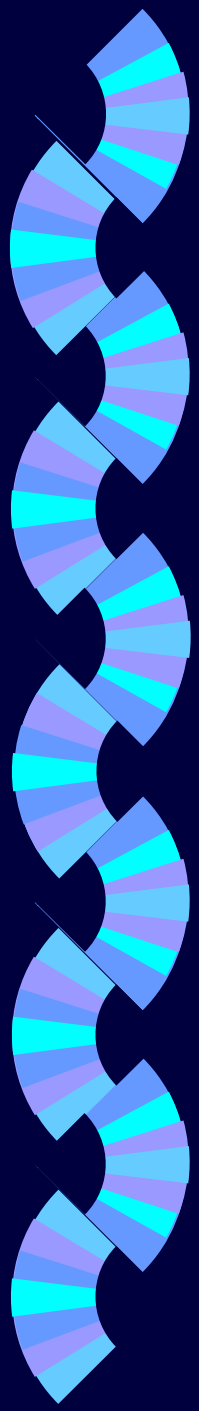


MODULUL 9

Genna inženerija

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
B) 2, 3, 4
C) 2, 4, 5
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

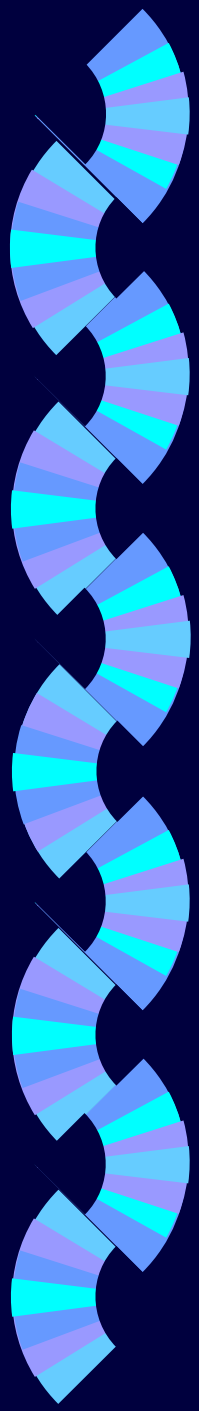
7. ПЛАЗМИДЫ ЯВЛЯЮТСЯ:

A) молекулами ДНК с экзон-интронной организацией

B) бактериальными молекулами ДНК, которые не могут передаваться другим клеткам

C) кольцевыми молекулами ДНК

D) 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
B) 2, 3, 4
C) 2, 4, 5
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

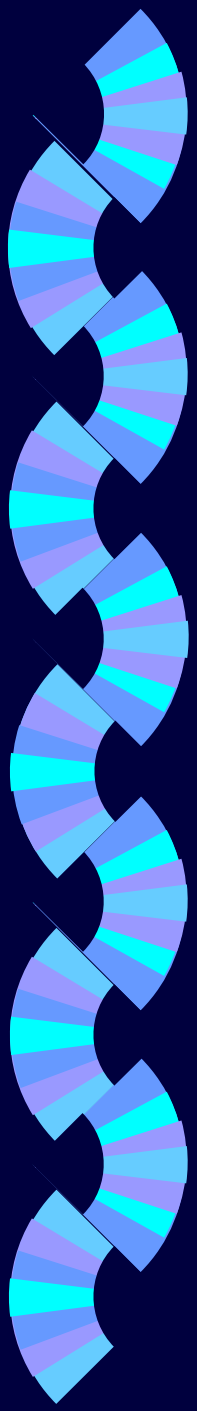
3. определяется взаимодействием аллельных генов типа плейотропии

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:

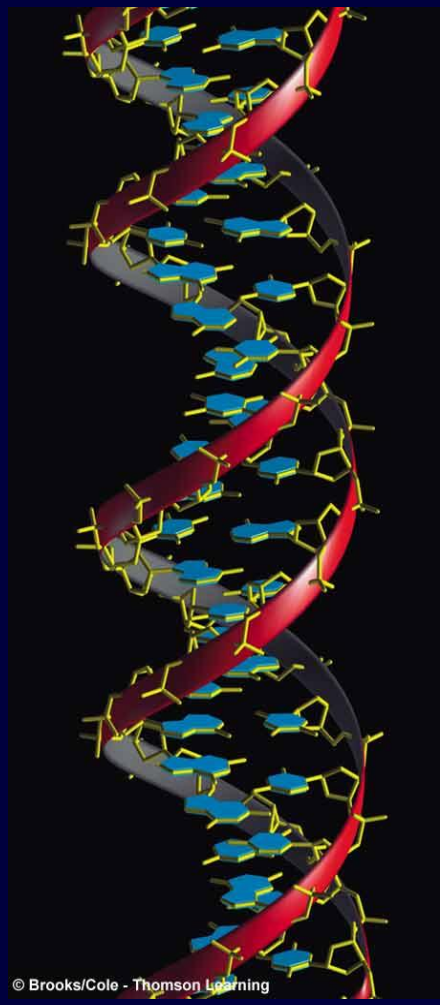
A) молекулами ДНК с экзон-интронной организацией

B) бактериальными молекулами ДНК, которые не могут передаваться другим клеткам

C) кольцевыми молекулами ДНК

D) 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** (Griffits, 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**
  - **Лигазы**

Основные этапы развития генной инженерии (продолжение):

- **Открытие обратной транскрипции** (G.Temin, S.Mizutani, D.Baltimor, 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 prezenţa în mediu de incubare ATP, S-adenozilmetionină, Mg2+**
  - **Sunt instabile**
  - **Nu produc fragmente discrete**

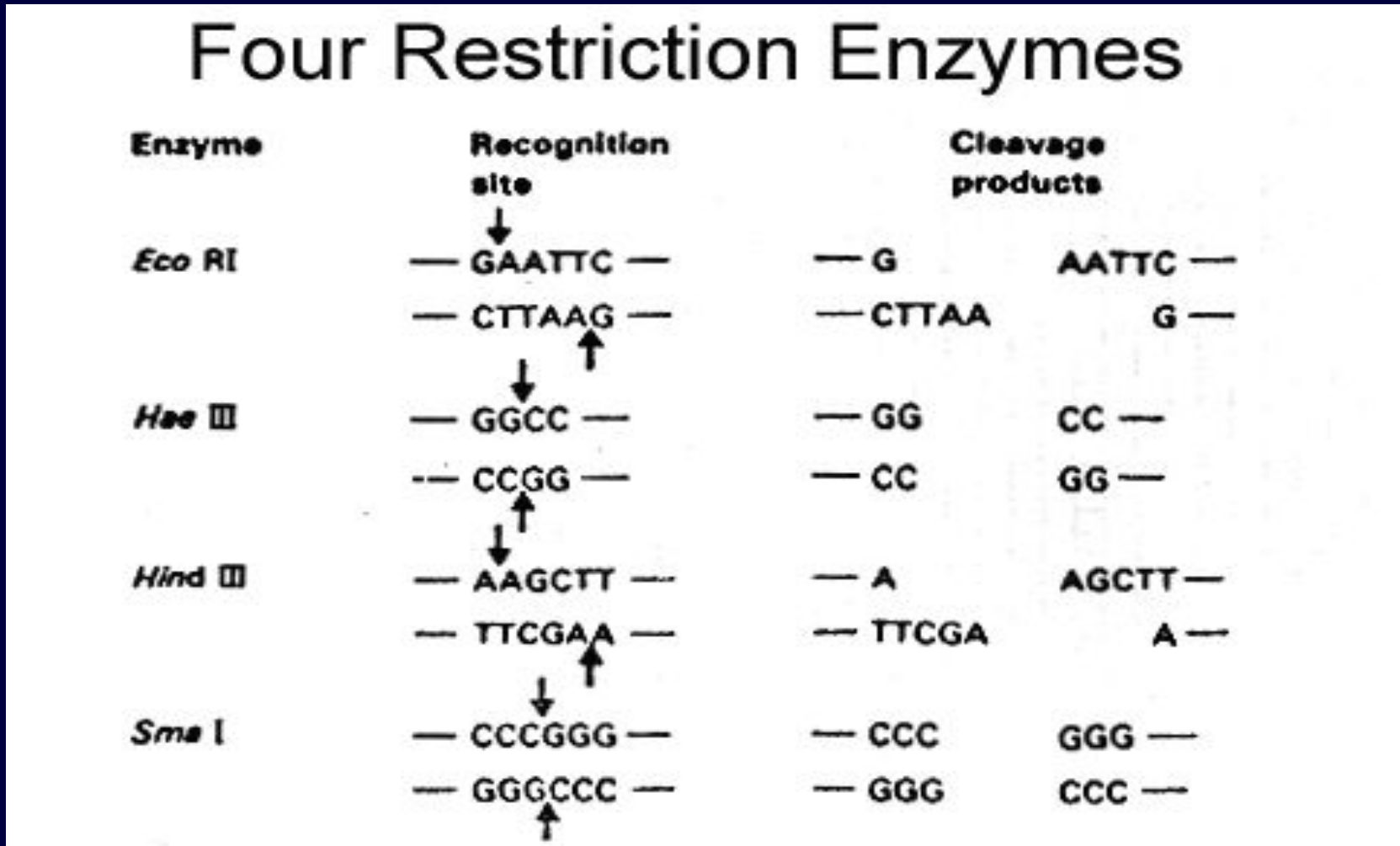
- **“site”- специфические эндонуклеазы**
  - **Для активности нуждаются лишь в Mg2+**
  - **Около 500**
  - **Производят дискретные фрагменты, легко выделяются электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле**

- **Grupa intermediară**
  - **Pentru activitate necesită prezenţa a Mg2+ şi 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:



Примеры рестрикции

Recognition Site	Cleavage Products	
EcoR1	---GAATTC---	---G AATTC--
	---CTTAAG---	---CTTAA G—

- **STICKY ENDS**

Sma 1	---CCCGGG---	---CCC GGG---
	---GGGCCC---	---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 φ80;
  - изолирование участка *lac*-оперона;
  - **Гибридизация ДНК – РНК** (Tomas, 1976)
  - комплекс ДНК – РНК является более устойчивым чем ДНК – ДНК;
  - **Гибридизация РНК – ДНК** (G.Temin, B.Mizutani, D.Baltimor, 1970)
  - **использование реверстранскриптаз**;
  - **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 рекомбинарнтных 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 Т3)**
- **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?!**