

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-16-28>



# Метод Golden Gate в биологии и медицине

М.И. Антипина, В.А. Ли, Е.Е. Попова, Е.В. Семина

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», ул. Александра Невского, д. 14, 236041, Калининград, Россия

Адрес для корреспонденции: [antipinaria@gmail.com](mailto:antipinaria@gmail.com)

## Аннотация

Целью данного обзора было описать и сравнить методы молекулярного клонирования для сборки генетических конструкций. Генетическая терапия — одна из активно развивающихся отраслей современной медицины, поэтому особое внимание в данном обзоре уделено таким параметрам, как быстрота, точность и эффективность клонирования, так как они являются критическими факторами при создании генно-терапевтических средств. Особое внимание уделено методике Golden Gate, которая основана на использовании эндонуклеаз рестрикции типа IIS, поскольку такой подход упрощает процесс клонирования и повышает его эффективность за счет стандартизированного дизайна и минимального набора ферментов. Наряду с Golden Gate в обзоре также обсуждаются такие методы молекулярного клонирования, как Gateway и Gibson, с точки зрения перспектив их использования для решения фундаментальных и прикладных задач регенеративной медицины.

**Ключевые слова:** молекулярное клонирование, Golden Gate, клонирование Gateway, клонирование Gibson

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Антипина М.И., Ли В.А., Попова Е.Е., Семина Е.В. Метод Golden Gate в биологии и медицине. *Регенерация органов и тканей*. 2024;2(1):16–28. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-16-28>

Поступила 10.02.2024

Обработана 21.03.2024

Принята к публикации 28.03.2024

# Golden gate method in biology and medicine

Maria I. Antipina, Vladislav A. Li, Elizaveta E. Popova, Ekaterina V. Semina

Immanuel Kant Baltic Federal University, Alexander Nevsky Str., 14, 236041, Kaliningrad, Russia

Correspondence address: [antipinaria@gmail.com](mailto:antipinaria@gmail.com)

## Abstract

The aim of this review was to describe and compare molecular cloning methods for assembling genetic constructs. Genetic therapy is one of the rapidly developing fields of modern medicine, so special attention in this review is paid to parameters such as speed, accuracy, and efficiency of cloning, as these are critical factors in creating gene therapy agents. Special attention is given to the Golden Gate method, which is based on the use of type IIS restriction endonucleases, as this approach simplifies the cloning process and increases its efficiency through standardized design and a minimal set of enzymes. Alongside Golden Gate, the review also discusses more innovative molecular cloning methods, Gateway and Gibson, in terms of their potential use for addressing fundamental and applied challenges in regenerative medicine.

**Keywords:** molecular cloning, Golden Gate, Gateway cloning, Gibson Assembly

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Antipina M.I., Li V.A., Popova E.E., Semina E.V. Golden gate method in biology and medicine. *Tissue and organ regeneration*. 2024;2(1):16–28. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2024-1-16-28>

Received 10.02.2024

Revised 21.03.2024

Accepted 28.03.2024

## Список сокращений

**Эндонуклеазы рестрикции IIS типа** — ферменты, способные разрезать цепь ДНК за пределами сайта узнавания

**ПЦР** — полимеразная цепная реакция

**attP и attB** — сайты прикрепления фага и бактерии, в результате рекомбинации между этими сайтами происходит интеграция фаговой ДНК в геном бактерии

**attL и attR** — левый и правый сайты рекомбинации, фланкирующие встроенную ДНК фага, создаваемые при рекомбинации сайтов attP и attB

**BP клоназа** — фермент, катализирующий реакцию рекомбинации по сайтам attP и attB

**LR клоназа** — фермент, катализирующий реакцию рекомбинации по сайтам attL и attR

**ccdB** — ген-киллер, экспрессирующий смертельный для бактерий токсин

**CRISPR** — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, особые локусы бактерий и архей, обеспечивающих адаптивный иммунитет

**TALEN** — эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции, представляют собой рестрикторные ферменты, которые могут быть сконструированы для разрезания определенных последовательностей ДНК

**ЦНС** — центральная нервная система

**ИПСК** — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

**МСК** — мезенхимальные стволовые клетки

## Введение

Огромное количество исследований в области регенеративной медицины направлено на разработку технологий генной инженерии для создания эффективных способов стимуляции регенерации органов и тканей, лечения пациентов с травмами, ожогами, генетическими патологиями.

Быстрая и корректная сборка генетических конструкций играет ключевую роль в разработке эффективных генно-терапевтических подходов, поскольку позволяет создавать специализированные последовательности, способные ускорить процессы восстановления и заживления тканей. Точность и оперативность молекулярного клонирования могут существенно повлиять на эффективность лечения нуждающихся в терапии пациентов, а также способствуют развитию персонализированной медицины и индивидуализированных подходов регенеративной медицины.

Часто ограничивающим фактором в создании сложных генетических конструкций является сложность сборки последовательностей ДНК, кодирующих несколько генетических элементов [1]. Несмотря на то что молекулярное клонирование является одной из бурно развивающихся областей науки, большая часть работы по-прежнему выполняется с использованием стандартных методик, таких как субклонирование, ПЦР-клонирование, ТА-клонирование и пр. Использование традиционных методов молекулярного клонирования трудоемко и затратно по времени и расходным материалам. Основная сложность заключается в том, что необходимо разрабатывать уникальный дизайн молекулярного конструирования практически в каждом проекте. Довольно часто это обусловлено тем, что в исходных последовательностях могут отсутствовать удобные сайты эндонуклеаз рестрикции для клонирования интересующего фрагмента или, наоборот, присутствовать нежелательные. В обоих этих случаях возникает потребность модифицировать целевые фрагменты перед сборкой, что существенно замедляет процесс. При работе с традиционными молекулярными методами сборку компонентов проводят в несколько этапов, проверяя наличие и ориентацию интересующего фрагмента ДНК на каждом этапе клонирования. При этом используется большое количество разных ферментов и буферов, что сказывается на стоимости, эф-

фективности и продолжительности выполнения всего эксперимента.

Сделать молекулярное клонирование фрагментов ДНК более эффективным можно, если рассматривать его как процесс, представляющий собой сборку дискретных функциональных генетических элементов. Взаимозаменяемость и возможность переиспользовать функциональные фрагменты ДНК, а также однотипные протоколы сборки упрощают как дизайн, так и саму процедуру клонирования. Одним из таких подходов является методика молекулярного клонирования Golden Gate, которая делает возможным универсальную и эффективную сборку генетических конструкций. В основе данного метода лежит использование эндонуклеаз рестрикции класса IIS, особенностью которых является наличие как сайта узнавания, так и сайта разрезания, а четырехбуквенные перекрытия (выступающие «липкие» концы после рестрикции) проектируются на стадии дизайна эксперимента таким образом, что сборка нескольких фрагментов ДНК будет производиться в одной, единственно верной, заранее спланированной исследователем ориентации.

Такой подход к организации молекулярного клонирования делает возможным сборку многокомпонентных последовательностей в одной пробирке, минуя такие этапы, как препаративный гель-электрофорез, экстракция ДНК из геля и дополнительные шаги по верификации на промежуточных стадиях. Преимущества данного подхода заключаются в стандартизированном дизайне, направленности клонирования, а также использовании минимального набора ферментов высокой точности, что позволяет сэкономить на затратах.

В обзоре будут рассмотрены как традиционные методики молекулярного клонирования, используемые для решения рутинных задач для сборки генетических конструкций, так и более современные и инновационные подходы, такие как Gateway, Gibson и Golden Gate

## Популярные стратегии молекулярного клонирования. Сравнительная характеристика

Традиционное клонирование основано на создании рекомбинантной ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции. Такие методики являются самым простым и самым старым методом молекулярного конструирования [2], а также

заложили основу для разработки новых способов молекулярной инженерии.

### 1. Субклонирование

Одной из самых базовых техник молекулярного клонирования является субклонирование. Метод основан на перемещении гена интереса с родительской плазмиды-вектора на плазмиду-шаттл. Ферменты рестрикции используются для того, чтобы разрезать плазмидный вектор по двум сайтам, а также вырезать ими же вставку из исходной родительской плазмиды. Далее вектор и вставка очищаются с помощью электрофореза в агарозном геле. После выделения из геля компонентов сборки производят сшивание вектора и вставки с использованием лигазы. В итоге получают новую плазмиду, которая содержит ген интереса. Далее производят трансформацию компетентных клеток *E. coli* полученной плазмидой, отбор колоний с помощью селекции на основе резистентности к антибиотику (выращивают бактерии на среде с антибиотиком, трансформируемый вектор, в свою очередь, содержит ген устойчивости к данному антибиотику), скрининг колоний, наращивание отобранных клонов и выделение из них плазмид [3, 4].

### 2. Система BioBrick

Система BioBrick основана на использовании изокаудомеров, представляющих собой эндонуклеазы рестрикции, распознающие разные последовательности нуклеотидов, но образующие одинаковые концы, что позволяет легко и достаточно эффективно конструировать генетические конструкции [5]. В основе метода BioBrick лежит активность ферментов рестрикции II типа — сайт узнавания и сайт рестрикции совпадают, при расщеплении фрагмента ДНК образуются «липкие» концы. Под одним элементом этой системы подразумевается ген интереса — это может быть промотор, ДНК-кодирующая последовательность, терминатор, сигнальный пептид, сайты связывания с рибосомой и т.д. В системе сборки BioBrick все эти элементы стандартизированы и содержатся в виде библиотек, в которых каждый фрагмент находится в отдельной плазмиде, содержащей ген резистентности к антибиотику, используемому для контрселекции, и точку начала репликации. К тому же BioBrick должен быть фланкирован с обеих сторон двумя стандартными сайтами рестрикции — внутренним и внешним, при этом внутренние сайты должны являться изокаудомерами. При лигировании таких «липких» концов образуется гибридный сайт,

находящийся между двух элементов BioBrick, который более не может узнать ни один из исходных ферментов. Сайты рестрикции, фланкирующие финальную сборку, восстанавливаются. Таким образом можно собирать достаточно объемные конструкции, выбирая сайты рестрикции с совместимыми концами, при этом фланкирующие сайты можно использовать повторно для следующего раунда сборки. Это довольно простой и эффективный вариант клонирования, но необходимо иметь в виду, что на месте образования гибридного сайта появляется «шов» в несколько аминокислот, что во многих случаях недопустимо [6].

### 3. ПЦР-клонирование

Другой базовой техникой клонирования в синтетической биологии является метод клонирования с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7]. Есть два варианта ПЦР-клонирования. Первый отличается от традиционных методов тем, что позволяет избежать использования ферментов рестрикции. ПЦР используют для наработки гена интереса с родительской плазмиды, а потом готовый ампликон присоединяют к заранее линейаризованному вектору с помощью лигирования по «тупым» концам. Второй вариант ПЦР-клонирования основан на использовании сайтов рестрикции, которые добавляются к ампликону гена интереса посредством праймеров, содержащих выступающие концы (dangling ends) с сайтами рестрикции. Для линейаризации плазмидного вектора также используют эндонуклеазы рестрикции (в том числе изоизомеры или изокаудомеры), благодаря чему клонирование фрагментов происходит в необходимой ориентации. Далее вектор и ген интереса лигируются с последующей трансформацией компетентных клеток *E. coli* лигазной смесью.

### 4. ТА-клонирование

ТА-клонирование — еще один метод клонирования, который является более быстрым и простым, чем метод традиционного субклонирования, и также позволяет избежать работы с ферментами рестрикции [8]. В ТА-клонировании используют Taq ДНК-полимеразу, которая амплифицирует ген интереса с добавлением остатков аденина к 3'-концам ПЦР-продукта. Для создания вектора необходимо линейаризовать плазмиду-шаттл разрезанием ферментами рестрикции с образованием «тупых» концов. Далее вектор соединяется с дидезокситимидин-

трифосфатом (ddNTP) с помощью терминальной трансферазы. Затем ампликон с аденинами на 3'-концах лигируют с вектором, содержащим тимины на 3'-концах вектора, с использованием ДНК-лигазы T4 [9].

### 5. ТОРО ТА-клонирование

Помимо ТА-клонирования существует его разновидность — ТОРО ТА-клонирование [10]. Этот метод объединяет в себе преимущества ТА-клонирования с лигирующей активностью топоизомеразы I. А именно: биологическая роль топоизомеразы I состоит в расщеплении и повторном сшивании концов суперскрученной ДНК для облегчения репликации. Топоизомераза I, используемая в ТОРО ТА-клонировании, специфически узнает последовательность ДНК 5' — (С/Т) ССТТ — 3', которая находится на обоих концах вектора. В процессе репликации она специфически разрезает ДНК в этой области, раскручивает ДНК и лигирует ее со вставкой. Вставка, в свою очередь, должна быть наработана ПЦР амплификацией с помощью Taq ДНК-полимеразы и содержать аденин на 3'-концах ампликона. Этот метод позволяет обходиться без ДНК-лигазы, а также достаточно быстро производить прямое лигирование ПЦР-фрагментов в вектор [11, 12].

### 6. Клонирование по методу Gateway

Метод клонирования Gateway основан на феномене интеграции и рекомбинантного вырезания генов, которые происходят при внесении генетического материала лямбда-фага в бактерию [13]. В естественных условиях рекомбинация ДНК происходит с помощью ВР клоназы между сайтами рекомбинации attP у фага и attB у бактерии [14]. В результате реакции между сайтами attP и attB лямбда-фаг интегрируется в бактериальный геном, окруженный двумя новыми сайтами рекомбинации — attL (Left) и attR (Right). Сайты attL и attR могут также рекомбинировать, с помощью LR клоназы, что приводит к удалению фага из бактериального генома. Эти две противоположные реакции лежат в основе технологии Gateway:

а) Реакция ВР или рекомбинация сайтов attB и attP. В этом этапе ген интереса должен быть фланкирован последовательностями attB1 и attB2, а донор-вектор последовательностями attP1 и attP2, между которыми в векторе должен находиться ген *ccdB* — белок-токсин, нарушающий работу ДНК-гиразы и приводящий к смерти клетки. При добавлении в реакционную смесь ВР фермента

клоназы происходит рекомбинация по attB и attP сайтам, в результате синтезируется промежуточный клон, который содержит ген интереса, фланкированный уже сайтами attL. Побочным продуктом реакции является ген *ccdB*, который вырезается из донор-вектора и добавляется в промежуточную плазмиду;

б) Реакция LR, или реакция рекомбинации сайтов attL и attR. На данном этапе рекомбинация происходит между полученным ранее клоном с интересующей вставкой, синтезированным на предыдущем шаге, и вектором назначения, который содержит ген *ccdB*. Ген интереса фланкирован последовательностями attL1 и attL2, ген *ccdB* на векторе назначения фланкирован последовательностями attR1 и attR2. При добавлении LR клоназы происходит рекомбинация по attL и attR сайтам с восстановлением сайтов attP и attB. В результате реакции генерируется экспрессионный клон, который содержит ген интереса, фланкированный сайтами attB. Как и в предыдущей реакции, ген, кодирующий *ccdB*, вырезается из вектора назначения и добавляется в промежуточный клон.

Следующим шагом является трансформация компетентных клеток и отбор положительных клонов. Для этого проводят двойную селекцию — оба вектора имеют ген резистентности к разным антибиотикам. К тому же необходимо использовать штамм *E. coli*, чувствительный к *ccdB*, который, как было упомянуто, является цитотоксическим геном. После трансформации проводят отбор клонов, содержащих интересующий фрагмент.

### 7. Клонирование по методу Gibson Assembly

Сборка векторов по Гибсону была разработана в 2009 году доктором Дэниэлом Гибсоном и его коллегами из института Дж. Крейга Вентера [15]. Суть этого клонирования состоит в объединении нескольких линейных фрагментов ДНК. Весь процесс клонирования происходит в одной пробирке, минуя этапы препаративной рестрикции, электрофореза в агарозном геле, выделения из геля фрагментов, фосфорилирования или дефосфорилирования и лигирования. Для успешной сборки по методу Гибсона необходимо, чтобы фрагменты ДНК, которые впоследствии соединяются в одну молекулу, содержали перекрывающиеся комплементарные концы. Их можно добавить к гену интереса с помощью ПЦР амплификации, используя праймеры с необходимыми адаптерами. Фрагменты

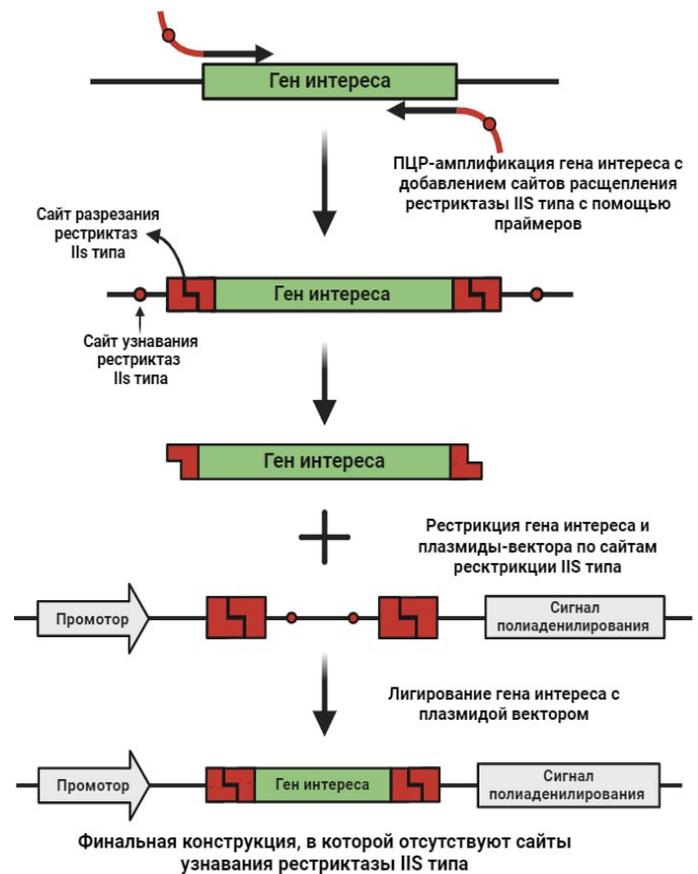
ДНК с перекрывающимися концами добавляют в реакционную смесь и инкубируют от 15 минут до 1 часа при температуре 50 °С. В реакционной смеси для клонирования по Гибсону содержится нуклеаза с 5'-3' экзонуклеазной активностью, которая отщепляет нуклеотиды с 5'-конца фрагментов, создавая одноцепочечные перекрытия, которые гибридизуются друг с другом по принципу комплементарности. Также в смеси содержится ДНК-полимераза, которая достраивает цепочку, используя в качестве матрицы интактные 3'-участки, и ДНК-лигаза, которая сшивает одноцепочечные разрывы цепи ДНК. После этих манипуляций получается цельная молекула ДНК, которая далее может использоваться для постановки ПЦР или трансформации. Клонирование по Гибсону может использоваться как для сборки большого количества фрагментов в одну молекулу одновременно, так и для рутинных манипуляций [16].

### 8. Golden Gate

Golden Gate сегодня рассматривают как одну из эффективных стратегий клонирования [17], которая позволяет встраивать в плазмидный вектор до нескольких вставок одновременно. Технология Golden Gate основана на активности эндонуклеаз рестрикции IIS типа, особенностью которых является разрезание последовательности ДНК за пределами сайта узнавания с образованием «липких» концов. Именно эта особенность позволяет производить сборку многокомпонентных конструкций в одной пробирке — еще на этапе дизайна эксперимента исследователь может спроектировать образующиеся выступающие концы таким образом, чтобы интересующие фрагменты ДНК были клонированы в заранее определенном порядке и ориентации [18].

Методику Golden Gate используют как для клонирования моногенных последовательностей (промоторы, гены интереса, линкеры, белковые метки, терминаторы и пр.) в плазмиды-хранилища, так и для сборки мультигенных конструкций. В обобщенном варианте схема клонирования одиночной последовательности в плазмидный вектор по методике Golden Gate (рис. 1) заключается в следующем: необходимо амплифицировать ген интереса с помощью ПЦР, используя праймеры, содержащие адаптеры на своих концах. В адаптерные последовательности входит сайт узнавания используемых эндонуклеаз рестрикции и линкерный регион, по которому

и происходит расщепление. Причем необходимо спроектировать праймеры таким образом, чтобы с 5'-конца шел сначала сайт узнавания ферментов рестрикции и только после него сайт разрезания. Такой дизайн олигонуклеотидов обеспечит удаление сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа из готовой конструкции. Плазмидный вектор должен содержать сайты узнавания ферментов рестрикции с 3'-конца относительно сайта расщепления. А также такие линкерные регионы, чтобы при обработке эндонуклеазами рестрикции IIS типа образовывались «липкие» концы, комплементарные «липким» концам, которые содержит ген интереса. Таким образом происходит встраивание гена интереса в плазмидный вектор в строго определенной ориентации. При этом сайты узнавания



**Рис. 1.** Схема молекулярного конструирования моногенной последовательности по методу Golden Gate. Сайты узнавания и разрезания рестриктазы IIS типа добавляются с помощью праймеров во время ПЦР-амплификации. Сайт узнавания рестриктазы IIS типа отмечен кружком; сайт разрезания — зигзагом. После подготовки генетического фрагмента производится его клонирование с помощью реакции рестрикции-лигирования в необходимый участок по липким концам

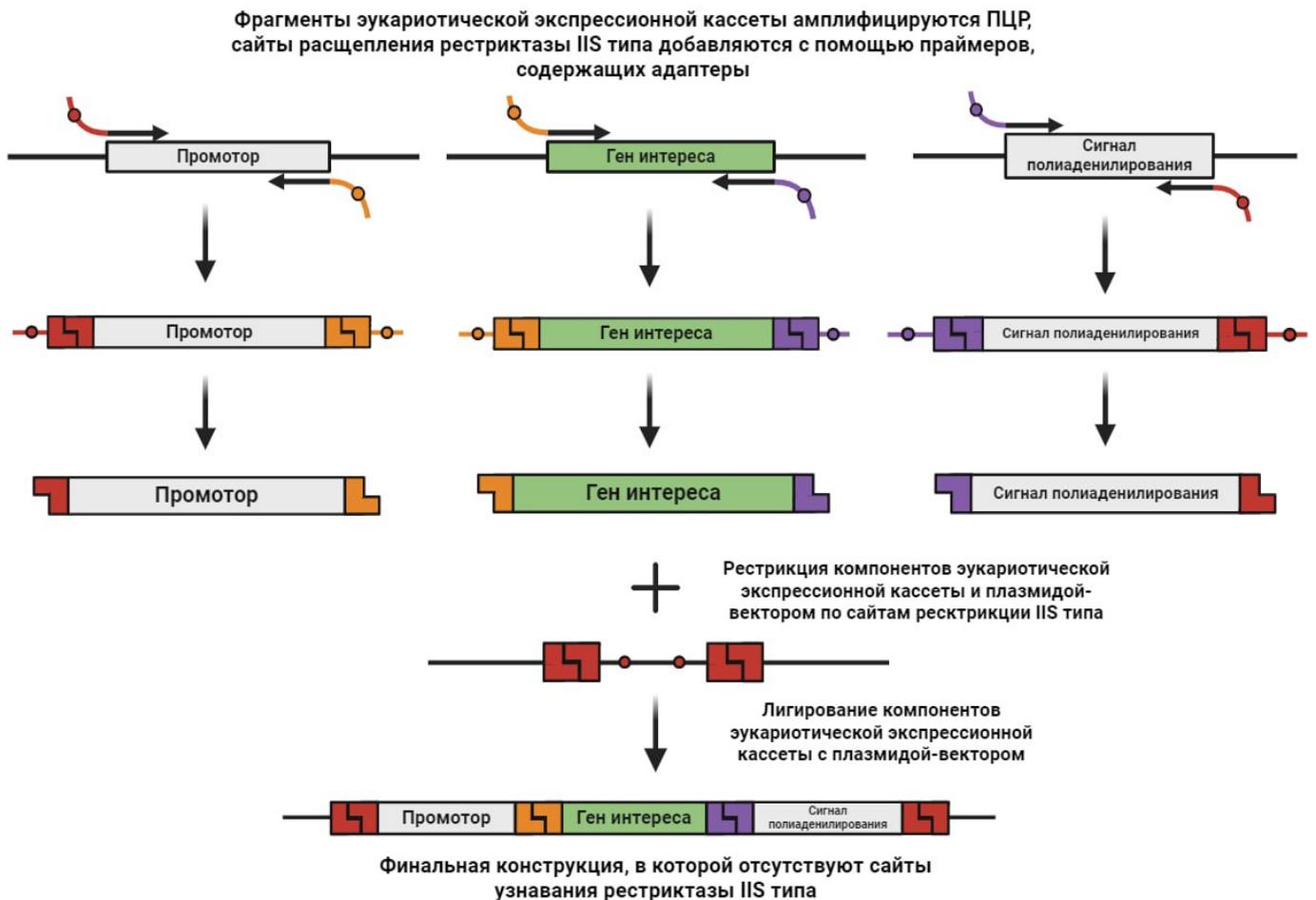
фермента рестрикции, используемой в реакции, удаляются из готовой конструкции.

В случае сборки конструкции, которая состоит из нескольких компонентов, алгоритм сборки является аналогичным. Каждый из компонентов эукариотической экспрессионной кассеты амплифицируется ПЦР с добавлением адаптеров, содержащих сайты узнавания и расщепления эндонуклеазы рестрикции IIS типа, при этом линкерные регионы должны быть комплементарны друг другу, как указано на схеме ниже (рис. 2). В этом случае сборка компонентов эукариотической экспрессионной кассеты будет происходить в правильной ориентации и последовательности. Финальная конструкция не содержит сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа [17].

Вставка и плазмидный вектор должны быть сконструированы таким образом [19], чтобы удовлетворять следующим условиям:

а) Вставка и вектор должны содержать гомологичные нуклеотидные последовательности в сайтах расщепления; таким образом, реакция рестрикции будет протекать с образованием «липких» концов, которые затем гибридизуются друг на друга. Более того, такая конструкция обеспечивает правильную ориентацию вставки в векторе;

б) Сайт узнавания эндонуклеаз рестрикции типа IIS должен фланкировать интересующий ген таким образом, чтобы после реакции рестрикции-лигирования он оставался



**Рис. 2.** Схема молекулярного клонирования Golden Gate для сборки эукариотических экспрессионных кассет. Сайты узнавания и разрезания рестриктазы IIS типа добавляются с помощью праймеров во время ПЦР-амплификации. Сайт узнавания рестриктазы IIS типа отмечен кружком; сайт разрезания – зигзагом. Клонирование мультигенной конструкции происходит аналогично моногенной за один этап реакции рестрикции-лигирования по совместимым «липким» концам, которые обеспечивают заданную ориентацию и последовательность фрагментов эукариотической экспрессионной кассеты

на плазмиде-хранилище; это необходимо для того, чтобы избежать повторной рестрикции готового продукта. Конечным результатом реакции является упорядоченная сборка фрагментов ДНК, полученная за одну совместную реакцию рестрикции-лигирования.

Молекулярное конструирование в технике Golden Gate отличает быстрота, которая связана с простотой реакционной смеси. Время, затраченное для приготовления лигазной смеси (hands-on time), может составлять 5 минут.

После того как в одной пробирке к исходному вектору и вектору назначения добавляется эндонуклеаза рестрикции IIS типа и лигаза, происходит необратимая сборка финальной конструкции. И хотя может происходить образование побочного продукта (исходный вектор лигируется со вставкой или лигирование с образованием исходной плазмиды), он будет существовать в реакционной смеси временно, так как последовательность сохраняет сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа, и, следовательно, будет расщепляться. В результате эффективность процесса лигирования приближается к 100%.

Еще одним преимуществом клонирования по методу Golden Gate является масштабируемость. Эндонуклеазы рестрикции IIS типа отличаются тем, что производят расщепление ДНК в регионе, находящемся на несколько нуклеотидов ниже от сайта узнавания с образованием четырехнуклеотидного одноцепочечного «липкого» конца. Так как при Golden Gate может происходить конструирование нескольких фрагментов ДНК, обычно до 10, линкерные регионы можно спроектировать таким образом, чтобы сборка финальной конструкции происходила в строго определенной последовательности и ориентации. Поскольку «липкий» конец будет состоять только из четырех нуклеотидов, следовательно, существует 256 возможных вариантов проектируемых перекрытий. Количество комбинаций «липких» концов рассчитывается по формуле  $I^k$ , где  $I$  — это количество переменных позиций, а  $k$  — количество нуклеотидов в одной позиции, таким образом  $I^k = 4^4$ , или 256. Однако, так как исследователи избегают палиндромных последовательностей и содержания GC состава более 50–75%, то практический выбор последовательностей перекрытий ограничивается приблизительно 90 вариантами, чего более чем достаточно для клонирования [20].

В отличие от Golden Gate методы, основанные на работе экзонуклеаз, например молекулярное конструирование по Гибсону, требуют от 20 до 40 гомологичных пар нуклеотидов на концах фрагментов ДНК, которые необходимы для указания порядка сборки. В методе Golden Gate необходимо всего четыре пары нуклеотидов для гомологии. Как правило, в большинстве случаев линкерные регионы, необходимые для установления порядка конструирования в системе Golden Gate, добавляются к гену интереса посредством адаптеров на концах праймеров в полимеразной цепной реакции. Это говорит о том, что метод Golden Gate является более экономически выгодным, чем другие методы клонирования, такие как BioBrick, Gateway или Gibson.

Несмотря на все вышесказанное, у метода Golden Gate есть определенные ограничения. Во-первых, при проведении реакции необходимо убедиться, что сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции IIS типа присутствуют только там, где они нужны. Другими словами — сайты узнавания должны фланкировать ген интереса, но не находиться в нем. В противном случае будет происходить нежелательное расщепление продукта и нарушение итоговой сборки. Эту проблему можно решить ПЦР-амплификацией гена с внесением точечной мутации посредством праймеров (доместикация фрагмента) или с помощью субклонирования элементов. Во-вторых, теоретически существует ограниченное количество вариантов дизайна перекрытий — 256. И хотя данное число является достаточно большим, необходимо помнить о том, что некоторые варианты перекрытий с различием в один нуклеотид могут неспецифически лигироваться друг с другом. Этот момент должен учитываться на этапе разработки эксперимента [21, 22].

### 9. Сравнительная характеристика методов молекулярного клонирования

Стратегии традиционного молекулярного клонирования все еще являются наиболее распространенными на сегодняшний день. Эти сборки могут быть очень эффективными при условии, что совместимые сайты узнавания для применяемых эндонуклеаз рестрикции легко доступны в последовательностях ДНК, которые необходимо модифицировать. Однако зачастую это не так или сайт узнавания необходимой рестриктазы не является уникальным, и тогда приходится искать сложные и многоэтапные альтернативы — подбирать уникальную стратегию клони-

рования, адаптированную к конкретной конструкции и последовательности ДНК каждый раз. Также при таком подходе довольно сложно собирать одновременно множество генетических конструкций. Например, при параллельной сборке более трех генетических конструкций значительно возрастает вероятность ошибки.

Большая часть рассмотренных методов молекулярного клонирования являются финансово затратными и требуют значительного времени, при этом обладают высокой трудоемкостью и низкой эффективностью. Два из представленных методов — молекулярное клонирование по методу Gibson и Golden Gate наиболее выгодно выделяются на фоне всех рассмотренных методов, так как они дают широкие возможности для стандартизации элементов, скорости и гибкости дизайна эксперимента. Сравнительная

характеристика методов молекулярного клонирования представлена в таблице 1.

### Обсуждение

Создание простых и эффективных подходов молекулярной инженерии при разработке генетических конструкций, в рамках которых для достижения желаемых терапевтических эффектов становится возможным целенаправленное изменение транскрипционного профиля клеток, в т.ч. стволовых, является важной задачей для регенеративной медицины. В последние годы использование технологий редактирования генома CRISPR и TALEN открыло новые возможности решения таких задач, в частности лечения нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний, фиброза, ожогов и др. [23]. На данный момент практически все эти примеры находятся в области

**Таблица 1.** Сравнительная характеристика методов молекулярного конструирования

Метод клонирования	Этапы приготовления вектора	Этапы приготовления вставки	Необходимые реагенты (в т.ч. ферменты)
Субклонирование	1. Препаративная рестрикция вектора 2. Гель-электрофорез 3. Вырезание и выделение из геля 4. Иногда дефосфорилирование вектора	1. Препаративная рестрикция вставки 2. Гель-электрофорез 3. Вырезание и выделение из геля 4. Иногда фосфорилирование вставки	Набор эндонуклеаз рестрикции (от 1 до 10) <sup>1</sup> , фосфатаза, киназа, лигаза
Система BioBrick	Препаративная рестрикция вектора	Препаративная рестрикция вставки	Набор эндонуклеаз рестрикции
ПЦР-клонирование	1. Подготовка вектора посредством рестрикции 2. Гель-электрофорез 3. Вырезание и выделение из геля	1. ПЦР амплификация вставки 2. Фосфорилирование	Полимераза, набор эндонуклеаз рестрикции, фосфатаза, лигаза, киназа
TA-клонирование	1. Линеаризация вектора посредством рестрикции 2. Добавление к вектору ddTTP с помощью терминальной трансферазы	1. ПЦР амплификация вставки	Полимераза, набор эндонуклеаз рестрикции, трансфераза, лигаза
ТОРО TA-клонирование	Лигирование вектора со вставкой с помощью топоизомеразы I	ПЦР амплификация вставки	Полимераза, топоизомераза
Gateway	1. Реакция BP 2. Реакция LR	1. ПЦР амплификация вставки	BP-клоназа, LR-клоназа
Клонирование по методу Gibson	1. ПЦР амплификация фрагментов праймерами, содержащих адаптеры 2. Реакция Гибсона	1. ПЦР амплификация фрагментов праймерами, содержащими адаптеры	Полимераза, экзонуклеаза, полимеразы <sup>2</sup> , лигаза
Клонирование по методу Golden Gate	Реакция Golden Gate		Эндонуклеаза рестрикции IIS типа, лигаза

*Примечание:* <sup>1</sup> Количество используемых эндонуклеаз рестрикции зависит от дизайна эксперимента; <sup>2</sup> Первая полимеразы используется для амплификации гена интереса, вторая полимеразы входит в коммерческий набор Gibson Assembly вместе с экзонуклеазой и лигазой.

экспериментальной медицины, однако уже первые результаты таких исследований выглядят многообещающе с точки зрения приложений для регенеративной медицины. Одним из ярких примеров использования технологии редактирования TALEN является стимуляция ангиогенеза. В работах Баркера и коллег [24] был использован TALEN подход для интеграции гена *PDGF-B* человека в первичные фибробласты мыши, после чего модифицированные фибробласты были введены в рану мыши *in vivo*. Использование гиперэкспрессирующих *PDGF-B* клеток сильнее симулировало заживление ран по сравнению с вводимыми фибробластами дикого типа за счет усиления васкуляризации раны. Плазмиды, кодирующие последовательности химерных нуклеаз, были созданы с помощью метода Golden Gate.

В последние годы стали использовать генетические конструкции для разработки терапий, направленных на замедление или остановку нейродегенеративных процессов. Так, в исследовании Нью и коллег было показано, что астроциты путем принудительной экспрессии фактора транскрипции *SOX2* могут быть идеальной мишенью для преобразования их в нейроны после повреждения ЦНС [25]. Плаزمид-шаттл, содержащая фактор транскрипции *SOX2*, была создана методом субклонирования. Результаты этих экспериментов показали принципиальную возможность использования эндогенных глиальных клеток, специфичных для пациента, как источника функциональных нейронов для лечения нейродегенеративных состояний или травм мозга.

В другом исследовании была показана возможность использования CRISPR/Cas9 технологии для исправления мутации в гене *APP<sup>Swe</sup>*, что привело к снижению секреции бета-амилоида A $\beta$ , это позволило авторам рассматривать такой подход для лечения болезни Альцгеймера. В данном исследовании клонирование направляющих РНК в плазмидный вектор осуществляли с помощью Golden Gate [26]. Другим примером эффективного перепрограммирования одним геном (фактором транскрипции) *NeuroD1* неактивных глиальных клеток коры головного мозга в функциональные нейроны у мышей в *in vivo* моделях травмы мозга и болезни Альцгеймера являются исследования Гуо и коллег [27], и в которых плаزمид была создана посредством субклонирования.

Технологии редактирования генома активно исследуются в моделях лечения фиброза. Так, Шванк и коллеги впервые сообщили об использовании системы редактирования CRISPR/Cas9 для коррекции локуса гена *CFTR* в культивируемых стволовых клетках тонкого кишечника пациентов, гомозиготных по мутации F508del [28]. Направляющие РНК для редактирования генома создавали с помощью инвертированной ПЦР с последующим субклонированием; экспрессионные кассеты, используемые для селекции клонов, создавали с помощью метода In-Fusion ПЦР. Стволовые клетки с исправленным геном *CFTR* формировали органоиды, функционально реагирующие на добавление в систему форсколина. Фирт и коллеги получили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из фибробластов кожи пациентов с аналогичной мутацией, где выполнили коррекцию гена *CFTR* с помощью CRISPR/Cas9. Исправленные ИПСК далее дифференцировали в зрелые эпителиальные клетки дыхательных путей и показали восстановление функции транспорта хлорида, специфичной для *CFTR* дикого типа [29]. Для исправления мутации авторами была создана система CRISPR, состоящая из двух компонентов: плазмиды, кодирующей полноразмерный белок Cas9, оптимизированный по кодонам для оптимальной экспрессии в клетках человека, и отдельной плазмиды, содержащей кассету шпильки направляющей РНК, управляемую промотором U6, обе конструкции были собраны с использованием субклонирования.

Нельзя не отметить уже большое на сегодняшний день число исследований, в которых оцениваются подходы подавления апоптоза за счет активации экспрессии антиапоптотических генов. В работах Чо и коллег продемонстрировано, что сверхэкспрессия гена *LEF1* (связывающий лимфоидный энхансер-1 фактор) в мезенхимальных стволовых клетках, полученных из пуповинной крови человека hUCB-MCK, увеличивает их пролиферацию и защищает от индуцированного перекисью водорода апоптоза *in vitro*. Более того, использование сверхэкспрессирующих *LEF1* hUCB-MCK, полученных на основе CRISPR/Cas9, и дальнейшая их трансплантация в зону инфаркта миокарда показали повышенную выживаемость стволовых клеток и кардиопротекторные эффекты на животной модели инфаркта миокарда [30].

Хочется отметить, что, несмотря на уже ставшее рутинным использование технологий TALEN

и CRISPR/Cas9, их трансляция в клиническую практику осложнена запретом на прямое редактирование генома человека [31]. Тем не менее активно исследуются модифицированные ИПСК, использование которых позволяет подбирать как персонифицированную терапию, так и в целом разрабатывать подходы для лечения большого спектра различных заболеваний: от нейродегенеративных и онкологических до заболеваний сердечно-сосудистой системы и регенерации органов и тканей [32, 33]. Огромное число исследовательских групп активно применяют различные методы сборки генетических конструкций для создания и перепрограммирования ИПСК, в т.ч. технологию Golden Gate [34–36], что значительно ускоряет скорость сборки таких конструкций, и, как следствие, стоимость оценки их эффективности и безопасности.

### Заключение

Критическими параметрами для сборки генетических конструкций, используемых для генной терапии, являются точность и скорость клонирования последовательностей в вектор, количество клонов, содержащих целевую последовательность, а также эффективность экспрессии трансгена в клетках-мишенях. Использование технологии Golden Gate удовлетворяет всем этим характеристикам и представляет собой мощный инструмент для быстрого создания сложных конструкций. Более того, Golden Gate позволяет собирать мультикомпонентные конструкции в одной пробирке с высокой скоростью и надежностью, а универсальность протокола и модульность клонирования, благодаря которым возможно создавать

кастомизированные конструкции, требуемые в персонализированной медицине, выгодно отличает Golden Gate от методов классического клонирования. Также уменьшение количества необходимых ферментов и расходных материалов делает методику Golden Gate более экономичной, чем стандартные подходы, применяемые сегодня во многих лабораториях. Благодаря этим особенностям молекулярное конструирование плазмидных векторов при Golden Gate может быть автоматизировано, в том числе и с применением компьютерных алгоритмов для упрощения дизайна и контроля выполнения клонирования.

Несмотря на то что молекулярное клонирование Golden Gate накладывает некоторые ограничения на этапе дизайна стратегий сборки, они не являются критичными. Необходимость удаления сайтов узнавания используемой рестриктазы IIS типа из финальной конструкции легко решается грамотным дизайном на стадии разработки стратегии клонирования, а набор эффективных нуклеотидных перекрывающихся последовательностей, необходимых для избежания неспецифичного лигирования фрагментов, хоть и ограничен, но все же их количество [22] достаточно для сборки мультигенных конструкций.

**Финансирование:** Исследование поддержано из средств программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. Канта

**Funding:** This research was supported from the Russian Federal Academic Leadership Program Priority 2030 at the Immanuel Kant Baltic Federal University.

### Литература

1. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. PLOS One. 2011;6(2):e16765. DOI: 10.1371/journal.pone.0016765
2. A Quick Overview Of Molecular Cloning. <https://www.goldbio.com/articles/article/cloning-overview> [Accessed March 31, 2024].
3. Williams SA, Slatko BE, McCarrey JR. Laboratory investigations in molecular biology. Jones and Bartlett Publishers, 2007.
4. Struhl K. Subcloning of DNA fragments. Current Protocols in Molecular Biology. 1991; 13(1):3.16. DOI: 10.1002/0471142727.mb0316s13
5. Shetty RP, Endy D, Knight TFJr. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. Journal of Biological Engineering. 2008;2(1):5. DOI: 10.1186/1754-1611-2-5
6. Sleight SC, Bartley BA, Lieviant, JA, and Sauro HM. In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. Nucleic Acids Research. 2010;38(8):2624–2636. DOI: 10.1093/nar/gkq179

7. Hoseini S, Sauer MG. Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *Journal of Biological Engineering*. 2015;9(1):2. DOI: 10.1186/1754-1611-9-2
8. Motohashi K. A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6417. DOI: 10.1038/s41598-019-42868-6
9. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE. Universal TA Cloning. *Current Issues in Molecular Biology*. 2000;2:1–7. DOI: 10.21775/cimb.002.001
10. Plasmid 101: TOPO Cloning <https://blog.addgene.org/plasmids-101-topo-cloning> [Accessed April 10, 2024].
11. Shuman S. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(22):10104–10108. DOI: 10.1073/pnas.88.22.10104
12. Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(51):32678–32684. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)31688-0
13. Reece-Hoyes JS, Walhout AJM. Gateway recombinational cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018;2018(1):pdb.top094912. DOI: 10.1101/pdb.top094912
14. Chin CF, Chee JY. Gateway cloning technology: Advantages and drawbacks. *Cloning & Transgenesis*. 2015;04(01):1-3. DOI: 10.4172/2168-9849.1000138
15. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CAIII, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. 2009;6(5):343–345. DOI: 10.1038/nmeth.1318
16. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010;329(5987):52–56. DOI: 10.1126/science.1190719
17. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLOS One*. 2008;3(11):e3647. DOI: 10.1371/journal.pone.0003647
18. Engler C, Marillonnet S. Combinatorial DNA assembly using Golden Gate cloning. In *Synthetic Biology*. Humana Press. 2013;1073:141-156. DOI: 10.1007/978-1-62703-625-2\_12
19. Chiasson D, Giménez-Oya V, Bircheneder M, Bachmaier S, Studtrucker T, Ryan J, et al. A unified multi-kingdom Golden Gate cloning platform. *Scientific Reports*. 2019;9(1):10131. DOI: 10.1038/s41598-019-46171-2
20. Potapov V, Ong JL, Kucera RB, Langhans BW, Bilotti K, Pryor JM, et al. Comprehensive profiling of four base overhang ligation fidelity by T4 DNA ligase and application to DNA assembly. *ACS Synthetic Biology*. 2018;7(11):2665–2674. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00333
21. Plasmid 101: Golden Gate Cloning <https://blog.addgene.org/plasmids-101-golden-gate-cloning> [Accessed April 17, 2024].
22. New England BioLabs: Golden Gate Assembly <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/golden-gate-assembly> [Accessed April 17, 2024].
23. Kues WA, Kumar D, Selokar NL, Talluri TR. Applications of genome editing tools in stem cells towards regenerative medicine: An update. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2022;17(3):267–279. DOI: 10.2174/1574888X16666211124095527
24. Barker JC, Barker AD, Bills J, Huang J, Wight-Carter M, Delgado I, et al. Genome Editing of Mouse Fibroblasts by Homologous Recombination for Sustained Secretion of PDGF-B and Augmentation of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2014;134(3):389e–401e. doi: 10.1097/PRS.0000000000000427
25. Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo R, et al. In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nature Cell Biology*. 2013;15(10):1164–1175. doi: 10.1038/ncb2843
26. György B, Lööv C, Zaborowski MP, Takeda S, Kleinstiver BP, Commins C, et al. CRISPR/Cas9 Mediated Disruption of the Swedish APP Allele as a Therapeutic Approach for Early-Onset Alzheimer's Disease. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*. 2018;11:429–440. doi: 10.1016/j.omtn.2018.03.007
27. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. In Vivo Direct Reprogramming of Reactive Glial Cells into Functional Neurons after Brain Injury and in an Alzheimer's Disease Model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(2):188–202. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.001

28. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):653–658. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002
29. Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports*. 2015;12(9):1385–1390. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.062
30. Cho HM, Lee KH, Shen Y ming, Shin TJ, Ryu PD, Choi MC, et al. Transplantation of hMSCs Genome Edited with LEF1 Improves Cardio-Protective Effects in Myocardial Infarction. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*. 2020;19:1186–1197. doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.007
31. О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности: федеральный закон от 12.07.1996 № 86-ФЗ; в ред. от 29.12.2022. Собрание законодательства РФ. 1996. № 28. Ст. 3348
32. Park S, Gwon Y, Khan SA, Jang KJ, Kim J. Engineering considerations of iPSC-based personalized medicine. *Biomaterials Research*. 2023;27(1):67. doi: 10.1186/s40824-023-00382-x
33. Kim C. Disease modeling and cell based therapy with iPSC: future therapeutic option with fast and safe application. *Blood Research*. 2014;49(1):7–14. doi: 10.5045/br.2014.49.1.7
34. Gao X, Yang J, Tsang JCH, Ooi J, Wu D, Liu P. Reprogramming to Pluripotency Using Designer TALE Transcription Factors Targeting Enhancers. *Stem Cell Reports*. 2013;1(2):183–197. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.06.002
35. Weltner J, Balboa D, Katayama S, Bessalov M, Krjutškov K, Jouhilahti EM, et al. Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nature Communications*. 2018;9(1):2643. doi: 10.1038/s41467-018-05067-x
36. Weltner J, Trokovic R. Reprogramming of Fibroblasts to Human iPSCs by CRISPR Activators. *Methods Mol Biol*. 2021;2239:175–198. doi: 10.1007/978-1-0716-1084-8\_12.

### Об авторах

**Антипина Мария Игоревна** — инженер-исследователь НИЛ трансляционных исследований ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

**Ли Владислав Артурович** — студент 4-го курса специалитета по направлению «Биоинженерия и биоинформатика» ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

**Попова Елизавета Евгеньевна** — студентка 4-го курса специалитета по направлению «Биоинженерия и биоинформатика» ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

**Семина Екатерина Владимировна** — д.б.н., зав. лаб. НИЛ трансляционных исследований ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ имени И. Канта.

### Authors

**Maria I. Antipina** — Research Engineer at the Translational Research Laboratory of the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.

**Vladislav A. Li** — 4th-year student specializing in Bioengineering and Bioinformatics at the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.

**Elizaveta E. Popova** — 4th-year student specializing in Bioengineering and Bioinformatics at the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.

**Ekaterina V. Semina** — Dr. Sci. (Biology), Head of the Translational Research Laboratory at the Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO) Immanuel Kant Baltic Federal University.