



MODULUL 9

Генная инженерия



9.1. Основы генной инженерии

- **Материально-техническая база генной инженерии**
- **Основные этапы генной инженерии**



Проверим наши знания:

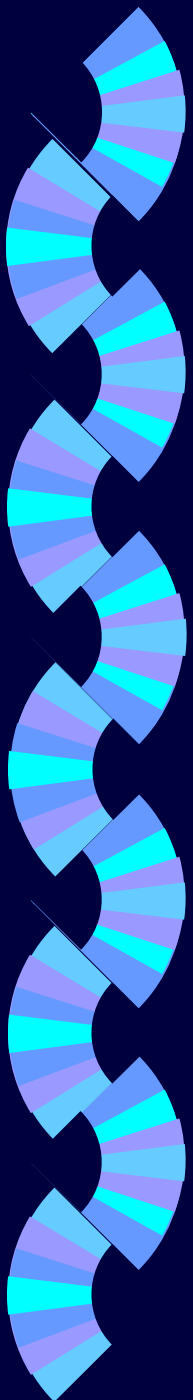
**1. ЧТО ЯВЛЯЕТСЯ ОСНОВНОЙ
ЕДИНИЦЕЙ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ?**

A) аминокислота

B) нуклеотид

C) ген

D) белок



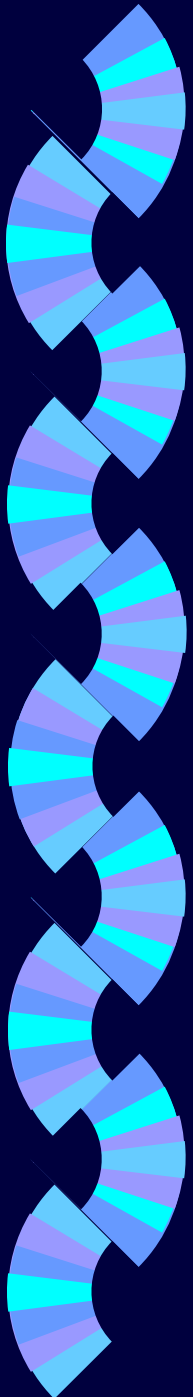
2. Сколько типов тРНК могут быть в одной клетке?

A) 4

B) 20

C) 61

D) 64



3. Генетическая рекомбинация у бактерий осуществляется следующими способами:

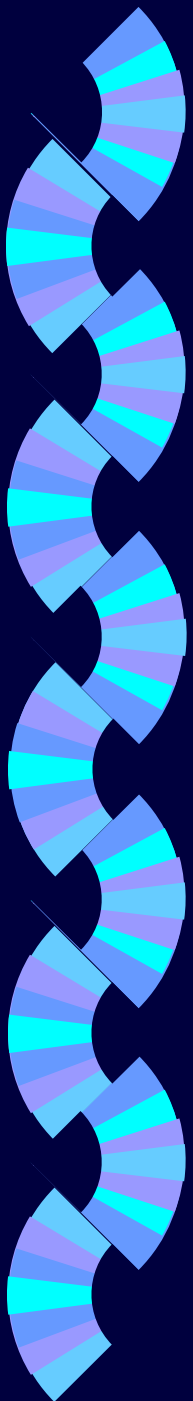
- 1. репликация*
- 2. трансформация*
- 3. трансляция*
- 4. трансдукция*
- 5. конъюгация*

A) 1, 2, 4, 5

C) 2, 4, 5

B) 2, 3, 4

D) только 2 и 4



4. Сколько хромосом отошло к полюсам клетки в анафазе I мейоза, если исходная клетка содержала 14 хромосом?

- A) 0
- B) 7
- C) 14
- D) 28



5. Наследование групп крови у человека в система АВО:

- 1. определяется взаимодействием аллельных генов типа множественного аллелизма*
- 2. определяется взаимодействием аллельных генов типа кодоминирования*
- 3. определяется взаимодействием аллельных генов типа плейотропии*
- 4. определяется взаимодействием неаллельных генов типа комплемантарии*
- 5. определяется взаимодействием аллельных генов типа эпистазии*

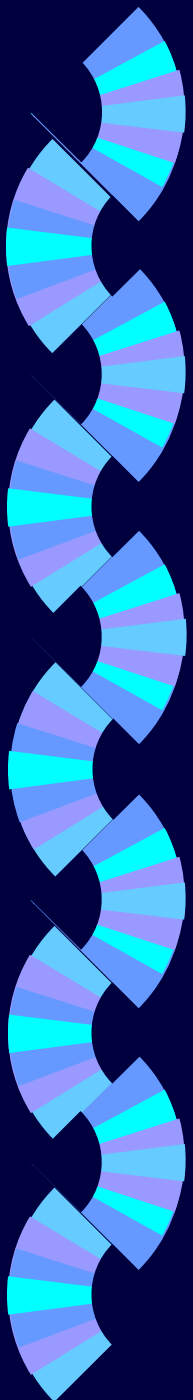
A) 1, 3

B) 1, 5

C) 1, 2, 5

D) 1, 3, 5

E) 2, 5



6. КАКИМИ СВЯЗЯМИ СВЯЗАНЫ МЕЖДУ СОБОЙ ЦЕПИ В МОЛЕКУЛЕ ДНК?

A) пептидными

B) водородными

C) фосфодиэфирными

D) сульфидными

E) все варианты являются правильными



7. ПЛАЗМИДЫ ЯВЛЯЮТСЯ:

- А) молекулами ДНК с экзон-интронной организацией*
- В) бактериальными молекулами ДНК, которые не могут передаваться другим клеткам*
- С) кольцевыми молекулами ДНК*
- Д) молекулами ДНК, которые реплицируются под непосредственным контролем бактериальной хромосомы*



Проверим наши знания:

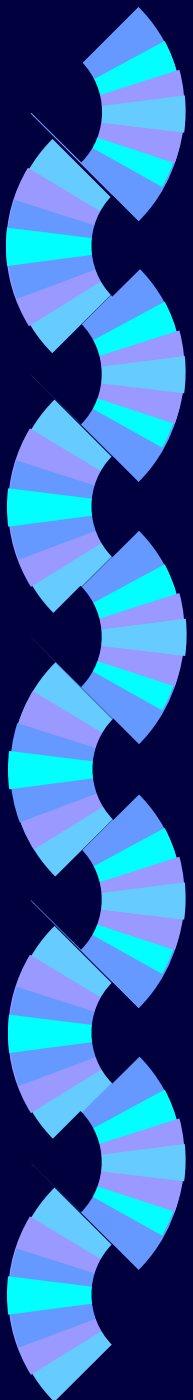
1. ЧТО ЯВЛЯЕТСЯ ОСНОВНОЙ
ЕДИНИЦЕЙ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ?

A) аминокислота

B) нуклеотид

C) ген

D) белок



2. Сколько типов тРНК могут быть в одной клетке?

A) 4

B) 20

C) 61

D) 64



3. Генетическая рекомбинация у бактерий осуществляется следующими способами:

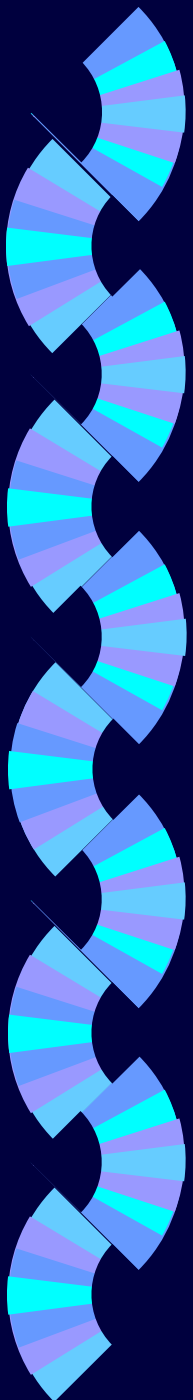
- 1. репликация*
- 2. трансформация*
- 3. трансляция*
- 4. трансдукция*
- 5. конъюгация*

A) 1, 2, 4, 5

C) 2, 4, 5

B) 2, 3, 4

D) только 2 и 4



4. Сколько хромосом отошло к полюсам клетки в анафазе I мейоза, если исходная клетка содержала 14 хромосом?

A) 0

B) 7

C) 14

D) 28



5. Наследование групп крови у человека в система АВО:

- 1. определяется взаимодействием аллельных генов типа множественного аллелизма*
- 2. определяется взаимодействием аллельных генов типа кодоминирования*
- 3. определяется взаимодействием аллельных генов типа плейотропии*
- 4. определяется взаимодействием неаллельных генов типа комплемантарии*
- 5. определяется взаимодействием аллельных генов типа эпистазии*

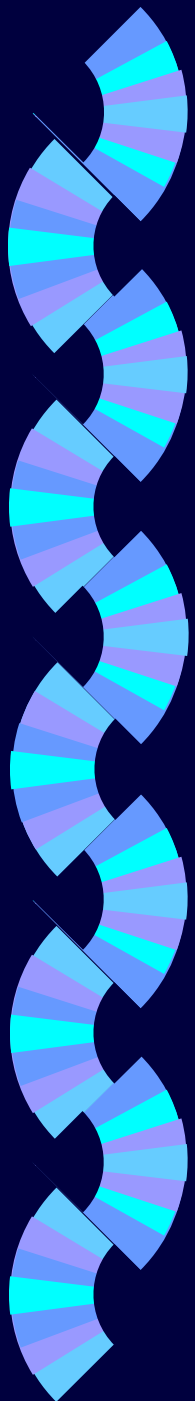
A) 1, 3

B) 1, 5

C) 1, 2, 5

D) 1, 3, 5

E) 2, 5



6. КАКИМИ СВЯЗЯМИ СВЯЗАНЫ МЕЖДУ СОБОЙ ЦЕПИ В МОЛЕКУЛЕ ДНК?

A) пептидными

B) водородными

C) фосфодиэфирными

D) сульфидными

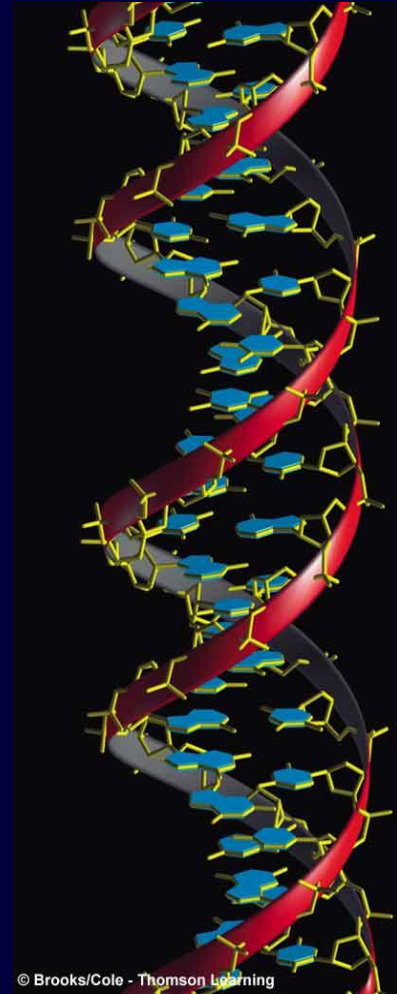
E) все варианты являются правильными

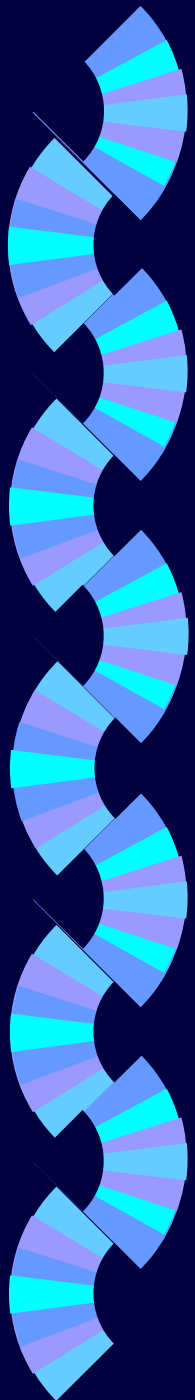


7. ПЛАЗМИДЫ ЯВЛЯЮТСЯ:

- А) молекулами ДНК с экзон-интронной организацией*
- В) бактериальными молекулами ДНК, которые не могут передаваться другим клеткам*
- С) кольцевыми молекулами ДНК***
- Д) молекулами ДНК, которые реплицируются под непосредственным контролем бактериальной хромосомы*

- 
- *Проверим полученные результаты !*

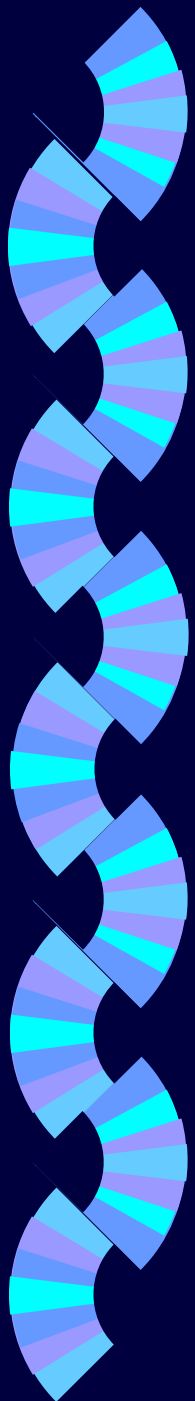




- *Вернемся к
нашим*

• *Вернемся к
нашим*





- ***Генетическая инженерия***

- Манипуляция на уровне генома организмов с целью их совершенствования
- Пр.: экспериментальный мутагенез, гибридизация

- ***Генная инженерия***

- Манипуляция на уровне ДНК с целью создания рекомбинантных молекул и их переноса в другие организмы
- Пр.: получение гормонов, получение генетически модифицированных организмов (ГМО)



Когда возникла генная инженерия?

- 1972, P.Berg
 - Получение первой рекомбинантной молекулы ДНК
- 1944, A.Avery, C.McLeod, M.McCarty
 - Открытие явления трансформации



Основные этапы развития генной инженерии:

- **Открытие основных механизмов переноса генетической информации**
 - **Трансформация** (Griffiths, 1928; Avery, McLeod, McCarty, 1944)
 - **Сексдукция** (Lederberg, Tatum, 1946)
 - **Трансдукция** (Tsinder, Lederberg, 1952)
- **Открытие структуры ДНК** (Watson, Crick, 1953)
- **Открытие основных ферментов (50-60 гг.)**
 - **Рестриктазы**
 - **Лигаза**



Основные этапы развития генной инженерии (продолжение):

- **Открытие обратной транскрипции (G.Temin, S.Mizutani, D.Baltimore, 1970)**
- **Открытие возможности искусственного синтеза генов (H.Corana, 1970-76)**
- **Получение первой рекомбинантной молекулы ДНК (P.Berg, 1972)**
- **Искусственное получение инсулина (1982)**



2. Материально-техническая база генной инженерии

Генная инженерия основывается на изолирование отдельных фрагментов ДНК и их клонирование в векторные системы которые реплицируются автономно в клетки (организмы) хозяева

Она включает:

- Систему ферментов
- Систему переноса (векторы)
- Клетки хозяева



Ферменты (основные группы рестриктаз)

- **Endonucleaze**

- Pentru activitate necesită prezența în mediu de incubare ATP, S-adenozilmetionină, Mg^{2+}
- Sunt instabile
- Nu produc fragmente discrete

- **“site”- специфические эндонуклеазы**

- Для активности нуждаются лишь в Mg^{2+}
- Около 500
- Производят дискретные фрагменты, легко выделяются электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле

- **Grupa intermediară**

- Pentru activitate necesită prezența a Mg^{2+} și ATP
- Produc fragmente discrete



Свойства рестриктаз

- Могут разрезать молекулу ДНК на дискретные фрагменты
- Относительно легко выделяются
- Способность образовывать “липкие концы” (не все рестриктазы)
- Высокая специфичность действия (разрезает молекулу ДНК в определенных местах – сайтах узнавания)

“Site”-узнавания некоторых рестриктаз:

Four Restriction Enzymes

Enzyme	Recognition site	Cleavage products	
<i>Eco</i> RI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— GAATTC —} \\ \text{— CTTAAG —} \\ \uparrow \end{array}$	— G	AATTC —
		— CTTAA	G —
<i>Hae</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— GGCC —} \\ \text{— CCGG —} \\ \uparrow \end{array}$	— GG	CC —
		— CC	GG —
<i>Hind</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— AAGCTT —} \\ \text{— TTCGAA —} \\ \uparrow \end{array}$	— A	AGCTT —
		— TTCGA	A —
<i>Sma</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— CCCGGG —} \\ \text{— GGGCCC —} \\ \uparrow \end{array}$	— CCC	GGG —
		— GGG	CCC —



Примеры рестрикции

Recognition Site

Cleavage Products

EcoR1

---GAATTC---
---CTTAAG---

---G AATTC--
---CTTAA G—

STICKY ENDS

Sma 1

---CCCGGG---
---GGGCCC---

---CCC GGG---
---GGG CCC---

BLUNT ENDS

- Участки рестрикции содержат 4 – 8 пар оснований в длину



Название ферментов рестрикции

Название рестриктаз происходит от названия бактерий из которых они выделены:

- *Пр.: EcoRI*
 - Из *E.coli*, штамм R
 - I – число (первый) выделенного фермента



Векторные системы

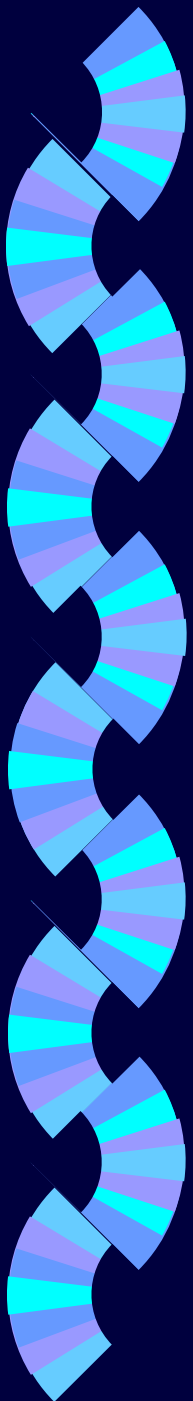
- Специализированные молекулы по переносу наследственной информации рекомбинантных молекул ДНК в клетки (организмы) хозяева

Примеры:

- плазмиды
- фаги
- вирусы
- космиды
- митохондриальное ДНК / хлоропластное ДНК

Требования предъявляемые векторным системам

- **Безвредность вектора**
- **Быстрое размножение в клетке-хозяине и разрушение вне ее**
- **Наличие ограниченного количества сайтов рестрикции**
- **Наличие маркерных генов для узнавания**
- **Относительная легкость выделения**
- **Клонирование и экспрессия в другие клетки**





Использование векторов

- **Плазмиды**

- Для клонирования ДНК которые содержат от нескольких пар оснований (pb) до нескольких тысяч

- **Фаги**

- Для клонирования ДНК которые содержат 10.000 – 20.000 пар оснований (pb)

- **Искусственные “хромосомы”**

- Для клонирования ДНК которые содержат сотни тысяч пар оснований (pb)



Клетки хозяева (требования)

- **Возможность вовлечения в исследовательский процесс**
- **Отсутствие возможности существовать вне лабораторных условиях**
- **Возможность разрушения ДНК вне лабораторных условиях**
- **Исключение возможности передачи наследственной информации другим организмам**
- **Исключение возможности биологического загрязнения окружающей среды**



3. Этапы генной инженерии

- **1. Изолирование и / или синтез генов**
- **2. Клонирование генов и получение рекомбинантных молекул ДНК**
- **3. Перенос и экспрессия рекомбинантных молекул ДНК в клетки (организмы) хозяева**



1. Получение генов

• 1.1. Изолирование генов

- **Гибридизация ДНК – ДНК** (Dj.Shapiro et al., 1969)
 - гибридизация фагов λ и $\phi 80$;
 - изолирование участка *lac*-оперона;
- **Гибридизация ДНК – РНК** (Tomas, 1976)
 - комплекс ДНК – РНК является более устойчивым чем ДНК – ДНК;
- **Гибридизация РНК – ДНК** (G.Temin, V.Mizutani, D.Baltimore, 1970)
 - использование ревертранскриптаз;
- **Фрагментация ДНК** (Maniatis et al., 1978)
 - используется для ДНК эукариот;
 - предполагает анализ фрагментов на селективных средах



1. Получение генов

- 1.2. Синтез генов

- **Из смеси дезоксиполинуклеотидтрифосфатов в присутствии ДНК полимераз (A.Cornberg, M.Djulian, 1967)**
 - получение инфекционного генетического материала фага φX174;
- **Химическим синтезом (H.Corana, 1970 - 1976)**
 - синтез тРНК аланина дрожжей (генетически неактивен);
 - синтез тРНК тирозина (генетически активен), содержащий промотор (52 нуклеотида), структурный участок (126 нуклеотидов) и терминатор (21 нуклеотид);



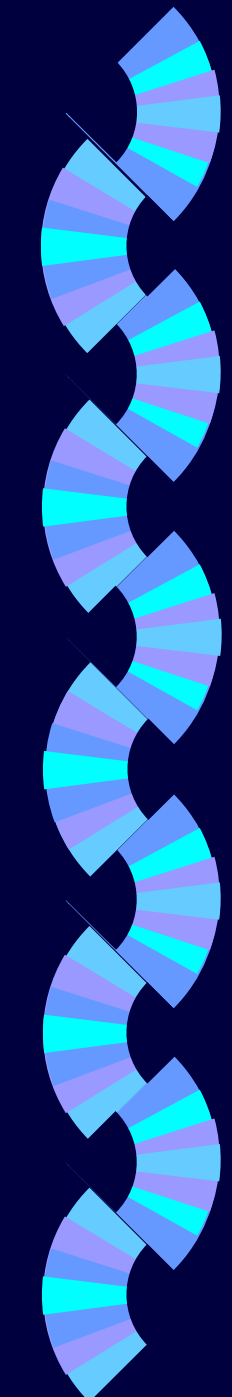
2. Получение рекомбинантных молекул ДНК

- **1.1. лигазный метод**

- Использование рестриктаз образующих “липкие концы”
- Использование лигаз
- Риск нарушения целостности генов;
- Не все рестриктазы образуют “липкие концы”;
- Малое количество рекомбинантных молекул;
- Необходимость сложного отбора рекомбинантных молекул;

- **1.2. терминальный метод**

- Использование эндо- и экзонуклеаз
- Искусственное прикрепление “липких концов”
- Использование в качестве вектора любых плазмид
- Использование комплексных фрагментов ДНК



3. Перенос и экспрессия рекомбинантных молекул ДНК

- **Типы переноса**

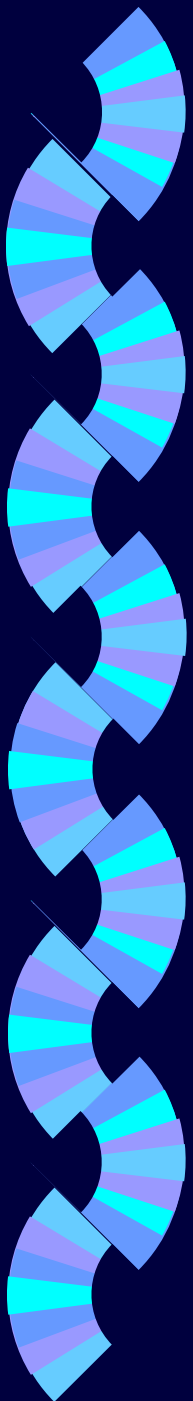
- Трансформация
 - В качестве векторов используются плазмиды;
- Трансфекция
 - В качестве векторов используются специфические фаги;
- Трансгенез
 - В качестве векторов используются неспецифические вирусы;

- **Пути переноса**

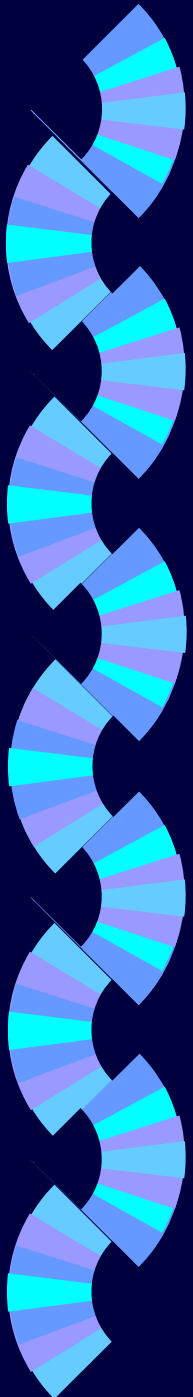
- Прокариот → прокариот
- Прокариот → эукариот
- Эукариот → прокариот
- Эукариот → эукариот

Механизмы защиты экзогенной генетической информации

- Метилирование ДНК (вирусы)
- Перевод линейной формы ДНК в кольцевую (фаг λ)
- Блокирование системы рестрикции клетки хозяина (фаг T3)
- Действие рестриктаз



Механизмы защиты эндогенной генетической информации

- 
- Метилирование ДНК
 - Действие специфических рестриктаз
 - Действие эригенетического окружения
 - Неспецифическое действие клеточных нуклеаз
 - Защитные свойства мембран
 - Действие гистоновых белков
 - Действие негистоновых белков
 - Действие интерферона

..... ?!

• КТО КОГО?!

