Лекция 1

Молекулярно-биологические и молекулярно-генетические основы биотехнологии

Лектор Юдина О.П.

План лекции.

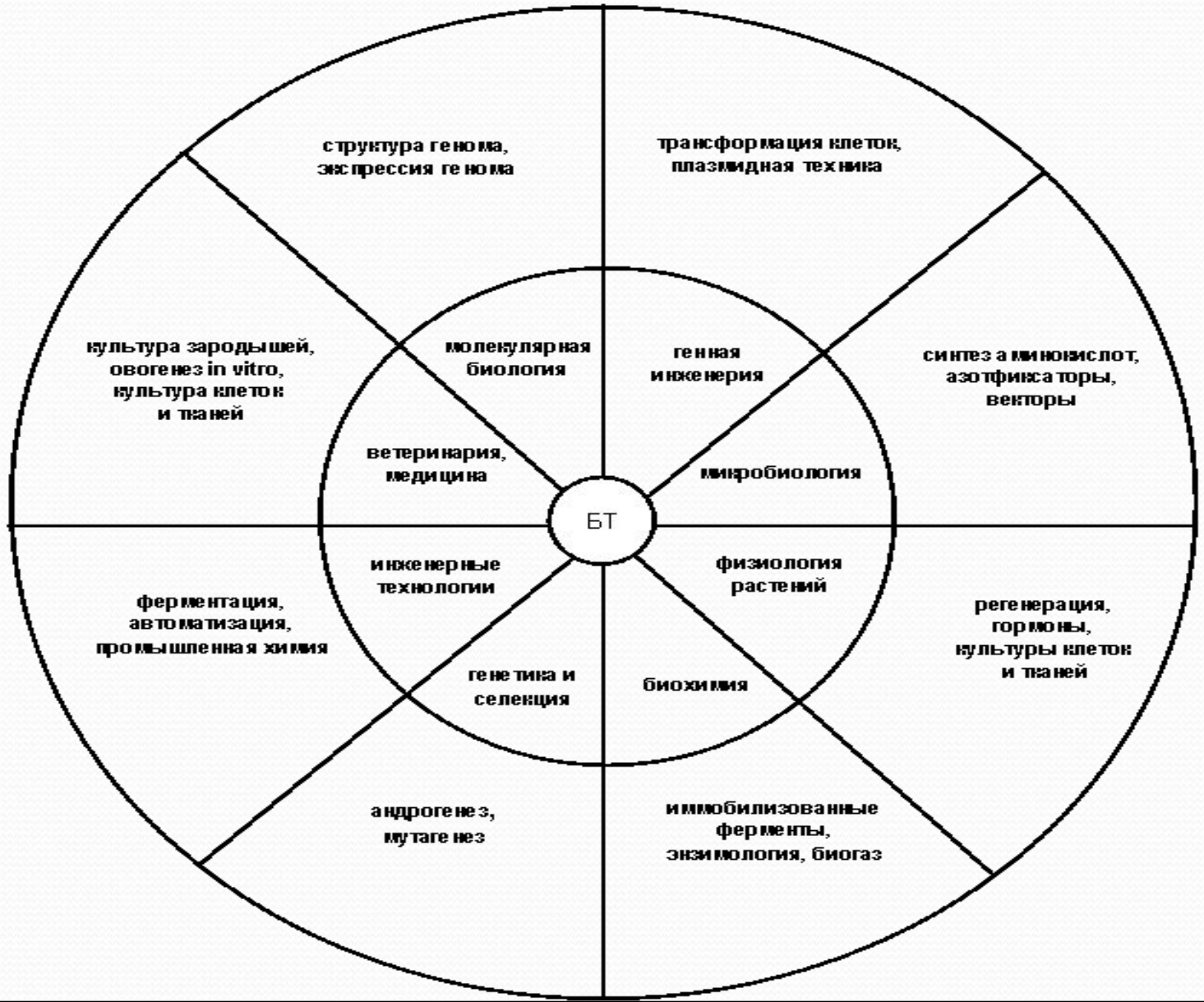
- 1. Биотехнология как наука. Основные этапы ее становления.
- 2. Методы биотехнологии.
- 3. Генная инженерия.
- 3.1. Разделение фрагментов ДНК. Физическое картирование.
- 3.2. Конструирование рекомбинантных ДНК. Геномные библиотеки.
- 3.3. Выделение генов. Создание библиотек к-ДНК.

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.

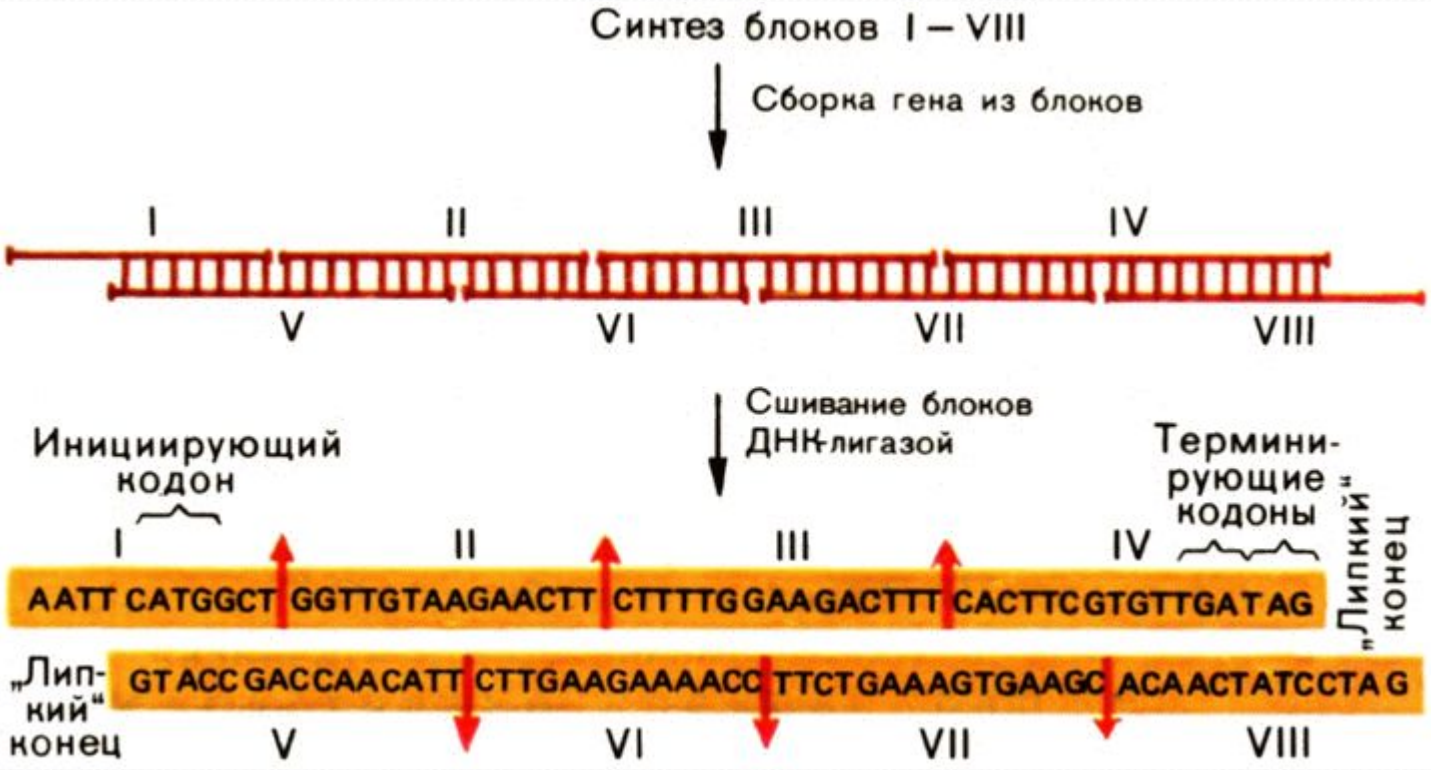
Отличие генной инженерии от классической селекции

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 in vitro, 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)

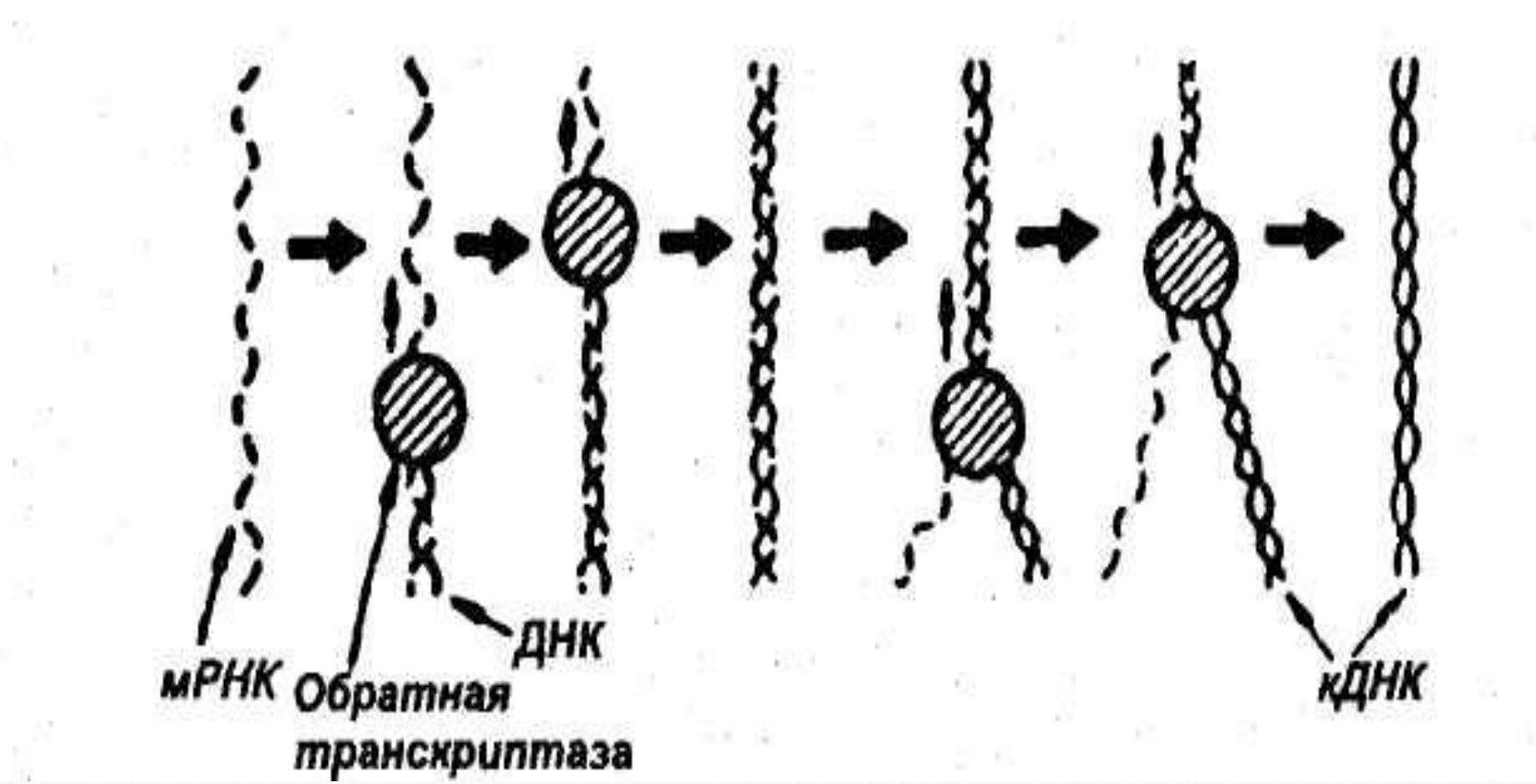
Генная инженерия включает ряд сложных приемов:

- 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.

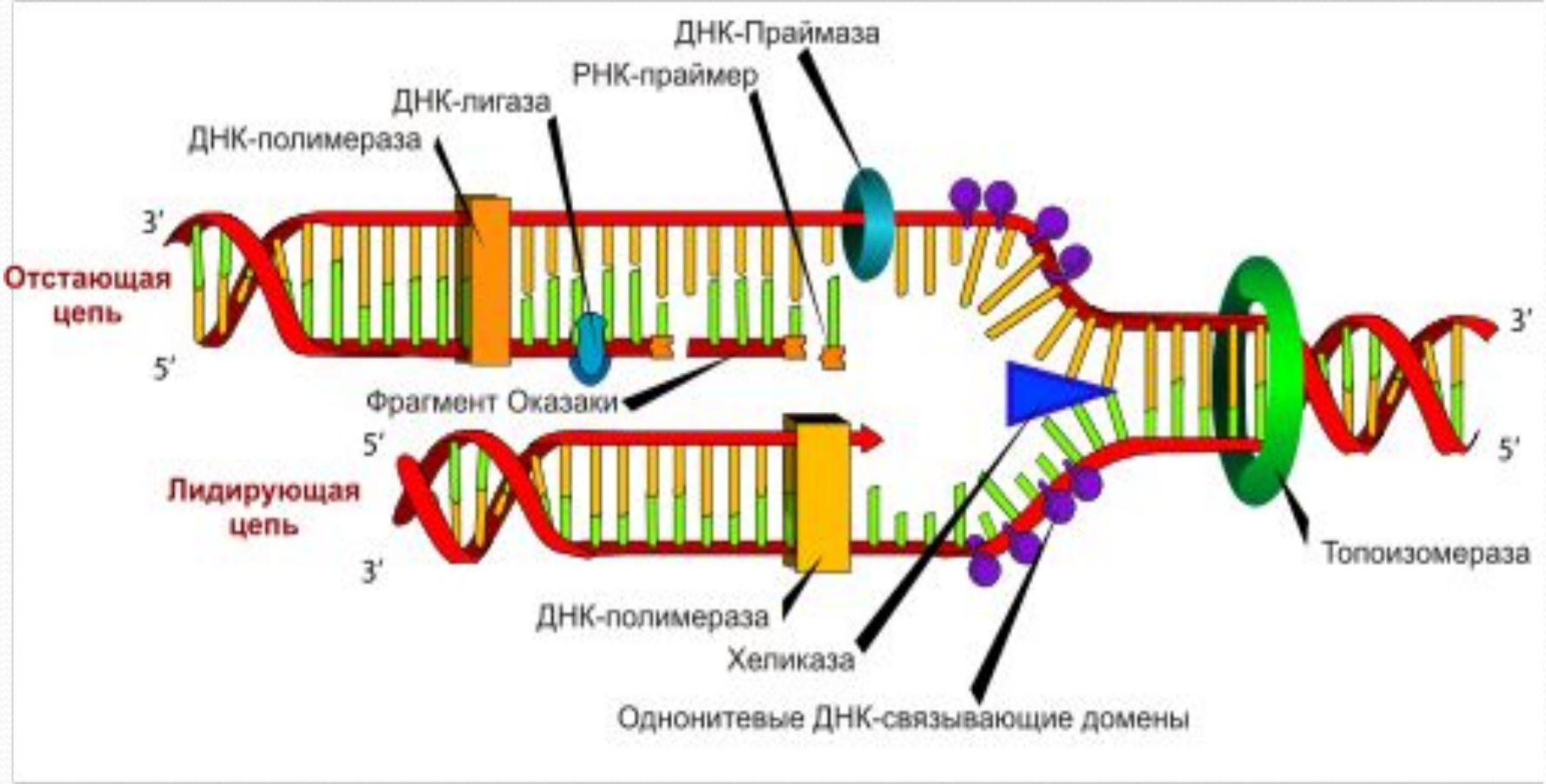
Химический синтез гена



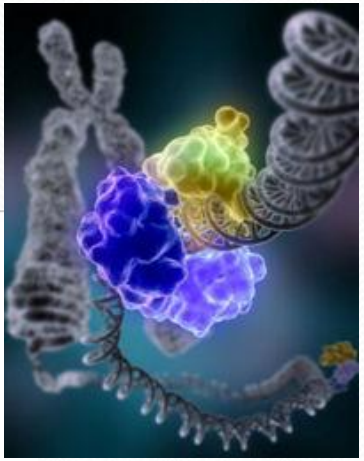
Ферментативный синтез гена

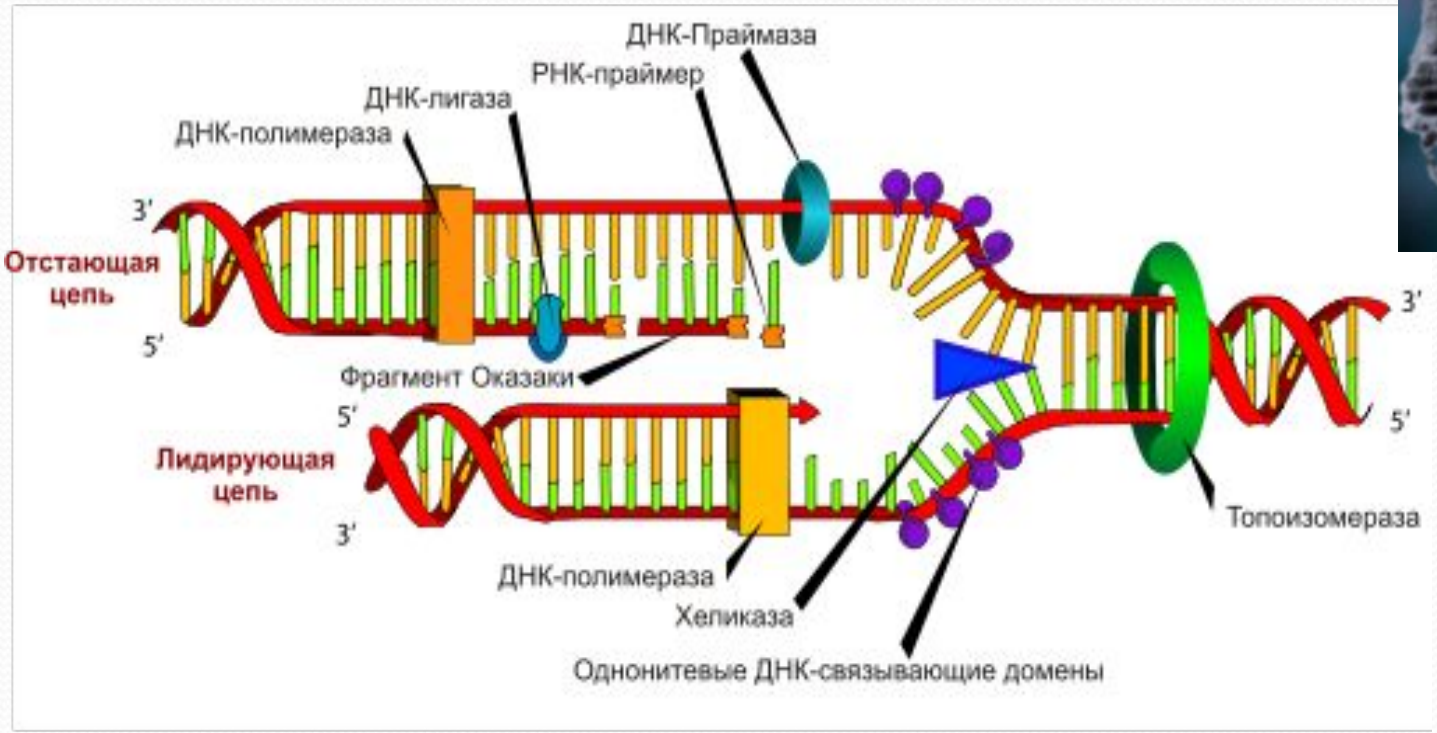


ДНК-полимераза – **фермент, участвующий в репликации ДНК.**



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:

5’ TA ↓ GA 3’ 5’ GTT ↓ AAC 3’

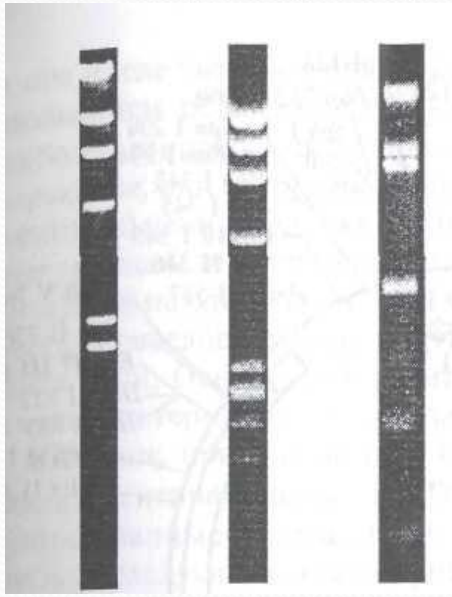
Taq I 3’ AT ↑ CT 5’ Hinc I 3’ CAA ↑ TTG 5’

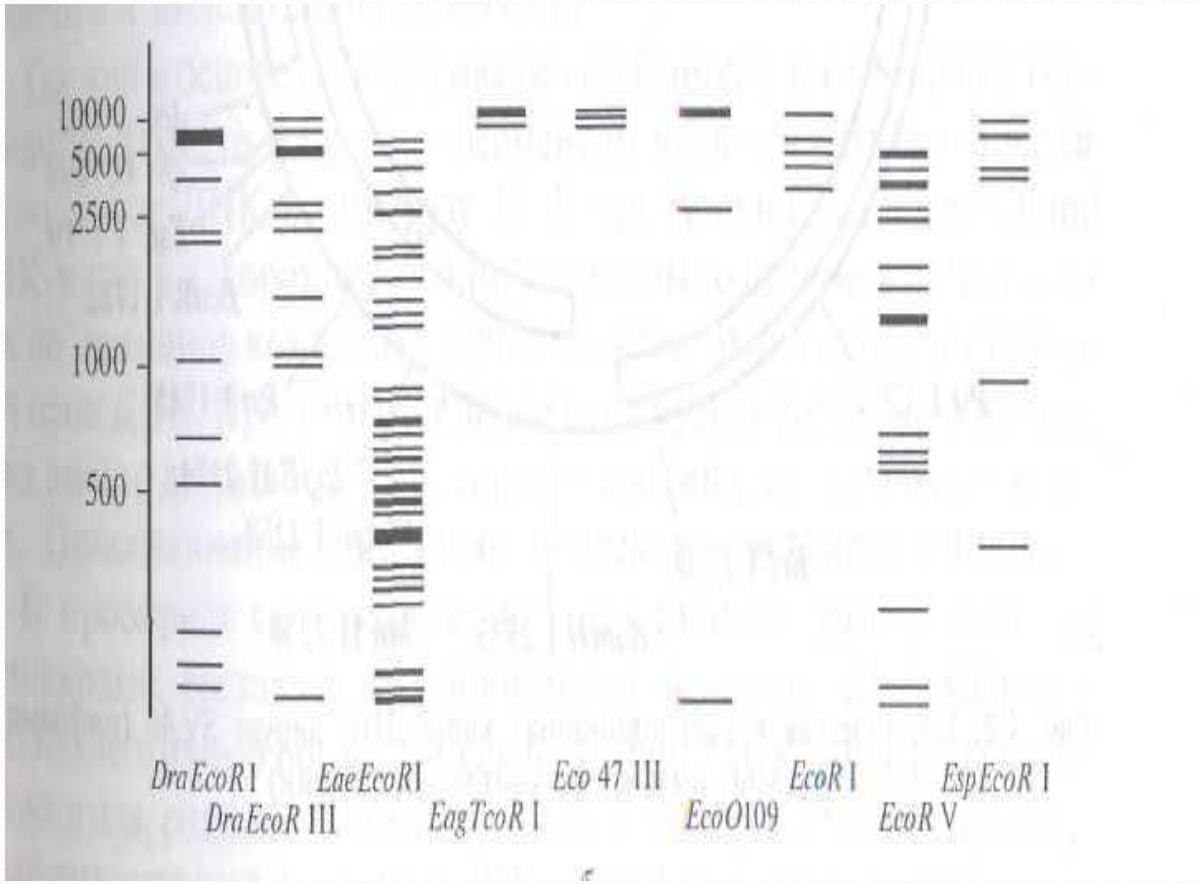
2) Другие вносят разрывы с образованием «ступеньки», образуются «липкие» концы, т.е. фрагменты имеют на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки:

5’ G ↓ AA TTC 3’ 5’ C ↓ CGG 3’

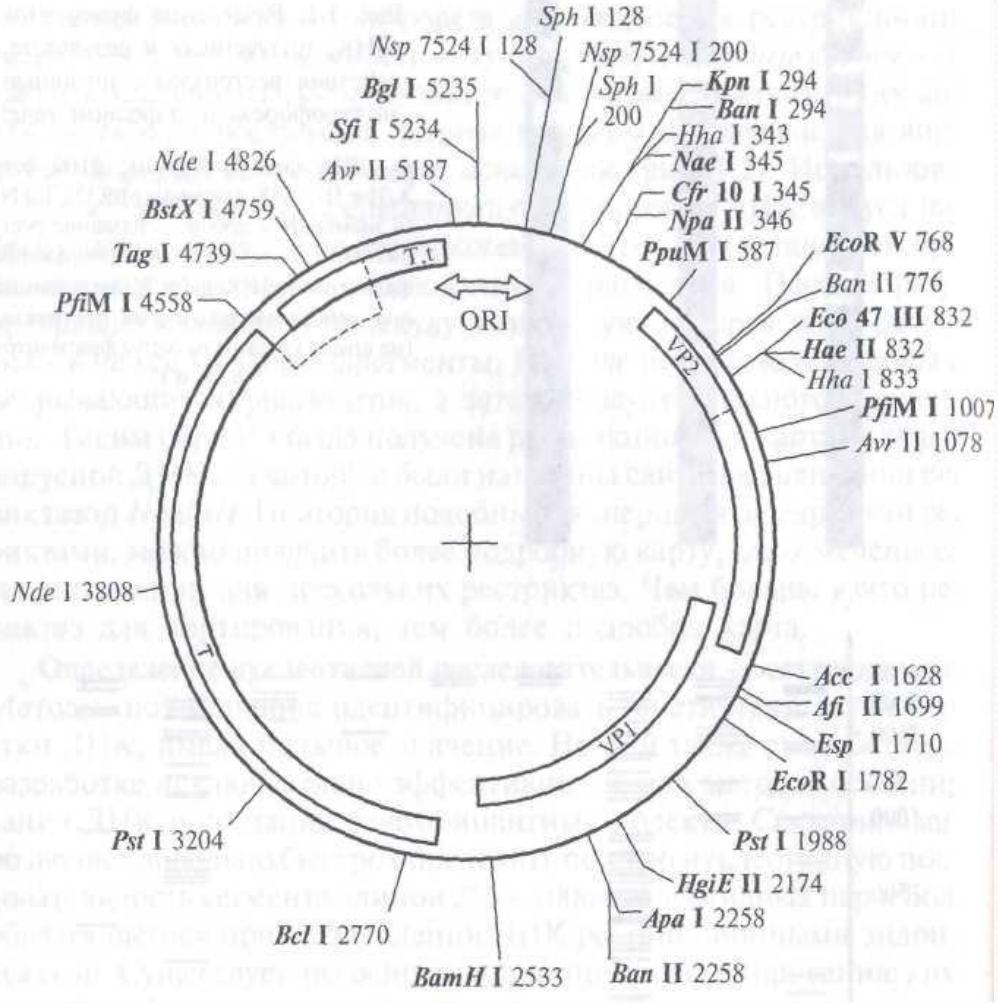
Eco R I 3’ CTTAA ↑ G 5’ Hpa II 3’ GGC ↑ C 5’

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., плазмида), 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.

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 BAC и YAC.

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;

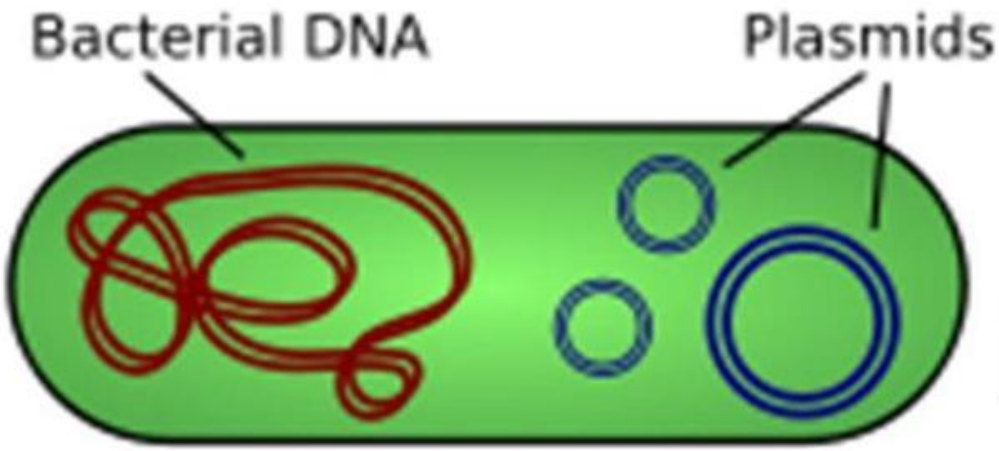
3) реплицироваться в определённых клетках за счёт имеющейся последовательности точки начала репликации (ориджина);

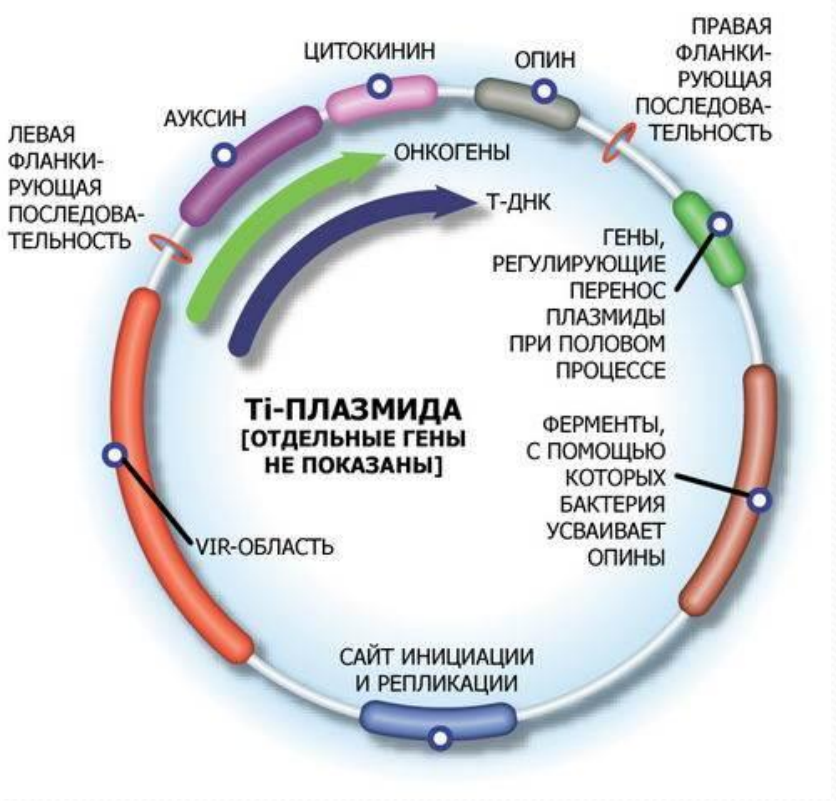
4)содержать последовательность маркерного гена, облегчающего селекцию клеток, несущих векторную конструкцию.

Типы векторов по профилю их использования:

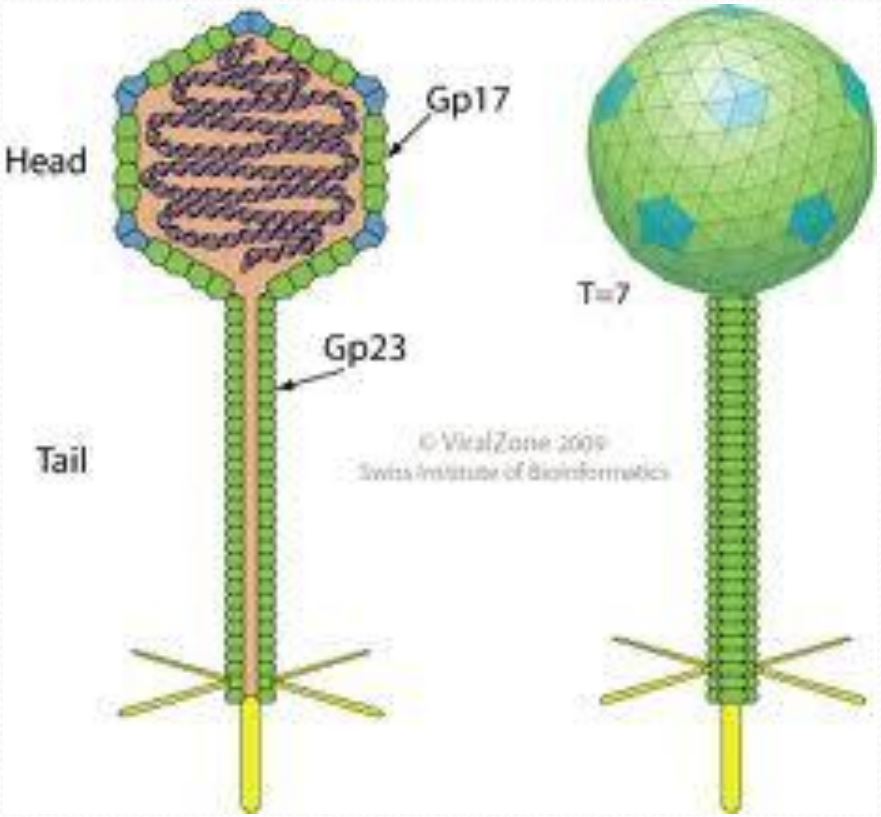
1. **Векторы для клонирования**
2. **Экспрессионные векторы**
3. **Векторы для трансформации**

Бактериальные плазмиды в качестве векторов для клонирования

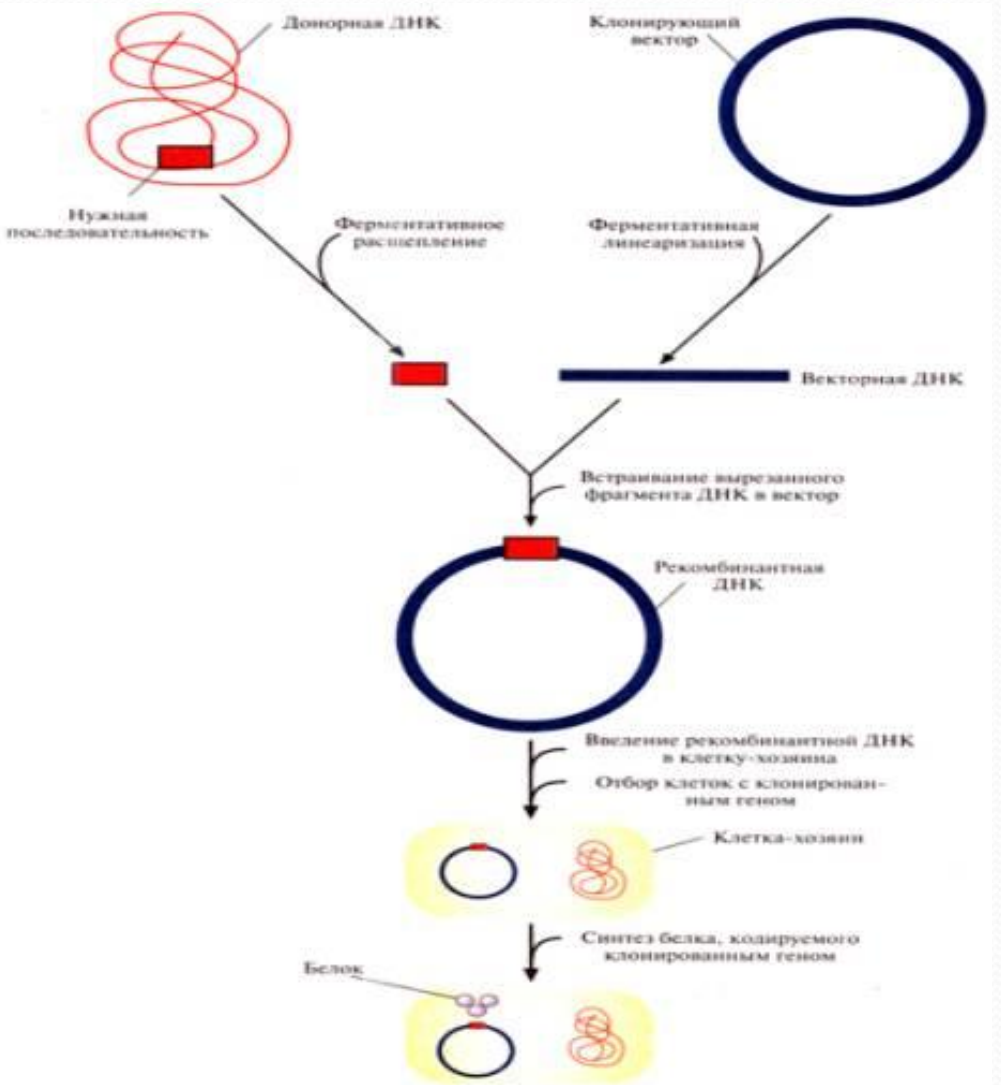




Фаговые векторы. Бактериофаг λ



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.



BAC-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.).

YAC-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°С 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.