

УДК 577.113.5

ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ[#]

© 2016 г. Malla Ashwini¹, Shanmugaraj Bala Murugan^{1,2},
Srinivasan Balamurugan^{1,3}, Ramalingam Sathishkumar^{1*}

¹Plant Genetic Engineering Laboratory, Department of Biotechnology, Bharathiar University, Coimbatore, Tamil Nadu, India

²Department of Biotechnology, PSR College of Engineering, Sivakasi, Tamil Nadu, India

³Department of Genetic Engineering, SRM University, Chennai, Tamil Nadu, India

*e-mail: rsathish@buc.edu.in

Поступила в редакцию 29.01.2015 г.

Принята к печати 03.03.2015 г.

“Молекулярное клонирование”, как технология создания рекомбинантных молекул ДНК, стимулировала прогресс во всех науках о жизни. Экспоненциальный рост приложений технологии рекомбинантных ДНК стал возможен благодаря сравнительной легкости манипуляций с ДНК при помощи мощных молекулярных инструментов. Упрощенная технология клонирования генов, методы “бесшовного” соединения нескольких фрагментов гена и использование генных обменных кассет обеспечили скачок в понимании функций генов. Дальнейшее развитие молекулярного клонирования, возможно, связано с методами *in silico* дизайна последовательности ДНК и ее последующего химического синтеза *in vitro*. Эти методы синтетической биологии должны обеспечить быструю сборку ДНК из нескольких фрагментов и ускорить прогресс в создании векторов для генной терапии, производства рекомбинантных белков и новых вакцин. Появление инновационных подходов в клонировании позволило решить такие сложные задачи, как идентификация и картирование эпигенетических модификаций и высокопроизводительная сборка комбинаторных библиотек. В предлагаемом обзоре рассмотрены современные достижения в технологии клонирования.

Ключевые слова: клонирование, обработка эндонуклеазами, безлигазное клонирование, рекомбинация, перспективы использования.

DOI: 10.7868/S0026898416010134

ВВЕДЕНИЕ

Термин “клон”, *clone*, произошел от древнегреческого слова *klōn*, означающего росток или отпрыск. В современном языке слово “клон” означает генетическую копию молекулы ДНК, клетки, растения, животного или человека. Клонирование гена — это процесс, в котором идентичные копии данного гена создаются при помощи молекулярно-биологических инструментов. Суть метода молекулярного клонирования заключается в выделении фрагмента ДНК из какого-либо организма и его введении в вектор для последующего получения множества копий. Плазмидные конструкции, содержащие гены, могут быть далее использованы в анализе экспрессии клонированного гена или скорости синтеза кодируемого им белка. Кроме того, клонированные гены можно модифицировать *in vitro* с целью изменения уровня экспрессии белка и его функциональной активности.

Триумфом XX века стало появление технологии ферментативной сборки рекомбинантных ДНК

при помощи эндонуклеаз рестрикции и лигазы [1–4]. В настоящее время разработано множество вариантов этой технологии, которые обеспечивают точность сборки плазмидных конструкций и вносимых изменений в последовательность генов. Внесение изменений в последовательность ДНК стало рутинной процедурой благодаря методам сайт-направленного мутегенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В классическом методе клонирования ДНК можно выделить четыре ключевых этапа: обработка фрагментов ДНК и вектора эндонуклеазами рестрикции, лигирование фрагментов ДНК и вектора, трансформация компетентных клеток бактерий лигазной смесью и селекция бактериальных колоний, содержащих собранную плазмиду. В целом эти этапы присутствуют и в других методах клонирования; однако существует большое число методов, отличающихся по схеме клонирования ДНК.

В XXI веке появились более совершенные методы молекулярного клонирования, позволяющие модифицировать и анализировать длинные фрагменты ДНК, такие как система рекомбинационного клонирования, технология “Golden Gate” и

[#] Текст представлен на английском языке.

безлигазное клонирование [5–10]. В обзоре кратко рассмотрены принципы этих методов.

ПЕРЕДОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ КЛОНИРОВАНИЯ

Традиционное клонирование

Основная схема клонирования включает в себя следующие этапы: выделение целевого фрагмента ДНК, обработка эндонуклеазами рестрикции, лигирование с соответствующим вектором, трансформация компетентных клеток и отбор колоний. С целью повышения эффективности молекулярного клонирования разработано несколько специализированных методологических подходов, использующих уникальные свойства ферментов (рис. 1). Так, ТА-клонирование основано на свойстве ДНК-полимеразы Taq добавлять на 3'-конец ПЦР-продукта олигонуклеотиды ТТ. Клонирование без лигирования основано на свойстве ДНК-полимеразы T4 создавать выступающие липкие концы. GC-клонирование основано на свойстве таких ДНК-полимераз, как Taq, Tfl и Tth, в ходе ПЦР или в реакции наращивания добавлять один остаток G на 3'-конец цепи ДНК. Выступающий 3'-концевой гуанин ПЦР-продукта лигируется с линеаризованным вектором, у которого выступает 3'-концевой цитидин [11].

Рекомбинационное клонирование (система Gateway)

В исследованиях трансгенных биологических систем используются разнообразные технологии клонирования ДНК. Эти технологии составляют важную часть анализа рекомбинантных генов. Система клонирования Gateway основана на сайт-специфичной рекомбинации и может служить платформой для эффективного клонирования, модульной сборки сложных конструкций и их последующей экспрессии [13, 14]. Основным преимуществом системы Gateway считается возможность объединения нескольких фрагментов ДНК в заданном порядке и ориентации вне зависимости от их последовательностей. Технология Gateway была разработана в группе компаний Life Technologies [6] и одобрена научным сообществом как способ сборки экспрессионных конструкций в различных системах *in vivo* и *in vitro*.

В системе Gateway используются ферменты сайт-специфичной рекомбинации фага λ, которые обеспечивают его встраивание в бактериальную хромосому и вырезание из нее [15]. В ходе клонирования происходят реакции обмена фрагментами ДНК между плазмидами, несущими сайты рекомбинации (*att*). Эти реакции катализируются двумя наборами ферментов, которые называются BP-клоназой и LR-клоназой. BP-клоназа (“Invitrogen”/“Life Technologies”) представляет собой смесь интегразы фага λ и клеточного фактора интеграции и осуществляет перенос задан-

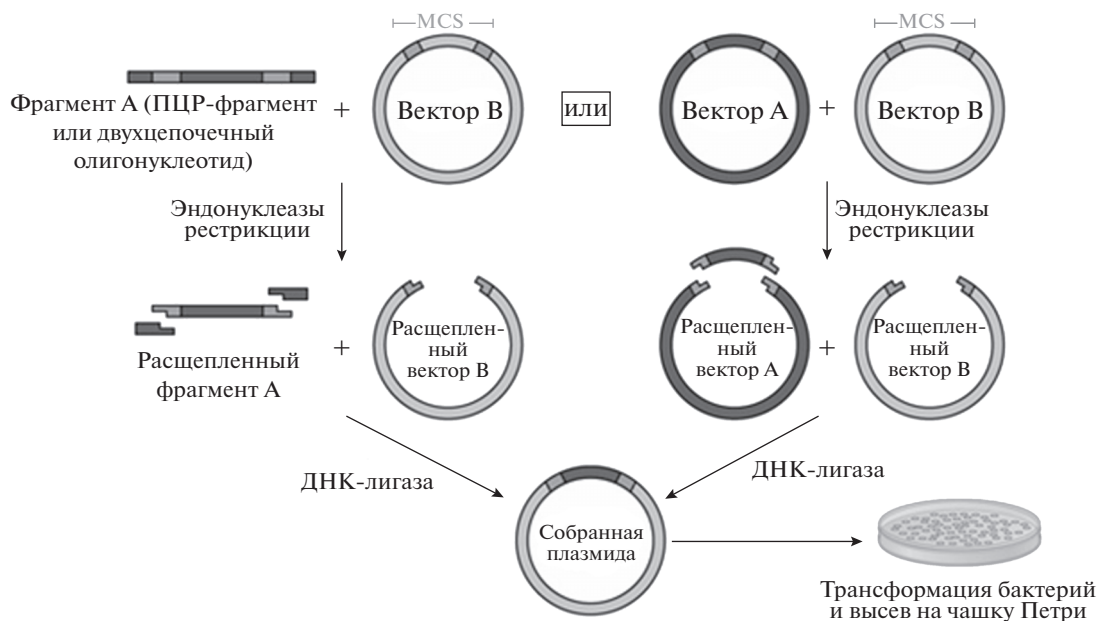


Рис. 1. Клонирование, основанное на лигировании фрагментов ДНК, полученных при обработке эндонуклеазами [12]. MCS (multicloning site) — фрагмент вектора, содержащий группу уникальных для данного вектора сайтов эндонуклеаз рестрикции.

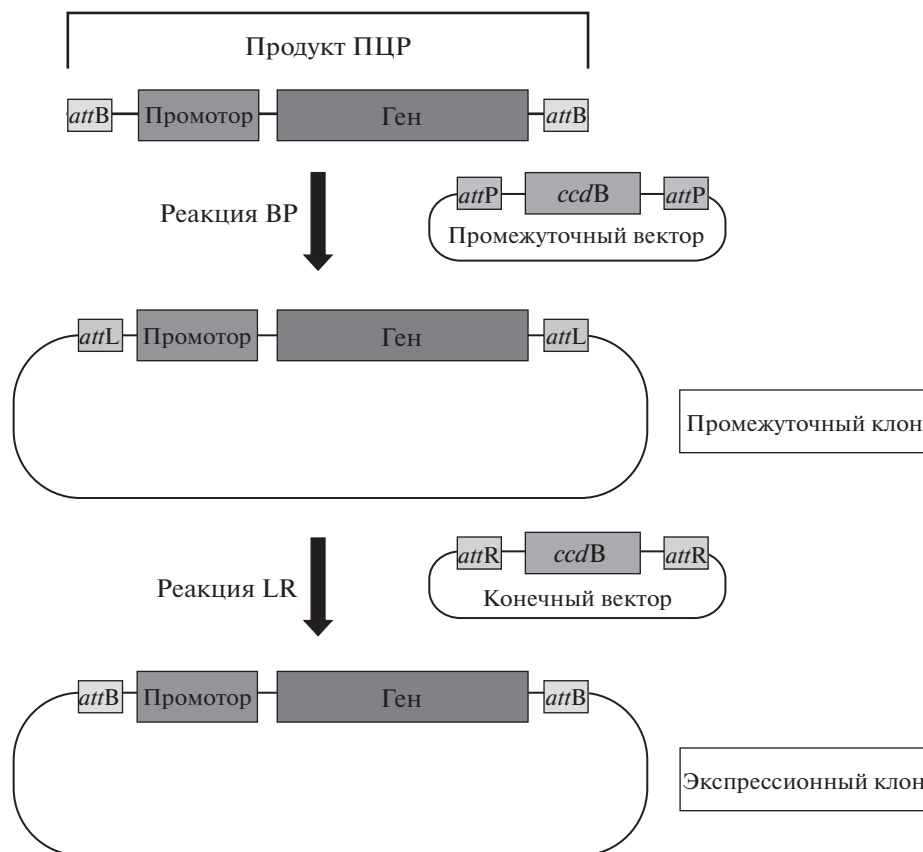


Рис. 2. Схема метода рекомбинационного клонирования [16].

ного фрагмента ДНК, фланкированного двумя *attB*-сайтами, в промежуточный вектор, содержащий два сайта *attP* (рис. 2). В ходе рекомбинации сайты *attP* в плазмиде конвертируются в сайты *attL*, между которыми находится клонированный фрагмент ДНК. Полученная плаزمида называется «промежуточным клоном». В смесь LR-клоназы («Invitrogen»/«Life Technologies») входит интеграз, клеточный фактор интеграции и эксцизионная гидролаза фага и осуществляет перенос клонируемого фрагмента ДНК из «промежуточного клона» в конечный экспрессионный вектор, содержащий сайты *attR* (рис. 2). В результате рекомбинации между соответствующими сайтами *attL* и *attR* образуется новый экспрессионный вектор, в котором клонируемый фрагмент ДНК фланкирован сайтами *attB*.

«Промежуточные клоны» могут быть получены и с использованием традиционных эндонуклеаз рестрикции и лигазы. Однако в этом нет большой необходимости, потому что разработчики системы Gateway создали варианты природных сайтов *attB*, *attP*, *attL* и *attR*, которые обеспечивают высокую специфичность действия ферментов и направленность сборки конструкций [17, 18].

Множественная система Gateway включает в себя векторы, позволяющие собирать транскрипционные единицы одновременно из двух или трех фрагментов ДНК. Эта система была использована при исследовании индуцируемой и тканеспецифичной экспрессии нескольких генов [13], в анализе *цис*-регуляторных элементов и субклеточной локализации белков [19], для продуцирования химерных и меченых белков [20]. Экспрессионные кассеты, полученные рекомбинационным методом, использовали как инструмент генного сайленсинга, рекомбинации фрагментов генома, сборки оперонов и в исследованиях белок-белковых взаимодействий [13, 21–26].

Метод клонирования Golden Gate

В синтетической биологии необходима технология точной сборки генетических конструкций, состоящих из нескольких частей. Метод Golden Gate обеспечивает точную, практически бесшовную сборку ДНК из множества фрагментов и получение комбинаторных библиотек. Соединение фрагментов ДНК по этому методу происходит при помощи ферментов рестрикции IIS-типа [27] (рис. 3). Наиболее часто используются такие ферменты как *BsaI*, *BsmBI* и *BbsI*. В этом методе от-

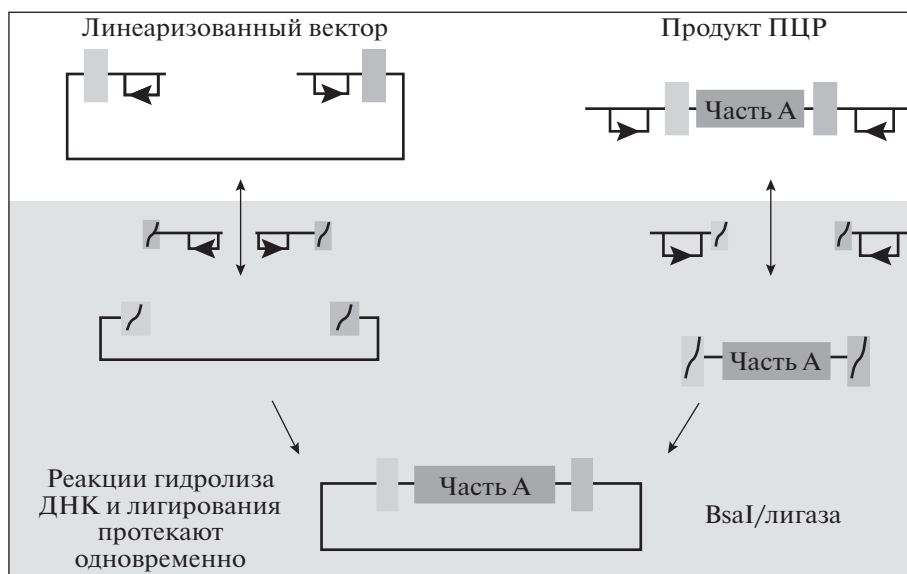


Рис. 3. Клонирование Golden Gate.

существуют такие трудоемкие этапы молекулярного клонирования, как ПЦР-амплификация, выделение полученных продуктов из геля, и дизайн праймеров. На концах клонируемых фрагментов ДНК должны быть короткие четырехчленные последовательности, называемые сайтами слияния. Сайты слияния в ряде случаев могут быть и естественной частью соединяемых фрагментов ДНК и тем самым обеспечивать их соединение “без швов” [7].

Сборка транскрипционных единиц из отдельных модулей происходит при одновременном присутствии эндонуклеазы и лигазы. Эта же реакция используется и при сборке более сложных мультигенных конструкций [28–30]. К ограничениям методологии Golden Gate относится требование отсутствия сайтов узнавания для ферментов IIS-типа внутри всех фрагментов ДНК, участвующих в сборке. Все внутренние сайты IIS-типа должны быть удалены из клонируемых фрагментов при помощи сайт-направленного мутагенеза (эта процедура получила название “одомашнивание”).

Таким образом, “в одно касание” мы получаем идеально структурированные фрагменты ДНК. Сборка Golden Gate – это надежная технология, которая позволяет проводить множественный сайт-направленный мутагенез и сборку различных ДНК-фрагментов – например, сайт-специфичных эндонуклеаз (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs) для редактирования генов *in vivo*.

Безлигазное клонирование (SLIC)

Безлигазное клонирование (Sequence and Ligation Independent Cloning, SLIC) – это метод кло-

нирования, реализующий RecA-независимый путь гомологичной рекомбинации *in vitro*. В основе этой методологии заложено свойство ДНК-полимеразы T4 в отсутствие нуклеозидтрифосфатов (dNTPs) за счет $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазной активности образовывать выступающие одноцепочечные концы на линейных фрагментах ДНК. В присутствии любого dNTP устанавливается равновесие между реакциями $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазного расщепления и $5' \rightarrow 3'$ полимеризации в том положении от 3'-конца фрагмента ДНК, где этот нуклеотид встречается впервые [31]. Последовательности концов вектора и вставки должны быть такими, чтобы длина образующихся в ходе реакции выступающих комплементарных концов составляла не менее 12 н.

Клонируемый фрагмент ДНК амплифицируется с олигонуклеотидами, которые на 5'-концах содержат участок длиной 25 п.н., идентичный концам целевого вектора в его линейной форме, полученной при обработке эндонуклеазами рестрикции или ПЦР-амплификации. Линеаризованный целевой вектор и ПЦР-продукт независимо обрабатываются ДНК-полимеразой T4 в отсутствие dNTPs. В ходе реакции фермент проявляет $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазную активность и тем самым создает выступающие одноцепочечные 5'-концы линейных фрагментов ДНК. Реакцию останавливают путем добавления в смесь одного из dNTPs, например, dCTP. Обработанные ДНК-полимеразой T4 линейные фрагменты ДНК смешивают и проводят отжиг по выступающим концам. В связи с тем, что в реакционной смеси нет ДНК-лигазы, продуктом реакции будет кольцевая плазмида с четырьмя однонитевыми

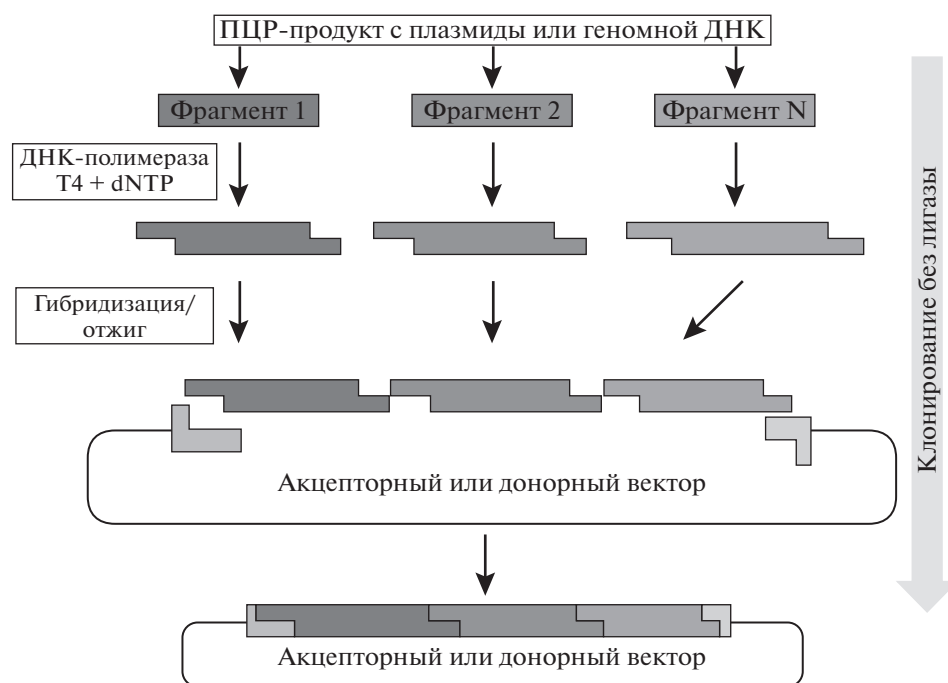


Рис. 4. Схема метода безлигазного клонирования.

разрывами (рис. 4). Для сборки рекомбинантной ДНК в безлигажном клонировании не требуются специальные последовательности для лигирования или рекомбинации. Метод может быть использован для клонирования любых генов, в том числе и при объединении нескольких фрагментов, без существенных затрат времени и средств.

ВЫВОДЫ И ПРОГНОЗЫ

В течение последних 40 лет область молекулярного клонирования развилась от трудоемкого выделения и соединения вместе фрагментов ДНК с последующим изнурительным скринингом колоний до высокоэффективной сборки ДНК из множества фрагментов и разработки новых экспрессионных систем. С того момента как получение тысяч конструкций перестало быть трудновыполнимой задачей, стали возможными функциональные исследования с использованием библиотеки клонированных последовательностей. Современные методы клонирования используются для получения рекомбинантных белков, при разработке и производстве вакцин, в генной терапии, технологии антисмысловых РНК и генной инженерии сельскохозяйственных культур. Инновационные технологии клонирования ускорили развитие биотехнологии, открыв нам новые возможности и поставив перед нами новые задачи. Современные технологии клонирования располагают мощным инструментарием для манипуляций с ДНК и их использование, безусловно, раздвинет границы научного познания.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Backman K., Ptashne M. 1978. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination *in vitro*. *Cell*. **13**, 65–71.
2. Cohen S.N., Chang A.C., Boyer H.W., Helling R.B. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 3240–3244.
3. Danna K., Nathans D. 1971. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 2913–2917.
4. Smith H.O., Wilcox K.W. 1970. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae* I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **51**, 379–391.
5. Bethke B., Sauer B. 1997. Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2828–2834.
6. Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A. 2000. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res.* **10**, 1788–1795.
7. Liu Q., Li M.Z., Liebham D., Cortez D., Elledge S.J. 1998. The univector plasmid fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr. Biol.* **8**, 1300–1309.
8. Nebert D.W., Dalton T.P., Stuart G.W., Carvan M.J. 2000. Gene-swap knock-in cassette in mice to study allelic differences in human genes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **919**, 148–170.
9. Siegel R.W., Velappan N., Pavlik P., Chasteen L., Bradbury A. 2004. Recombinatorial cloning using heterologous lox sites. *Genome Res.* **14**, 1119–1129.

10. Walhout A.J., Temple G.F., Brasch M.A., Hartley J.L., Lorson M.A., van den Heuvel S., Vidal M. 2000. Gateway recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol.* **328**, 575–592.
11. http://www.atzlabs.com/pdf/GC_Cloning_Kit_lifetech_india.pdf
12. <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases-molecular-cloning-and-beyond>
13. Karimi M., Depicker A., Hilson P. 2007. Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiol.* **145**, 1144–1154.
14. Tzfira T., Tian G.W., Lacroix B., Vyas S., Li J., Leitner-Dagan Y., Krichevsky A., Taylor T., Vainstein A., Citovsky V. 2005. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Mol. Biol.* **57**, 503–516.
15. Katzen F. 2007. Gateway recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin. Drug Discov.* **2**, 571–589.
16. www.invitrogen.com
17. Cheo D.L., Titus S.A., Byrd D.R.N., Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A. 2004. Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using *in vitro* site-specific recombination: functional analysis of multi-segment expression clones. *Genome Res.* **14**, 2111–2120.
18. Sasaki Y., Sone T., Yoshida S., Yahata K., Hotta J., Chesnut J.D., Honda T., Imamoto F. 2004. Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J. Biotechnol.* **107**, 233–243.
19. Citovsky V., Lee L.-Y., Vyas S., Glick E., Chen M.-H., Vainstein A., Gafni Y., Gelvin S.B., Tzfira T. 2006. Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J. Mol. Biol.* **362**, 1120–1131.
20. Underwood B.A., Vanderhaeghen R., Whitford R., Town C.D., Hilson P. 2006. Simultaneous high-throughput recombinational cloning of open reading frames in closed and open configurations. *Plant Biotechnol. J.* **4**, 317–324.
21. Alvarez J.P., Pekker I., Goldshmidt A., Blum E., Am-sellem Z., Eshed Y. 2006. Endogenous and synthetic micro RNAs stimulate simultaneous, efficient and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell.* **18**, 1134–1151.
22. Burch-Smith T.M., Anderson J.C., Martin G.B., Dinesh-Kumar S.P. 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* **39**, 734–746.
23. Chen Q.-J., Zhou H.-M., Chen J., Wang X.-C. 2006. A Gateway-based platform for multigene plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **62**, 927–936.
24. Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M., Séraphin B. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* **24**, 218–229.
25. Robertson D. 2004. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 495–519.
26. Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., Weigel D. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18**, 1121–1133.
27. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One.* **3**, e3647.
28. Sarrion-Perdigones A., Falconi E.E., Zandalinas S.I., Juárez P., Fernández-del-Carmen A., Granel A., Orzaez D. 2011. GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One.* **6**, e21622.
29. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. 2011. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One.* **6**, e16765.
30. Werner S., Engler C., Weber E., Gruetzner R., Marillonnet S. 2012. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioeng. Bugs.* **3**, 38–43.
31. Li M.Z., Elledge S.J. 2007. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat. Methods.* **4**, 251–256.

ADVANCES IN MOLECULAR CLONING

**Malla Ashwini^a, Shanmugaraj Bala Murugan^{a, b},
Srinivasan Balamurugan^{a, c}, Ramalingam Sathishkumar^{a *}**

^a*Plant Genetic Engineering Laboratory, Department of Biotechnology, Bharathiar University, Coimbatore, Tamil Nadu, India*

^{*}*e-mail: rsathish@buc.edu.in*

^b*Department of Biotechnology, PSR College of Engineering, Sivakasi, Tamil Nadu, India*

^c*Department of Genetic Engineering, SRM University, Chennai, Tamil Nadu, India*

“Molecular cloning” meaning creation of recombinant DNA molecules has impelled advancement throughout life sciences. DNA manipulation has become easy due to powerful tools showing exponential growth in applications and sophistication of recombinant DNA technology. Cloning genes has become simple what led to an explosion in the understanding of gene function by seamlessly stitching together multiple DNA fragments or by the use of swappable gene cassettes, maximizing swiftness and liveness. A novel archetype might materialize in the near future with synthetic biology techniques that will facilitate quicker assembly and iteration of DNA clones, accelerating the progress of gene therapy vectors, recombinant protein production processes and new vaccines by *in vitro* chemical synthesis of any *in silico*-specified DNA construct. The advent

of innovative cloning techniques has opened the door to more refined applications such as identification and mapping of epigenetic modifications and high-throughput assembly of combinatorial libraries. In this review, we will examine the major breakthroughs in cloning techniques and their applications in various areas of biological research that have evolved mainly due to easy construction of novel expression systems.

Keywords: cloning, restriction, ligation independent cloning, recombination, applications.