

Открытие явления трансформации

1928 г.

открытие явления трансформации

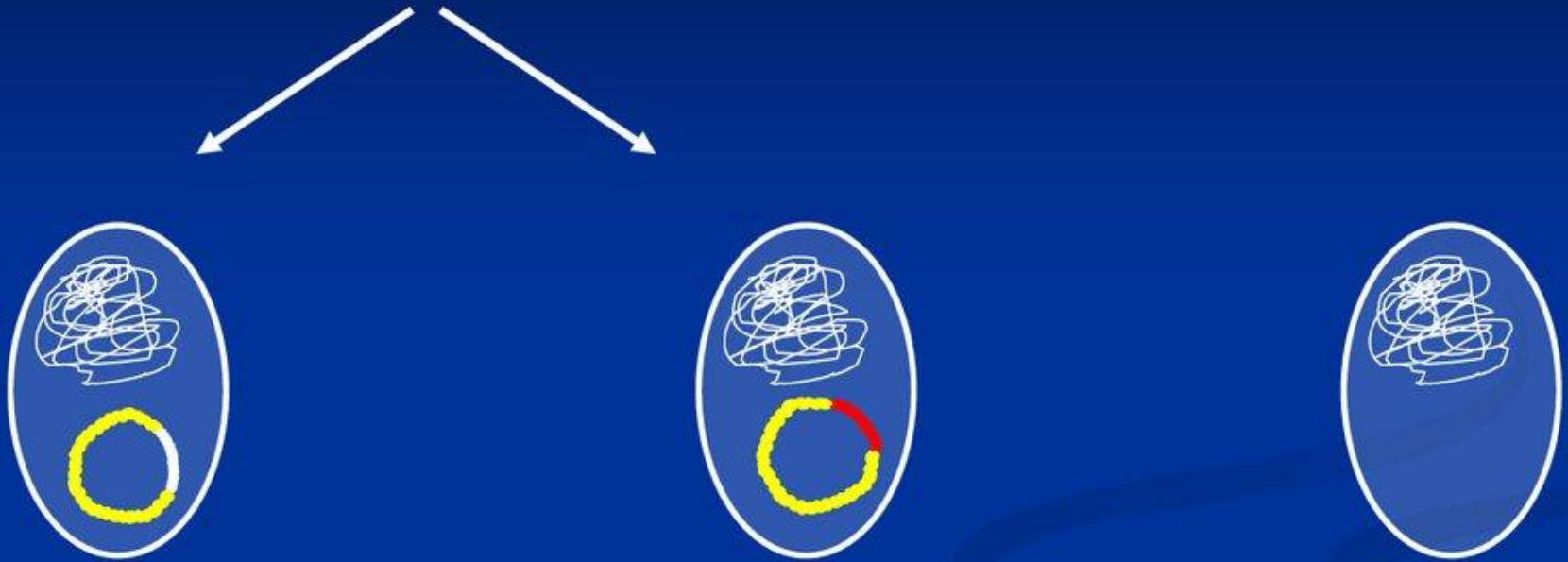


Фредерик
Гриффит

Streptococcus pneumoniae – пневмококки.
Бактерии, вызывающие пневмонию.

1. Капсульный S-штамм – патогенный
2. Бескапсульный R-штамм – непатогенный

3. Отбор клеток *E. coli*, несущих плазмиду с геном устойчивости к антибиотику.



4. Отбор колоний несущих рекомбинантную ДНК с помощью репортерного гена (синие колонии с плазмидой без вставки белые колонии с рекомбинантной плазмидой)



5. Идентификация клетки, несущей нужный участок ДНК



Гибридизация с использованием ДНК-зонда.

ДНК-зонд – радиоактивно меченная ДНК.

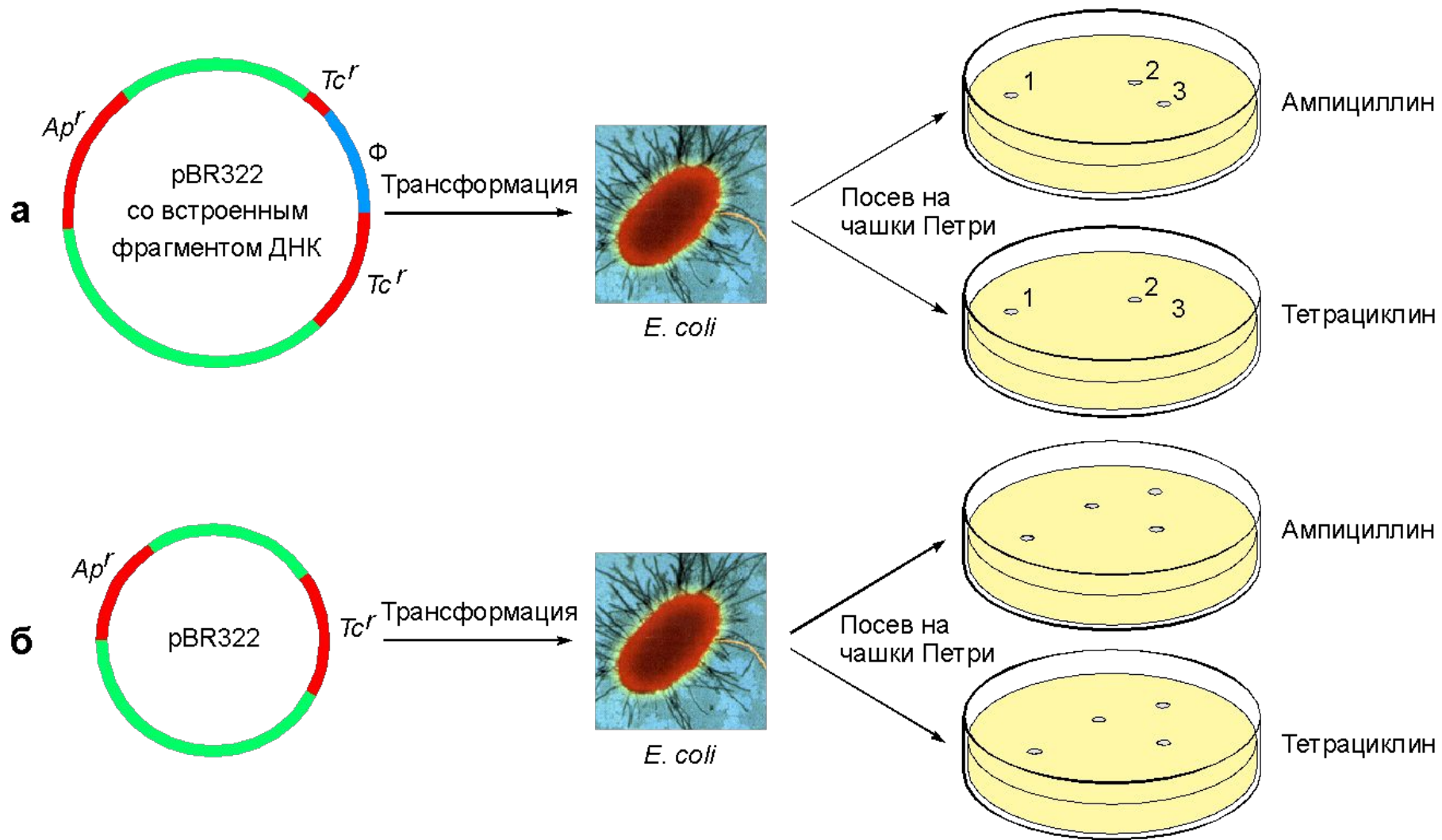
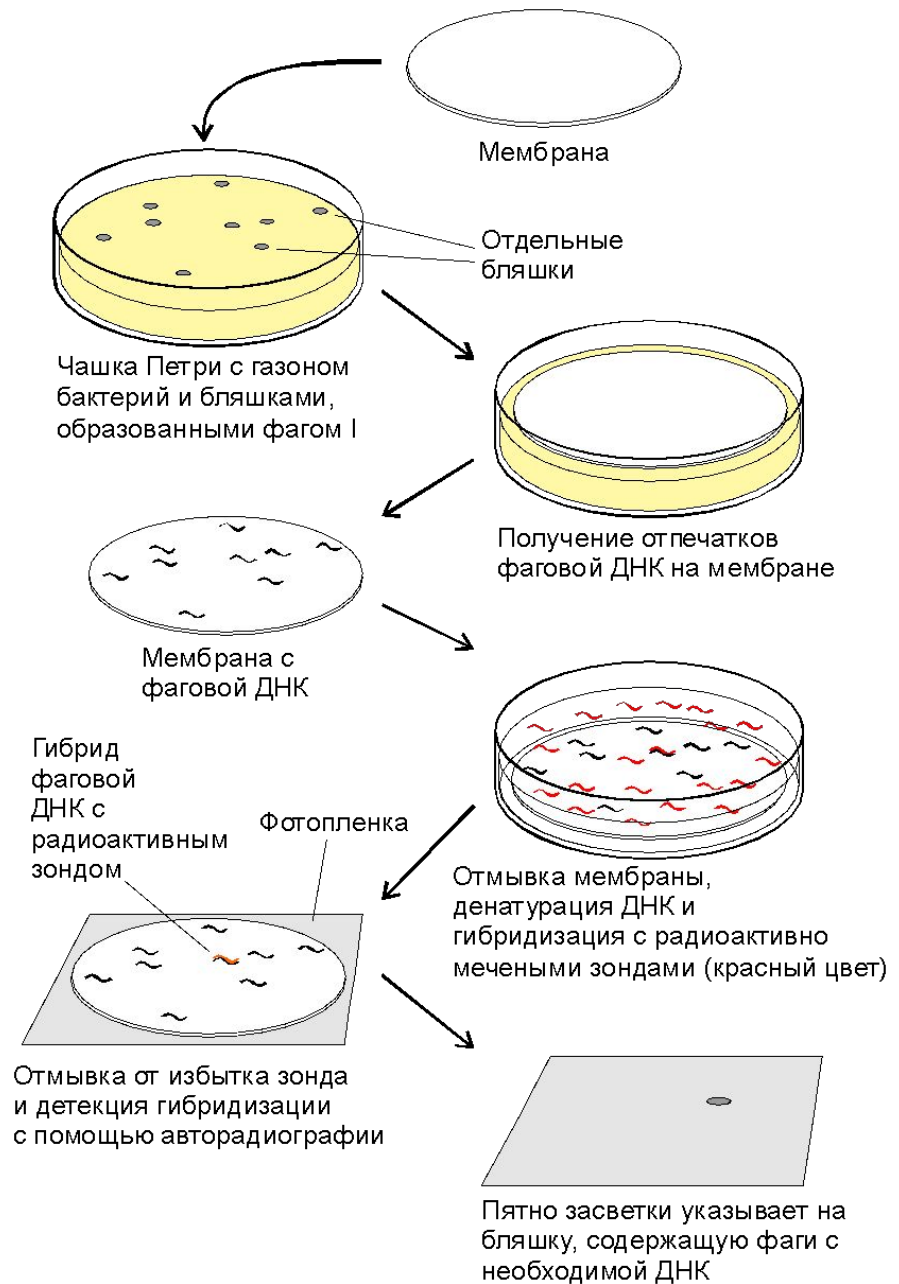


Схема выявления плазмид, содержащих встройку клонируемых фрагментов ДНК

Скрининг библиотеки λ -фагов и выделение индивидуального фага, содержащего клон ДНК



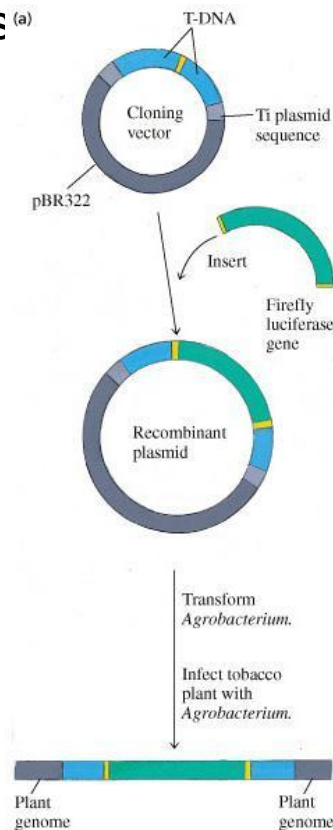
Shuttle vectors:

1. Capable of replicating in two or more types of hosts.
2. Replicate autonomously, or integrate into the host genome and replicate when the host replicates.
3. Commonly used for transporting genes from one organism to another (i.e., transforming animal and plant cells)

Example:

*Insert firefly luciferase gene into plasmid and transform *Agrobacterium*.

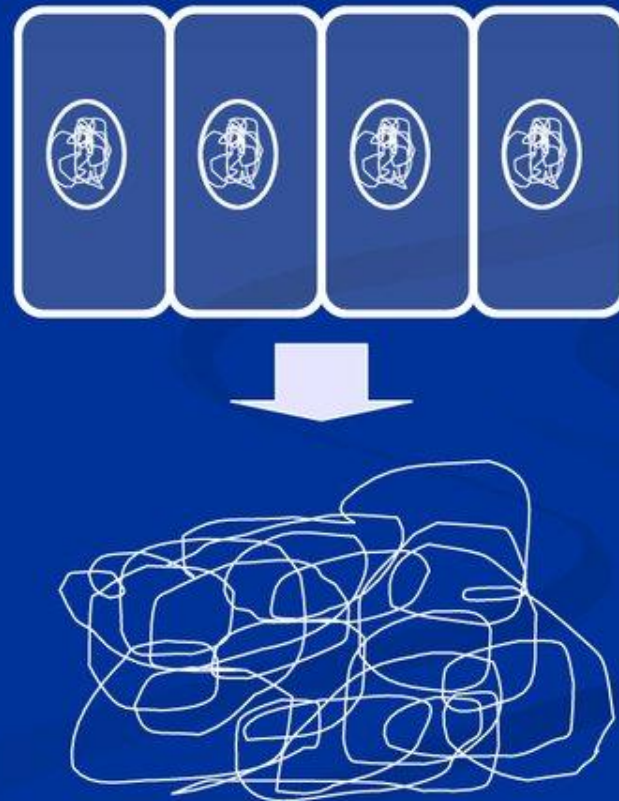
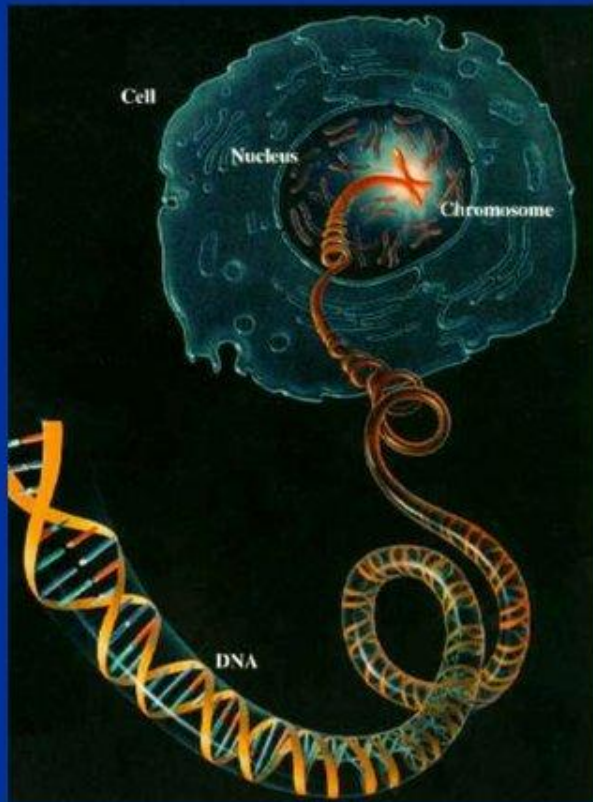
*Grow *Agrobacterium* in large quantities and infect tobacco plant.



http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/horton3/medialib/media_portfolio/23.html

Создание библиотеки геномной ДНК

1. Из организма – донора нужных генов – экстрагируют ДНК, расщепляют ее рестриктазами и соединяют с вектором с образованием рекомбинантной молекулы



Практическое применение рекомбинантных ДНК

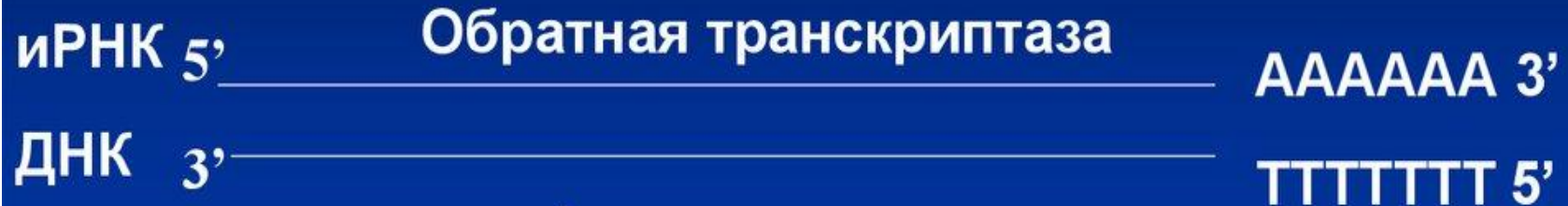
Получение животных белков



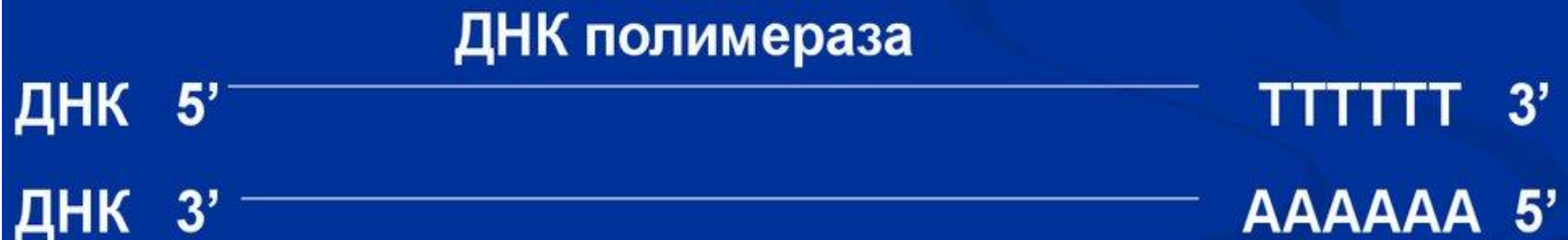
Прокариотический экспрессирующий вектор



Библиотека кДНК (комплементарной ДНК)

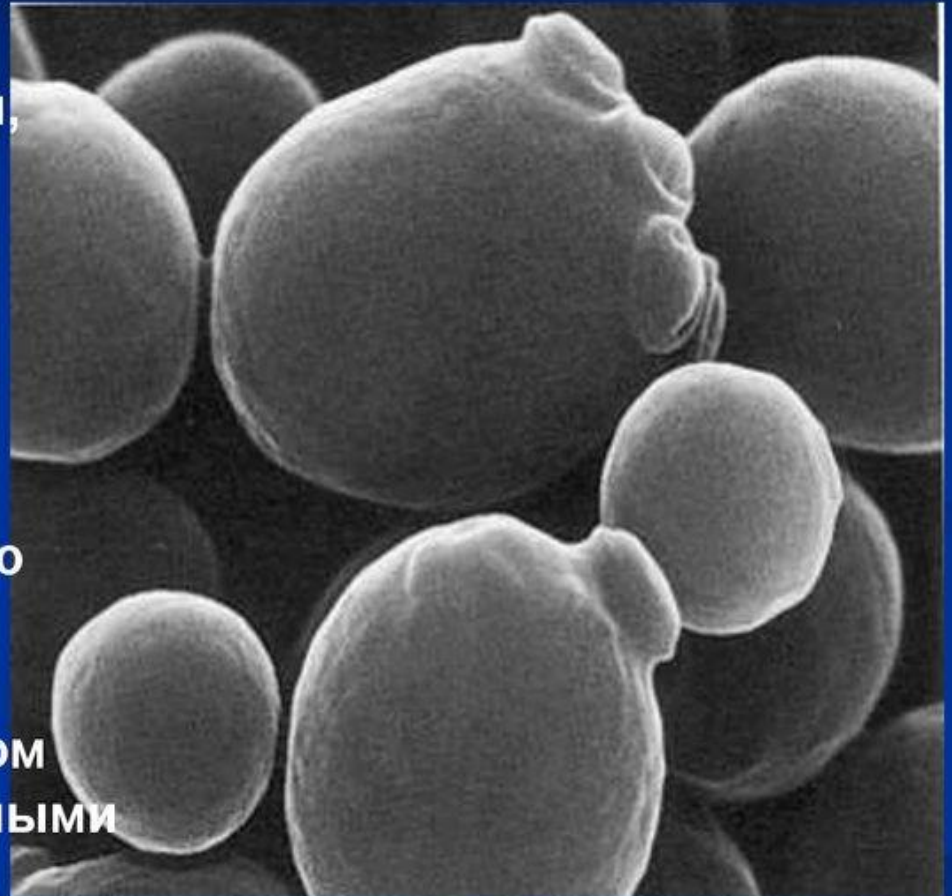


Обработка щелочью для разрушения РНК



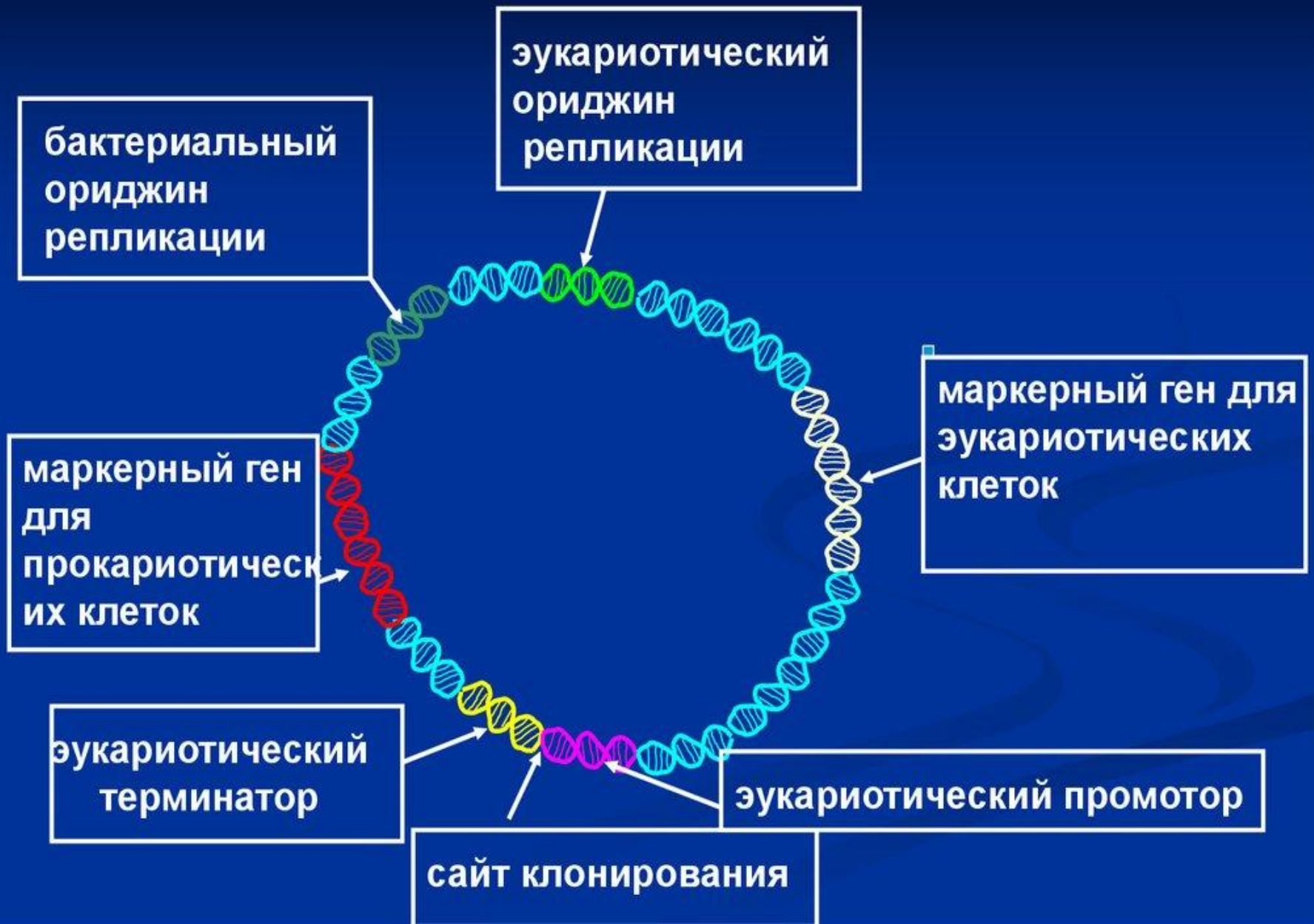
ДРОЖЖЕВЫЕ КЛЕТКИ

- это эукариотические организмы, которые могут расти так же быстро как бактерии
- могут осуществлять некоторые необходимые модификации
- генетика и физиология детально изучена
- дрожжи используются человеком давно и оно признаны безопасными



дрожжевые клетки

Эукариотический экспрессирующий вектор



Недостатки дрожжевых систем:

- присутствие активных ферментов, которые разрушают получаемый белок
- не гарантирует получение активного белка любого гена

Некоторые препараты, получаемые с помощью дрожжевых клеток:

- Фактор роста эпидермиса
- Инсулин
- Тромбоцитарный фактор роста
- Фактор роста фибробластов
- Фактор XIIIa системы свертывания крови
- α -антитрипсин
- вакцина против гепатита В

Клетки насекомых

Линии клеток, используемые для работы получают из гусениц *Spodoptera frugiperda* (линии Sf9, Sf21)

Векторы для экспрессии были разработаны на основе вирусов, инфицирующих насекомых - бакуловирусов

- высокий уровень синтеза белка
- осуществляется большинство необходимых модификаций
- получают активные формы белка



клетки насекомых

Некоторые рекомбинантные белки, синтезируемые в клетках насекомых:

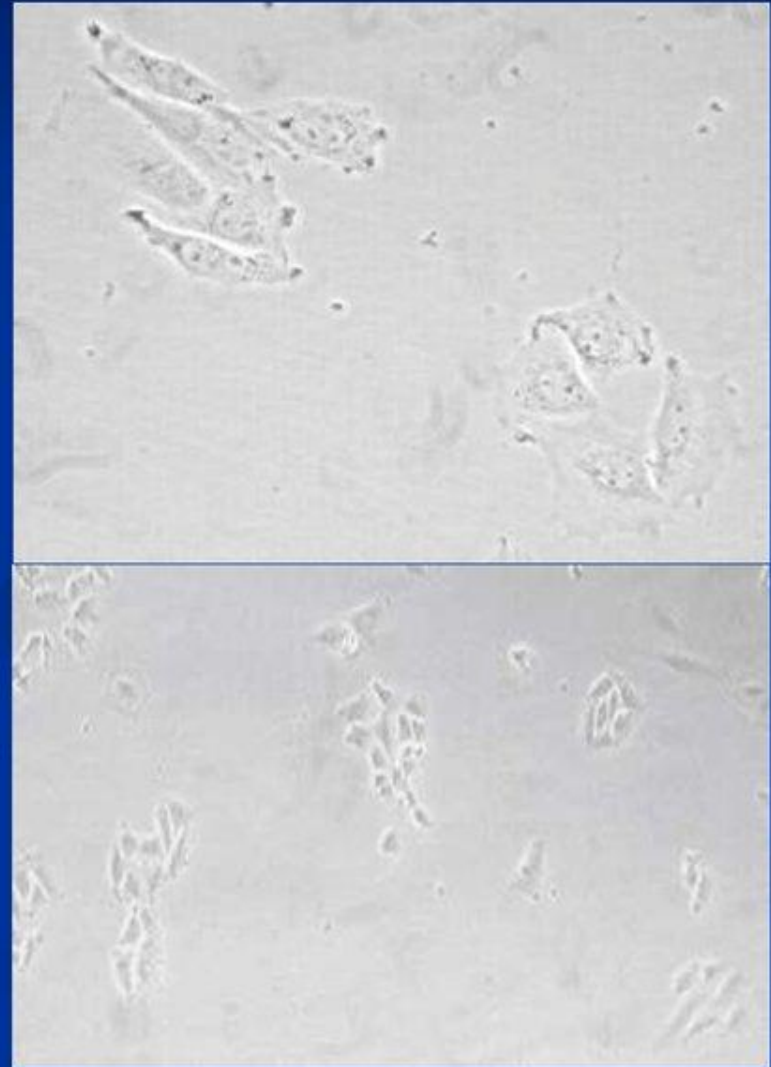
- α -интерферон
- эритропоэтин
- щелочная фосфатаза человека
- липаза поджелудочной железы человека
- интерлейкин-2
- активатор тканевого плазминогена
- регулятор проницаемости мембран, нарушения в котором приводят к муковисцидозу

Клетки млекопитающих

Созданы экспрессирующие векторы для культуры клеток млекопитающих

Промышленный синтез рекомбинантных белков с использованием модифицированных клеток млекопитающих обходится слишком дорого

Системы экспрессии на основе клеток млекопитающих используют для получения рекомбинантных белков, которые невозможно получить с помощью других систем получения



Получение определенных лечебных белков может быть достигнуто только с помощью культуры клеток млекопитающих, где белок соответствующим образом укладывается и модифицируется

Выработка этого белка в *трансгенных животных* может быть альтернативным методом

Секреция рекомбинантного белка может происходить в молоко. Таким способом можно получать экспрессию белка на уровне 35 г/л

Рекомбинантный белок – белок, кодируемый геном, который экспрессируется в клонированной рекомбинантной ДНК.

Для достижения эффективной экспрессии гена сконструировано много специфических векторов; для этого проводились манипуляции с целым рядом генетических элементов, контролирующим процессы транскрипции и трансляции, стабильность белков, секрецию продуктов из клетки-хозяина и т. д.

Для стабильной экспрессии клонированного гена важно:

- тип промотора и терминатора транскрипции
- прочность связывания иРНК с рибосомой
- число копий клонированного гена и его локализации
- конечная локализация синтезируемого продукта
- эффективность трансляции в организме хозяине
- стабильность продукта в клетке хозяина

Векторы, используемые в генотерапии

- Ретровирусы – поражают миобласты, фибробласты, гепатоциты, гематопозитические и стволовые клетки
- Аденовирусы – поражают клетки слизистой оболочки дыхательных путей
- Аденоассоциированные вирусы - интегрируют в специфический участок 19 хр.
- Герпесвирусы – инфицируют нейроны и другие клетки

Основные ферменты, используемые в
генной инженерии:

- **Эндонуклеазы рестрикции**
- **ДНК-лигазы**
- **Обратная транскриптаза**
- **Тақ-полимераза**
- **Концевая трансфераза**
- **ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова)**
- **РНКаза H**

Клонирование рекомбинантной ДНК

- Клонирование – это получение большого количества копий определенного гена в результате его размножения в клетках в составе рекомбинантной ДНК
- Клон – это популяция клеток, которая берет начало от одной клетки

- **Трансформация** – изменение свойств клетки в результате переноса рекомбинантной ДНК через мембрану
- **Скрининг** – поиск и обнаружение рекомбинантных ДНК среди десятков тысяч клонов

Методы доставки генно-инженерных конструкций в клетки-мишени

- Физические методы:
- Микроинъекция
- Электропорация
- с помощью аэрозолей

- Биологические методы :

- эндоцитоз
- липосомы
- нановекторы на основе желатина