трансляции на основе (А) S30 экстракта *E.coli* и (Б) экстракта зародышей пшеницы. В качестве матрицы использовали

эквимоллярные количества продукта ПЦР (дорожки «1»), линейаризованной плазмиды (дорожки «2») и кольцевой плазмиды (дорожка «3»). Дорожка «М» содержит маркер - карбоангидразу (молекулярный вес 30 кДа), позиция которой отмечена [14 C]-чернилами. Радиоавтограф градиентного 8-22% полиакриламидного геля.

именно этот вариант и обеспечил максимальный выход GFP (приблизительно 4 молекулы белка на 1 молекулу ДНК-матрицы). С линеаризованной плазмидой синтез заметно хуже, а при использовании продукта ПЦР полоса, соответствующая GFP, вообще практически отсутствует. Другая ситуация наблюдается, когда эксперимент проводили с системой на основе экстракта зародышей пшеницы (рис. 9Б). Матрицами служили линеаризованная плазида и продукт ПЦР с геном GFP в окружении соответствующих усилителей трансляции (рис. 5). Выход белка в обоих случаях практически одинаков и составляет порядка 10 молекул GFP на 1 молекулу ДНК-матрицы. Полученные данные согласуются с тем, что эта бесклеточная система характеризуется небольшим уровнем нуклеазных активностей. Поэтому дальнейшие усилия по разработке метода экспрессии генов в молекулярных колониях следовало сосредоточить на бесклеточной системе транскрипции-трансляции с экстрактом зародышей пшеницы.

Транскрипция-трансляция в геле. Успех экспрессии генов в молекулярных колониях зависел от того, будет ли происходить синтез белка в полиакриламидном геле и будет ли синтезированный белок функционально активен.

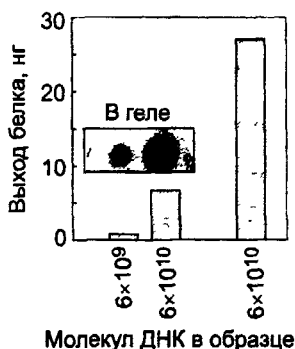


Рис. 10. Эффективность транскрипции-трансляции в геле. С указанными количествами матричной ДНК провели транскрипцию-трансляцию в присутствии [14 C]-лейцина в жидкой среде и в геле, на который перед пропитыванием реакционной смесью нанесли разведения ДНК. Включение меченой аминокислоты анализировали на нитроцеллюлозных мембранах с нанесенными из пробирки аликвотами или перенесенными из геля продуктами трансляции (автограф последней мембраны показан на вставке).

Ответ на первый вопрос нам дал следующий эксперимент. На сухой гель мы нанесли ряд аликвот с разведениями матричной ДНК (линеаризованной плазмиды с геном обелина), имитируя таким образом молекулярные колонии. Далее гель пропитали бесклеточной системой транскрипции-трансляции с экстрактом зародышей пшеницы, содержащей [14 C]-лейцин, и инкубировали в

течение 1 часа при 25°C После этого белки перенесли из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond™ C, освободились от невключенной метки кипячением в 5% ТХУ и анализировали оставшуюся на мембране радиоактивность при помощи фосфоимиджера Cyclone™ На рисунке 10 представлены результаты этого эксперимента Как можно видеть, эффективность синтеза белка в геле всего лишь втрое ниже, чем контрольного синтеза в жидкой среде Следует принять во внимание тот факт, что только часть продуктов трансляции переносится из геля на мембрану (например, как мы знаем, эффективность переноса ДНК составляет около 10%) С учетом этого можно сделать вывод, что бесклеточная система транскрипции-трансляции практически столь же продуктивна в геле, как и в жидкой среде.

Эффективность синтеза функционально активного белка в геле мы исследовали на примере GFP (рис 11) По аналогии с предыдущим экспериментом мы имитировали молекулярные колонии ДНК нанесением на

гель ряда аликвот с разведениями линейаризованной плазмиды с геном GFP.

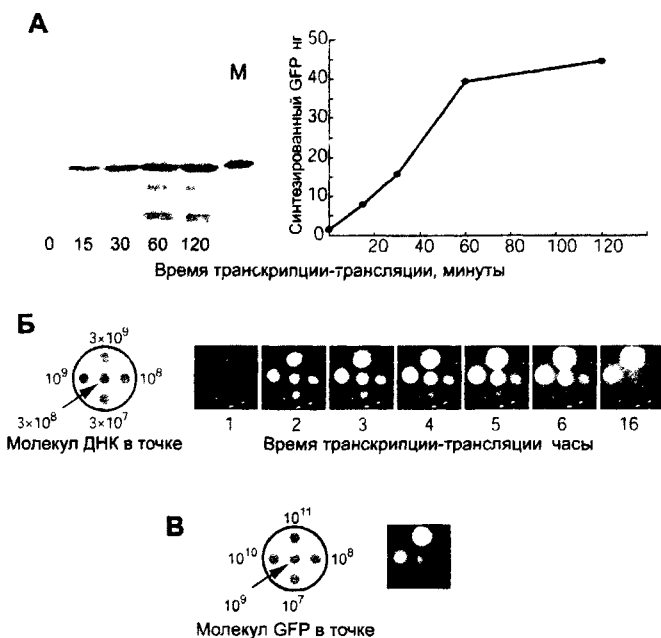


Рис. 11. Синтез GFP в бесклеточной системе транскрипции-трансляции (А) Синтез GFP в жидкой среде в присутствии [¹⁴C]-лейцина Аликвоты реакционной смеси (по 5 мкл) отобранные в указанные моменты времени, подвергали электрофорезу вместе с маркером подвижности (дорожка «М» см подпись к рис 9), затем гель высушивали и

радиоавтографировали (левая часть рисунка) На правой части рисунка представлена зависимость количества белка в полосе GFP от времени транскрипции-трансляции (Б) Флуоресценция GFP, синтезированного в геле На гель нанесли указанные количества матричной ДНК (В) Флуоресценция указанных количеств синтезированного ранее зрелого GFP

Далее гель пропитали бесклеточной системой транскрипции-трансляции с экстрактом зародышей пшеницы и инкубировали при 25°C. В указанные на рисунке 11Б моменты времени флуоресценцию GFP в геле регистрировали при помощи конфокального сканера микрочипов ScanArray Express. Приведенные данные демонстрируют, что флуоресцентный сигнал в геле достигает своего максимума после 2 часов транскрипции-трансляции. При этом из рисунка 11А следует, что большая часть белка синтезируется уже к первому часу. В то же время, для созревания этого варианта GFP требуется также около часа. Таким образом, можно заключить, что матрикс геля практически не сказывается на скоростях транскрипции, трансляции и формирования функционально активного белка.

Сопоставив интенсивность флуоресцентного сигнала в образце со свечением известных количеств полученного ранее зрелого GFP (рис. 11В), можно определить, что в геле синтезировалось порядка 10 молекул GFP на 1 молекулу ДНК-матрицы. Это совпадает с выходом белка в жидкой среде, рассчитанным по включению [^{14}C]-лейцина (рис. 11А). Стоит отметить, что в процессе инкубации происходит диффузия GFP в геле (рис. 11Б). Однако она становится существенной только после 3 часов инкубации, когда уже завершен не только синтез белка, но и реакция формирования флуорофора GFP.

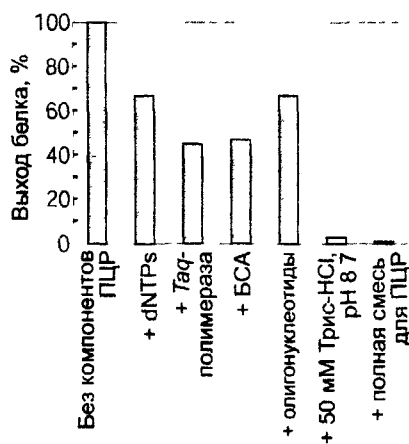


Рис. 12. Ингибирование транскрипции-трансляции компонентами ПЦР. Совмещенная транскрипция-трансляция в жидкой среде в присутствии компонентов ПЦР.

Поэтому мы ожидали, что молекулярные колонии белка будут компактными и сохранится высокая разрешающая способность метода.

Проблема несовместимости условий ПЦР и транскрипции-трансляции и ее решение. Первые эксперименты по синтезу белка в молекулярных колониях мы проводили по той же схеме, что и транскрипцию *in situ* – после проведения ПЦР гель высушивали, а затем пропитывали реакционной смесью для экспрессии. Однако все

они были неудачны, и синтеза белка в молекулярных колониях детектировать не удавалось. Зная, что транскрипция-трансляция идет в полиакриламидном геле почти столь же эффективно, как и в жидкой среде, мы предположили, что после ПЦР в геле может оставаться ингибитор синтеза белка. Для проверки этого предположения компоненты ПЦР добавили в жидкую систему транскрипции-трансляции (рис 12), в которой в качестве матрицы присутствовала линеаризованная плаزمида с геном обелина. Выяснилось, что каждый из компонентов ПЦР в той или иной степени ингибирует синтез белка, но самым сильным ингибитором является буфер (50 мМ Трис-НСl, рН 8,7).

Мы сравнили рН-зависимости транскрипции-трансляции и ПЦР (рис 13). Оказалось, что при оптимальном для синтеза белка значении рН 7,6 сильно подавлена ПЦР. В свою очередь, использование при транскрипции-трансляции буфера для ПЦР со значением рН 8,7 понижает выход белка практически до нуля. Как видно из рисунка 13, в принципе возможен компромисс между этими двумя крайностями: при рН 7,9 и синтез белка на относительно высоком уровне, и продукт ПЦР еще удастся обнаружить. Однако этот компромисс нас не устраивал. Такое уменьшение количества ДНК в геле привело бы к столь низкому содержанию продукта экспрессии в колонии, что мы не смогли бы его детектировать.

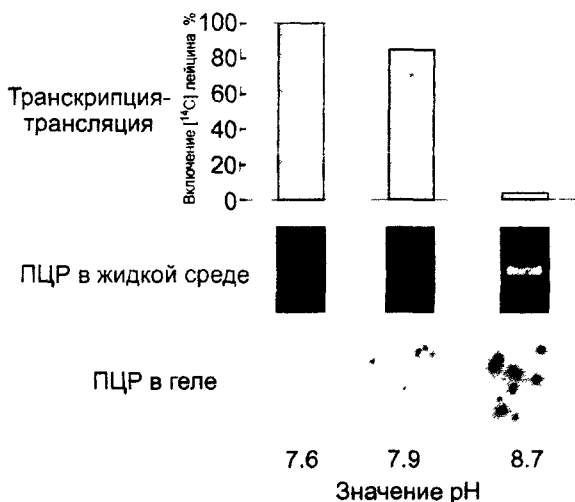


Рис. 13. Оптимальные условия ПЦР и транскрипции-трансляции несовместимы. Влияние значения рН используемого буфера на эффективность совмещенной транскрипции-трансляции в жидкой среде и на ПЦР в жидкой среде (приведены участки окрашенного бромистым этидием 1% агарозного геля, включающие полосу продукта ПЦР) и в геле (приведены радиоавтографы мембран, гибридизованных с зондом). В качестве матрицы использовали плазмиду с геном обелина.

Нами было найдено простое и эффективное решение этой проблемы (рис. 14). Если гель, содержащий компоненты ПЦР, промыть спиртово-солевым раствором и далее 50% этанолом, то ингибирующий эффект компонентов ПЦР полностью снимается. При этом ДНК остается в геле в виде столь же компактных точек, как и без всякой обработки (рис. 14).

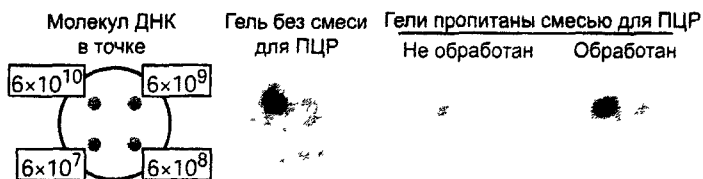


Рис. 14. Замена в геле буфера для ПЦР на буфер для транскрипции-трансляции. Радиоавтографы мембран с продуктами транскрипции-трансляции в геле. На гели нанесли указанные количества плазмиды с геном обелина. Два геля пропитали смесью для ПЦР, один из них затем промыли спиртово-солевым раствором и 50% этанолом и высушили. Далее провели транскрипцию-трансляцию в присутствии [^{14}C]-лейцина.

Таким образом, нам удалось полностью поменять реакционную среду без потери генетического материала. Данный способ можно использовать для того, чтобы в одном и том же геле последовательно проводить несколько реакций, оптимальные условия которых сильно различаются. Например, после размножения ДНК в виде молекулярных колоний становится возможным проводить *in situ* различные ферментативные реакции – лигирование, модификации ДНК и т.д.

Экспрессия гена GFP в молекулярных колониях. Завершением создания бесклеточного метода клонирования генов стал синтез белка в молекулярных колониях (рис. 15). Мы размножили ген GFP при помощи ПЦР в геле. Далее гели промыли спиртово-солевым раствором, высушили и пропитали бесклеточной системой транскрипции-трансляции на основе пшеничного экстракта. В процессе инкубации детектировали флуоресценцию GFP (рис. 15А). После синтеза белка ДНК из геля перенесли на нейлоновую мембрану, гибридизовали с радиоактивным зондом и таким образом выявили колонии ДНК с геном GFP (рис. 15Б). Содержание белка в колонии оценили, сравнив интенсивность флуоресцентного сигнала со свечением известных количеств синтезированного ранее зрелого GFP (рис. 11В). Оказалось, колония содержит в среднем 10^9 молекул GFP. Это соответствует 40 пг/мм^2 белка в геле и

говорит о том, что на одну молекулу матричной ДНК образовалось 10 копий белка (это согласуется с результатами предварительных экспериментов, см рис 11) Обращает на себя внимание тот факт, что число флуоресцентных пятен близко к числу молекул матрицы, добавленных в гель перед ПЦР. Более того, изображения гелей, полученные при детекции флуоресценции и при выявлении колоний ДНК с помощью гибридизации, практически совпадают. Это означает, что флуоресцируют молекулярные колонии, содержащие ген GFP, то есть экспрессия *in situ* привела к образованию функционально активного белка.

Разработанный метод позволяет осуществлять быстрый скрининг большого числа клонов одновременно. Благодаря отсутствию клеточных стенок, мембран каплей водно-масляной эмульсии и т.д. имеется прямой доступ к новосинтезированным белкам, что облегчает и ускоряет тестирование их функции. Кроме того, исследователь имеет возможность вводить в гель после экспрессии различные реагенты и, таким образом, тестировать специфическую активность клонов в условиях, отличных от условий транскрипции-трансляции.

Полученные результаты позволяют рассматривать разработанный метод как новую разновидность генетического дисплея, обладающую рядом существенных преимуществ перед используемыми в настоящее время подходами. В частности, физическая связь фенотипа и генотипа осуществляется за счет того, что ген и соответствующий ему белковый продукт находятся в одной и той же молекулярной колонии. Это позволяет

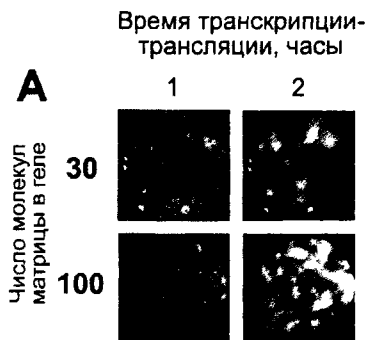


Рис. 15. Экспрессия гена GFP в молекулярных колониях. После ПЦР в геле с указанным числом молекул плазмиды, содержащей ген GFP, гели промыли спиртово-солевым раствором и 50% этанолом и высушили. Затем в гелях провели транскрипцию-трансляцию и в указанные моменты времени регистрировали флуоресценцию GFP. (А) Флуоресценция GFP, синтезированного в молекулярных колониях. (Б) Колонии гена GFP в тех же гелях. Радиоавтографы мембран, гибридизованных с меченым зондом.

избежать необходимости в модификациях белка, обеспечивающих ковалентную связь с собственной матрицей либо образование нековалентного с ней комплекса (как, например, тройственного комплекса мРНК, рибосомы и пептидил-тРНК в случае рибосомного дисплея). Таким образом, нативная структура белкового продукта клонов не будет нарушена.

Известно, что бесклеточные системы синтеза белка транслируют только каждую десятую молекулу мРНК, внесенную в реакционную смесь. Это означает, что в результате экспрессии библиотеки, где последовательности могут быть представлены всего в одном экземпляре, часть клонов неизбежно останется вне поля зрения исследователя. В то же время, предлагаемый нами подход обеспечивает размножение каждой исходной молекулы библиотеки в виде молекулярной колонии, которая содержит многие миллионы копий родителя. Следовательно, даже при столь малоэффективном вовлечении матриц в трансляцию проэкспрессирован будет каждый клон. Более того, в результате экспрессии в молекулярной колонии оказывается до 10^9 молекул белкового продукта данного клона. Таким образом, белок имеет возможность формировать олиго- или даже мультимерные комплексы, если этого требует проявление его функциональной активности.

Хотелось бы еще раз подчеркнуть то преимущество разработанного нами метода клонирования, что исследователь имеет возможность сразу извлечь ген в виде ДНК из молекулярной колонии, содержащей искомым белок. В отличие от большинства традиционных методов селекции *in vitro*, результатом которых являются последовательности мРНК (например, в случае рибосомного или мРНК-дисплея), в нашем случае нет необходимости в последующей стадии обратной транскрипции, которая малоэффективна и в процессе которой РНК-зависимой ДНК-полимеразой могут быть внесены мутации в отобранный клон.

ВЫВОДЫ

1. Разработана ПЦР-версия метода молекулярных колоний. Найдены условия для размножения полноразмерных генов (свыше 1500 пар оснований) в виде колоний ДНК, содержащих до 100 миллионов копий исходной матрицы. Таким образом, впервые осуществлено истинно молекулярное клонирование генов.

2. На примере кДНК гена люциферазы светляка *Luciola mingrelica* продемонстрирована возможность бесклеточного клонирования и последующего размножения *in vitro* индивидуальных последовательностей из библиотеки кДНК. Показано, что клонирование может быть осуществлено с использованием генетического материала, эквивалентного содержанию всего одной клетки.

3. Осуществлена транскрипция генов в молекулярных колониях с выходом не менее 10 РНК-копий длиной 1700 нуклеотидов на молекулу ДНК. Разработанный метод может быть использован для прямой селекции РНК с заданными свойствами, таких как рибозимы и аптамеры.

4. Осуществлена экспрессия (транскрипция и трансляция) генов в молекулярных колониях с выходом около 10 копий белка на молекулу ДНК. На примере гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP) продемонстрировано, что синтезированный в молекулярных колониях белок является функционально активным. Разработанный метод может быть использован для скрининга генов по функции кодируемого белка. Также, поскольку синтезированный белок находится в той же колонии, что и кодирующий его ген, метод может быть использован в качестве альтернативы фаговому и иным формам генетического дисплея.

Материалы диссертации опубликованы в следующих работах

Статьи в научных журналах:

1. Chetverina, H.V., Samatov, T.R., Ugarov, V.I. and Chetverin, A.B. (2002) Molecular colony diagnostics: detection and quantitation of viral nucleic acids by in-gel PCR. *BioTechniques* 33 pp 150-157.

2. Samatov, T.R., Chetverina, H.V. and Chetverin, A.B. (2005) Expressible molecular colonies. *Nucleic Acids Res*, 33, e145

Тезисы международных конференций:

1. Samatov, T.R., Chetverina, H.V., Ugarov, V.I., and Chetverin, A.B. (2000) PCR molecular colony technique: the ultrasensitive quantitative diagnostics. *Student Meeting of the Medical Academy of Latvia, Riga, Latvia, May 18, pp 28-29.*
2. Chetverin, A.B., Samatov, T.R., Chetverina, H.V., and Ugarov, V.I. (2000) DNA colonies: prospects for cell-free gene cloning and diagnostics. *Meeting of International Research Scholars, Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, Maryland, USA, June 20-23, p. 65.*
3. Chetverina, H.V., Samatov, T.R., Ugarov, V.I. and Chetverin, A.B. (2001) Virus assay with the molecular colony technique. *Meeting of International Research Scholars, Howard Hughes Medical Institute, Vancouver, Canada, June 20-23, p. 48.*
4. Samatov, T.R., Chetverina, H.V., Ugarov, V.I., and Chetverin, A.B. (2003) PCR molecular colony technique: the powerful tool for quantitative assays. *Conference for Young Scientists, PhD Students and Students on Molecular Biology and Genetics, Kyiv, Ukraine, September 25-27, p. 204.*

Принято к исполнению 13/04/2006
Исполнено 17/04/2006

Заказ № 268
Тираж: 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш , 36
(495) 975-78-56
(495) 747-64-70
www.autoreferat.ru

2006A
7911

NO - 7911