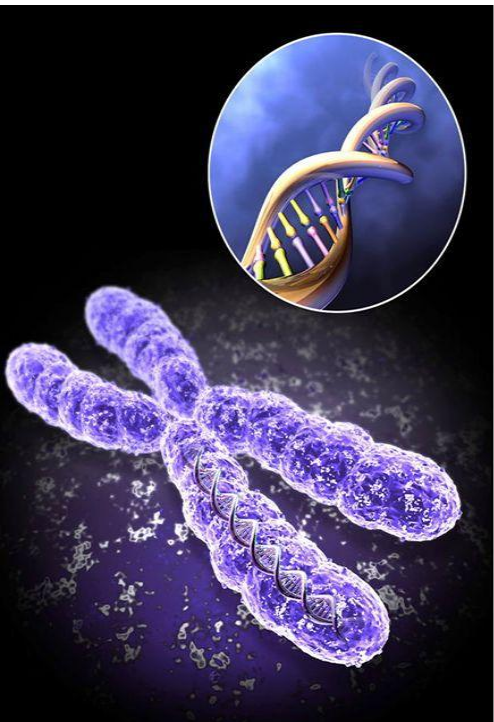




Биотехнология

Генная инженерия

Санкт-Петербургский медико-технический колледж



МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

- **Тема лекции №6:**
- **Генная инженерия в
медицинской
микробиологии.**
- **Преподаватель-Гуц Н.И.**

Биотехнология

БИОТЕХНОЛОГИЯ – производственное использование биологических агентов (микроорганизмы, растительные клетки, животные клетки, части клеток: клеточные мембраны, рибосомы, митохондрии, хлоропласты) для получения ценных продуктов и осуществления целевых превращений. В биотехнологических процессах также используются такие биологические макромолекулы как рибонуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), белки - чаще всего ферменты. ДНК или РНК необходима для переноса чужеродных генов в клетки.

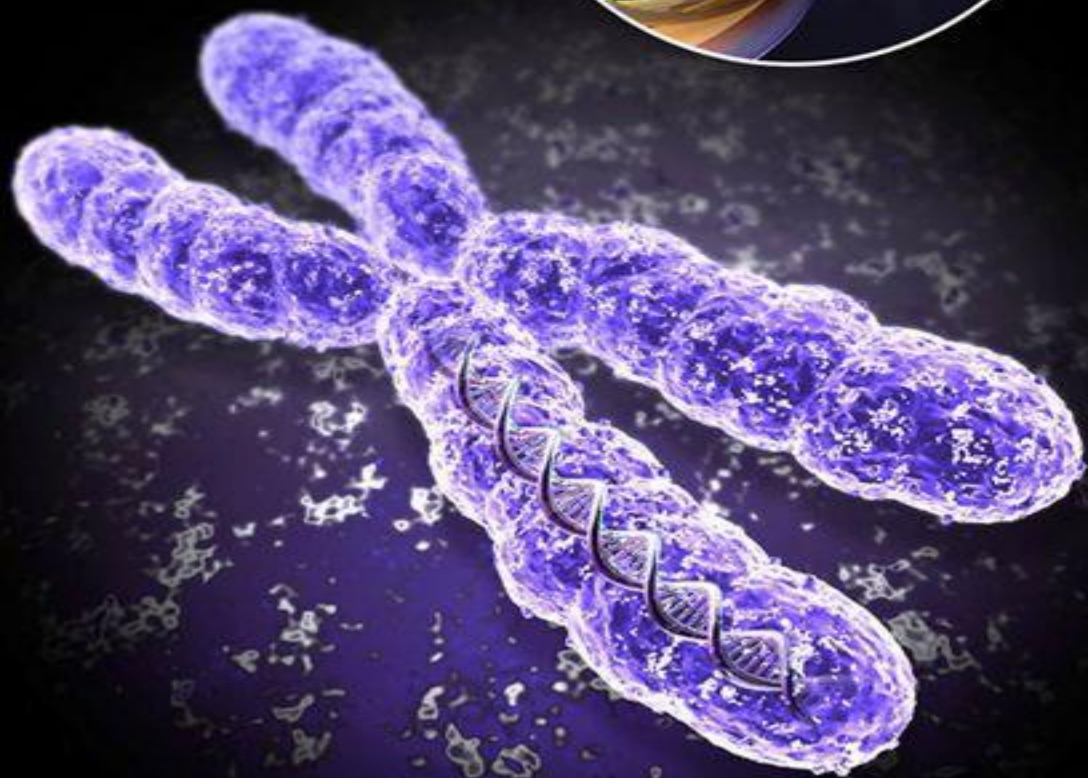
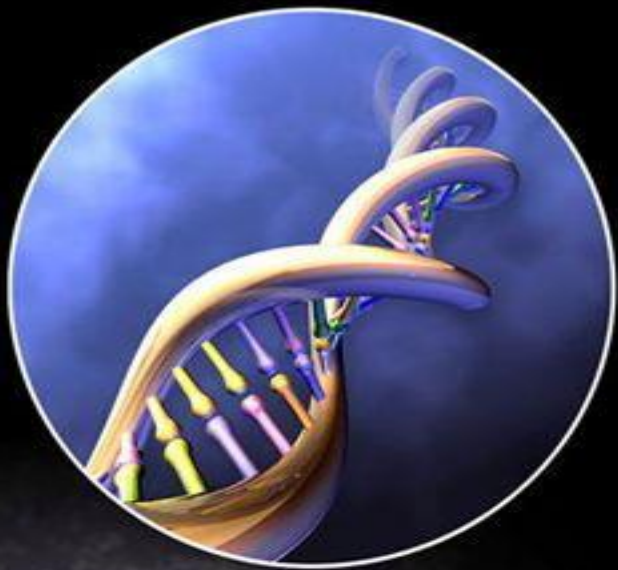
История Биотехнологии

Люди выступали в роли биотехнологов тысячи лет: пекли хлеб, варили пиво, делали сыр, другие молочнокислые продукты, используя различные микроорганизмы и даже не подозревая об их существовании. Собственно сам термин "биотехнология" появился в нашем языке не так давно, вместо него употреблялись слова "промышленная микробиология", "техническая биохимия" и др. Вероятно, древнейшим биотехнологическим процессом было брожение. При раскопках Вавилона на дощечке, которая датируется примерно 6-м тысячелетием до н. э. В 3-м тысячелетии до н. э. шумеры изготавливали до двух десятков видов пива. Не менее древними биотехнологическими процессами являются виноделие, хлебопечение и получение молочнокислых продуктов. В традиционном, классическом, понимании биотехнология — это наука о методах и технологиях производства различных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов и процессов.



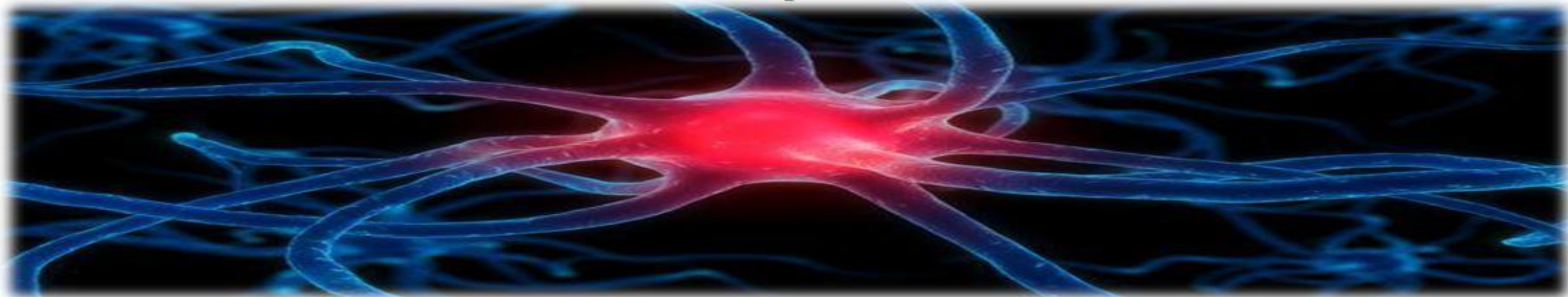
Введение:

Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Родившись в начале 70-х годов, она добилась сегодня больших успехов. Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в "фабрики" для масштабного производства любого белка. Это дает возможность детально анализировать структуру и функции белков и использовать их в качестве лекарственных средств.



МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Клеточная инженерия

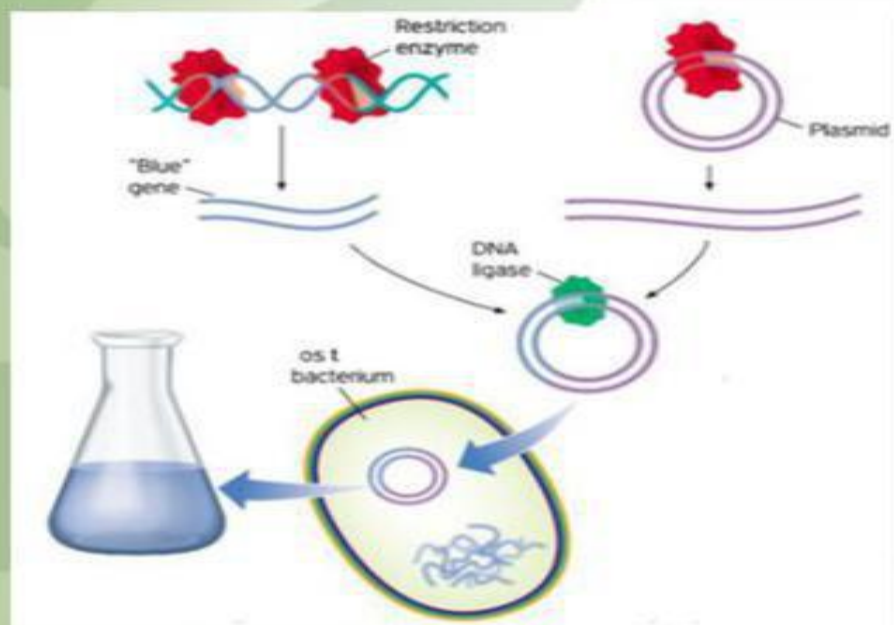


Клеточная инженерия основана на культивировании отдельных клеток или тканей на искусственных питательных средах. Такие клеточные культуры используются для синтеза ценных веществ, производства незараженного посадочного материала, получения клеточных гибридов. Метод гибридизации клеток приобретает все большее значение в селекции. Оказалось, что если взять клетки разных органов и тканей или клетки разных организмов, объединить их с помощью специальных приемов, разработанных учеными, в одну, то образуется новая, гибридная клетка. Свойства этой гибридной клетки существенно отличаются от свойств родительских клеток, Таким путем можно получать клетки, выделяющие необходимые человеку лекарства.

Генетическая инженерия или молекулярное клонирование



Метод создания новых генетических программ путем конструирования и внесения новой генетической информации в уже существующие живые организмы

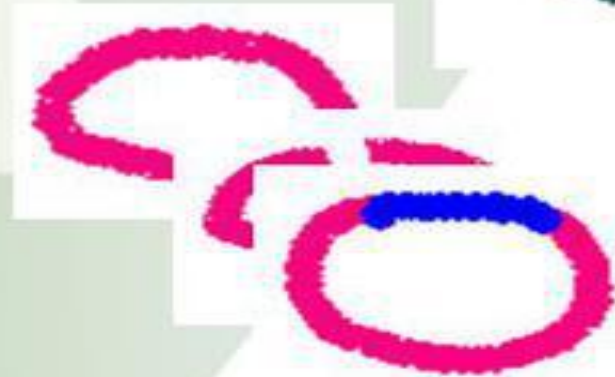
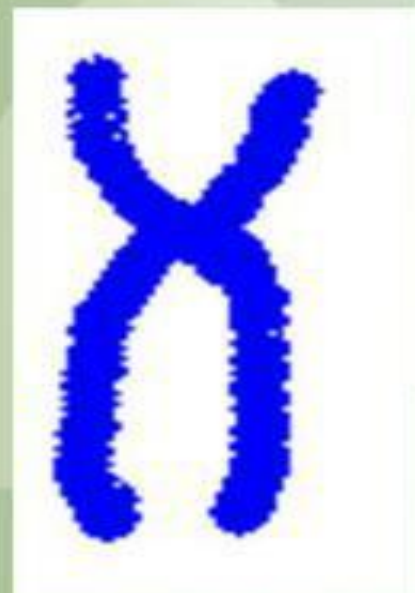




«Генетическая инженерия – потомок молекулярной генетики, но своим рождением обязана успехам генетической энзимологии и химии нуклеиновых кислот, так как инструментами молекулярного манипулирования являются ферменты»

З.И.Абрамова

Суть метода





Рекомбинантная ДНК – искусственно сконструированная ДНК, несущая фрагменты генетической информации разных организмов

Трансгенез – процесс перенос гена или группы генов из одного организма в другой и создание условий для его/их экспрессии

Векторы – системы доставки трансгена, обеспечивающие его интеграцию, амплификацию и экспрессию

ТЕХНИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ



I этап Получение гена

II этап Создание рекомбинантной ДНК

III этап Создание трансгенного организма

IV этап Отбор модифицированных систем



ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

I ЭТАП. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНА

I этап Получение гена



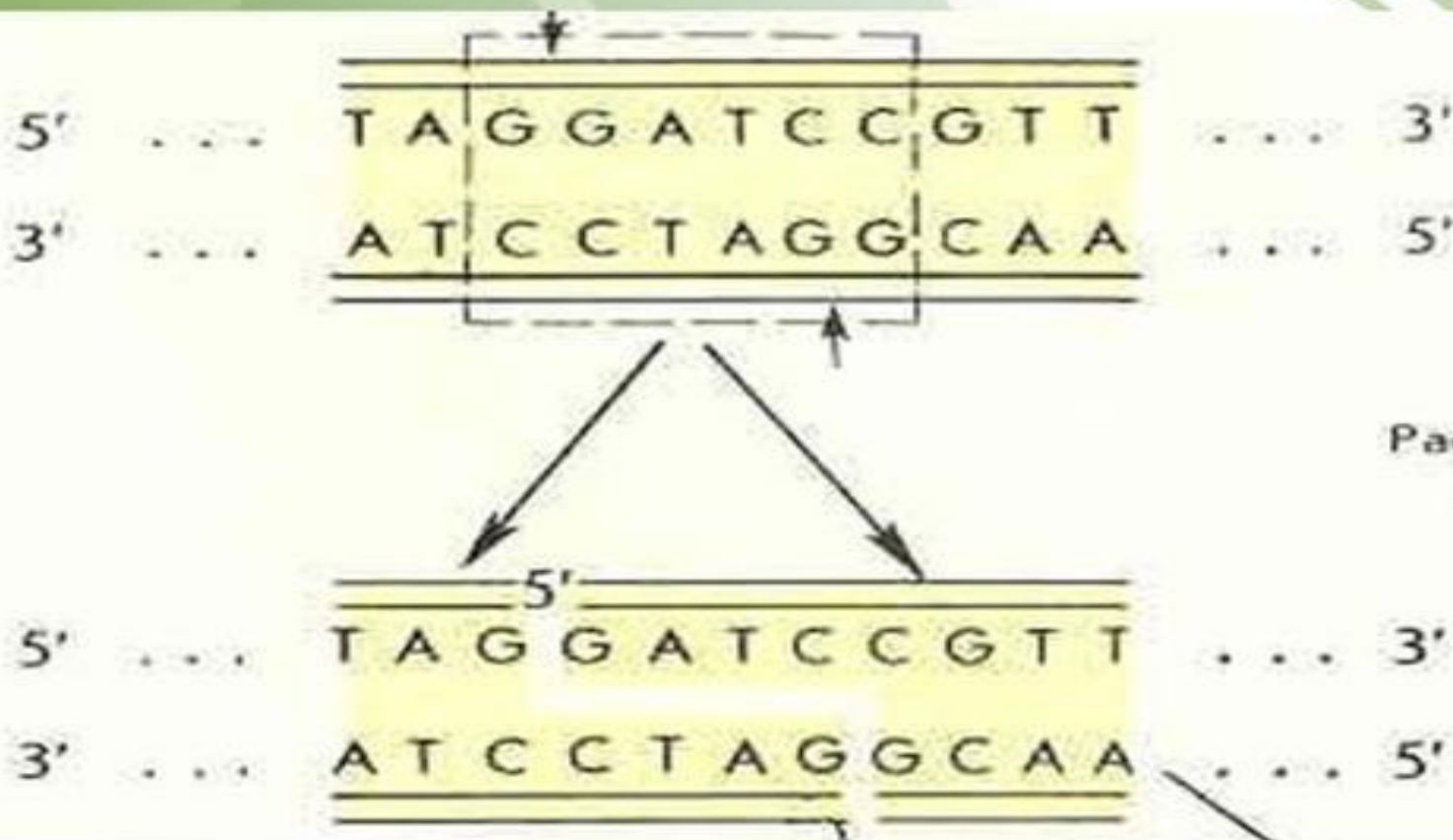
Цель:

получение гена-матрицы для молекулярного клонирования

Методы:

- 1) рестриктазный
- 2) химико-ферментативный синтез
- 3) синтез на основе мРНК

Рестриктазы – ферменты, узнающие особые последовательности нуклеотидов в ДНК (сайты рестрикции)



Расщепление
BamHI

Рестриктазы.

Типы рестрикции.



1 ТИП

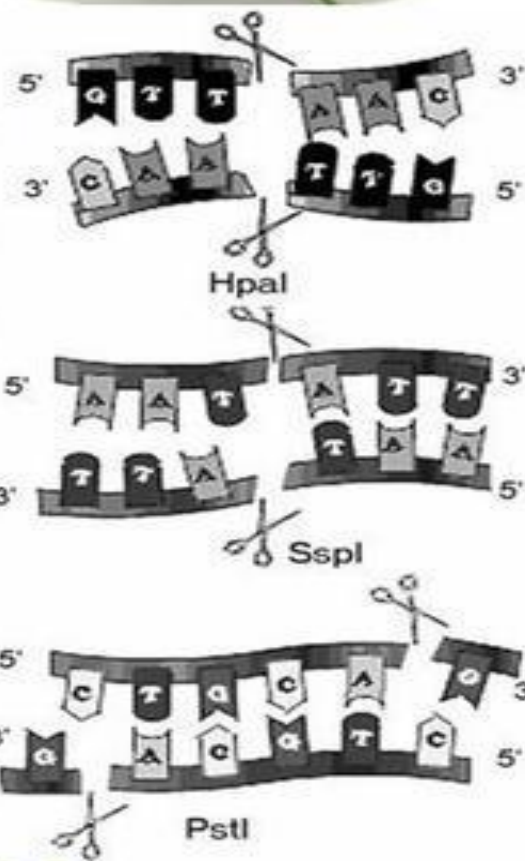
- узнают сайт рестрикции и вносят разрез неподалёку, в произвольной точке

2 ТИП

- узнают сайт рестрикции и вносят разрез в фиксированной точке внутри сайта

3 ТИП

- узнают сайт рестрикции и вносят разрез отступив на несколько нуклеотидов от конца сайта





ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

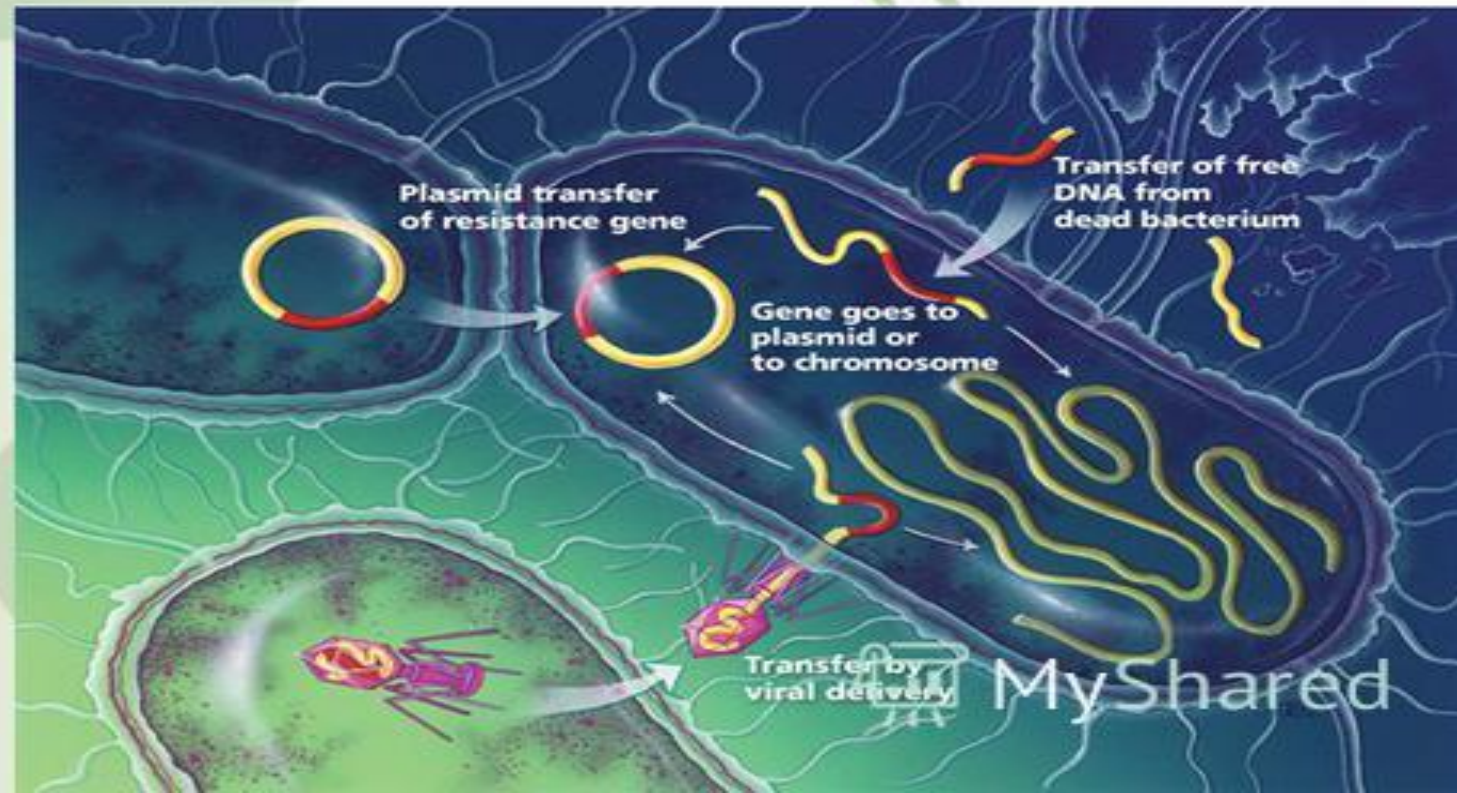
II ЭТАП. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК



MyShared

ВЕКТОРА (лат. *vector* – несущий)

молекулы способные к самостоятельной репликации и обеспечивающие интеграцию, амплификацию и экспрессию трансгена



Словарь



Амплификация – увеличение количества копий гДНК (трансген + вектор)

Интеграция – встраивание гДНК в ДНК хозяина

Экспрессия – транскрипция трансгена аппаратом клетки хозяина

Классификация векторов по реципиентным системам



Вектора прокариот

Естественные
плазмиды
бактериофаги

Искусственные
космиды
фазмиды
бакмиды

Вектора эукариот

Естественные
плазмиды
вирусы

Искусственные
челночные векторы



ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

III ЭТАП. СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННОГО ОРГАНИЗМА

I этап Получение гена



II этап Создание рекомбинантной ДНК



III этап Создание трансгенного организма

Цель:
введение гена-матрицы в организм-реципиент

Методы введения рДНК в клетку:
конъюгация
трансдукция
трансфекция
трансформация





ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

IV ЭТАП. ОТБОР

I этап Получение гена

II этап Создание рекомбинантной ДНК

III этап Создание трансгенного организма

IV этап Отбор модифицированных систем

Цель:

оценка результата молекулярного клонирования

Методы:

маркерный, иммунологическая детекция, скрининг, картирование, секвенирование

Методы отбора



1. Отбор клеток, несущих вектор

2. Отбор клеток, несущих ген-мишень

Первые достижения

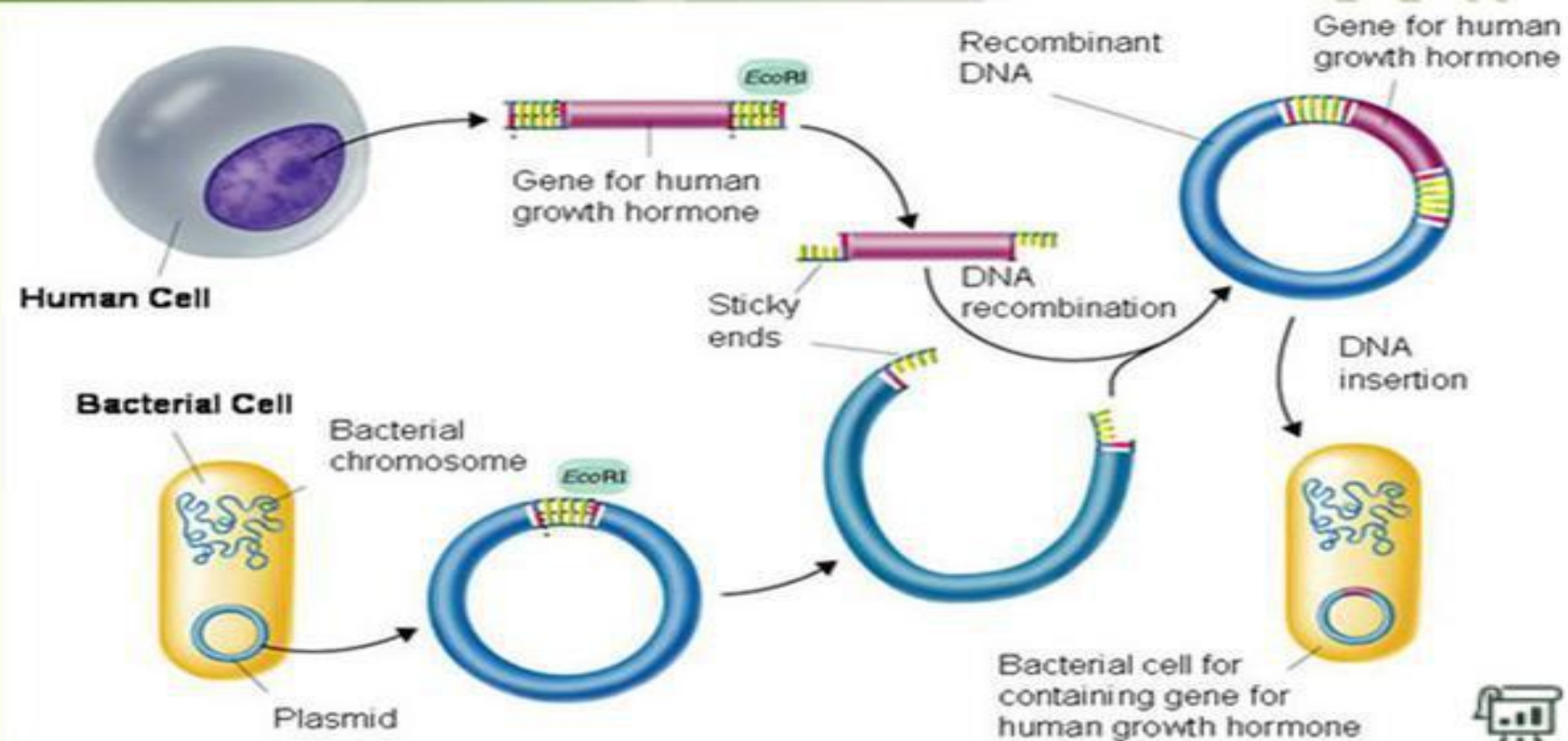
ИНСУЛИН

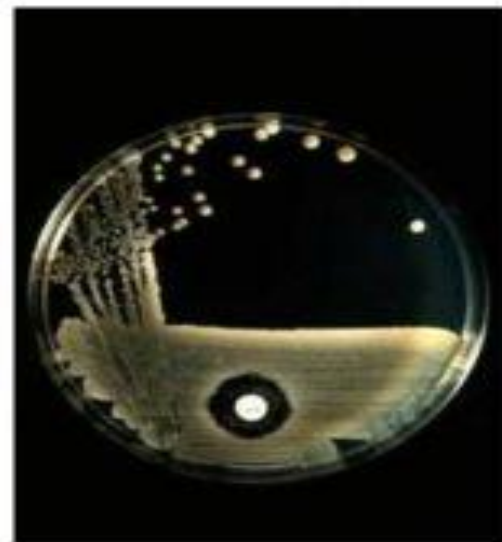
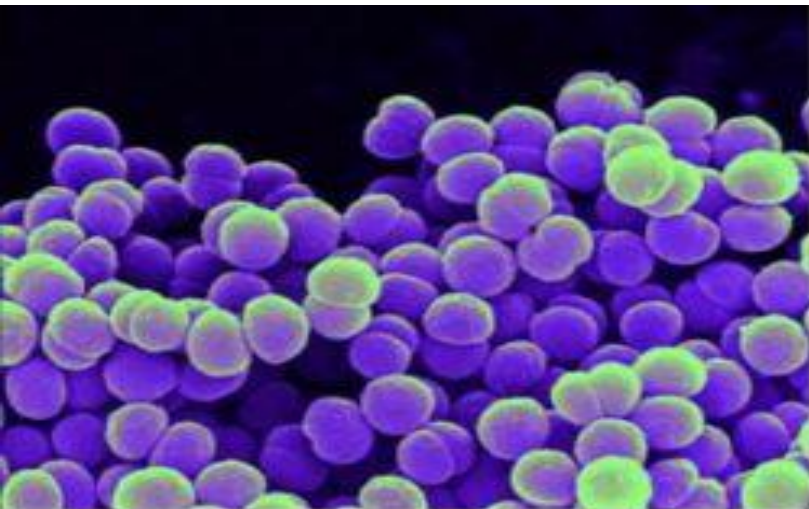
ИНТЕРФЕРОН

СОМАТОТРОПИН

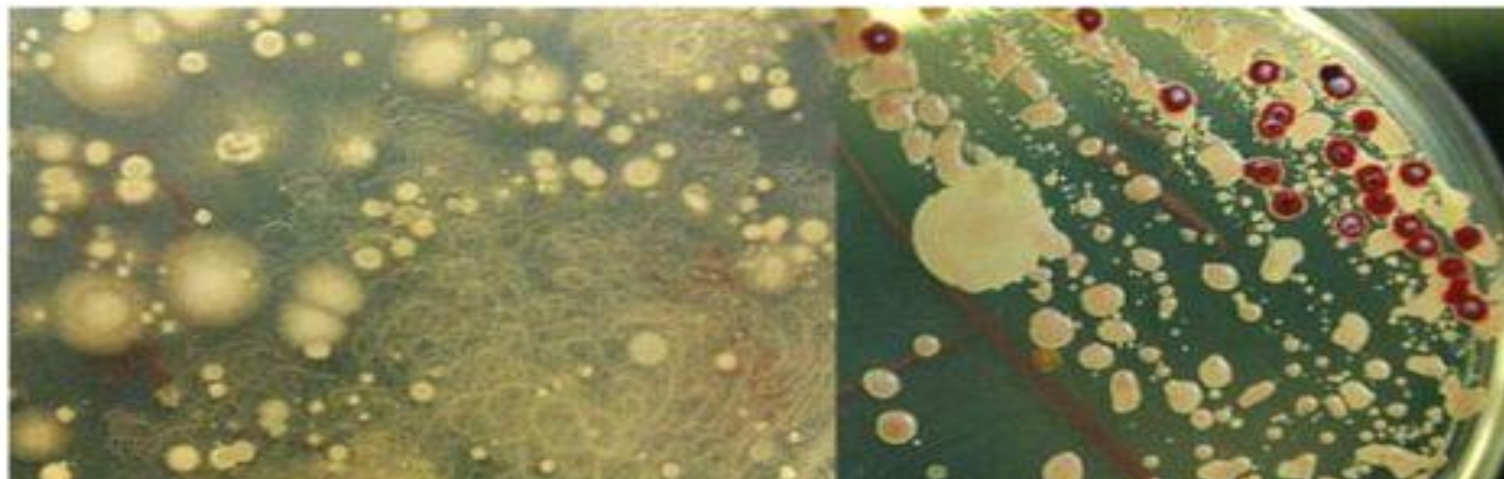


Гипофизарная карликовость





Селекция микроорганизмов



Биотехнология -
использование живых
организмов и их
биологических процессов в
производстве необходимых
человеку веществ.
Объектами биотехнологии
являются бактерии, грибы,
клетки растительных и
животных тканей. Их
выращивают на
питательных средах в
специальных биореакторах.



направления биотехнологии:

производство с помощью



микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток биологически активных соединений (ферментов, витаминов, гормональных препаратов), лекарственных препаратов (антибиотиков, вакцин, сывороток, высокоспецифичных антител и др.), а также белков, аминокислот, используемых в качестве кормовых добавок, shared

направления биотехнологии:

применение биологических методов борьбы с загрязнением окружающей среды (биологическая очистка сточных вод, загрязнений почвы и т. и.) и для защиты растений от вредителей и болезней



направления биотехнологии:

создание новых полезных штаммов
микроорганизмов, сортов растений, пород
животных и т. п.



ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ- ХОРОШО ИЛИ ПЛОХО?

- Генная инженерия для человечества творит чудеса. Эта наука помогает приостанавливать развитие тяжелейших заболеваний.
- Ученые из Дании утверждают, что, блокировав работу определенного фермента, можно останавливать развитие рака в человеческом теле. Эксперименты на мышах продемонстрировали: при дезактивации одного-единственного фермента развитие рака прекращалось у шести из семи лабораторных грызунов. При этом мыши не испытывали никаких неудобств от того, что этот фермент в их организмах не работает.
- Придуман ген, отвечающий за выработку инсулина в организме человека, который продлит жизнь больным диабетом.
- С помощью генной инженерии можно приостанавливать старость, впредь люди будут бессмертными, будут ликвидированы генетические причины серьезных заболеваний.
- Китайские ученые с помощью ДНК одаренных детей хотят искусственно выводить гениев.

Клеточная инженерия — одно из наиболее важных направлений в биотехнологии. Она основана на использовании принципиально нового объекта — изолированной культуры клеток или тканей эукариотических организмов, а также на **тотипотентности** — уникальном свойстве растительных клеток воспроизводить целый организм.

Генетическая (генная) инженерия — это методы получения рекомбинантных (гибридных) ДНК из фрагментов геномов разных организмов, введение их в клетку и обеспечение условий для экспрессии чужеродных генов. При этом можно осуществить направленное конструирование (создание) организмов с заданными (нужными человеку) свойствами, что трудно (или невозможно) сделать обычными методами — гибридизацией, мутагенезом и др.

Прогресс в области генетики бактерий и бактериофагов

- **Трансдукция** - процесс переноса бактериальной ДНК из одной клетки в другую осуществляется бактериофагом
- **Конъюгация** - процесс переноса части генетического материала (плазмид, бактериальной хромосомы) при непосредственном контакте двух бактериальных клеток.
- **Репликация** - процесс синтеза дочерней молекулы ДНК на матрице родительской молекулы ДНК. В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки



Перенос информации с ДНК, находящейся в ядре, в цитоплазму, где реализуется синтез белка на рибосомах

- последовательность триплетных кодонов, хранящаяся в ДНК, **транскрибируется** (переписывается) в недолговечные молекулы информационной РНК (иРНК).
- Данный этап **ДНК → иРНК** был назван **транскрипцией**,
- Этап **иРНК → белок** – **трансляцией**.
- Перенос аминокислоты и определение ее местонахождения в синтезирующейся белковой молекуле осуществляет **транспортная РНК (тРНК)**

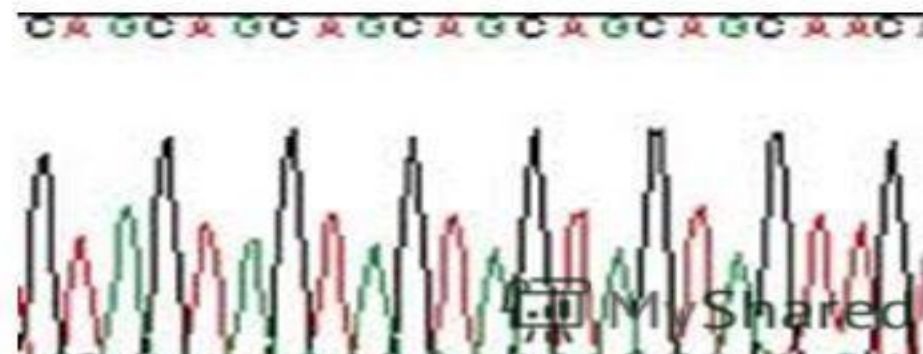
Механизм контроля генной активности

показал, что у бактерий есть

- **структурные гены** - дающие информацию о синтезе определенных белков
- **регуляторные гены** - осуществляют включение или выключение отдельных генов или их блоков

Секвенирование

- Определение аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов



ДЛЯ ТОГО, ЧТОБЫ ИСКУССТВЕННЫМ ПУТЕМ НАДЕЛИТЬ КАКОЙ-ЛИБО ОРГАНИЗМ НОВЫМИ НАСЛЕДСТВЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ, НУЖНО ВВЕСТИ В НЕГО ХОТЯ БЫ ОДИН ЧУЖЕРОДНЫЙ ГЕН.

ПРИЧЕМ, НЕОБХОДИМО ПРИГОТОВИТЬ (СКОНСТРУИРОВАТЬ) ФРАГМЕНТ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК, СОДЕРЖАЩИЙ ЭТОТ НУЖНЫЙ ГЕН. ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ЭТА ПРОЦЕДУРА С ПОМОЩЬЮ ДВУХ ОПЕРАЦИЙ: "РАЗРЕЗАНИЯ" И "СШИВАНИЯ". РОЛЬ ПОРТНЯЖНЫХ ИНСТРУМЕНТОВ для генетического конструирования стали две группы ферментов – **рестриктирующие эндонуклеазы (рестриктазы) и лигазы**

ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ. ВЕКТОРНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ



Генетическое конструирование *in vitro*

- Получение нужного гена (трансгена), намеченного для переноса
- Создание специальных генетических конструкций – векторов (переносчиков)
- Генетическая трансформация
- Молекулярная селекция
- Выращивание измененных клеток в целые трансгенные организмы

Выделение генов из ДНК

Проводят с помощью рестриктаз, катализирующих расщепление ДНК на участках, имеющих определенные нуклеотидные последовательности (4–7 нуклеотидных пар):

1. Расщепление можно проводить посередине узнаваемого участка нуклеотидных пар; при этом обе нити ДНК «разрезаются» на одном уровне. Образующиеся фрагменты ДНК имеют так называемые тупые концы.
2. Возможно расщепление ДНК со сдвигом, при этом одна из нитей выступает на несколько нуклеотидов. Образующиеся при этом «липкие» концы в силу своей комплементарности вступают во взаимодействие.

Ферментный синтез гена на основе выделенной матричной РНК (мРНК)

- Сначала из клеток выделяют матричные РНК, среди которых присутствует мРНК, кодируемая геном, который требуется выделить.
- Затем в подобранных условиях на выделенной из клетки мРНК, как на матрице, с помощью **обратой транскриптазы (ревертазы)** синтезируется нить ДНК, комплиментарная м РНК (**кДНК**)
- Полученная **комплиментарная ДНК** (кДНК) служит матрицей для синтеза второй нити ДНК с использованием **ДНК-полимеразы** или ревертазы.
- Затравкой при этом служит олигонуклеотид, комплиментарный 3'-концу мРНК; новая цепь ДНК образуется из дезоксинуклеозидтрифосфатов в присутствии ионов магния

Конструирование рекомбинантных ДНК

- **Вектор** – это молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию) встроеного в неё искусственно какого-либо гена.

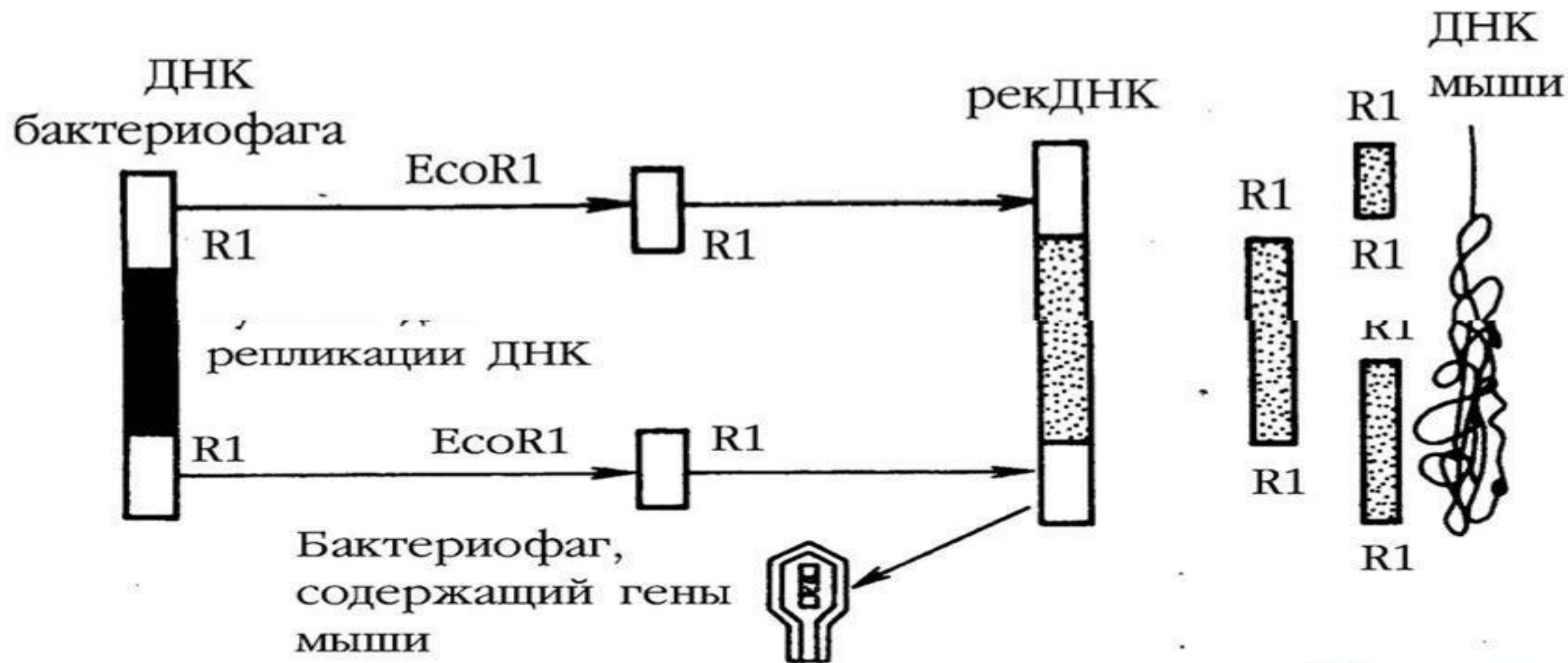
вектор (vehicle) – повозка

Вектор должен обладать следующими свойствами.

1. Способность к автономной (т.е. независимо от хромосомы реципиента) репликации в клетке реципиента.
2. Наличие сайта, в котором возможно встраивание желаемого фрагмента ДНК.
3. Наличие одного или нескольких маркерных генов, благодаря которым клетка-реципиент будет обладать новыми признаками, позволяющими отличить трансформированные клетки (т.е. содержащие рекДНК) от исходных.
4. Кроме того, чтобы чужеродный ген экспрессировался, необходимо его поместить под соответствующий промотор.

- **плазмиды** - представляют собой небольшие **кольцевые молекулы ДНК**, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий.
- **плазмиды** способны к автономной репликации, обладают **генами устойчивости** к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках
- **плазмиды** могут внедряться в хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (**сайты рестрикции**) для действия ряда рестриктаз

Структура вектора, созданного на основе ДНК бактериофага λ



Простейший плазмидный вектор pSC101

- Кольцевая плаزمида **pSC101** несет только один **участок расщепления (сайт рестрикции)** рестриктазой EcoR1 и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы.
- Кроме того, она несет ген устойчивости к антибиотику тетрациклину, а значит легко обнаруживается в бактериях, если их растить на среде с этим антибиотиком.
- Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и **клонирования** первых **гибридных (рекомбинантных) ДНК**, которые были бы функционально активными, то есть могли бы стабильно существовать в клетке и наделять **(трансформировать)** ее новыми признаками

Перенос генов в клетки организма-реципиента

- **Трансформация** – это процесс изменения генетических свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК
- Установлено, что к трансформации способны лишь некоторые, так называемые компетентные, клетки (способные включать чужеродную ДНК и синтезирующие особый трансформирующий белок)

Перенос генов в клетки организма-реципиента.

- **Конъюгация** – один из способов обмена генетического материала, при котором происходит однонаправленный перенос генетической информации от донора к реципиенту.
- Этот перенос находится под контролем особых конъюгативных плазмид (фактор фертильности).
- Перенос информации от донорской клетки в реципиентную осуществляется через специальные половые ворсинки (пили)

Скрининг и отбор рекомбинантных клеток

1. идентифицируют и отбирают клетки, несущие вектор, на основе которого осуществлен перенос ДНК
2. отбирают клетки, несущие вектор и ген-мишень

Для этого используют две группы методов

- а. основанные на непосредственном анализе ДНК клеток-реципиентов
- б. основанные на идентификации признака, кодируемого геномишенью

Основные проблемы, возникающие при генетических манипуляциях

- гены при трансформации, попадая в чужеродную среду, подвергаются воздействию протеаз, поэтому их надо защищать;
- как правило, продукт трансплантированного гена аккумулируется в клетках и не выделяется в среду;
- большинство желаемых признаков кодируется не одним, а группой генов

Перспективы развития генетической инженерии



1

- Получение ДНК зондов для исследования структуры и функций и экспрессии генов

2

- Дальнейшее развитие «обратной генетики»: зная белок, выделяют и модифицируют, кодирующий его ген, и получают белок с новыми свойствами

3

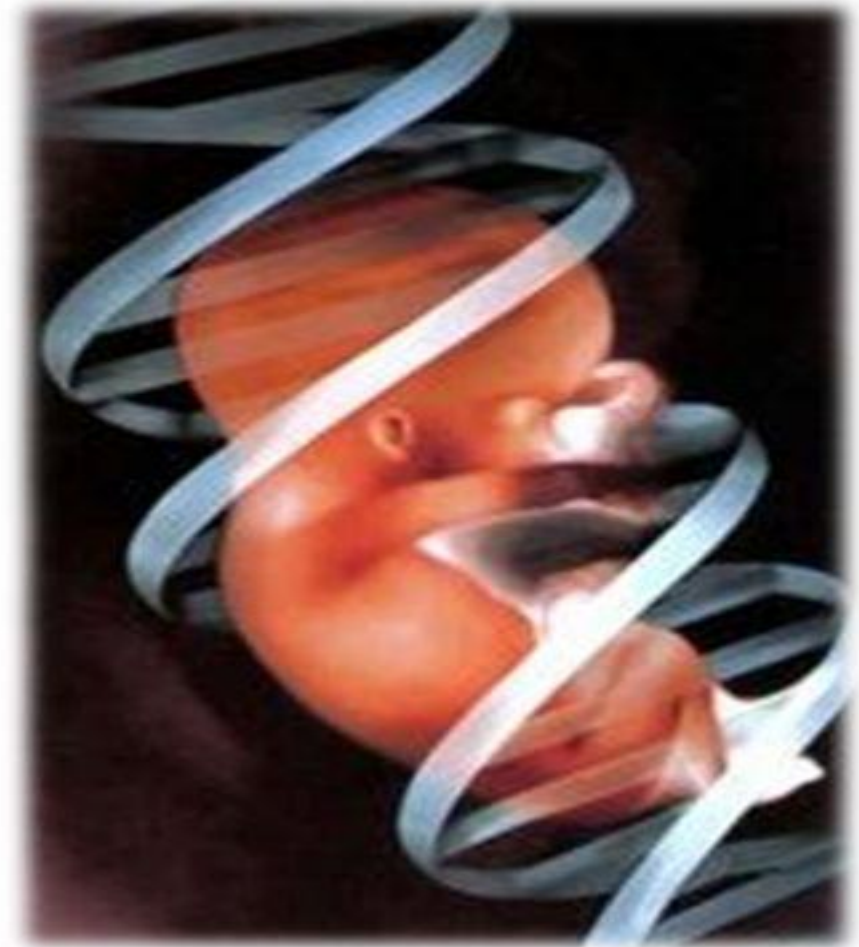
- Развитие и совершенствование генной терапии: методологии лечения наследственных болезней

4

- Получение ГМО, трансгенных растений и животных с полезными для человека свойствами



Генная инженерия – это целенаправленный перенос нужных генов от одного вида живых организмов в другой, часто очень далеких по своему происхождению. Это, как считают ученые, перспективное направление, которое в недалеком будущем позволит человеку целенаправленно улучшать наследственные качества организмов, получать в неограниченном количестве ценные биологически активные вещества. В то же время многие ученые высказывают опасения, что неконтролируемые работы в области генной инженерии могут привести к созданию организмов, опасных для человека.





Первым клонированным млекопитающим официально считается всем нам известная овечка Долли, эксперимент по её клонированию был поставлен Яном Вилмутом и Кейтом Кемпбеллом в Рослинском институте, в Шотландии, близ Эдинбурга в 1996 году., однако, с этим нельзя всецело согласиться, так как за 10 лет до клонирования Долли была клонирована мышь Машка в Пущино под Москвой советскими исследователями Чайлахяным Л.М, Вепренцевой Б.Н., Свиридовой Т.А., Никитиной В.А.

Названия «генетическая (или генная) инженерия» или «работа с рекомбинантными ДНК» эквивалентны

Суть этой технологии заключается в воссоединении фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением новых («рекомбинантных») генетических структур в живую клетку



Основные задачи генной инженерии:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.



Понятие генной инженерии

Генетическая инженерия (генная инженерия) — совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

Генетическая инженерия не является наукой в широком смысле, но является инструментом биотехнологии, используя методы таких биологических наук, как молекулярная и клеточная биология, цитология, генетика, микробиология, вирусология.

Развитие

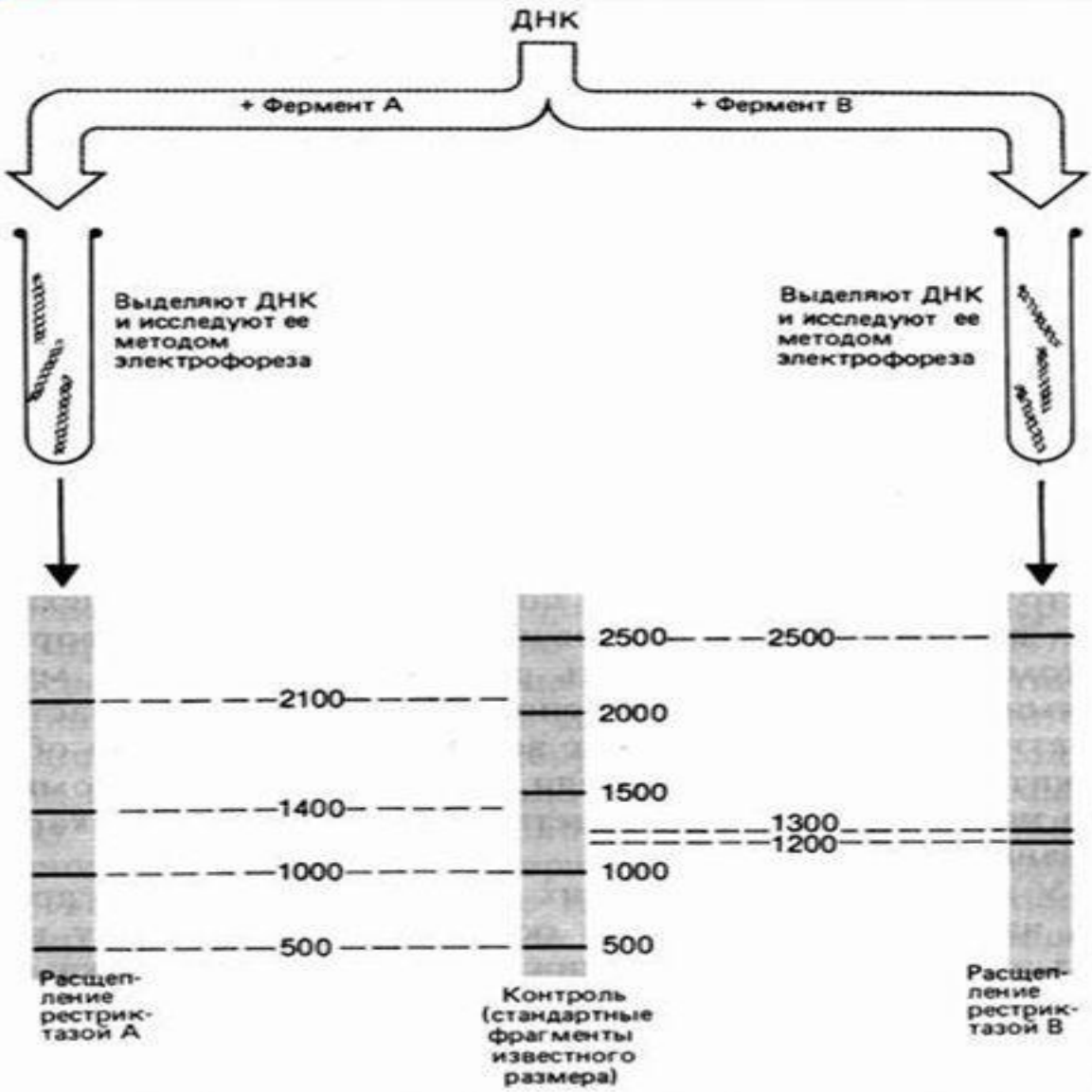
Во второй половине XX века было сделано несколько важных открытий и изобретений, лежащих в основе генной инженерии. Успешно завершились многолетние попытки «прочитать» ту биологическую информацию, которая «записана» в генах. Эта работа была начата английским учёным Ф. Сенгером и американским учёным У. Гилбертом (Нобелевская премия по химии 1980 г.). Как известно, в генах содержится информация-инструкция для синтеза в организме молекул РНК и белков, в том числе ферментов. Чтобы заставить клетку синтезировать новые, необычные для неё вещества, надо чтобы в ней синтезировались соответствующие наборы ферментов. А для этого необходимо или целенаправленно изменить находящиеся в ней гены, или ввести в неё новые, ранее отсутствовавшие гены. Изменения генов в живых клетках — это мутации. Они происходят под действием, например, мутагенов — химических ядов или излучений. Но такие изменения нельзя контролировать или направлять. Поэтому учёные сосредоточили усилия на попытках разработать методы введения в клетку новых, совершенно определённых генов, нужных человеку.

Генная инженерия человека

В применении к человеку генная инженерия могла бы применяться для лечения наследственных болезней. Однако, технически, есть существенная разница между лечением самого пациента и изменением генома его потомков.

Хотя и в небольшом масштабе, генная инженерия уже используется для того, чтобы дать шанс забеременеть женщинам с некоторыми разновидностями бесплодия. Для этого используют яйцеклетки здоровой женщины. Ребёнок в результате наследует генотип от одного отца и двух матерей.

При помощи генной инженерии можно получать потомков с улучшенной внешностью, умственными и физическими способностями, характером и поведением. С помощью генотерапии в будущем возможно улучшение генома и ныне живущих людей. В принципе можно создавать и более серьёзные изменения, но на пути подобных преобразований человечеству необходимо решить множество этических проблем.



Результаты электрофореза после обработки фрагмента ДНК разными рестриктазами

Экономическое значение



Генетическая инженерия служит для получения желаемых качеств изменяемого или генетически модифицированного организма. 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. Примерами применения генной инженерии являются получение новых генетически модифицированных сортов зерновых культур, производство человеческого инсулина путем использования генномодифицированных бактерий, производство эритропоэтина в культуре клеток или новых пород экспериментальных мышей для научных исследований.

Нокаут гена

Для изучения функции того или иного гена может быть применен нокаут гена. Так называется техника удаления одного или большего количества генов, что позволяет исследовать последствия подобной мутации. Для нокаута синтезируют такой же ген или его фрагмент, изменённый так, чтобы продукт гена потерял свою функцию. Для получения нокаутных мышей полученную генно-инженерную конструкцию вводят в эмбриональные стволовые клетки, где конструкция подвергается соматической рекомбинации и замещает нормальный ген, а измененные клетки имплантируют в бластоцист суррогатной матери. У плодовой мушки дрозофилы мутации инициируют в большой популяции, в которой затем ищут потомство с нужной мутацией. Сходным способом получают нокаут у растений и микроорганизмов.



Искусственная экспрессия

Логичным дополнением нокаута является искусственная экспрессия, то есть добавление в организм гена, которого у него ранее не было. Этот способ генной инженерии также можно использовать для исследования функции генов. В сущности процесс введения дополнительных генов таков же, как и при нокауте, но существующие гены не замещаются и не повреждаются.



Визуализация продуктов генов

Используется, когда задачей является изучение локализации продукта гена. Одним из способов мечения является замещение нормального гена на слитый с репортёрным элементом, например, с геном зелёного флуоресцентного белка. Этот белок, флуоресцирующий в голубом свете, используется для визуализации продукта генной модификации. Хотя такая техника удобна и полезна, ее побочными следствиями может быть частичная или полная потеря функции исследуемого белка. Более изощрённым, хотя и не столь удобным методом является добавление к изучаемому белку не столь больших олигопептидов, которые могут быть обнаружены с помощью специфических антител.



Исследование механизма экспрессии

В таких экспериментах задачей является изучение условий экспрессии гена. Особенности экспрессии зависят прежде всего от небольшого участка ДНК, расположенного перед кодирующей областью, который называется промотор и служит для связывания факторов транскрипции. Этот участок вводят в организм, поставив после него вместо собственного гена репортерный, например, GFP или фермента, катализирующего легко обнаруживаемую реакцию. Кроме того, что функционирование промотора в тех или иных тканях в тот или иной момент становится хорошо заметным, такие эксперименты позволяют исследовать структуру промотора, убирая или добавляя к нему фрагменты ДНК, а также искусственно усиливать его функции.

Что такое генетическая инженерия?

- **Генетическая инженерия** – использование основ и методов молекулярной биологии и молекулярной генетики для конструирования организмов с заданными наследственными свойствами.

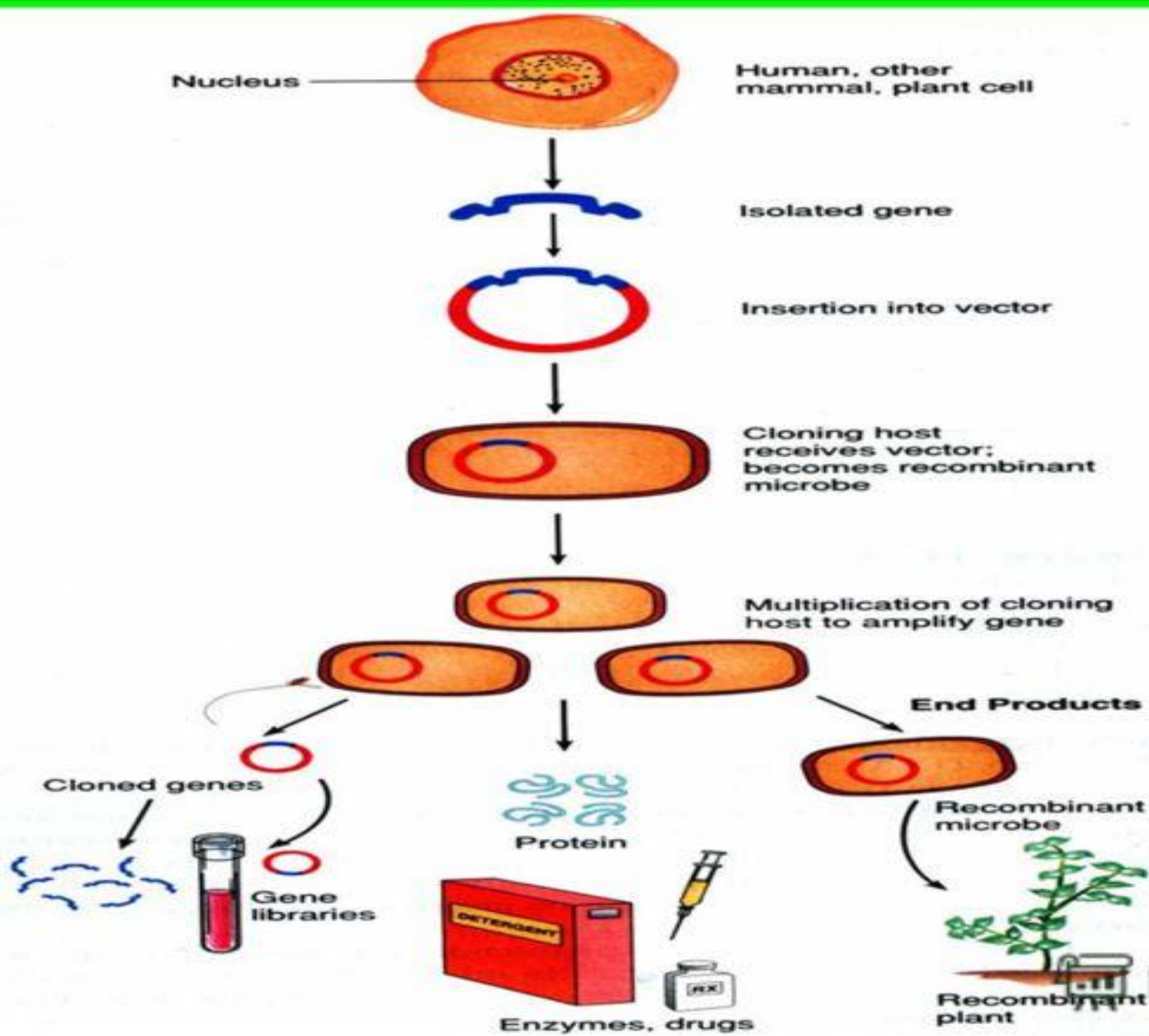
“ИНСТРУМЕНТЫ” ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

- ✂ ФЕРМЕНТЫ (рестриктазы, лигазы, обратная транскриптаза)
- ✂ ВЕКТОРЫ (плазмиды, умеренные бактериофаги, космиды, транспозоны, вирусы)

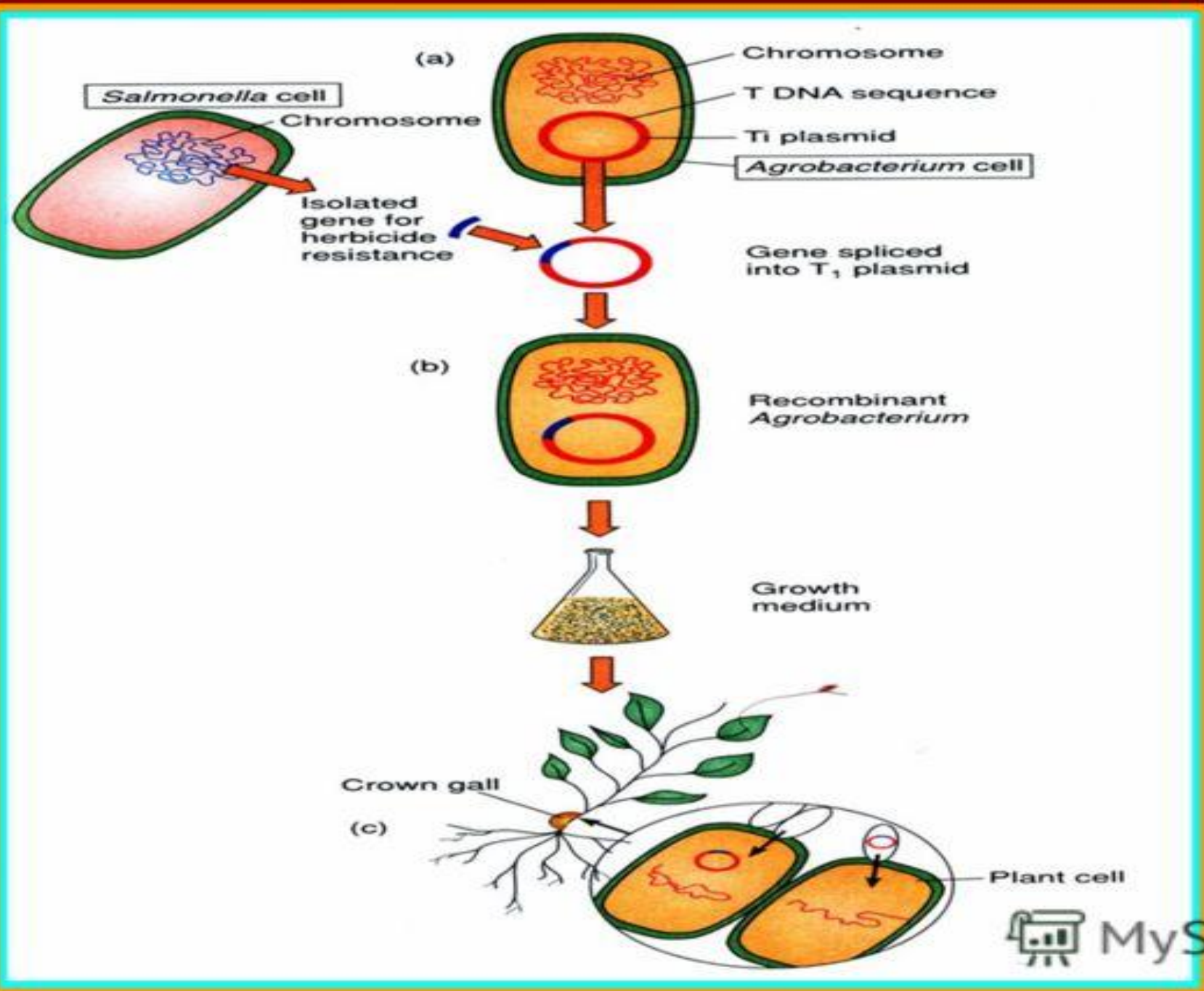
СХЕМА ГЕННО - ИНЖЕНЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

- ↓ определение локализации необходимого гена (сиквенс, генетическая карта) - клонирование (выделение) необходимого гена при помощи рестриктаз
- ↓ возможно выделение иРНК и комплементарный синтез необходимого гена при помощи обратной транскриптазы
- ↓ соединение изолированного гена с геномом вектора при помощи ферментов (рестриктаз, лигаз)
- ↓ введение рекомбинантного вектора в клетку-продуцент

БИОТЕХНОЛОГИЯ



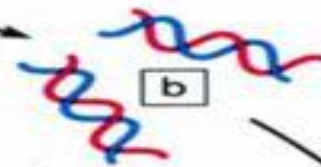
БИОТЕХНОЛОГИЯ



ГЕНОТЕРАПИЯ

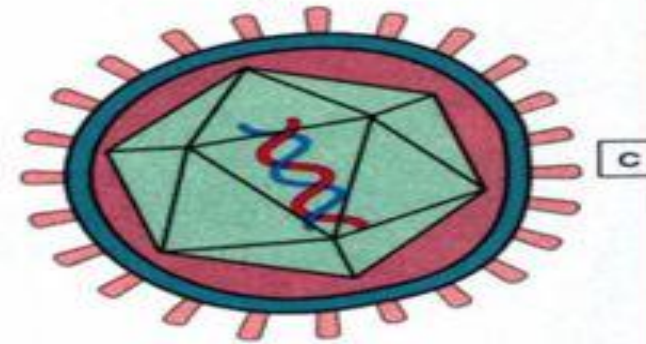


(a) Normal gene is isolated.



(b) Gene is cloned.

(c) Gene is inserted in retrovirus vector.

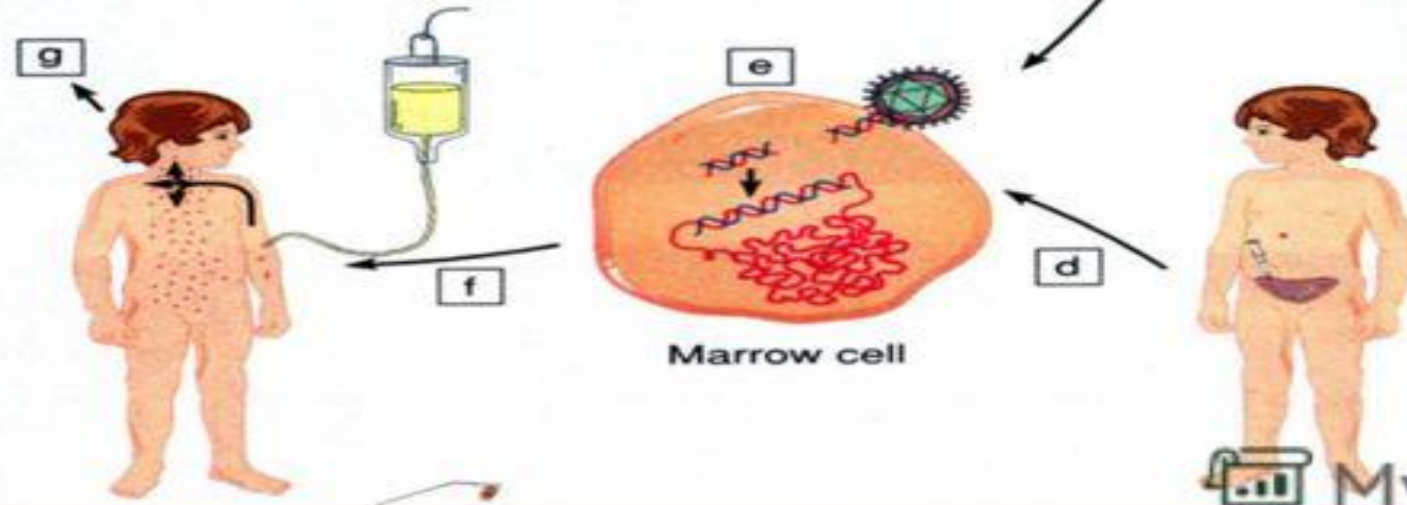


(d) Bone marrow sample is taken from patient with genetic defect.

(e) Marrow cells are infected with retrovirus.

(f) Transfected cells are reinfused into patient.

(g) Observe patient for expression of normal gene.



Применения генной инженерии

7. Генная терапия (герминальная, соматическая).



Применения генной инженерии

8. Для красоты



Применения генной инженерии

9. И многое-многое другое!



Your face cream,
is it really organic ?



ГЕНЕТИКА ВИРУСОВ

Способы увеличения информации:

- ⊙ двухразовое считывание одной иРНК с других иницилирующих кодонов
- ⊙ сдвиг рамки трансляции
- ⊙ сплайсинг (вырезание интронов)
- ⊙ транскрипция с участков ДНК, что перекрываются

У вирусов могут быть:

- © **Модификации** (изменение состава белков капсида, суперкапсида под влиянием клеток)
- © **Мутации** (размер бляшек под агаровым покрытием, нейровирулентность для животных, чувствительность к действию химиотерапевтических агентов, ts-мутации – температурочувствительные – вирус теряет способность размножаться при повышенной температуре)
- © **Рекомбинации**



- Генная инженерия находит широкое практическое применение в отраслях народного хозяйства, таких как микробиологическая промышленность, фармакологическая промышленность, пищевая промышленность и сельское хозяйство.



- Одним из наиболее значимых отраслей в генной инженерии является производство лекарственных препаратов. Современные технологии производства различных лекарств позволяют излечивать тяжелейшие заболевания, или хотя бы замедлять их развитие.



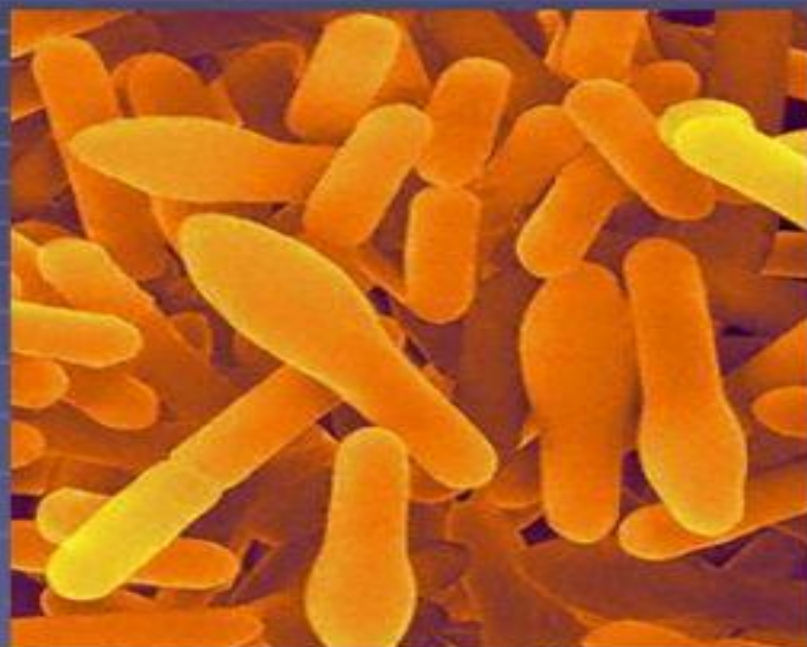
- С развитием генной инженерии всё чаще стали проводить различные опыты над животными, в результате которых ученые добивались своеобразной мутации организмов.
- Так, например, компания «Lifestyle Pets» создала с помощью генной инженерии гипоаллергенного кота, названного Ашера ГД. В организм животного был введен некий ген, позволявший «обходить» заболевания стороной.



- С помощью генной инженерии исследователи из Университета Пенсильвании представили новый метод производства вакцин: с помощью генетически сконструированных грибов. В результате был ускорен процесс производства вакцин, что может, по мнению пенсильванцев, пригодиться в случае биотеррористической атаки или вспышки птичьего гриппа.



- Как уже упоминалось выше, развитие генной инженерии не могло не отразиться на производстве препаратов, способствующих скорейшему выздоровлению пациента. Так, полученные путем все той же генной инженерии, бактерии семейства Clostridium, введенные в тело, растут и размножаются только в бедных кислородом частях опухолей, которые являются наиболее сложно излечимыми и по сей день.



- Теперь умеют уже синтезировать гены, и с помощью таких синтезированных генов, введенных в бактерии, получают ряд веществ, в частности гормоны и интерферон. Их производство составило важную отрасль биотехнологии.
- Интерферон – белок, синтезируемый организмом в ответ на вирусную инфекцию, изучают сейчас как возможное средство лечения рака и СПИДа. Понадобились бы тысячи литров крови человека, чтобы получить такое количество интерферона, какое дает всего один литр бактериальной культуры. Ясно, что выигрыш от массового производства этого вещества очень велик. Очень важную роль играет также получаемый на основе микробиологического синтеза инсулин, необходимый для лечения диабета. Методами генной инженерии удалось создать и ряд вакцин, которые испытываются сейчас для проверки их эффективности против вызывающего СПИД вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). С помощью рекомбинантной ДНК получают в достаточных количествах и человеческий гормон роста, единственное средство лечения редкой детской болезни – гипофизарной карликовости.

- Еще одно перспективное направление в медицине, связанное с рекомбинантной ДНК, – т.н. генная терапия. В этих работах, которые пока еще не вышли из экспериментальной стадии, в организм для борьбы с опухолью вводится сконструированная по методу генной инженерии копия гена, кодирующего мощный противоопухолевый фермент. Генную терапию начали применять также для борьбы с наследственными нарушениями в иммунной системе.
- В сельском хозяйстве удалось генетически изменить десятки продовольственных и кормовых культур. В животноводстве использование гормона роста, полученного биотехнологическим путем, позволило повысить удои молока; с помощью генетически измененного вируса создана вакцина против герпеса у свиней.

Генная инженерия человека

В применении к человеку генная инженерия могла бы применяться для лечения наследственных болезней. Однако, технически, есть существенная разница между лечением самого пациента и изменением генома его потомков.

В настоящее время эффективные методы изменения генома человека находятся на стадии разработки. Долгое время генетическая инженерия обезьян сталкивалась с серьезными трудностями, однако в 2009 году эксперименты увенчались успехом: дал потомство первый генетически модифицированный примат - игрунка обыкновенная. В этом же году в Nature появилась публикация об успешном исцелении взрослого самца обезьяны от дальтонизма.



Генная инженерия человека

Хотя и в небольшом масштабе, генная инженерия уже используется для того, чтобы дать шанс забеременеть женщинам с некоторыми разновидностями бесплодия. Для этого используют яйцеклетки здоровой женщины. Ребёнок в результате наследует генотип от одного отца и двух матерей. При помощи генной инженерии можно получать потомков с улучшенной внешностью, умственными и физическими способностями, характером и поведением. С помощью генотерапии в будущем возможно улучшение генома и нынеживущих людей. В принципе можно создавать и более серьёзные изменения, но на пути подобных преобразований человечеству необходимо решить множество этических проблем.

Научные факторы опасности генной инженерии

1. Генная инженерия в корне отличается от выведения новых сортов и пород. Искусственное добавление чужеродных генов сильно нарушает точно отрегулированный генетический контроль нормальной клетки. Манипулирование генами коренным образом отличается от комбинирования материнских и отцовских хромосом, которое происходит при естественном скрещивании.
2. В настоящее время генная инженерия технически несовершенна, так как она не в состоянии управлять процессом встраивания нового гена. Поэтому невозможно предвидеть место встраивания и эффекты добавленного гена. Даже в том случае, если местоположение гена окажется возможным установить после его встраивания в геном, имеющиеся сведения о ДНК очень неполны для того, чтобы предсказать результаты.

3. В результате искусственного добавления чужеродного гена непредвиденно могут образоваться опасные вещества. В худшем случае это могут быть токсические вещества, аллергены или другие вредные для здоровья вещества. Сведения о подобном рода возможностях ещё очень неполны.
4. Не существует совершенно надёжных методов проверки на безвредность. Более 10% серьёзных побочных эффектов новых лекарств не возможно выявить несмотря на тщательно проводимые исследования на безвредность. Степень риска того, что опасные свойства новых, модифицированных с помощью генной инженерии продуктов питания, останутся незамеченными, вероятно, значительно больше, чем в случае лекарств.
5. Существующие в настоящее время требования по проверке на безвредность крайне недостаточны. Они совершенно явно составлены таким образом, чтобы упростить процедуру утверждения. Они позволяют использовать крайне нечувствительные методы проверки на безвредность. Поэтому существует значительный риск того, что опасные для здоровья продукты питания смогут пройти проверку незамеченными.

6. Созданные до настоящего времени с помощью генной инженерии продукты питания не имеют сколько-нибудь значительной ценности для человечества. Эти продукты удовлетворяют, главным образом, лишь коммерческие интересы.
7. Знания о действии на окружающую среду модифицированных с помощью генной инженерии организмов, привнесённых туда, совершенно недостаточны. Не доказано ещё, что модифицированные с помощью генной инженерии организмы не окажут вредного воздействия на окружающую среду. Экологами высказаны предположения о различных потенциальных экологических осложнениях. Например, имеется много возможностей для неконтролируемого распространения потенциально опасных генов, используемых генной инженерией, в том числе передача генов бактериями и вирусами. Осложнения, вызванные в окружающей среде, вероятно, невозможно будет исправить, так как выпущенные гены невозможно взять обратно.

8. Могут возникнуть новые и опасные вирусы. Экспериментально показано, что встроенные в геном гены вирусов могут соединяться с генами инфекционных вирусов (так называемая рекомбинация). Такие новые вирусы могут быть более агрессивными, чем исходные. Вирусы могут стать также менее видоспецифичными. Например, вирусы растений могут стать вредными для полезных насекомых, животных, а также людей.
9. Знания о наследственном веществе, ДНК, очень неполны. Известно о функции лишь трёх процентов ДНК. рискованно манипулировать сложными системами, знания о которых неполны. Обширный опыт в области биологии, экологии и медицины показывает, что это может вызвать серьёзные непредсказуемые проблемы и расстройства.
10. Генная инженерия не поможет решить проблему голода в мире. Утверждение, что генная инженерия может внести существенный вклад в разрешение проблемы голода в мире, является научно необоснованным мифом.

Продукты питания, подвергавшиеся генной инженерии или которые могут содержать генетически созданные ингредиенты

- Амилаза - используется при приготовлении хлеба муки, крахмала
- Сидр, вино, пиво и так далее
- Разрыхлитель (пекарский порошок) – добавки
- Хлеб - содержит сою
- Масло Канола
- Каталаза - используется при приготовлении напитков, яичного порошка, сыворотки
- Зерновые культуры (крупы) - содержат сою
- Химозин
- Продукты из зерновых культур (круп)
- Крахмал из зерновых культур
- Сироп из зерновых культур

- Пищевые добавки - содержат дрожжи
- Фруктовые соки - могут изготавливаться из генетически модифицированных фруктов
- Сироп глюкозы
- Мороженое - может содержать сою, сироп глюкозы
- Кукуруза (маис)
- Макароны (спагетти, вермишель) - могут содержать сою
- Картофель
- Легкие напитки - могут содержать сироп глюкозы
- Соевые бобы, продукты, мясо
- Газированные Фруктовые напитки
- Тофу
- Помидоры
- Дрожжи (закваска)
- Сахар

Какие перспективы генной инженерии?

С развитием генетических технологий человечество впервые в истории получает возможность с помощью медицинской генетики уменьшить груз патологической наследственности, накопленной в процессе эволюции, избавиться от многих наследственных заболеваний, в частности, путем замены патологического гена нормальным.

Отношение к ГМО в мире



Томатное пюре – первый ГМ-продукт, появившийся в Европе в 1996 году



Маркировки, обозначающие отсутствие ГМ компонентов в продукте



Демонстрация противников ГМ-продуктов в Лондоне

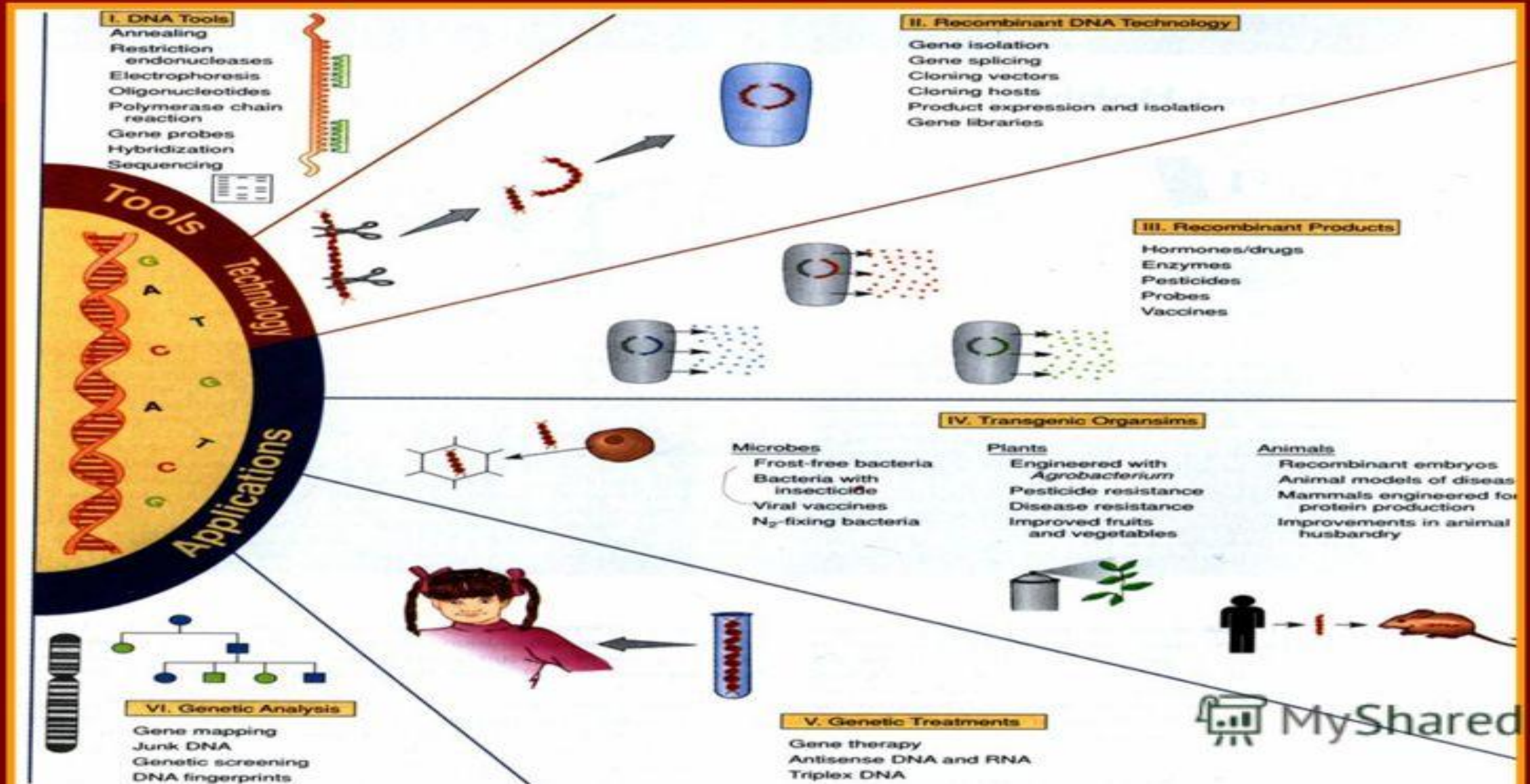


Биотехнологические продукты микроорганизмов - продуцентов

- сами клетки как источник продукта
- крупные молекулы (ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.)
- низкомолекулярные метаболиты, необходимые для роста клеток (аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты).
- антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны



СФЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ



Основные продукты, которые получают при помощи биотехнологии

В медицине	В ветеринарии та с/х	В пищевой промышленности	В химической промышленности и энергетике
Антибиотики Витамины Аминокислоты Гормоны Вакцины Компоненты крови Диагностические препараты Нуклеиновые кислоты Противоопухолевые агенты.	Кормовый белок Пищевые антибиотики Витамины Гормоны Вакцины Биологические средства защиты растений Инсектициды	Амінокислоти Пищевой белок Ферменты	Ацетон Этилен Бутанол Биогаз Спирты



Некоторые гормоны человека, продуцируемые рекомбинантными микроорганизмами

Белок	Название препарата
Инсулин	Гумулин, Новолин
Соматостатин	Протропин, Гуматроп
Интерферон-альфа	Роферон, Велферон
Интерферон-гамма	Актимун
Интерферон-бета	Фрон, Бетасерон
Интерлейкин-2	Пролейкин
Фактор некроза опухолей	-
Эритропоэтин	Прокрит, Эпоген
Гранулоцит колоние-стимулирующий фактор	Филграстин, Ньюпоген
Плазминоген активатор	Актилиз