БИОИНЖЕНЕРИЯ

«Когда я впервые услышал слово «биоинженерия», я подумал: «Вау, просто улет». Я дичайше угарел по этой теме, купил себе игрушечную змею и стал носить вместо шарфа».

Каменский Петр Андреевич
piotr.kamenski@gmail.com

Литература

1. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press.

2. N.King. **RT-PCR protocols**. Humana Press.

3. Д.В.Ребриков и др. **ПЦР в реальном времени**. Изд-во БИНОМ.

4. Д.В.Ребриков и др. **NGS: высокопроизводительное секвенирование**. Изд-во БИНОМ.

5. http://bitesizebio.com – отличный сайт с объяснением методологии работы с биомакромолекулами

Определение из Википедии:

Биоинженерия (включая инженерию биологических систем) — это применение понятий и методов биологии (и, во вторую очередь, физики (включая инженерию биологических систем) — это применение понятий и методов биологии (и, во вторую очередь, физики, химии (включая инженерию биологических систем) — это применение понятий и методов биологии (и, во вторую очередь, физики, химии, математики (включая инженерию биологических систем) — это применение понятий и методов биологии (и, во вторую оче ючая инженерию методов биологии (и форматики) для решени организмах (включая ин понятий и методов би очередь, ф ия актуальных проблем, св жениями, с использова ских систем) — орую очередь, ф ия актуальных проблем, св жениями, с использова ерию биологичес логии (и, во вторую очередь, физики, химии, математики и информатики) для решения

Определение специального для нашего курса, которое придумал я сам:

Биоинженерия – это практический раздел молекулярной биологии, изучающий способы работы с биологическими макромолекулами и направленного манипулирования ими.

Обратите внимание на слова «молекулярная биология».

Нет молекулярной биологии – нет биоинженерии.

Биоинженерия

Генная инженерия

(работа с генами в пробирке)
- Молекулярное клонирование
- Белковая инженерия

Геномная инженерия

(работа с геномами в живой клетке)
- Редактирование геномов

Изменение биологических макромолекул и, как следствие свойств живого

Общий методологический арсенал:
электрофорез, рестрикция, лигирование, трансформация, мутагенез, секвенирование, биоинформатика…

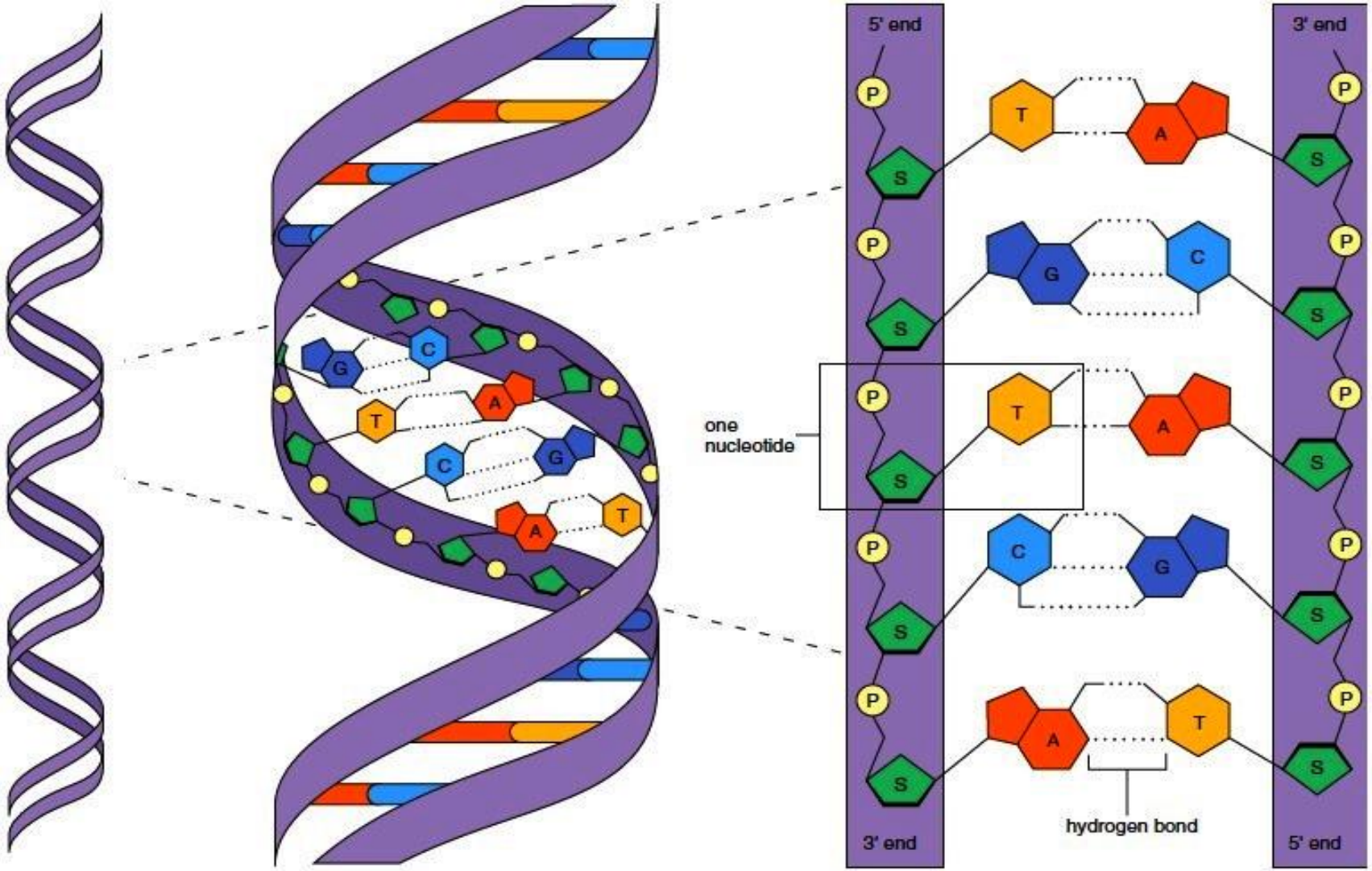
Центральная догма молекулярной биологии

(1958 год, Ф.Крик)

На самом деле все оказалось сложнее

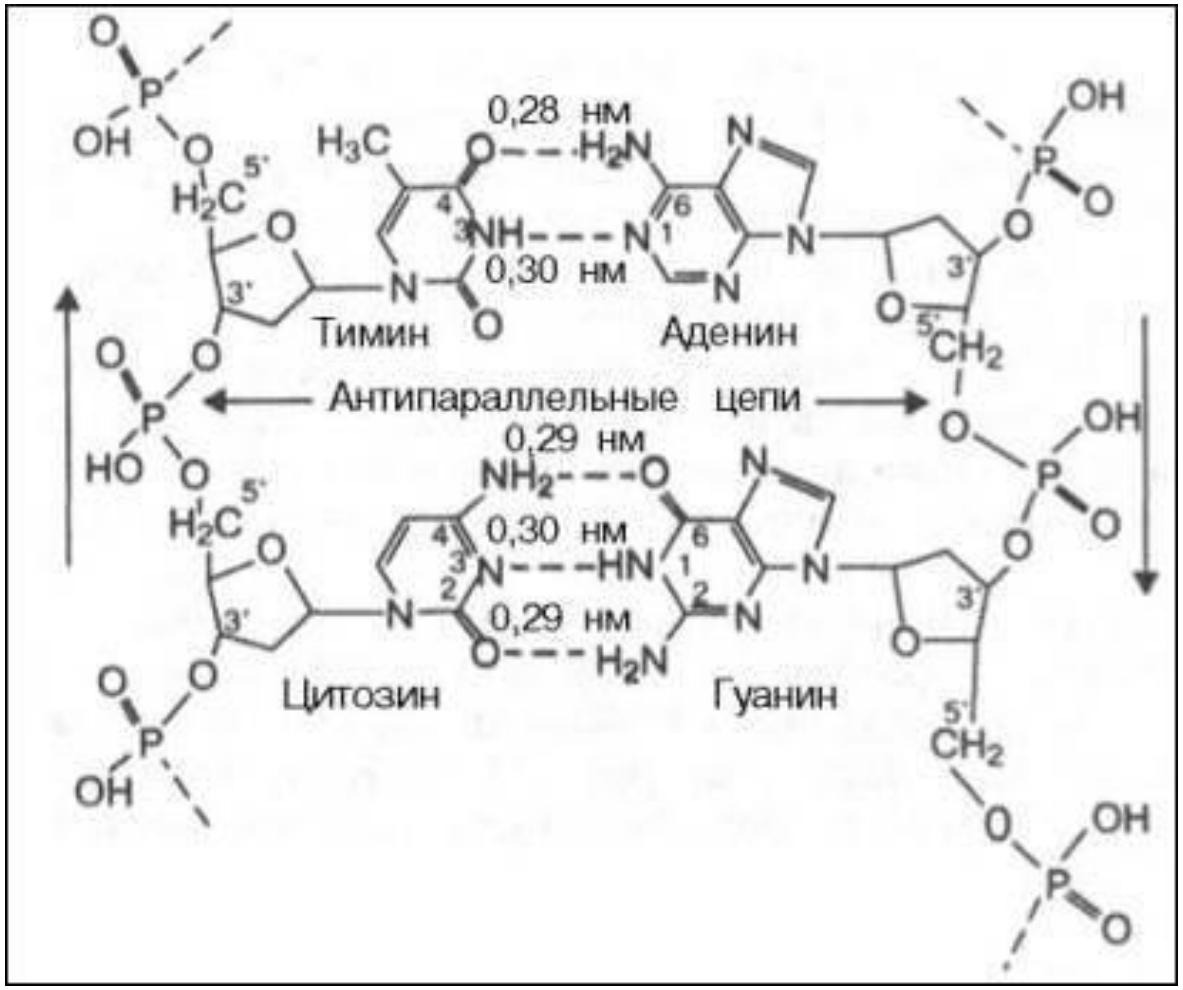
В любом случае, отсюда следует, что основным объектом биоинженерии является...

Дезоксирибонуклеиновая кислота!

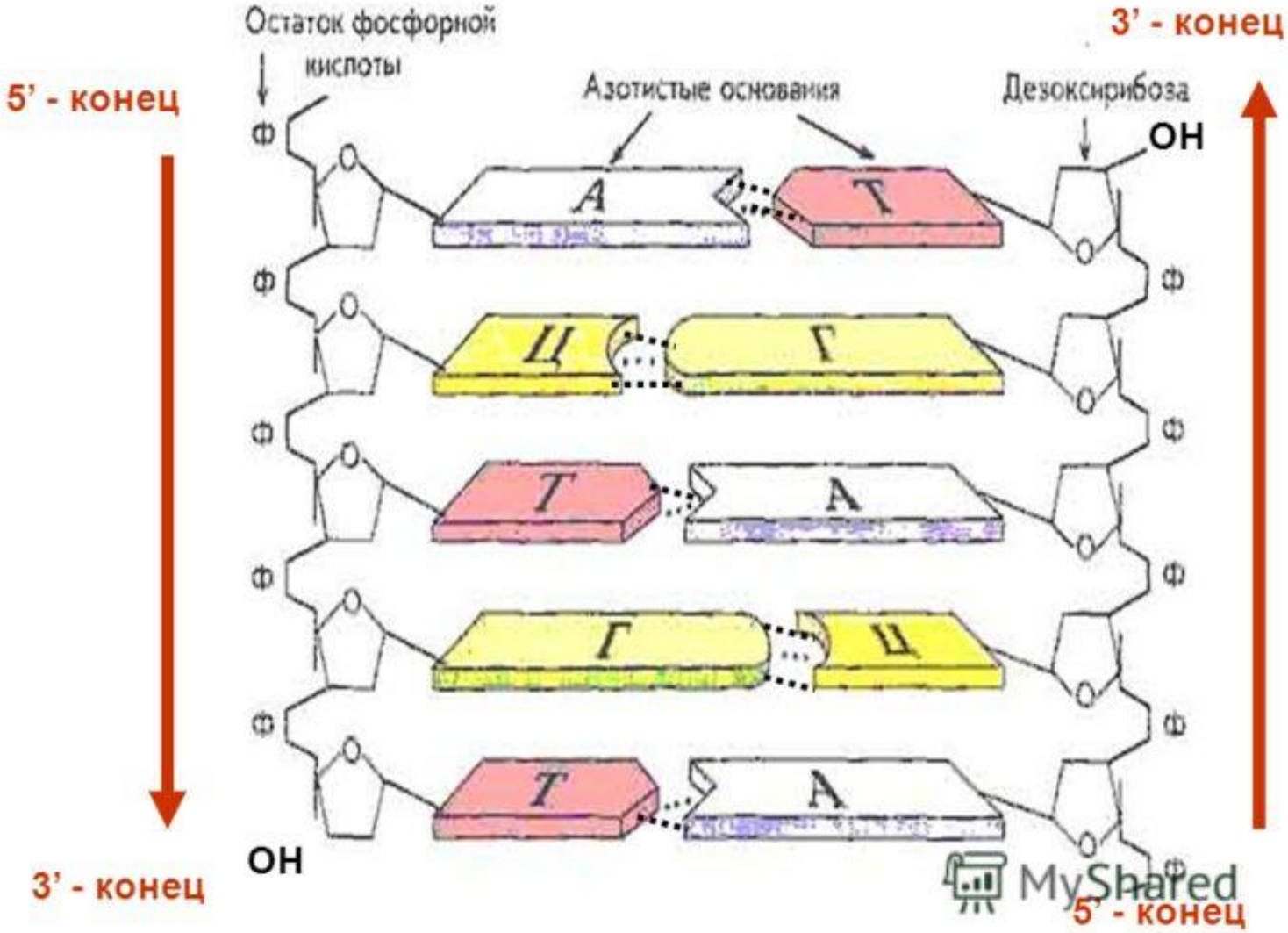


a. DNA double helix b. Complementary base pairing c. Ladder configuration

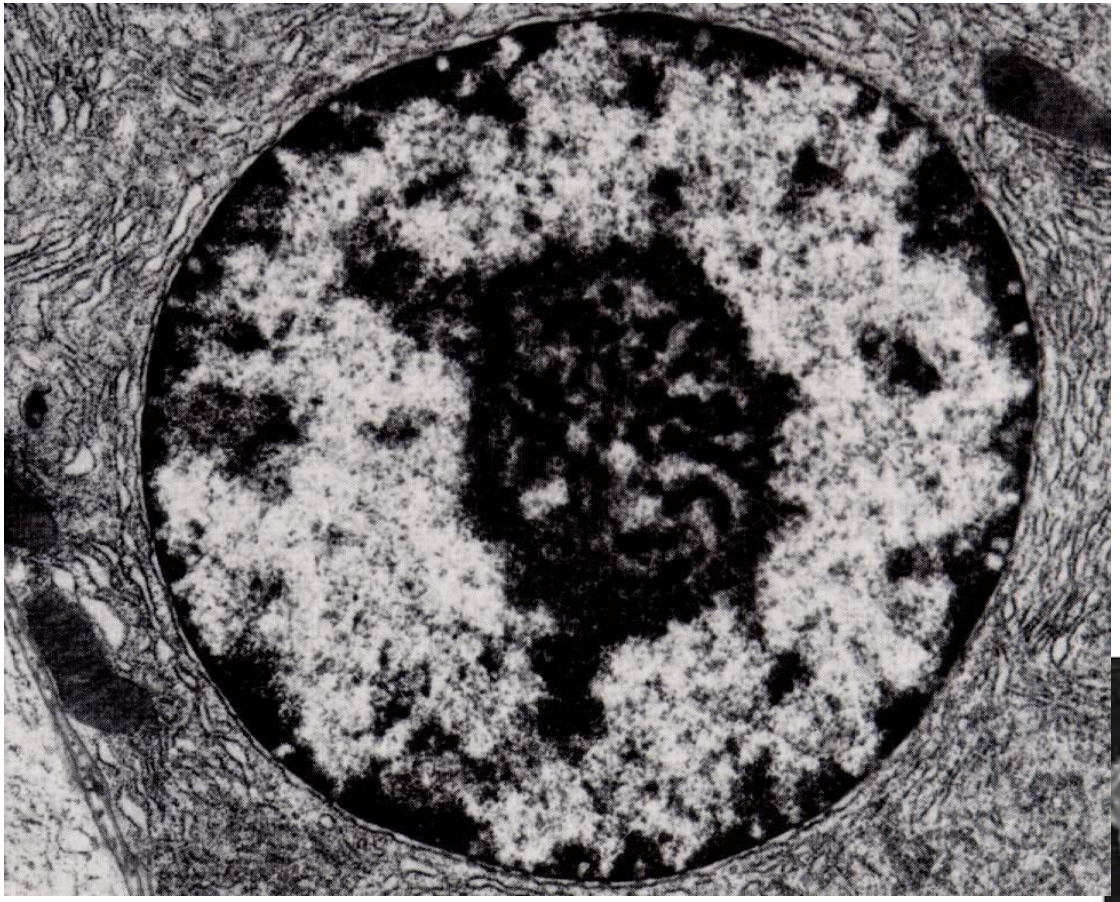
Принцип комплементарности цепей ДНК



Комплементарность и антипараллельность в строении ДНК

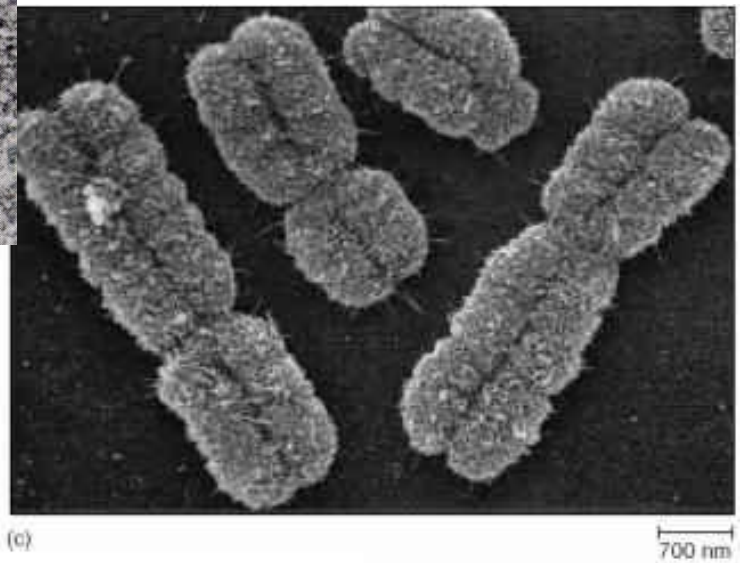


А вот как ДНК выглядит в клетке



Ядро

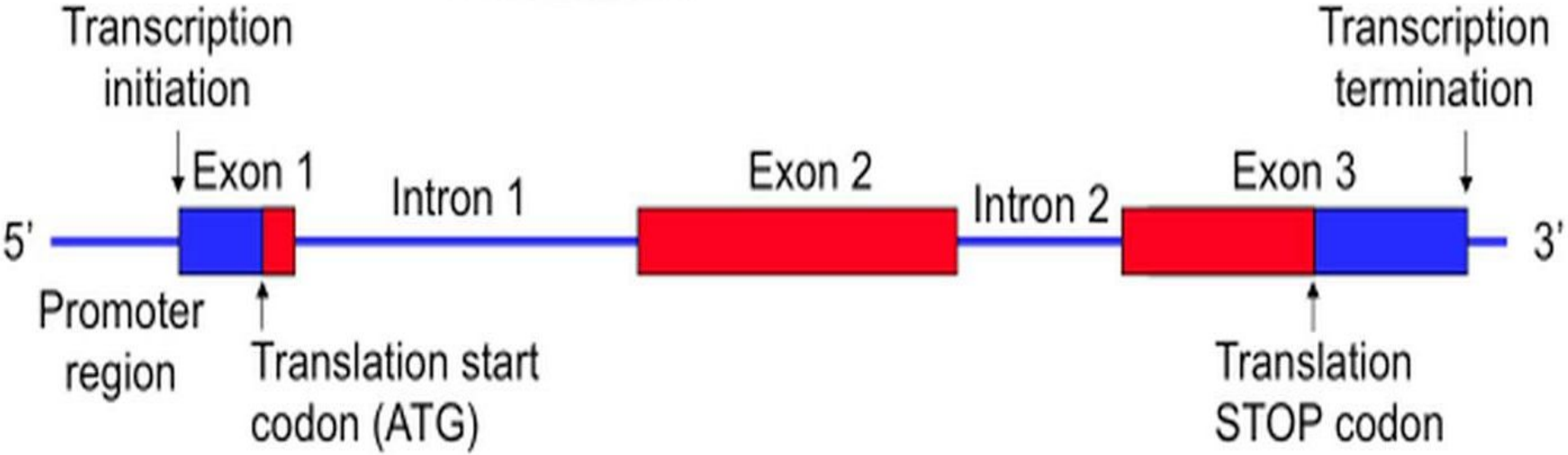
Хромосома



Ген (др.-греч. γένος — род) — структурная и функциональная единица наследственности живых организмов.

Биоинженерное определение: **ген** представляет собой участок ДНК, задающий последовательность определённой РНК.

(А почему не белок?)



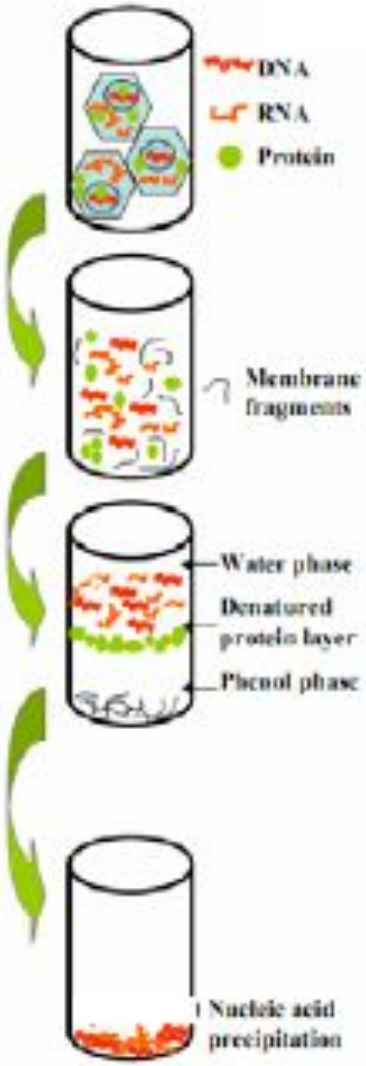
Первая биоинженерная эпоха: работа с генами

Что научились делать биоинженеры за время первой эпохи?

- «вынимать» ДНК из клетки – выделение и очистка нуклеиновых кислот,
- видеть ДНК глазами – электрофорез,
- «вынимать» нужные участки из ДНК - рестрикция,
- соединять несколько участков ДНК в один - лигирование, клонирование,
- «засовывать» ДНК в клетку - трансформация,
- многократно увеличивать количество нужного участка ДНК - ПЦР,
- определять нуклеотидную последовательность нужного участка ДНК - секвенирование,

- удалять участки ДНК из геномов,
- вставлять в геномы новые участки ДНК,
- заставлять один организм экспрессировать гены другого организма.

Выделение и очистка нуклеиновых кислот



В зависимости от типа ткани используются различные подходы к выделению нуклеиновых кислот, однако все они имеют общие стадии

1 шаг – лизис клеток и клеточных мембран

Клетки разрушают механически или с помощью ферментативной обработки. Мембраны разрушают с помощью обработки детергентами (SDS, ..) или хаотропными агентами (гуанидин изотиацианат)

2 шаг – удаление белков

Используют экстракцию белков смесью фенола, хлороформа, изоамилового спирта для создания белковой фракции

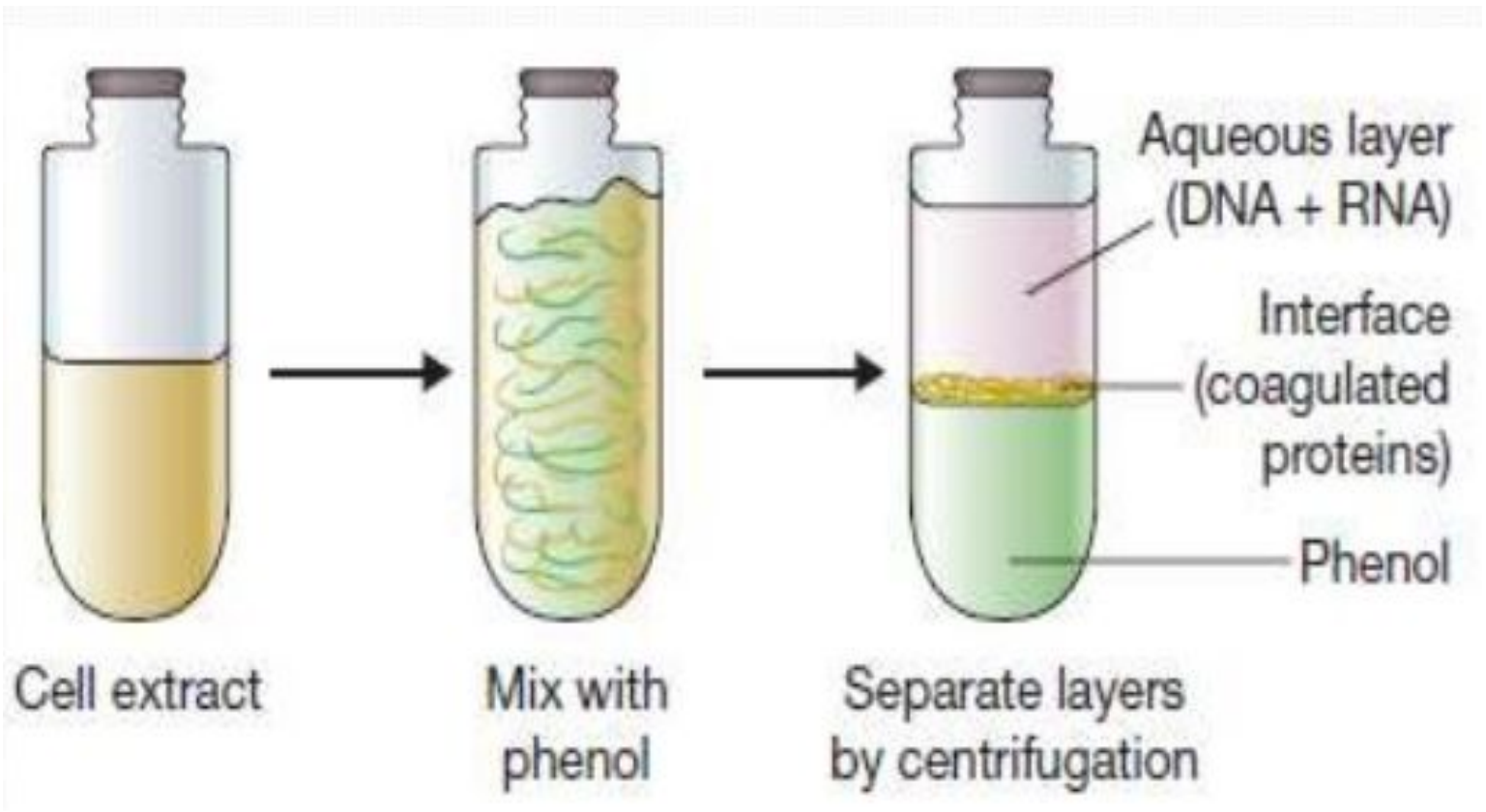
Фенол должен быть уравновешен буфером

3 шаг - получение концентрированной фракции нуклеиновых кислот

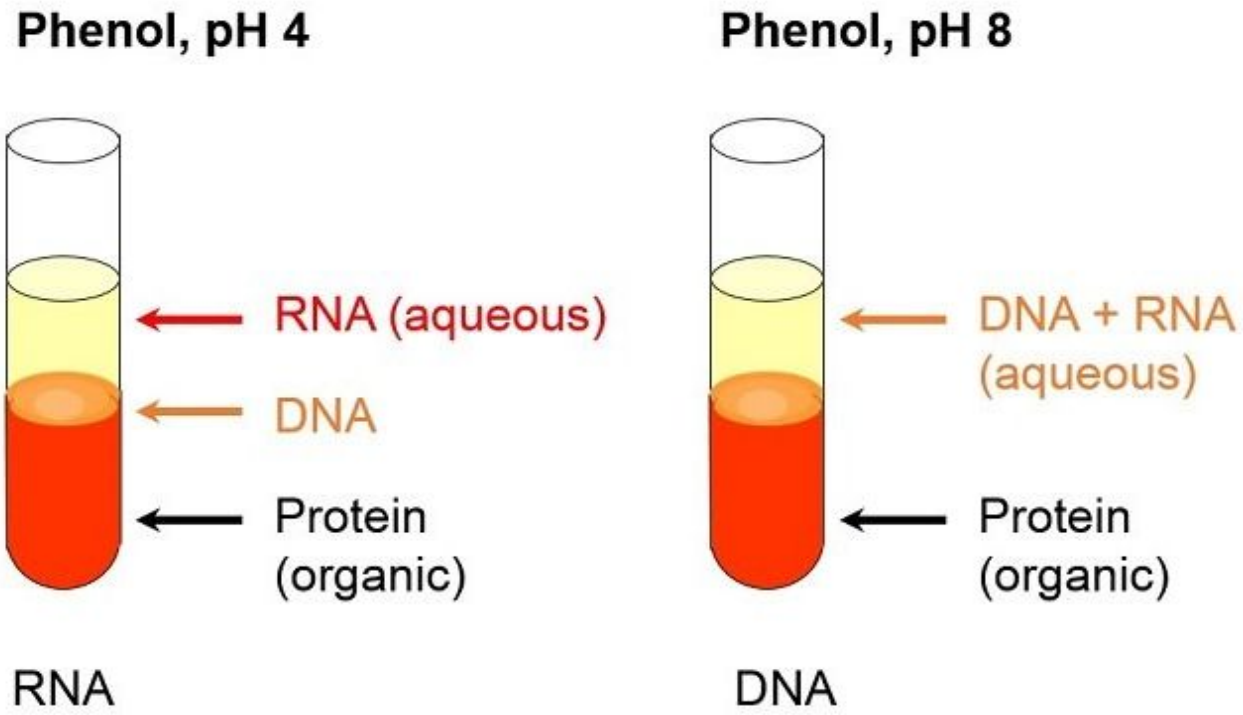
Используют (1) осаждение ДНК этанолом (изопрапанолом) в присутствии соли (ацетата натрия) с дальнейшим отделением осадка центрифугированием и растворением осадка или (2) адсорбцию ДНК на твердый носитель (стекло) с дальнейшей элюцией

Депротеинизация фенолом/хлороформом

ДНК/РНК гидрофильна*. Фенол гидрофобен. Белки содержат гидрофильные и гидрофобные химические группы.



Почему на предыдущем слайде была звездочка?

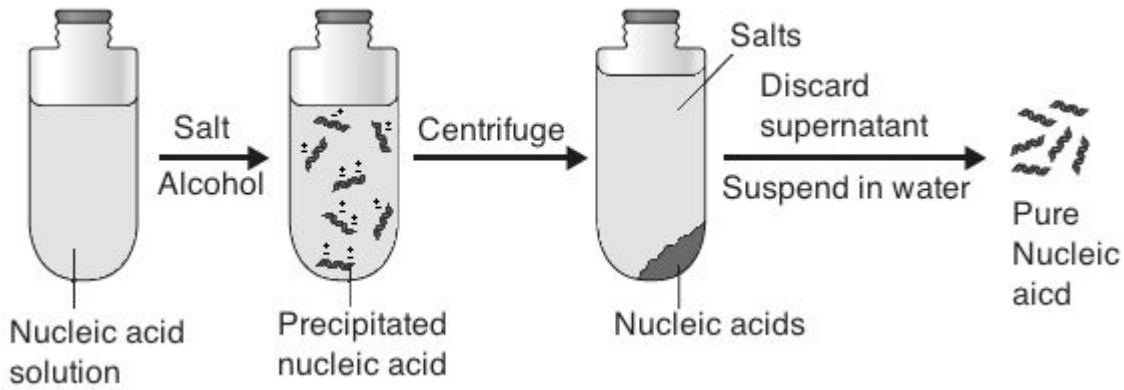


РНК более кислая, чем ДНК. При кислых pH РНК остается отрицательно заряженной и может гидратироваться, то есть по-прежнему гидрофильна. ДНК при кислых pH становится нейтральной. Она теряет способность к гидратации и становится гидрофобной.

Метод «кислого фенола» используется для выделения РНК.

Осаждение ДНК/РНК спиртами

(этанол, изопропанол)



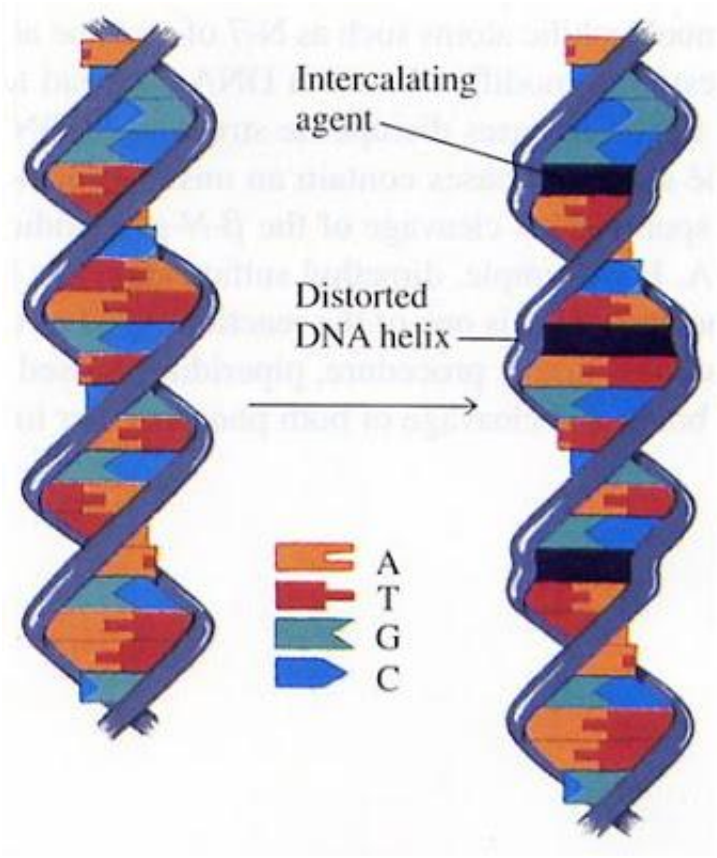
Соль (ацетат натрия) добавляется для того, чтобы ионы Na+ нейтрализовали отрицательные заряды фосфатных групп ДНК. Растворимость ДНК снижается. Однако вода обладает высокой диэлектрической константой, что не дает ионам Na+ как следует сблизиться с ДНК, и та остается растворимой.

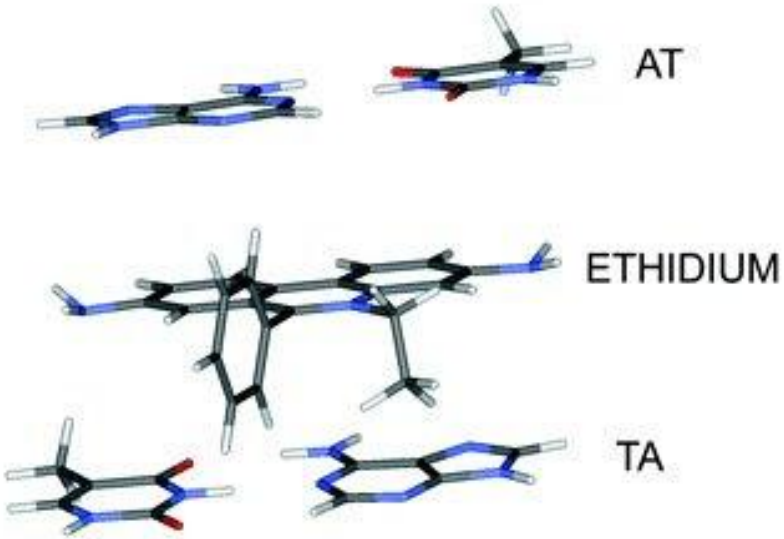
Спирт обладает значительно более низкой диэлектрической константой. Добавление достаточного количества спирта (около 70% минимум) приводит к усилению электростатического взаимодействия ионов Na+ с ДНК, что вызывает критическое снижение растворимости ДНК и еке выпадение в осадок.

Центрифугирование помогает сконцентрировать всю ДНК из образца в небольшом участке пространства.

Электрофорез

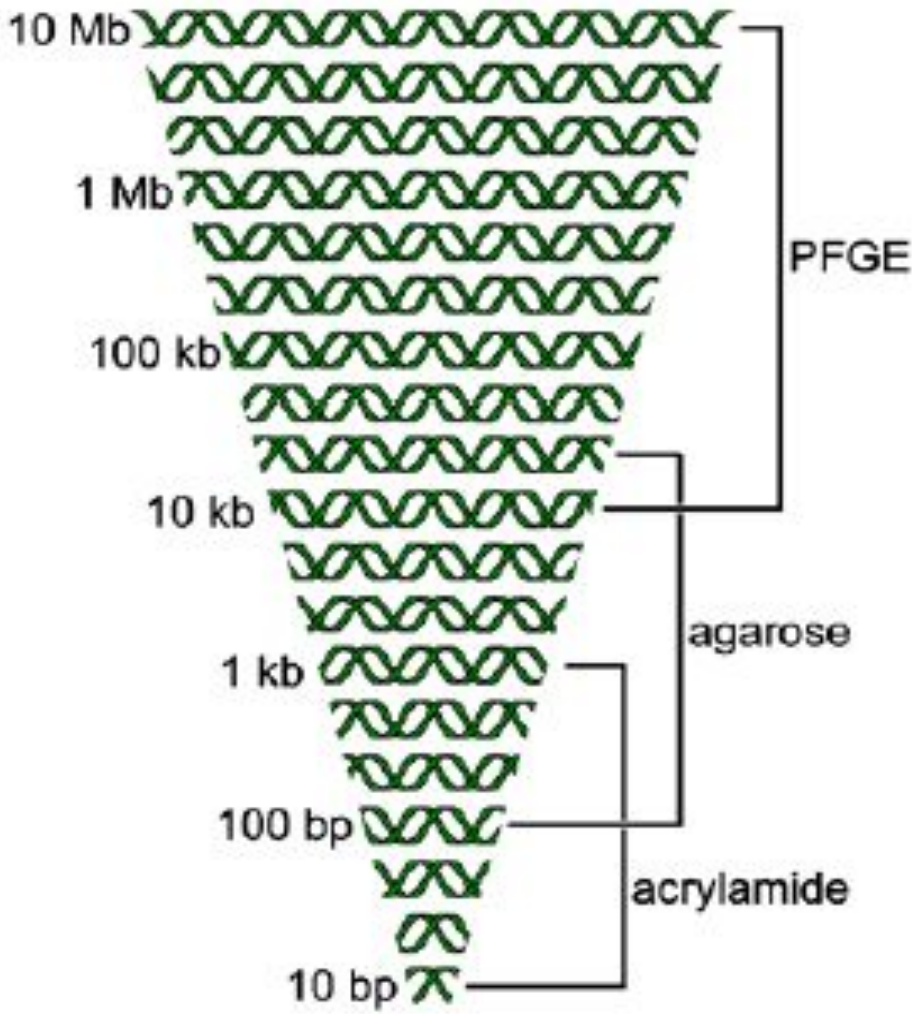
Нуклеиновые кислоты заряжены отрицательно. Если поместить их в гель с соответствующим размером пор и приложить электрическое поле, они начнут перемещаться сквозь поры, причем скорость их перемещения будет прямо пропорциональна заряду, то есть размеру.
Бромистый этидий интеркалирует между цепочками ДНК, возбуждается УФ-светом и испускает в видимом диапазоне (флуоресценция).





Красота-то какая!

Электрофоретическому разделению поддаются фрагменты ДНК самого разного размера



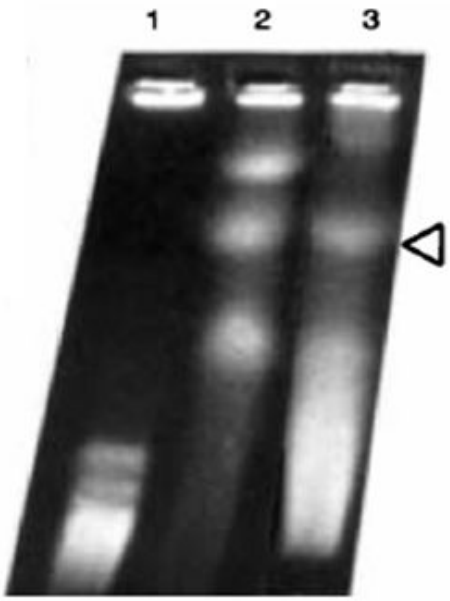
Разделение крупных фрагментов ДНК - электрофорез в импульсном электрическом поле

Разделение средних фрагментов ДНК электрофорез в агарозе

Разделение небольших фрагментов ДНК электрофорез в ПААГ

Пульс-электрофорез

При проведении обычного электрофореза все молекулы размером больше 50 т.п.н. движутся с одинаковой скоростью.
Пульс-электрофорез – движение молекул ДНК в геле под действием электрического поля с регулярно меняющейся направленностью. В этих условиях молекулы ДНК начинают «запаздывать», причем тем сильнее, чем больше молекула. В результате молекулы размером меньше 10 т.п.н. «убегают» слишком далеко, а более крупные молекулы, вплоть до 1,5 млн п.н., отлично разделяются.



Хромосомы дрожжей: 2 – *S. pombe*, 3 – *S. cerevisiae* самая большая хромосома ~1,5 м.п.н.