



Генная инженерия микроорганизмов

Булатова О.А.
гр. Ф-121

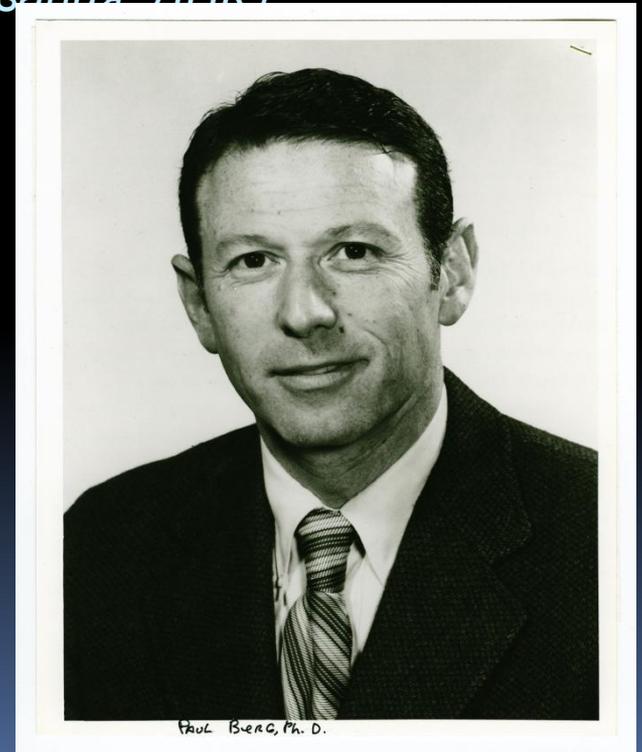
Генная инженерия или техника рекомбинантных ДНК, – это совокупность приемов, позволяющих путем операций *in vitro* перенести генетический материал из одного организма (который принято называть источником генов) в другой (называемый хозяином или реципиентом) таким образом, чтобы обеспечить наследование этих генов в новом для них организме.



Перенос генов методами генной инженерии дает возможность преодолевать межвидовые барьеры и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим (например, от человека или животного — бактерии и т. п.). В генной инженерии широко используются подходы и методы биоорганической химии.

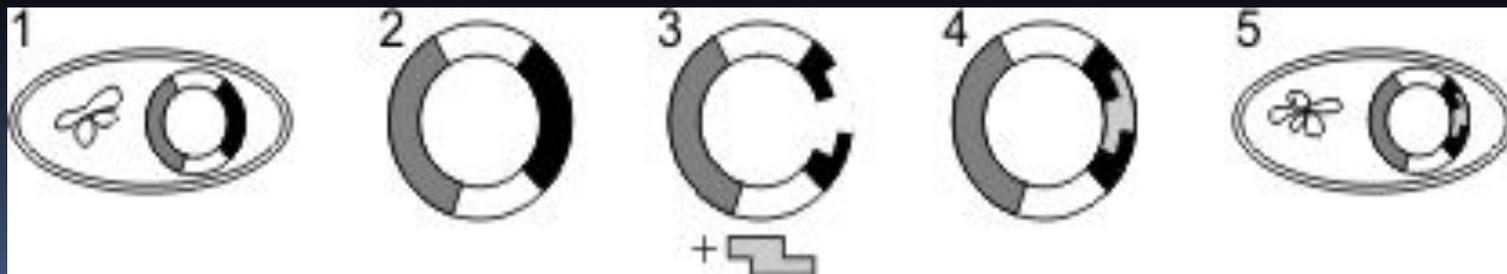
Рождением генной инженерии считают 1972 год, когда американский биохимик Пол Берг и его коллеги впервые *in vitro* получили рекомбинантную ДНК, состоящую из фрагмента ДНК бактериофага (вируса бактерии кишечной палочки), группы генов самой кишечной палочки и полной ДНК вируса, вызывающего развитие опухолей у обезьян. За эту работу П. Бергу в 1980 г. была присуждена Нобелевская премия (1/2 премии, и по 1/4 присуждено Уолтеру Гилберту и Фредериду Сенгеру за создание метода секвенирования ДНК)

Пол Наим Берг. Родился 30 июня 1926 г. в Бруклине (Нью-Йорк), США.



Процесс создания трансформированных бактерий включает в себя следующие этапы:

1. **Рестрикция** — «вырезание» нужных генов. Проводится с помощью специальных «генетических ножниц», ферментов — рестриктаз.
2. **Создание вектора** — специальной генетической конструкции, в составе которой намеченный ген будет внедрен в геном другой клетки. Основой для создания вектора являются плазмиды. Ген вшивают в плазмиду с помощью другой группы ферментов — лигаз. Вектор должен содержать все необходимое для управления работой этого гена — промотор, терминатор, ген-оператор и ген-регулятор, а также маркерные гены, которые придают клетке-реципиенту новые свойства, позволяющие отличить эту клетку от исходных клеток.
3. **Трансформация** — внедрение вектора в бактерию.
4. **Скрининг** — отбор тех бактерий, в которых внедренные гены успешно работают.
5. **Клонирование** трансформированных бактерий.



Образование рекомбинантных плазмид:

1 — клетка с исходной плазмидой; 2 — выделенная плазида; 3 — создание вектора; 4 — рекомбинантная плазида (вектор); 5 — клетка с рекомбинантной плазмидой.



В первые годы основными объектами генно-инженерных экспериментов были клетки *E. coli* K-12, а также ее плазмиды и бактериофаги, так как именно они были наиболее полно изучены генетически. Это позволяло целенаправленно конструировать новые типы векторных молекул и реципиентных клеток, а также прогнозировать свойства рекомбинантных молекул ДНК и проводить их анализ. Но со временем были разработаны системы клонирования для различных промышленно важных микроорганизмов, а также для клеток растений и животных. В настоящее время можно получать растения и животных, содержащих в своем геноме любой избранный ген.



В отличие от традиционной селекции, в ходе которой генотип подвергается изменениям лишь косвенно, генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат, применяя технику молекулярного клонирования.

Одно из важных направлений генной инженерии – производство лекарств нового поколения, представляющих собой биологически активные белки человека. В 1989-1990 гг. появилось новое лекарство – **человеческий интерферон-α**. (В России он выпускался под названием реаферон.) Полученный методом генной инженерии белок интерферон абсолютно идентичен интерферону, синтезируемому в организме человека.

В 80-е годы XX в. в научных лабораториях разных стран мира, в том числе и нашей страны, были выделены гены человека, определяющие синтез интерферона, и введены в бактерии. Такие бактерии быстро растут, используя дешевую питательную среду, и синтезируют большие количества интерферона. Из 1 л бактериальной культуры можно выделить столько человеческого интерферона, сколько из 5 – 10 тыс. л донорской крови. Интерферон обладает антивирусным действием, влияет на лечение рассеянного склероза и некоторых видов рака. Помимо этого, интерферон эффективен против вирусных гепатитов, герпеса, простудных заболеваний.

Процесс синтеза генов в настоящее время разработан очень хорошо и даже в значительной степени автоматизирован. Существуют специальные аппараты, снабжённые ЭВМ, в памяти которых закладывают программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей. Такой аппарат синтезирует отрезки ДНК длиной до 100–120 азотистых оснований (олигонуклеотиды). Получила распространение техника, позволяющая использовать для синтеза ДНК, в том числе мутантной, **полимеразную цепную реакцию**. Термостабильный фермент, ДНК-полимераза, используется в ней для матричного синтеза ДНК, в качестве затравки которого применяют искусственно синтезированные кусочки нуклеиновой кислоты – **олигонуклеотиды**. Фермент обратная транскриптаза позволяет с использованием таких затравок (праймеров) синтезировать ДНК на матрице выделенной из клеток РНК. Синтезированная таким способом ДНК называется **комплементарной (РНК) или кДНК**. Изолированный, «химически чистый» ген может быть также получен из фаговой библиотеки. Так называется препарат бактериофага, в геном которого встроены случайные фрагменты из генома или кДНК, воспроизводимые фагом вместе со всей своей ДНК.

Чтобы встроить ген в вектор, используют ферменты – **рестриктазы и лигазы**, также являющиеся полезным инструментом генной инженерии. С помощью рестриктаз ген и вектор можно разрезать на кусочки. С помощью лигаз такие кусочки можно «склеивать», соединять в иной комбинации, конструируя новый ген или заключая его в вектор. За открытие рестриктаз Вернер Арбер, Даниел Натанс и Хамилтон Смит также были удостоены Нобелевской премии (1978 г.)

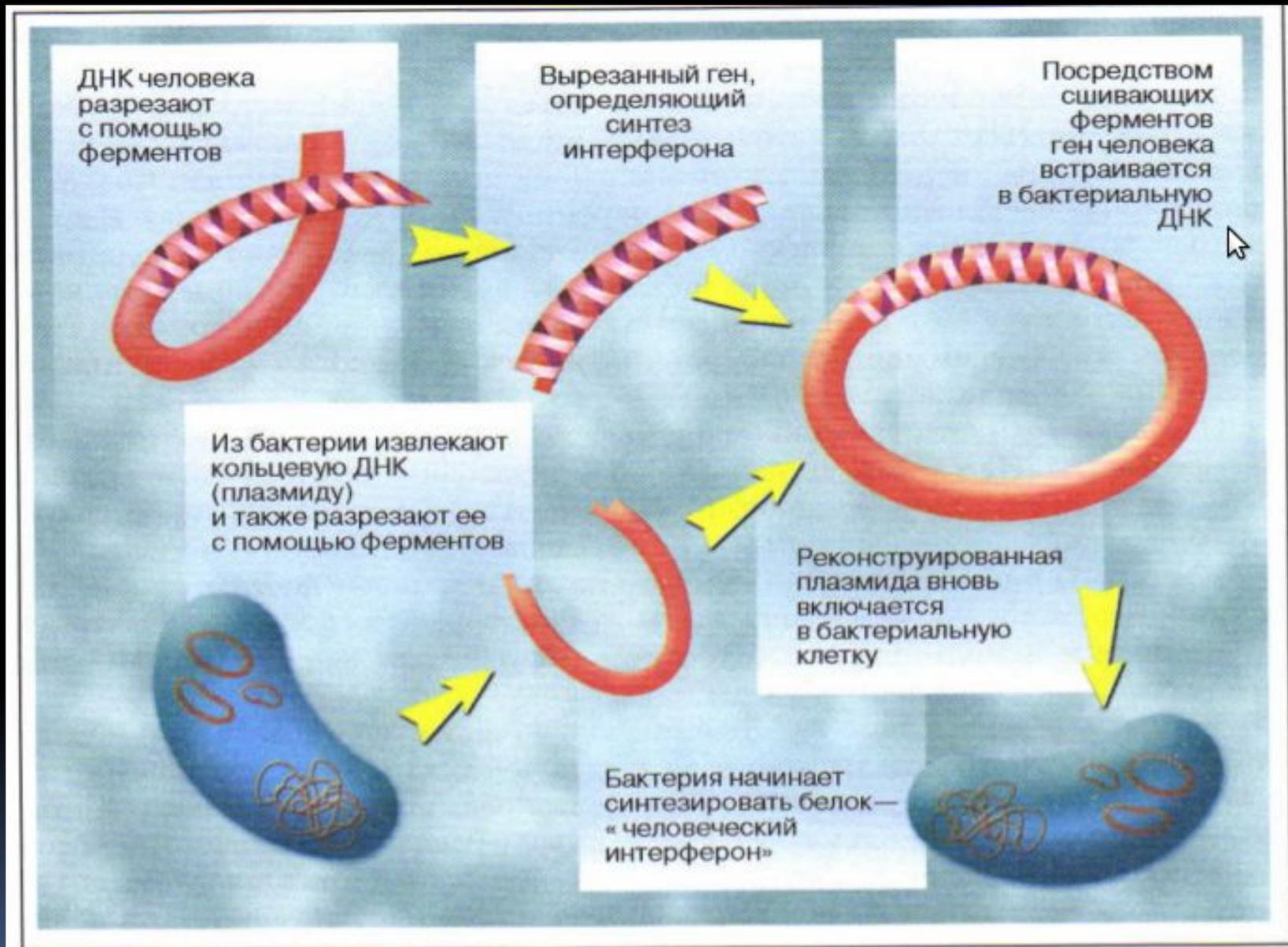
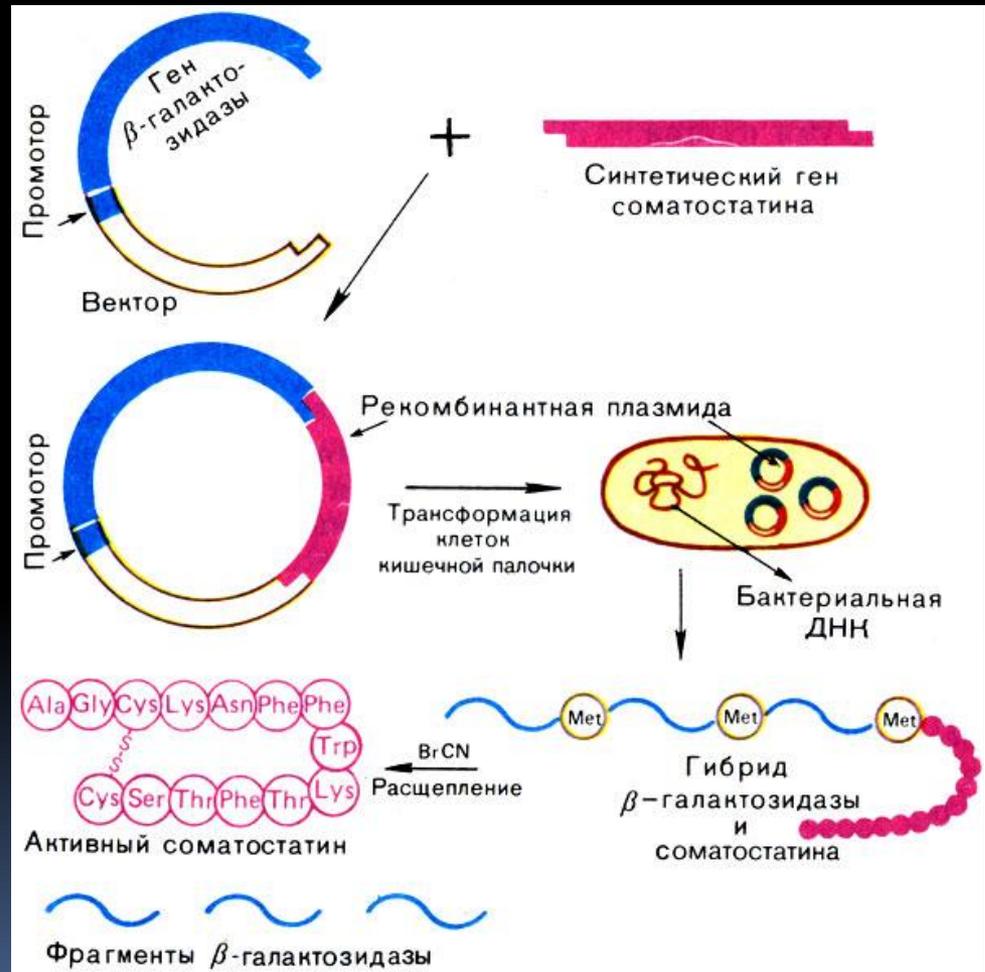


Схема встраивания гена человека, определяющего синтез интерферона, в ДНК бактерии.

Другие препараты белков, созданных методами генной инженерии, – **инсулин и гормон роста (соматотропин)**. Гормон инсулин необходим людям, страдающим сахарным диабетом. С 1926 г. для лечения сахарного диабета применялся инсулин, получаемый из поджелудочных желез свиней. Свиной инсулин отличается от человеческого всего одной аминокислотой..

Однако это незначительное отклонение приводит к тому, что у некоторых больных диабетом возникают аллергия и непереносимость названного препарата. Таким людям нужен только человеческий инсулин. С 1980 г. эта проблема была решена методами генной инженерии. В настоящее время человеческий инсулин получают в промышленных объемах



Получение гормона роста (соматотропина)

Получение генно-инженерного инсулина





Большую группу иммуноцитоклинов эндогенного происхождения, играющих большую роль в регуляции иммунитета, кооперации иммунокомпетентных клеток и в связи с этим используемых для лечебных и профилактических целей при иммунодефицитах, опухолях, нарушениях работы иммунной системы, получают главным образом методом генетической инженерии, поскольку этот метод эффективнее традиционного. К иммуноцитоклинам относят интерлейкины (насчитывают 18 разновидностей: ИЛ-1, ИЛ-2... ИЛ-18), миелопептиды, факторы роста, гормоны вилочковой железы. Иммуноцитоклины получают путем культивирования клеток (лимфоцитов, макрофагов и др.) на искусственных питательных средах. Однако процесс этот сложен, продукция иммуноцитоклинов незначительна и не имеет практического значения. Поэтому для получения иммуноцитоклинов применяют метод генетической инженерии. Уже созданы рекомбинантные штаммы *E. coli* и другие штаммы, продуцирующие интерлейкины, фактор некроза опухолей, фактор роста фибробластов и др. Это значительно ускорило процесс внедрения иммуноцитоклинов в практику.



Метод генной инженерии используется для получения принципиально новых продуктов и препаратов, не существующих в природе. Например, только с помощью генетической инженерии можно получить рекомбинантные поливалентные живые вакцины, несущие антигены нескольких микроорганизмов. Получен рекомбинантный штамм вируса оспенной вакцины, продуцирующий HBs- антиген вируса гепатита В, бешенства, клещевого энцефалита. Такие живые вакцины называют векторными. Метод генетической инженерии позволяет также заменить многие методы, основанные на получении продуктов *in vivo*, на способы получения этих продуктов *in vitro*.



На сегодняшний день получено разрешение на применение более 30 препаратов, созданных методами генной инженерии, и еще более 200 находятся на разных стадиях клинических исследований.



Яркий пример больших возможностей генетической инженерии — создание во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов штамма *E. coli* для получения треонина. В результате были изменены не только регуляторные свойства фермента аспартаткиназы, но и питательные потребности штамма. Введение в геном бактерии нового гена обеспечило бактерии возможность использования в качестве источника углерода сахарозу, основного дисахарида традиционного промышленного сырья — свекловичной мелассы. Перечисленные манипуляции наряду с амплификацией плазмид, содержащих оперон треонина, позволили значительно увеличить производительность штамма бактерии и получить за 40 ч ферментации 100 г L-треонина на 1 л культуральной жидкости. Учитывая исключительные способности штамма *E. coli* к сверхсинтезу L-треонина, японская фирма Адзиномото приобрела в 1982 г. лицензию на использование российского штамма — продуцента треонина для организации собственного производства.



Методами генной инженерии можно усиливать природную способность определенных видов бактерий к осуществлению специфических биологических процессов. Например, уже получены штаммы бактерий, которые более эффективно разрушают токсичные отходы, загрязняющие окружающую среду, способствуют ускорению роста сельскохозяйственных культур, эффективно расщепляют целлюлозу до низкомолекулярных углеродных соединений, уничтожают вредных насекомых.



Способность бактерий, стимулирующих рост растений, подавлять пролиферацию фитопатогенов можно повысить, если ввести в эти бактерии гены, кодирующие биосинтез антибиотиков, которые обычно синтезируются другими бактериями. Это позволит расширить спектр фитопатогенов, рост которых способна подавлять одна бактерия. Более того, ограничивая размножение других почвенных микроорганизмов, секретизирующие антибиотик бактерии, стимулирующие рост растений, облегчают свою собственную пролиферацию, поскольку уменьшается число конкурентов за ограниченные пищевые ресурсы, а с помощью методов генной инженерии со временем удастся увеличить выход бактериальных антибиотиков.

Генетически модифицированные микроорганизмы используются в настоящее время для производства фармацевтических препаратов, вакцин, продуктов тонкого органического синтеза, пищевых добавок и других сопутствующих соединений пищевой промышленности. Например:

- витамин В2 (краситель, рибофлавин Е 101),
- витамин С (консервант, аскорбиновая кислота Е 300);
- загуститель ксантан (Е 415),
- регулятор кислотности лимонная кислота (Е 330);
- консервант, натамицин (Е 235),
- низин (Е 234),
- лизоцим (Е 1105);
- Аминокислоты: глутамат – усилитель вкуса и запаха (Е621),
- аспартам - подсластитель (Е 951),
- цистеин (Е 921), используются для улучшения качества пищевых продуктов и кормов.