

Лекция 1

Молекулярно-биологические
и молекулярно-генетические
основы биотехнологии

Лектор Юдина О.П.

План лекции.

- 1. Биотехнология как наука. Основные этапы ее становления.
- 2. Методы биотехнологии.
- 3. Генная инженерия.
- 3.1. Разделение фрагментов ДНК. Физическое картирование.
- 3.2. Конструирование рекомбинантных ДНК. Геномные библиотеки.
- 3.3. Выделение генов. Создание библиотек к-ДНК.

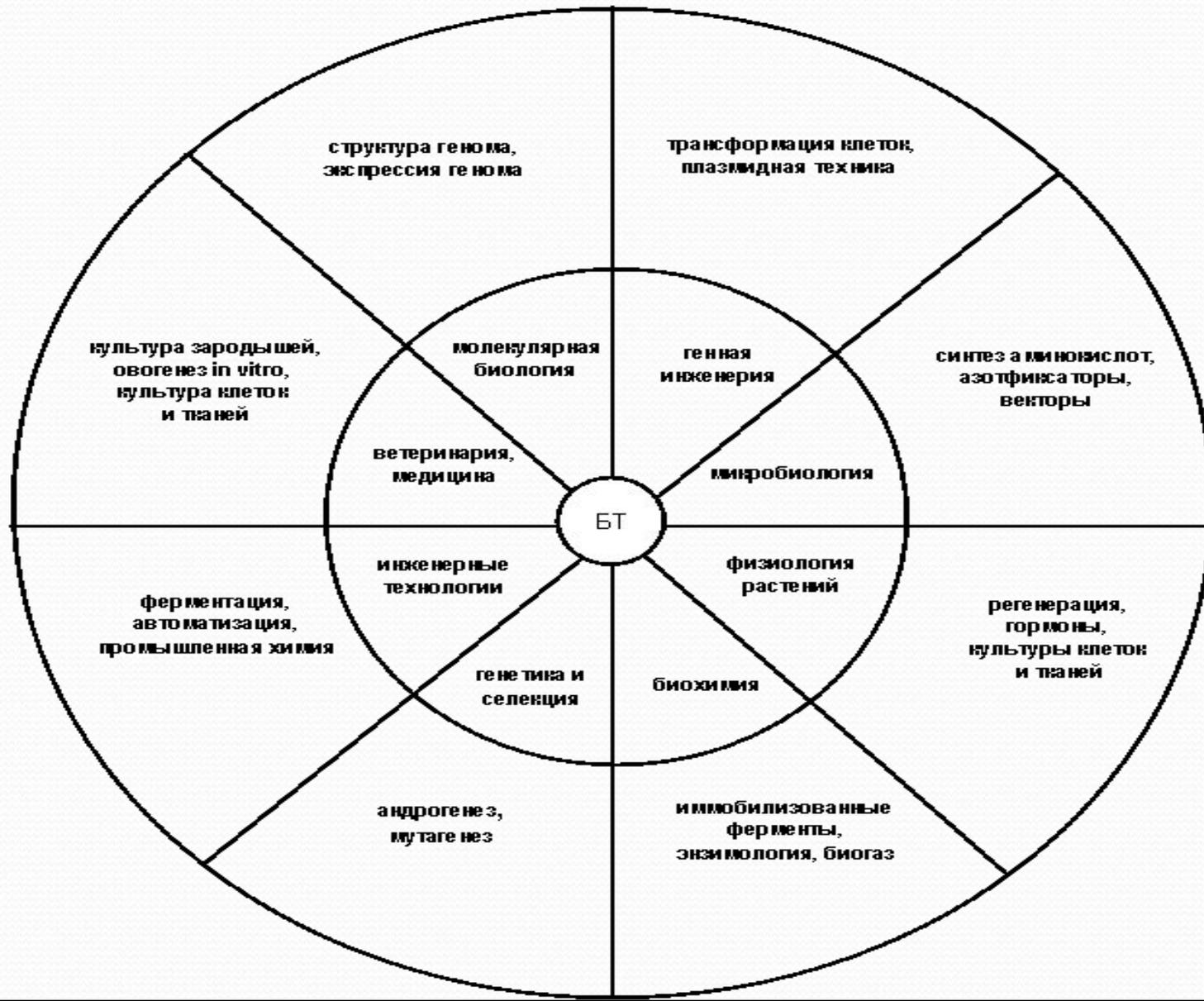
1. Биотехнология как наука.

Основные этапы ее становления.

- «**Био**» - жизнь, «**технология**» – способ (метод) индустриального производства.

- **Биотехнология** – использование живых организмов и биологических процессов в производстве.

Связь биотехнологии с другими науками (по В.И. Кефели, 1989)



Биотехнология

Классическая

Наука о методах и технологиях производства с использованием обычных (нетрансгенных) растений, животных, микроорганизмов в естественных условиях

Новейшая

Наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генно-модифицированных растений, животных, микроорганизмов в целях интенсификации производства, а также получения новых видов продуктов различного направления

Традиционные (классические) биотехнологии,
существующие уже тысячи лет, используют существующие в
природе микроорганизмы...

– для производства продуктов питания (хлебопечение,
производство молочнокислых продуктов);

— для производства алкогольных напитков (пивоварение,
виноделие);

– для производства промышленных товаров (кожевенное,
текстильное производство);

– для повышения плодородия почв (использование
органических и зеленых удобрений).

Джеймс Уотсон и Френсис Крик



Разделы биотехнологии

- **Клеточная инженерия** – метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.
- **Генетическая (генная) инженерия** – получение гибридных молекул ДНК и введении их в клетки бактерий, растений и животных.
- **Эмбриогенетическая инженерия** – активная перестройка генома животных путем вмешательства в их развитие на самых ранних стадиях онтогенеза.

В генетической инженерии и биотехнологии широко используются следующие *объекты* для экспериментов и практического применения:

- 1) Грамотрицательная бактерия кишечная палочка *E.coli*.
- 2) Грамотрицательные бактерии родов *Bacillus*, *Streptococcus* и *Streptomyces*.
- 3) Дрожжи (пекарские дрожжи) – сахаромицеты *Saccharomyces cerevisiae*.
- 4) Культивируемые клетки млекопитающих.
- 5) Вирусы животных (*SV40*, аденовирусы, герпеса, ретровирусы, поксвирусы, вирусы насекомых).
- 6) Трансгенные растения и животные.

2. Значение и методы биотехнологии

- **Промышленность** – пищевая, фармацевтическая, нефтегазовая, химическая.
- **Экология**
- **Энергетика**
- **Сельское хозяйство**
- **Медицина**

Методы биотехнологии

- 1. Микробиологический синтез
- 2. Биологический метод
- 3. Генная (генетическая) инженерия
- 4. Клеточная инженерия
- 5. Метод получения гибридом
- 6. Эмбриологический метод

3. Генетическая (генная) инженерия

- По определению академика А.А. Баева, **генетическая (генная) инженерия** – это конструирование *in vitro* – функционально активных генетических структур, т.е. создание искусственных генетических программ.

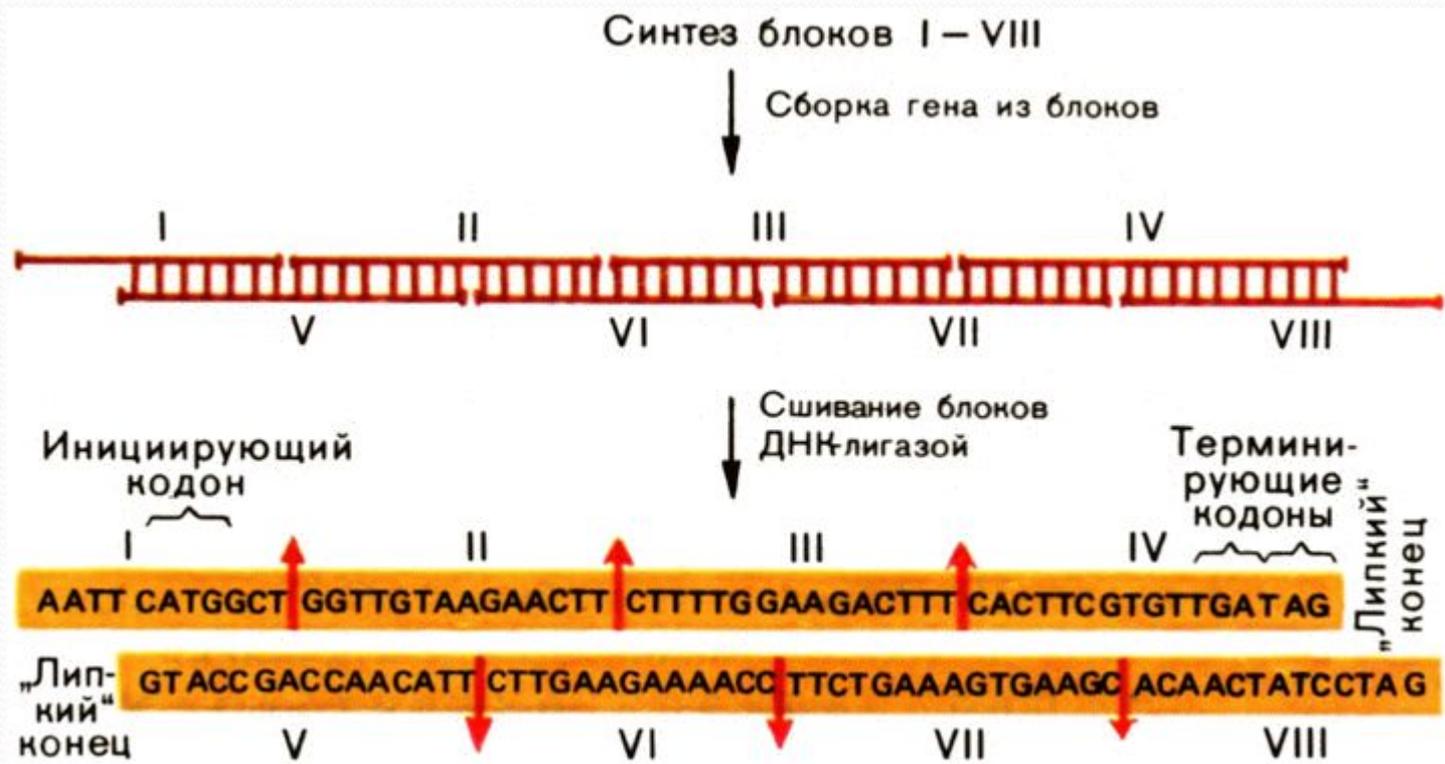
Отличие генной инженерии от классической селекции

| Селекция | Генная инженерия |
|--|---|
| 1. Нельзя скрещивать неродственные виды | Можно скрещивать индивидуальные гены видов, стоящих на разных ступенях эволюции, то есть происходит скрещивание гетерологичных ДНК |
| 2. Нельзя извне управлять процессом рекомбинации в организме | Можно управлять процессом рекомбинации, так как он происходит <i>in vitro</i> , то есть «в пробирке» и не защищен запрещающими механизмами организма. |
| 3. Нельзя точно угадать, какое получится потомство | Можно предсказать результат, так как отбирается потомство одной молекулы ДНК (молекулярное клонирование) |

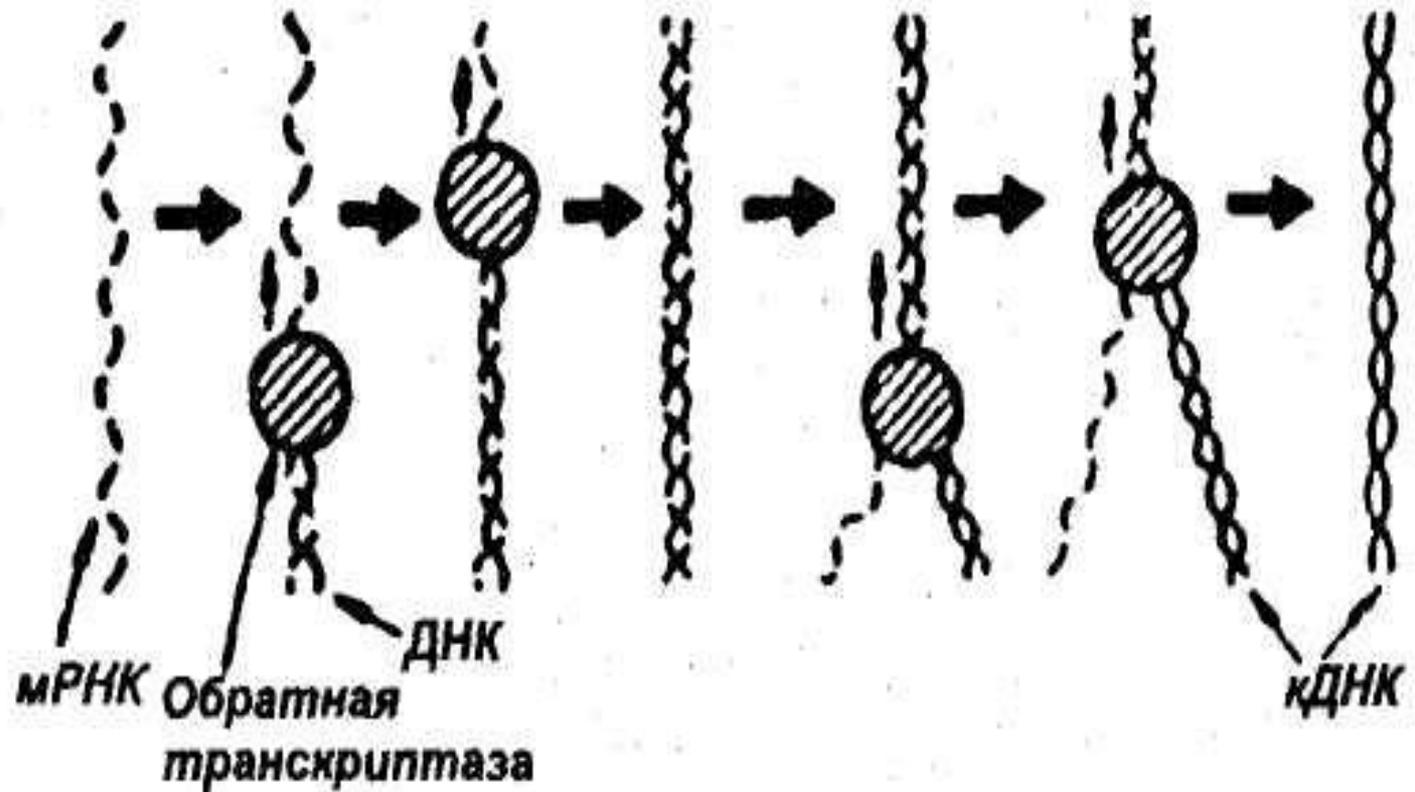
Генная инженерия включает ряд сложных приемов:

- 1). **Получение генов** путем их синтеза или выделения из клеток;
- 2). **Получение рекомбинантных молекул ДНК** – т.е. включение гена в вектор, обеспечивающий его размножение в реципиенте;
- 3). **Трансгеноз** – перенос гена с помощью вектора в клетку реципиента, а при необходимости, включение ее в геном реципиента;
- 4). **Функционирование гена в клетке** – реципиенте и синтез чужеродного белка.

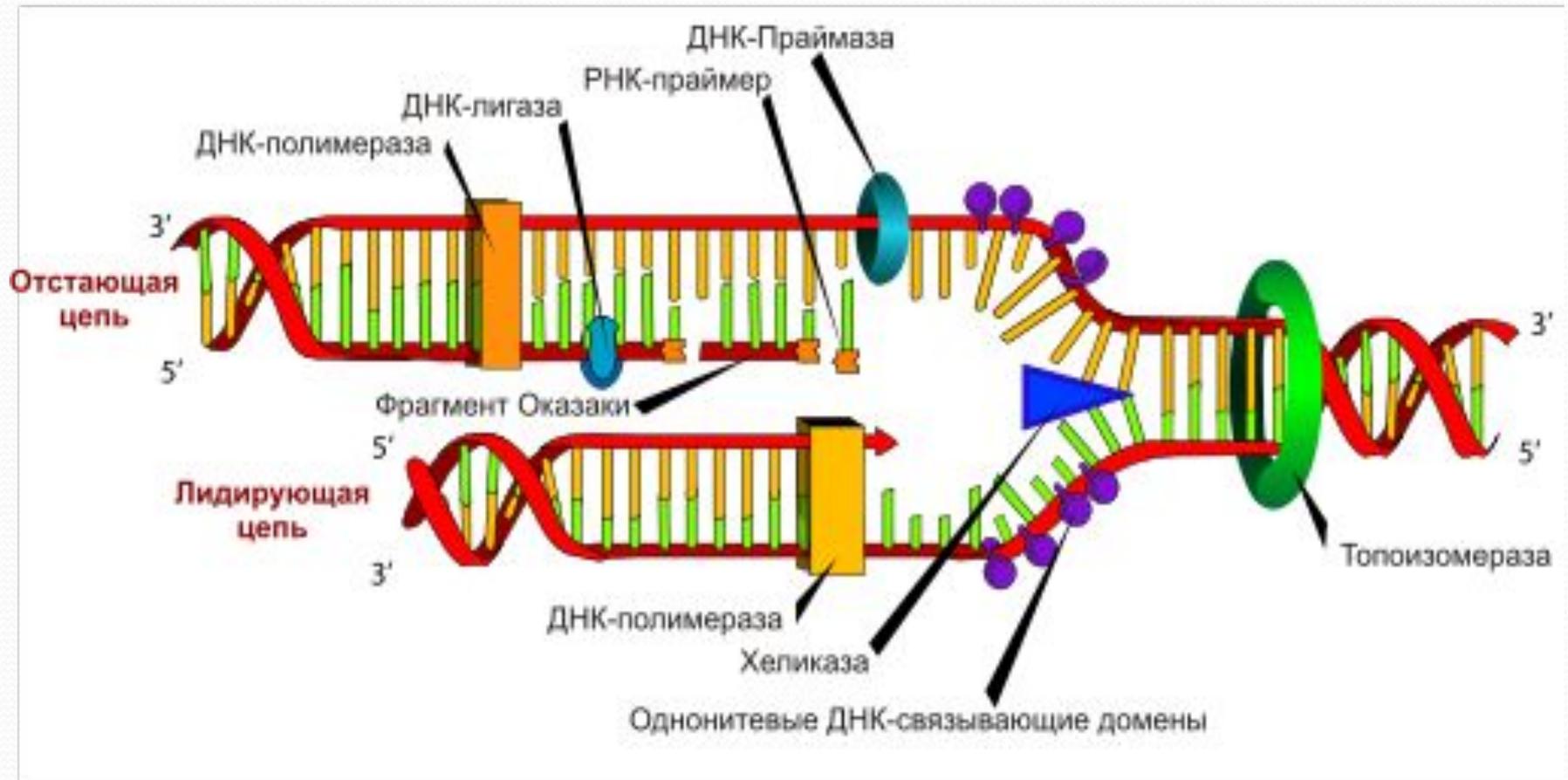
Химический синтез гена



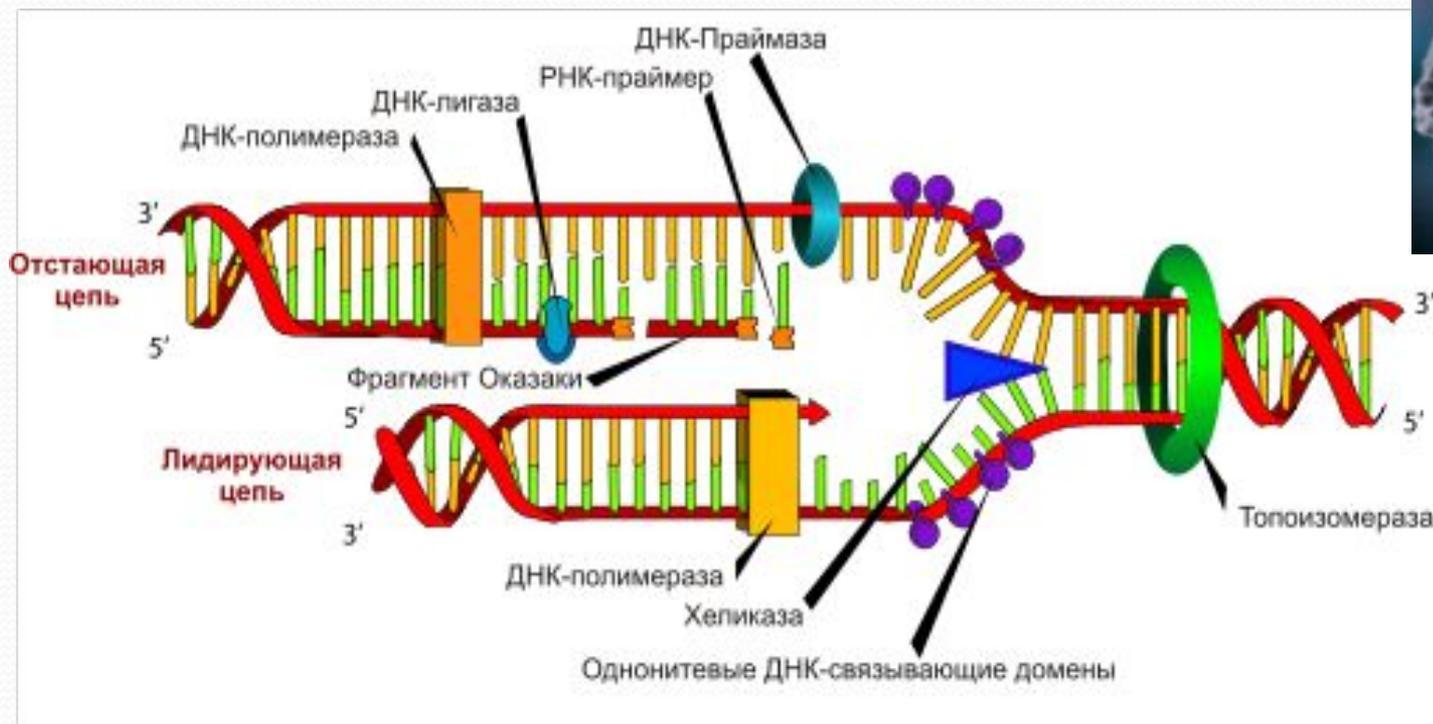
Ферментативный синтез гена



ДНК-полимераза – фермент, участвующий в репликации ДНК.



ДНК – лигаза – фермент, соединяющий фрагменты ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами.

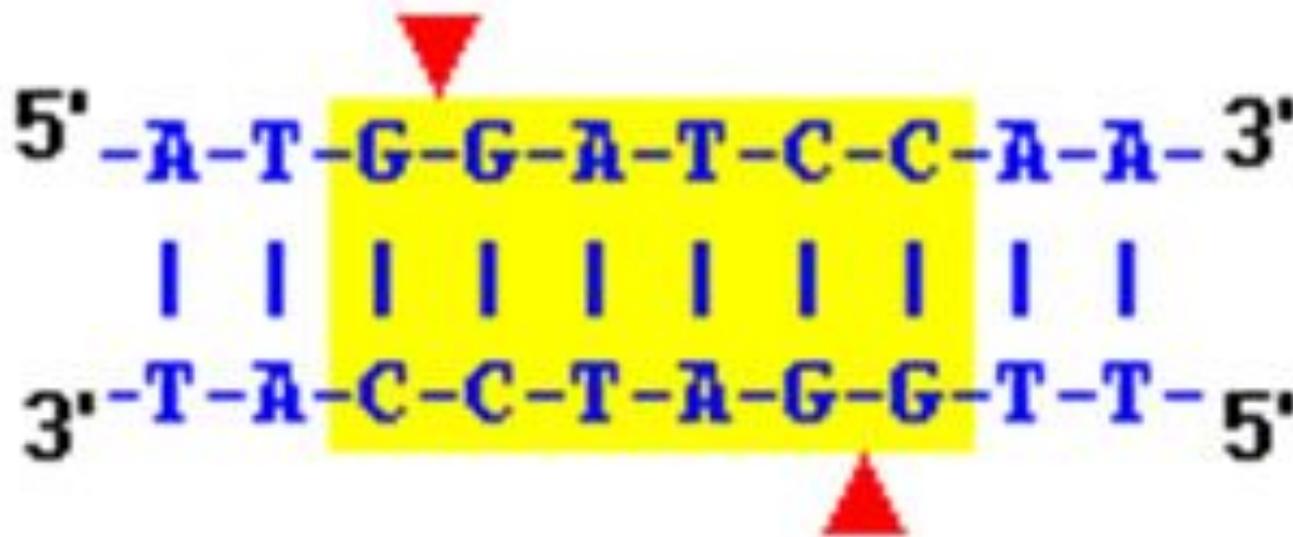


Нуклеазы – ферменты, катализирующие реакцию гидролиза молекул нуклеиновых кислот.

По типу действия нуклеазы можно разделить на:

- 1) ДНКазы – действуют только на молекулы ДНК;**
- 2) РНКазы – действуют только на молекулы РНК;**
- 3) Нуклеаза золотистой фасоли – действует на молекулы и ДНК, и РНК одновременно;**
- 4) Избирательное действие на одноцепочечную ДНК (нуклеаза S1), на двуцепочечную ДНК (эндонуклеаза III), или на гибридную молекулу ДНК-РНК (рибонуклеаза H);**
- 5) Экзонуклеазы – гидролизуют молекулы с 5' – или 3' – свободных концов;**
- 6) Эндонуклеазы – могут расщеплять внутри последовательности фрагмента или кольцевой молекулы ДНК.**

Рестриктазы – это особый класс эндонуклеаз, которые гидролизуют ДНК по строго определенным специфическим последовательностям – сайтам рестрикции.



ДНК – рестриктазы II типа –

в зависимости от размера сайта рестрикции и длины получаемых фрагментов ДНК делятся на классы:

- 1) мелкощепящие – сайт рестрикции представлен четырьмя нуклеотидными парами;**
- 2) среднещепящие – сайт рестрикции – 6-8 нуклеотидных пар;**
- 3) крупнощепящие - сайт рестрикции – 10-14 нуклеотидных пар.**

Рестриктазы, в зависимости от того, как они расщепляют последовательности ДНК делятся на 2 группы:

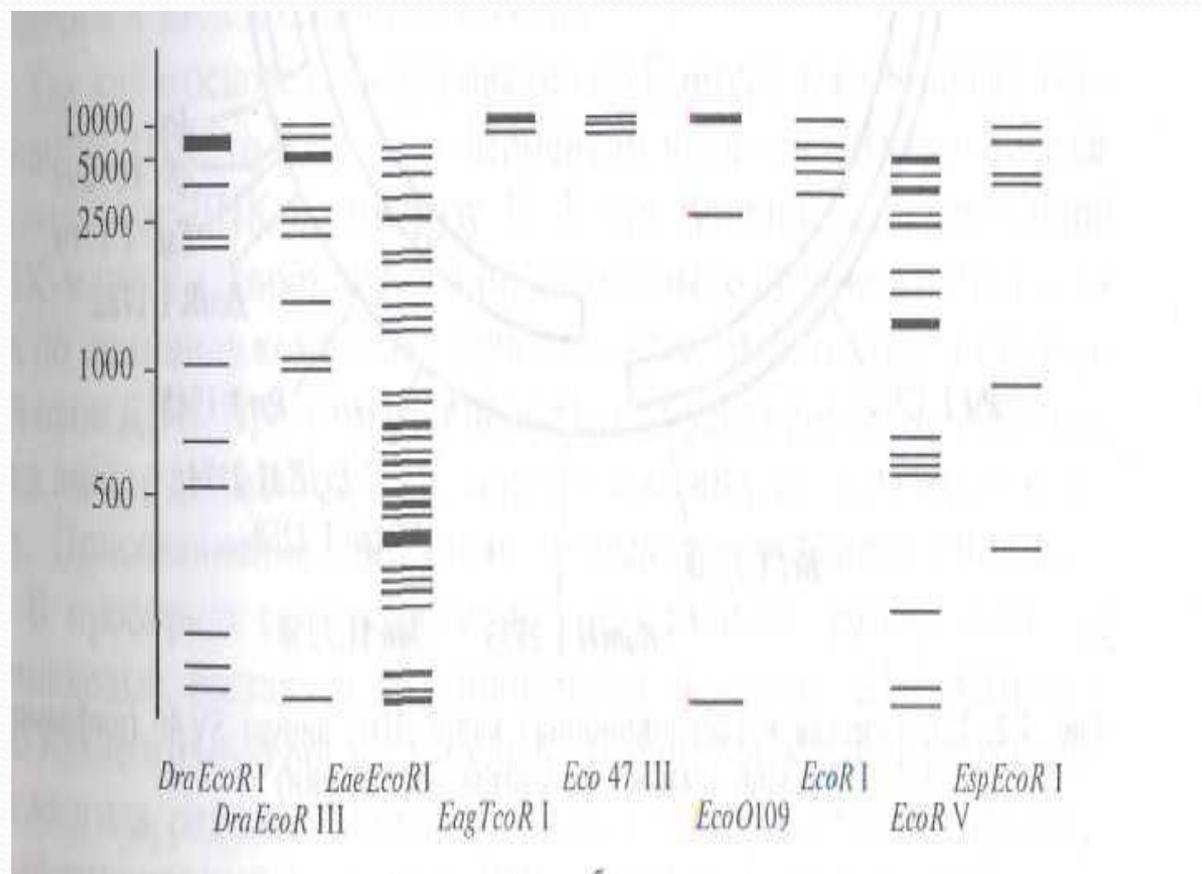
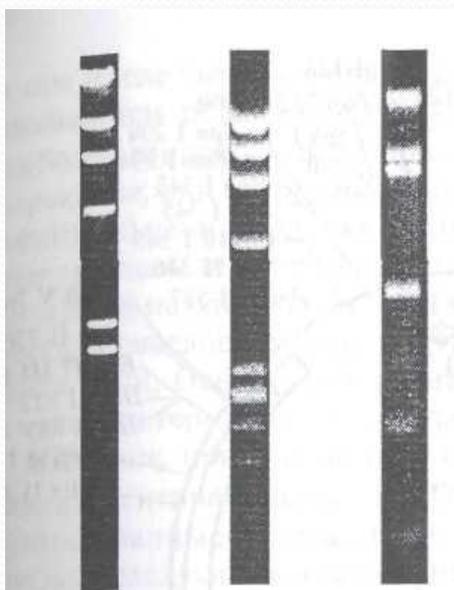
1) Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности, при расщеплении образуются фрагменты с «тупыми» концами:



2) Другие вносят разрывы с образованием «ступеньки», образуются «липкие» концы, т.е. фрагменты имеют на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки:



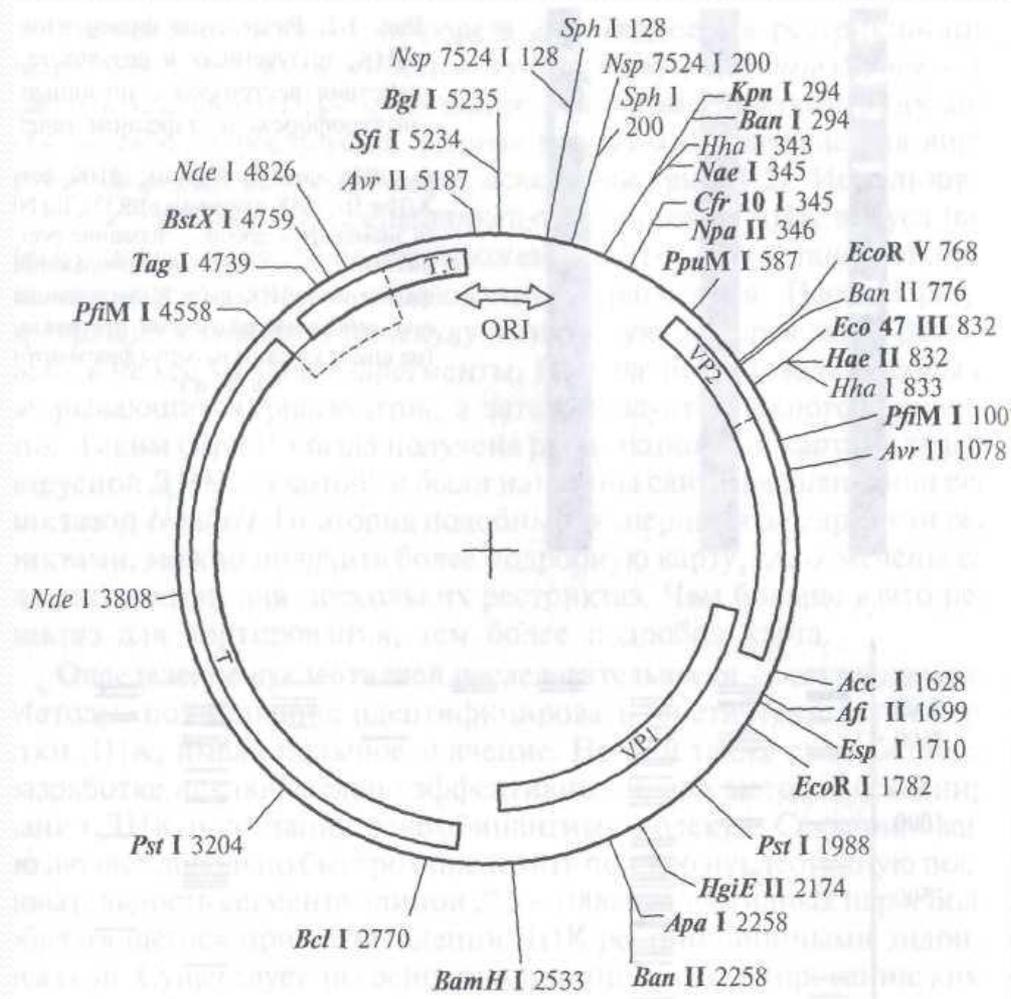
3.1. Разделение фрагментов ДНК. Физическое картирование.



Рестрикционные карты — последовательности

ДНК с нанесёнными на них сайтами разрезания для разных

рестриктаз.



Секвенирование

- это определение нуклеотидной последовательности сегментов ДНК длиной 350-1000 и более нуклеотидных пар, образующихся при расщеплении ДНК рестрикционными эндонуклеазами.

- Разработано два метода секвенирования – **химический и ферментативный сиквенс.**

3.2. Конструирование рекомбинантных ДНК. Геномные библиотеки.

- **Рекомбинантная ДНК** – это искусственно полученная молекула ДНК, она имеет форму кольца, включает ген (гены) как объект конкретных генетических манипуляций, и так называемый *вектор* (напр., плазида), обеспечивающий размножение рекомбинантной ДНК и синтез в клетке хозяина определённого продукта, кодируемого внесённым геном.

Соединение фрагментов в единую молекулу производится несколькими методами:

- 1) Соединение по одноименным «липким» концам.
- 2) Соединение фрагментов по «тупым» концам.
- 3) Соединение фрагментов с разноименными концами.

-АТГ
-ТАЦААААА

фрагмент 1

ТТТТТ ЦЦА-
ГГТ-

фрагмент 2

-АТГ ТТТТТЦЦА-
-ТАЦАААААГГТ-

«сшитая» ДНК

Векторы – это молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и обеспечивать ее репликацию, экспрессию, считывание и/или трансформацию.

В качестве векторов используют: плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы животных, искусственные бактериальные и дрожжевые хромосомы ВАС и УАС.

Основные требования к векторной молекуле:

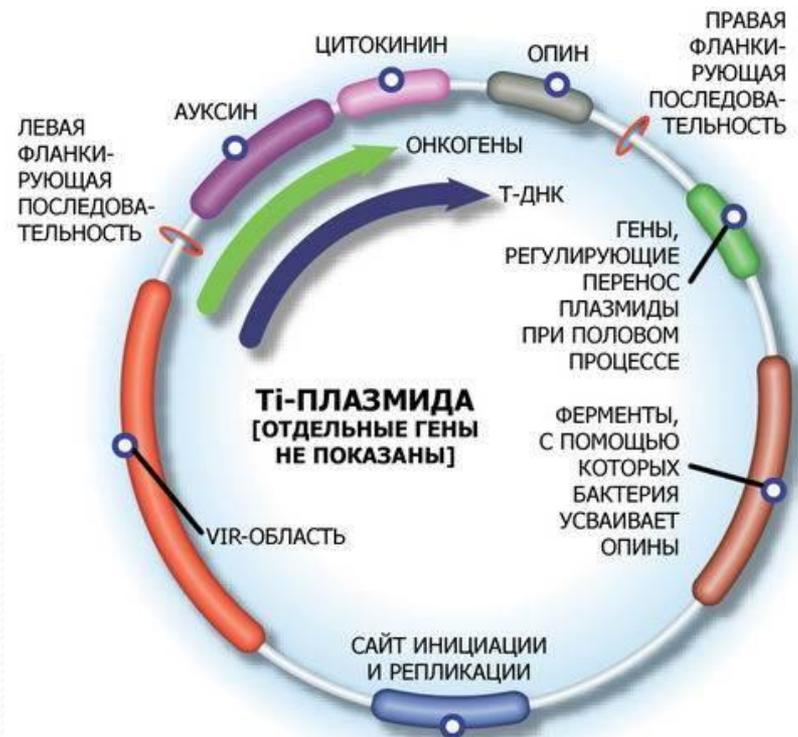
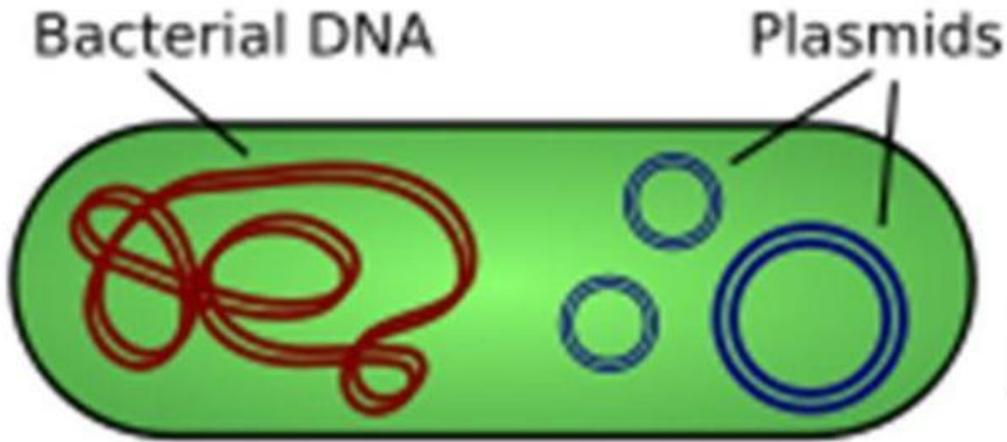
Вектор должен:

- 1) содержать уникальные сайты рестрикции для нескольких рестриктаз для встройки в него фрагмента чужеродной ДНК;**
- 2) обладать определённой ёмкостью и не абортировать встроенный фрагмент;**
- 3) реплицироваться в определённых клетках за счёт имеющейся последовательности точки начала репликации (ориджина);**
- 4) содержать последовательность маркерного гена, облегчающего селекцию клеток, несущих векторную конструкцию.**

Типы векторов по профилю их использования:

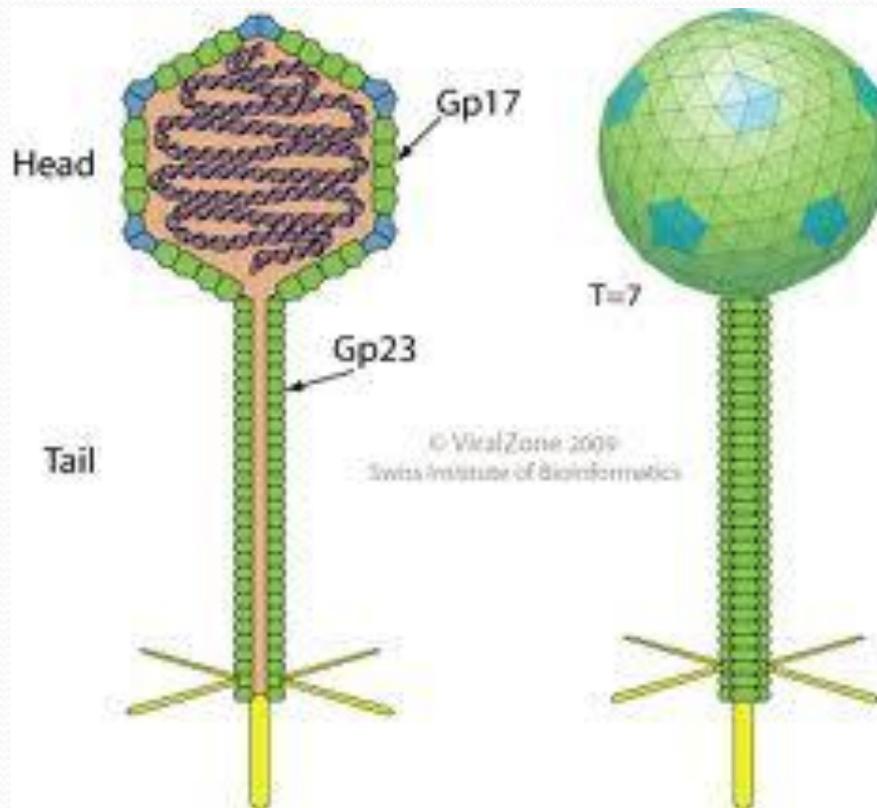
- 1. Векторы для клонирования**
- 2. Экспрессионные векторы**
- 3. Векторы для трансформации**

Бактериальные плазмиды в качестве векторов для клонирования

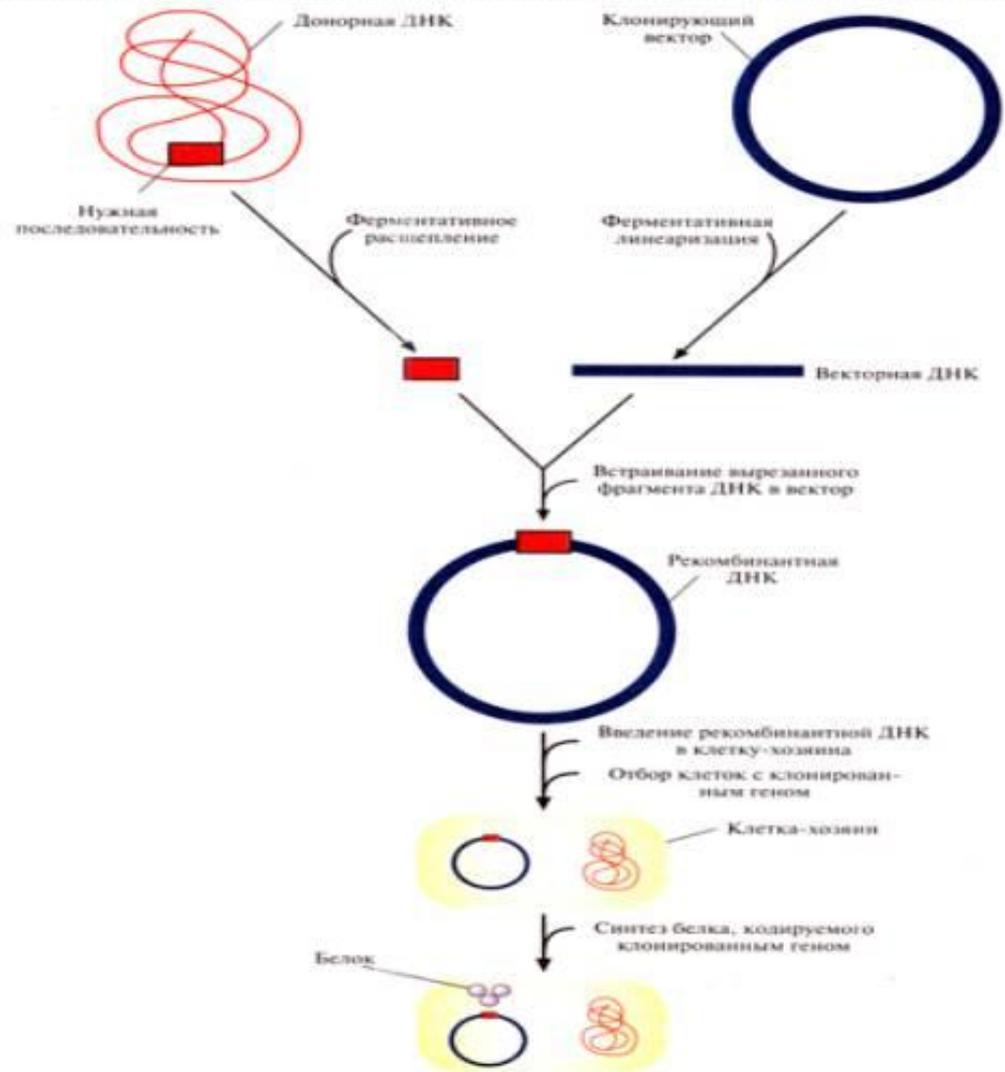


Фаговые векторы.

Бактериофаг λ



Космиды – это специальные векторы с большой емкостью, представляющие собой гибридную молекулу, содержащую специальный \cos -участок генома фага λ и специальные последовательности, позволяющие им реплицироваться по плазмидному типу.



ВАС-векторы:

получены на основе F-плазмид бактерий, содержат гены, ответственные за репликацию плазмид в бактериях. Ёмкость их огромная (100-300 т.н.п.) при небольшом собственном размере (~ 7 т.н.п.).

УАС-векторы:

это искусственные дрожжевые минихромосомы, содержащие центромеру, теломеры и точки начала репликации. В такой вектор можно встроить фрагменты ДНК размером более 100 т.н.п.

Геномная библиотека

(банк генов) - это клонированный в составе векторов полный набор последовательностей ДНК данного вида организмов.

Хранится в виде фагового банка под хлороформом при -70°C десятки лет.

3.3. Выделение генов. Создание библиотек к - ДНК.

Существует два пути получения генов:

- 1. искусственный синтез**
- 2. из клонотеки отбирают ту рекомбинантную ДНК, которая содержит данный ген**

Библиотеки к-ДНК –

**совокупность векторных
плазмид, каждая из которых
несёт в своём составе к-ДНК.**

Полный банк генов - это
сумма фрагментов всего
генома донора.