

# БИОИНЖЕНЕР



*Владимир, 21 год*

*Блогер, демократический журналист*



«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](mailto: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  
инженерию  
биологии (и  
для решени  
(включая ин  
методов би  
очередь, ф  
проблем, с  
использова  
систем) —  
очередь, ф  
проблем, с  
использова  
биологичес

очая  
методов  
форматики)  
[организмах](#)  
понятий и

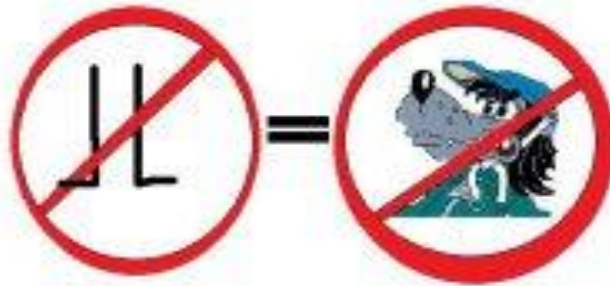
ия актуальных  
жениями, с  
ких  
орую  
ия актуальных  
жениями, с  
ерию  
логии (и, во

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

```
graph TD; A[Биоинженерия] --> B[Генная инженерия]; A --> C[Геномная инженерия]; B --> D[Изменение биологических макромолекул и, как следствие свойств живого]; C --> D; D --> E[Общий методологический арсенал: электрофорез, рестрикция, лигирование, трансформация, мутагенез, секвенирование, биоинформатика...];
```

## 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

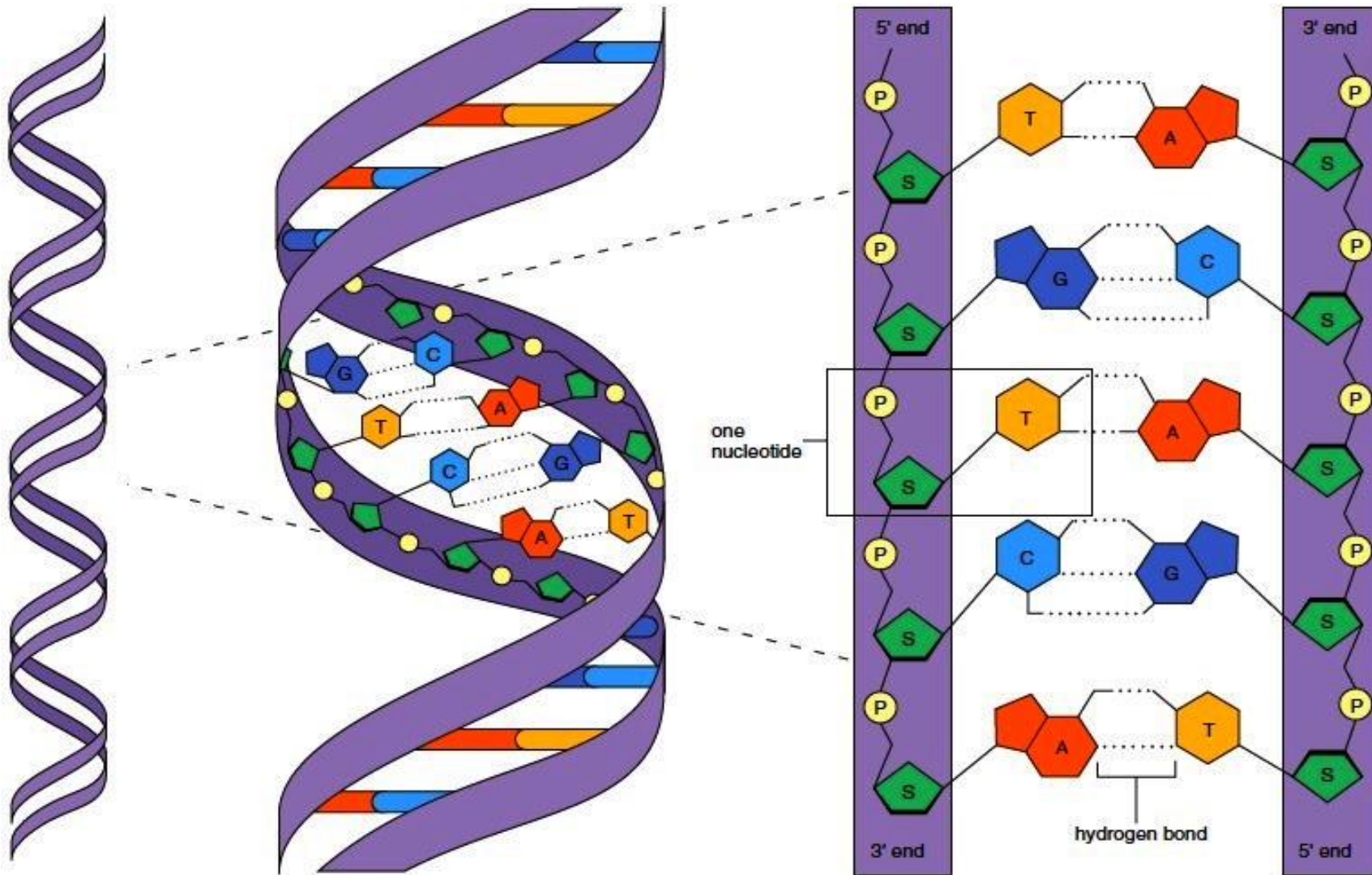


В любом случае, отсюда следует, что основным объектом биоинженерии является...





# Дезоксирибонуклеиновая кислота!



a. DNA double helix

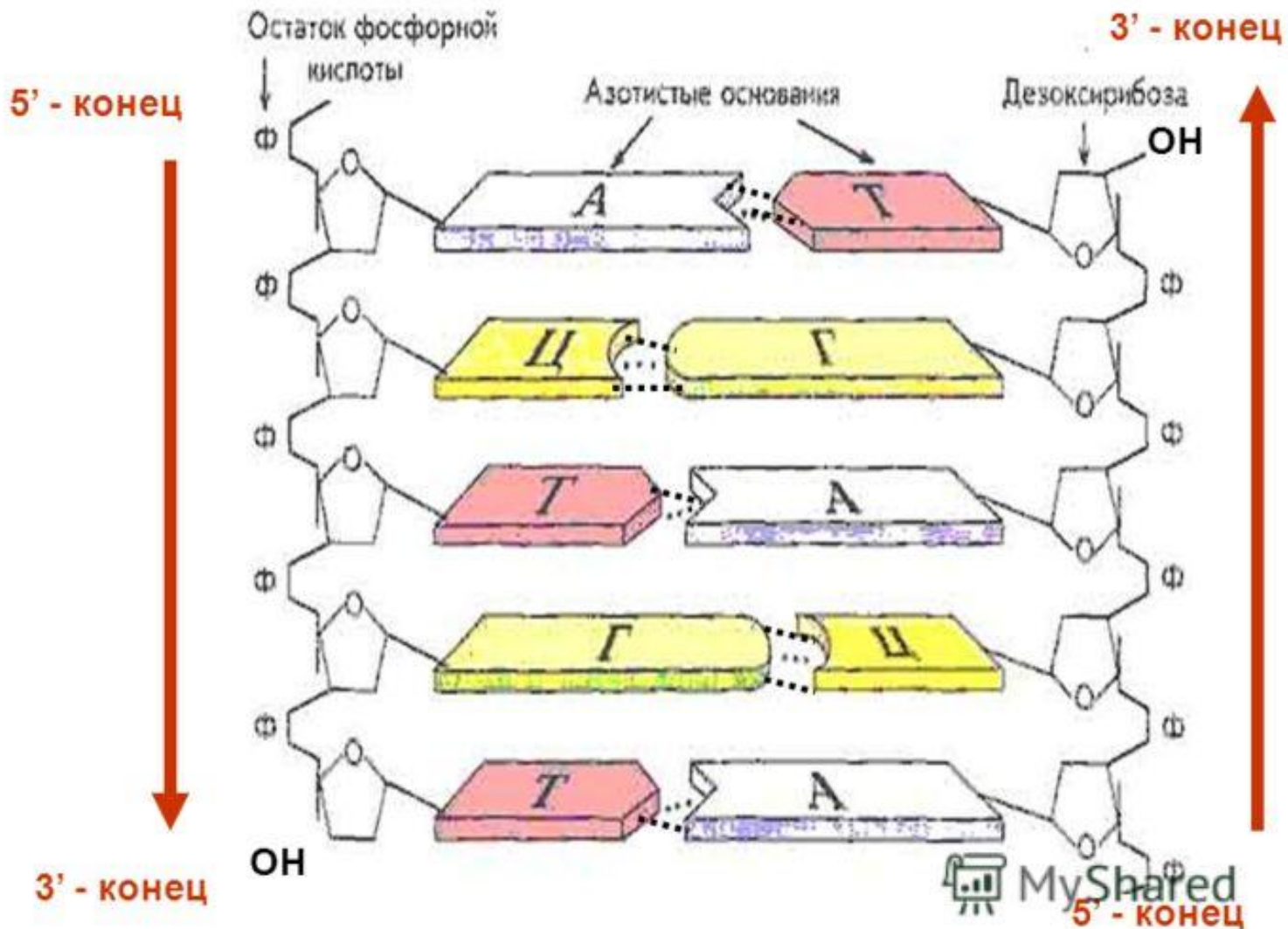
b. Complementary base pairing

c. Ladder configuration

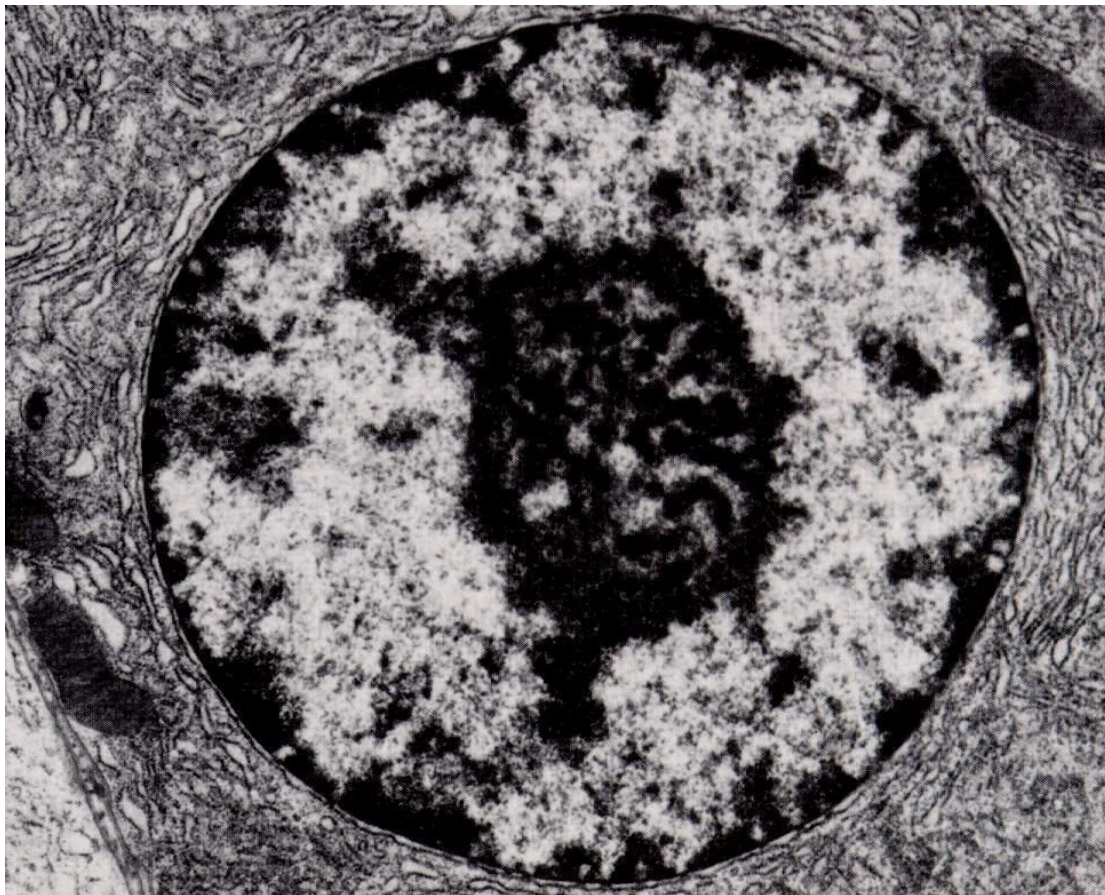




# Комплементарность и антипараллельность в строении ДНК

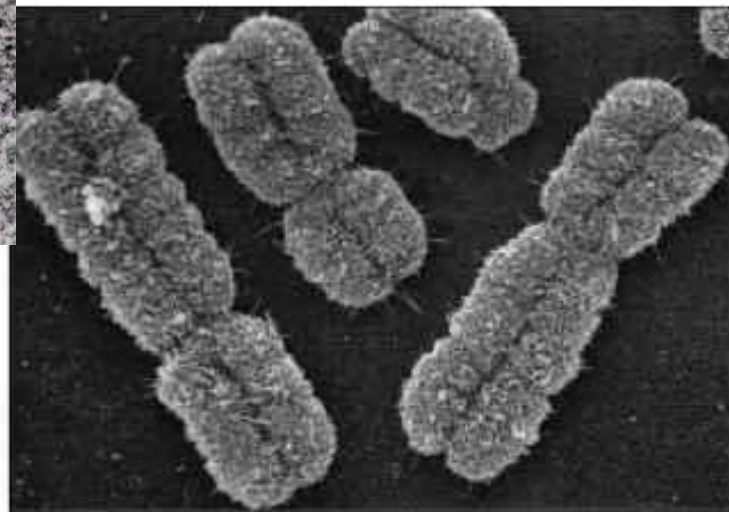


# А вот как ДНК выглядит в клетке



Ядро

Хромосома



(c)

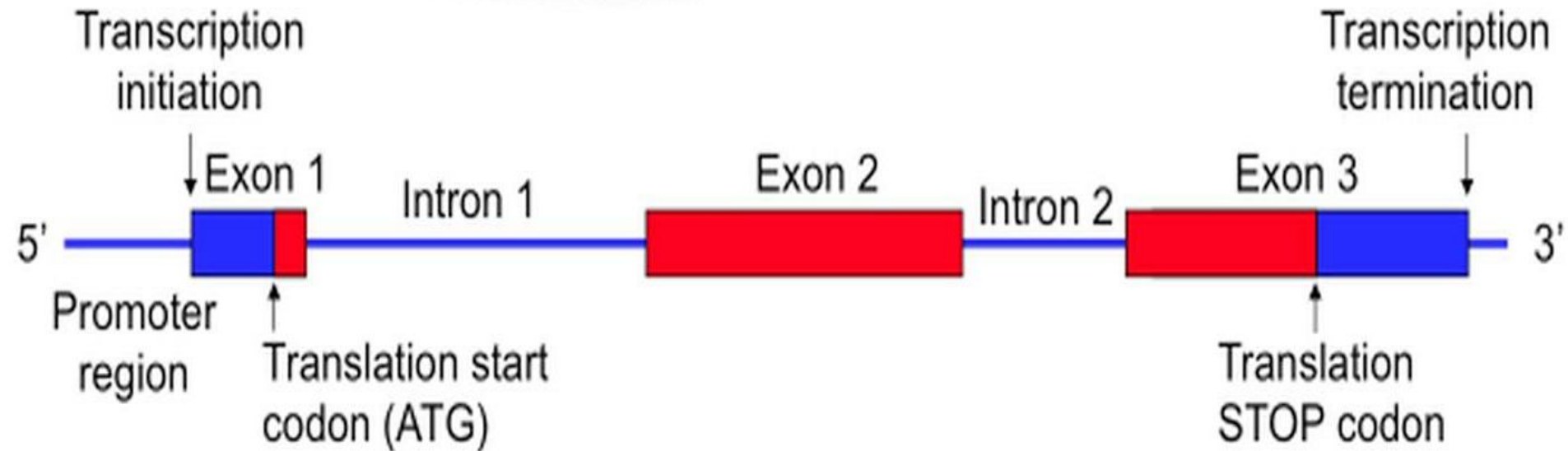
700 nm

**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?)



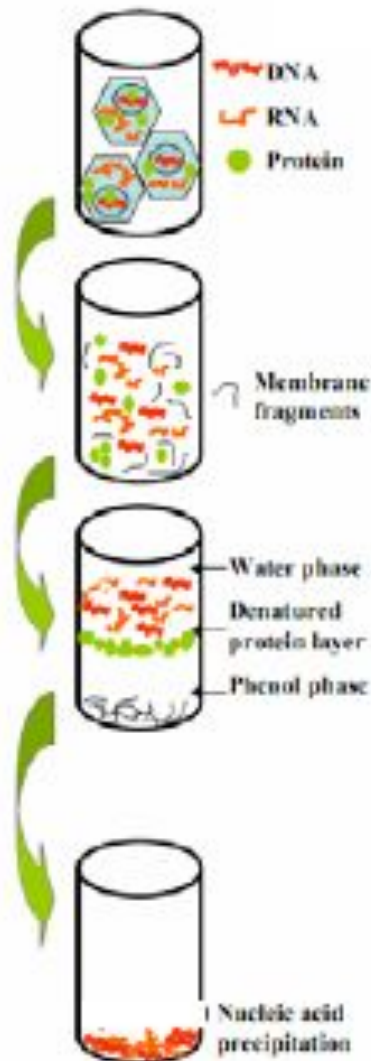


# Первая биоинженерная эпоха: работа с генами

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 изотиоцианат)

## **2 шаг – удаление белков**

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

Фенол должен быть уравновешен буфером

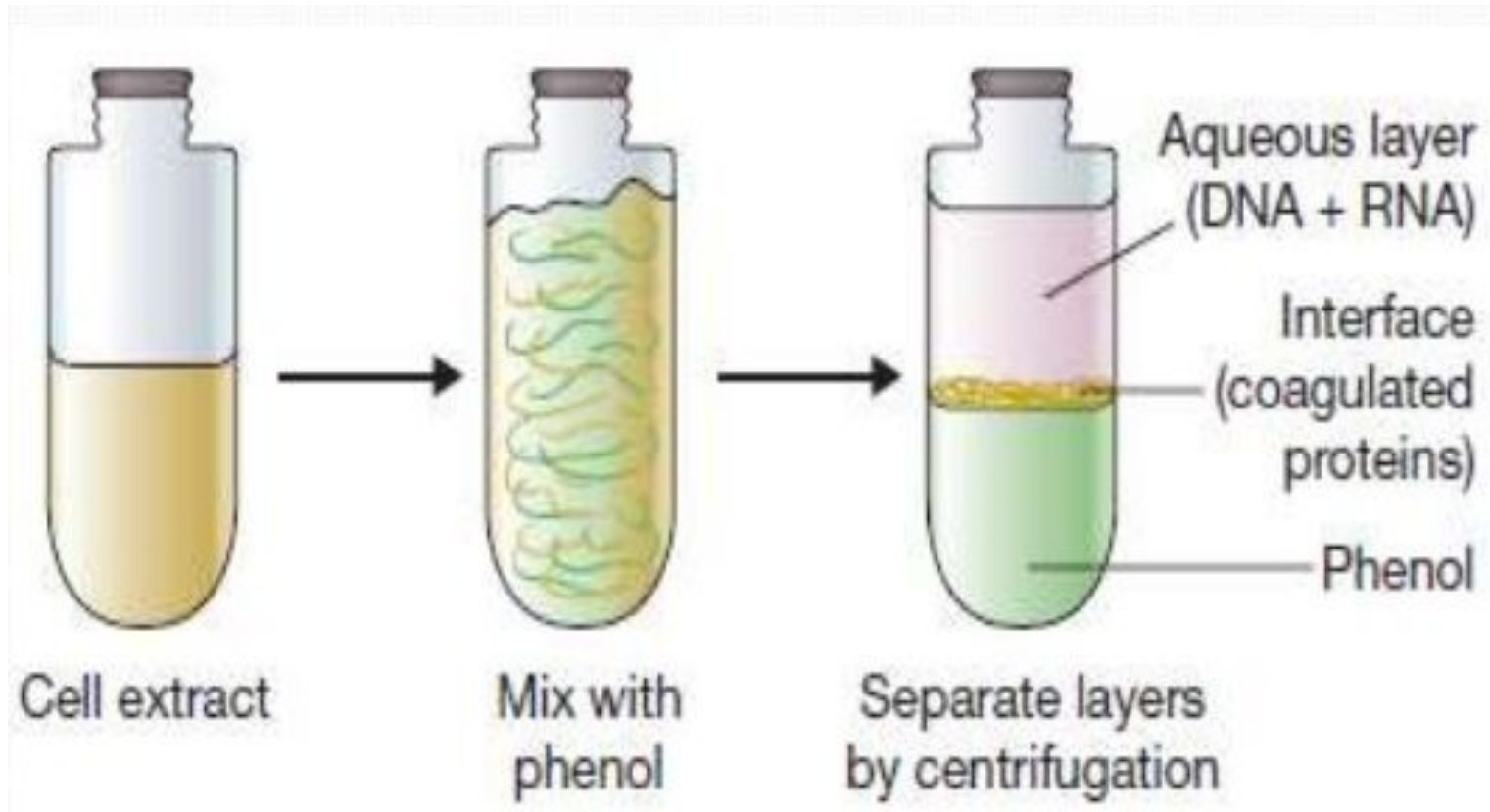
## **3 шаг - получение концентрированной фракции нуклеиновых кислот**

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

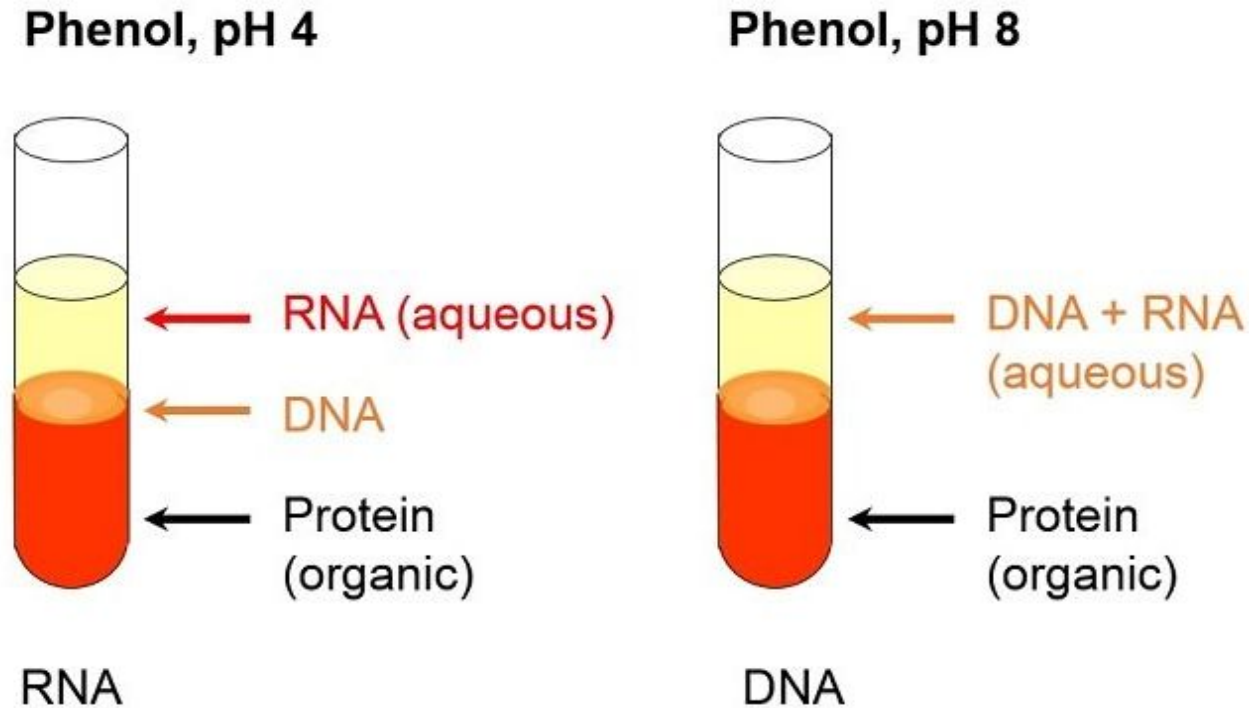


# Депротенинизация фенолом/хлороформом

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



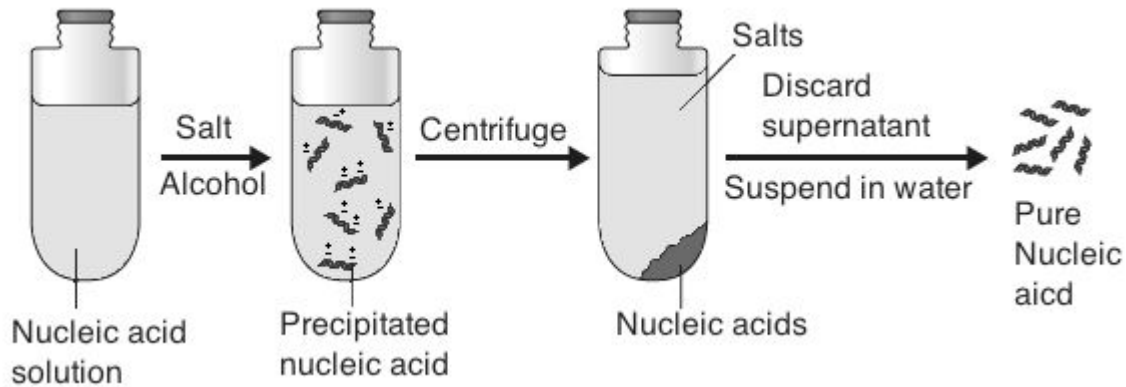
# Почему на предыдущем слайде была звездочка?



РНК более кислая, чем ДНК. При кислых рН РНК остается отрицательно заряженной и может гидратироваться, то есть по-прежнему гидрофильна. ДНК при кислых рН 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  $\text{Na}^+$  нейтрализовали отрицательные заряды фосфатных групп ДНК. Растворимость ДНК снижается. Однако вода обладает высокой диэлектрической константой, что не дает ионам  $\text{Na}^+$  как следует сблизиться с ДНК, и та остается растворимой.

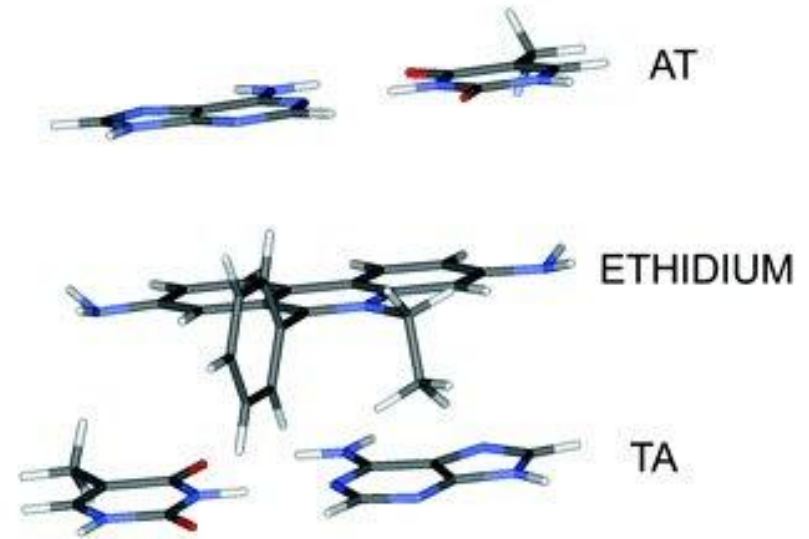
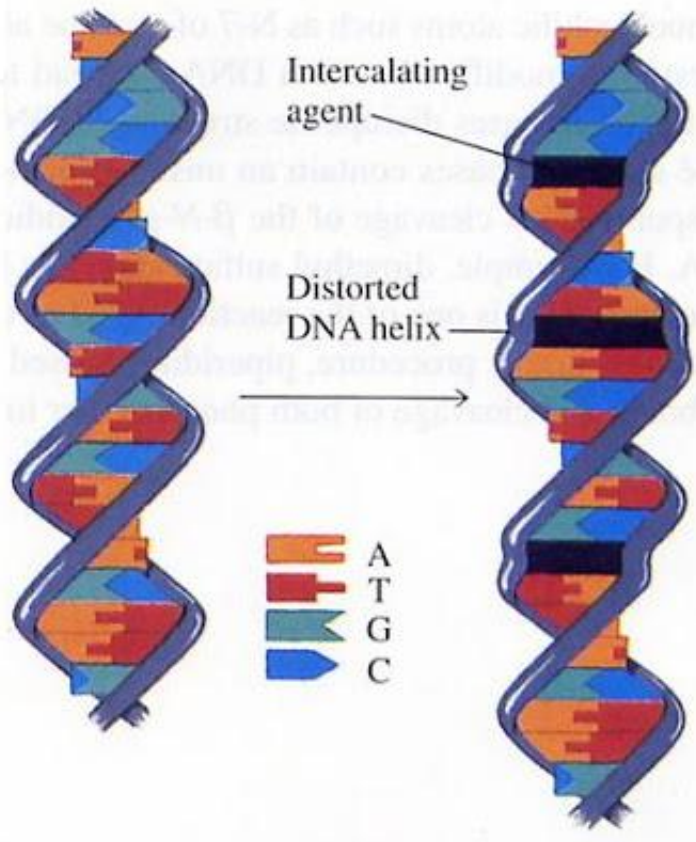
**Спирт** обладает значительно более низкой диэлектрической константой. Добавление достаточного количества спирта (около 70% минимум) приводит к усилению электростатического взаимодействия ионов  $\text{Na}^+$  с ДНК, что вызывает критическое снижение растворимости ДНК и ее выпадение в осадок.

**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).

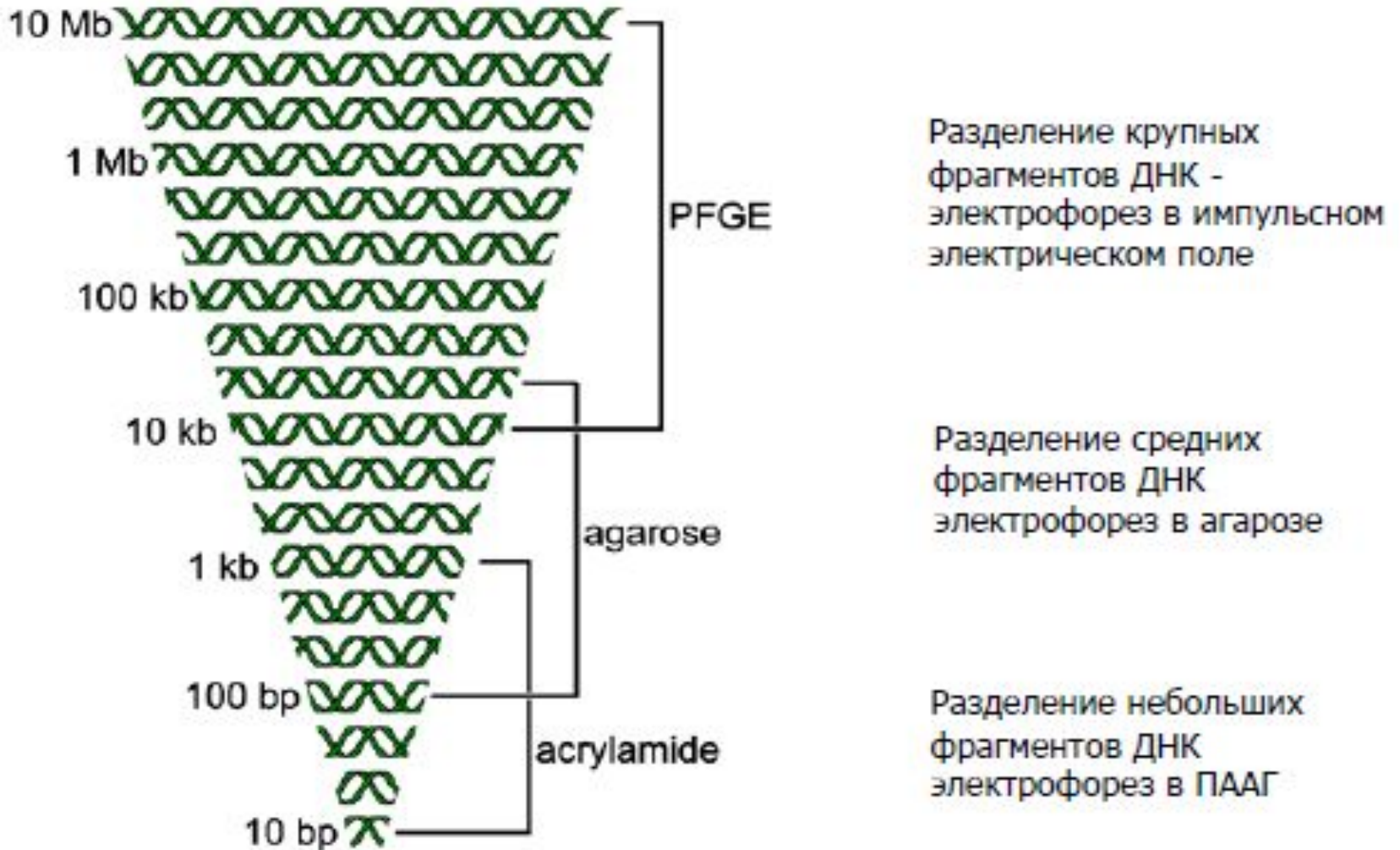


Красота-то какая!





# Электрофоретическому разделению поддаются фрагменты ДНК самого разного размера

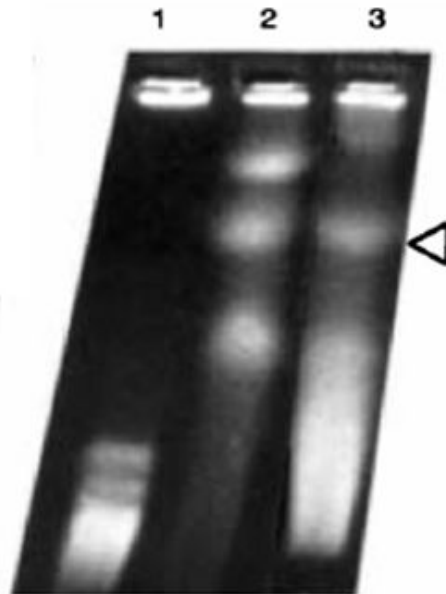




# Пульс-электрофорез

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.