

**Генетическая инженерия в
биотехнологии
Лекция № 7**

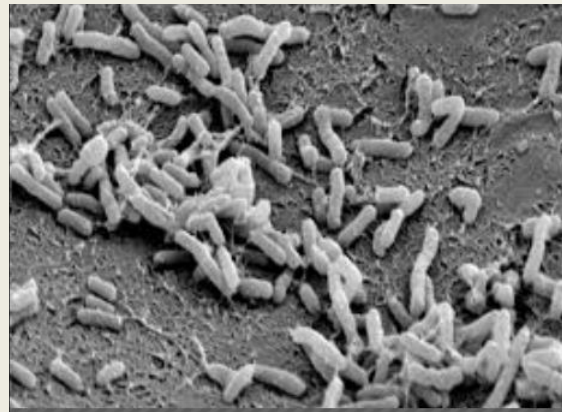


В 1983 году были опубликованы первые работы по получению трансгенных растений табака, которые содержали селективные маркеры устойчивости к вирусу табачной мозаики.

В 1994 году в США были получены первые официальные разрешения на коммерческую реализацию трансгенных сортов растений.



Растительные клетки не содержат плазмид. Для переноса генов в растения используют рекомбинантные векторы на основе Ti-плазмиды почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*



Agrobacterium tumefaciens – фитопатоген, который в процессе своего жизненного цикла трансформирует клетки растений. Это приводит к образованию **опухоли**, нарушающей нормальный рост растений. Причина – проникновение и интеграция в геном растений **агробактериальной Ti – плазмиды**.



Ti-плазмиды. Структура.



Ауксины

(индол-3-уксусная к-та)
- формирование корней, побегов, индукция соматического эмбриогенеза и пр.

Цитокинины

(кинетин) – » –
- ингибируют образование корней

Опины

(нопалин)
- производные аргинина

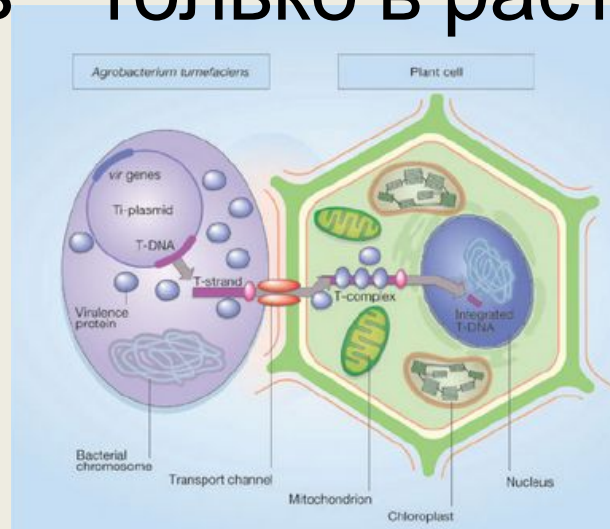
Размер от 200 т.п.н. до 800 т.п.н

Основные элементы:

1. Ori-область
2. Vir-область
3. Область Т-ДНК



Ti – плазмида содержит разнообразные уникальные гены. Часть этих генов экспрессируется только в бактериальных клетках, а часть – только в растительных.



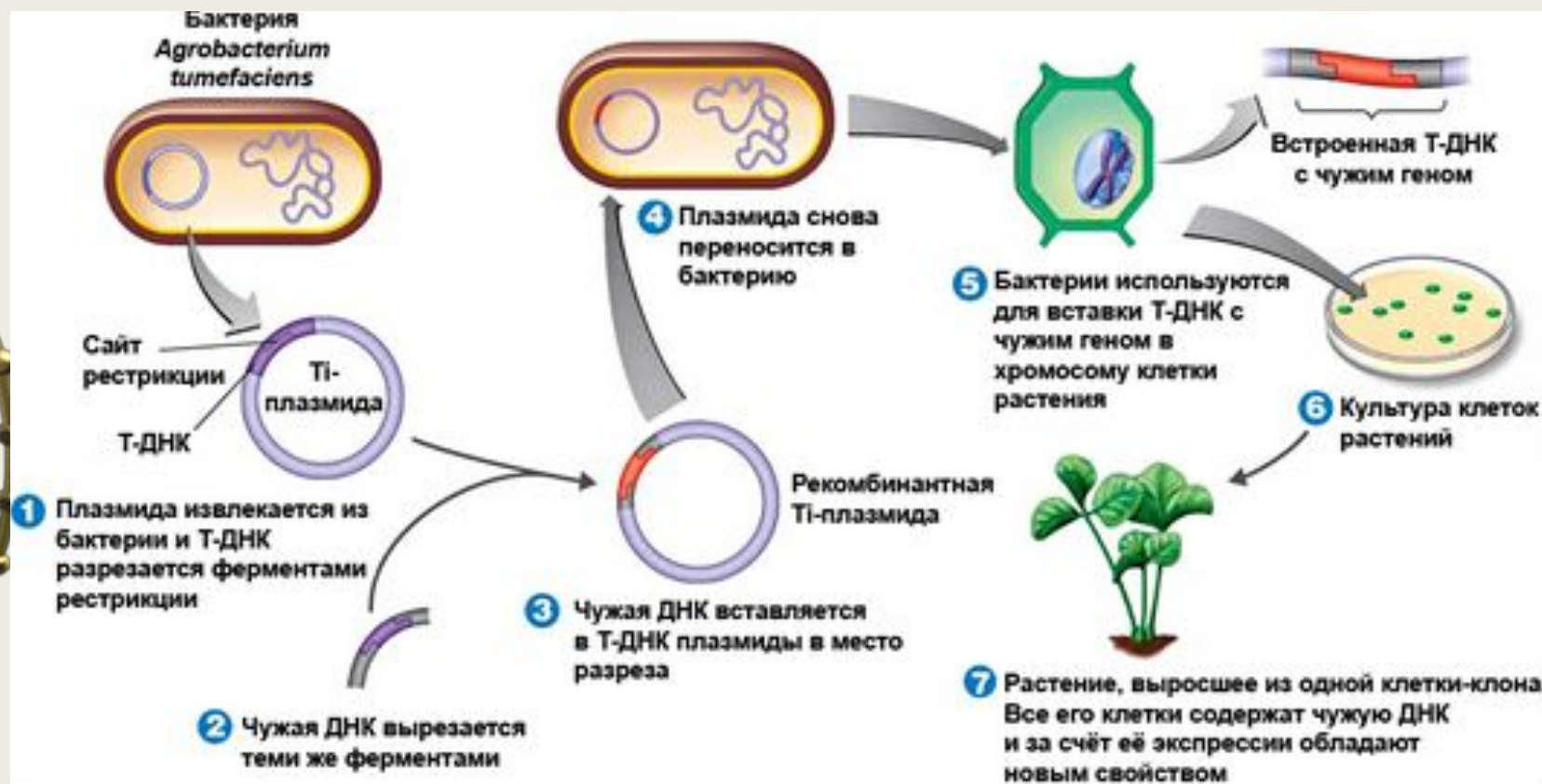
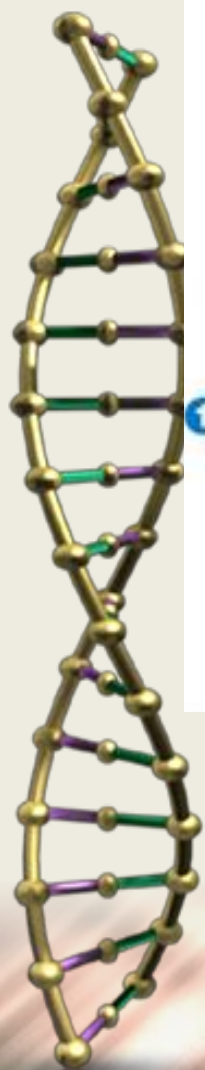
После прикрепления агробактерии к растительной клетке и активации механизма переноса с помощью пока ещё не известного механизма, который, возможно, аналогичен процессу бактериальной конъюгации, Т-ДНК переносится в растительную клетку и интегрируется в геном растения.





Существует два типа векторов на основе T_i –плазмид:

- **бинарный** (челночный вектор)
- **коинтегративный** (только в клетках *E.Coli*)



трансформация применима не
для всех видов растений. В
природных условиях
агробактериальной
трансформации подвержены
только двудольные растения
(виноград, фруктовые деревья,
розы и т.д.)



Однодольные растения, в число которых входят основные зерновые культуры (рис, пшеница, кукуруза), практически не трансформируются агробактериями. Для таких видов растений применяют метод прямого переноса ДНК в клетки.



Для прямого переноса генов в растительные клетки используются растительные протопласты. Обработка растительной клетки **целлюлазами и пектиназами приводит к гидролизу жёсткой клеточной стенки и в результате остаётся протопласт, окружённый только плазматической мембраной, проницаемой для ДНК.**



После трансформации протопласты восстанавливают клеточную стенку и затем из них также возможно регенерировать целые растения.

При проведении **электропорации** (создании пор в бислойной мембране под действием электрического поля) растительные протопласты помещают в раствор рекомбинантной ДНК высокой концентрации и действуют высоковольтным импульсом.



Для трансформации протопластов также применяется **метод микроинъекции ДНК** в ядро и **метод упаковки ДНК в липосомы**. **Биолистика – (бомбардировка микрочастицами)** второй по популярности метод трансформации растений и основной в случае однодольных растений.

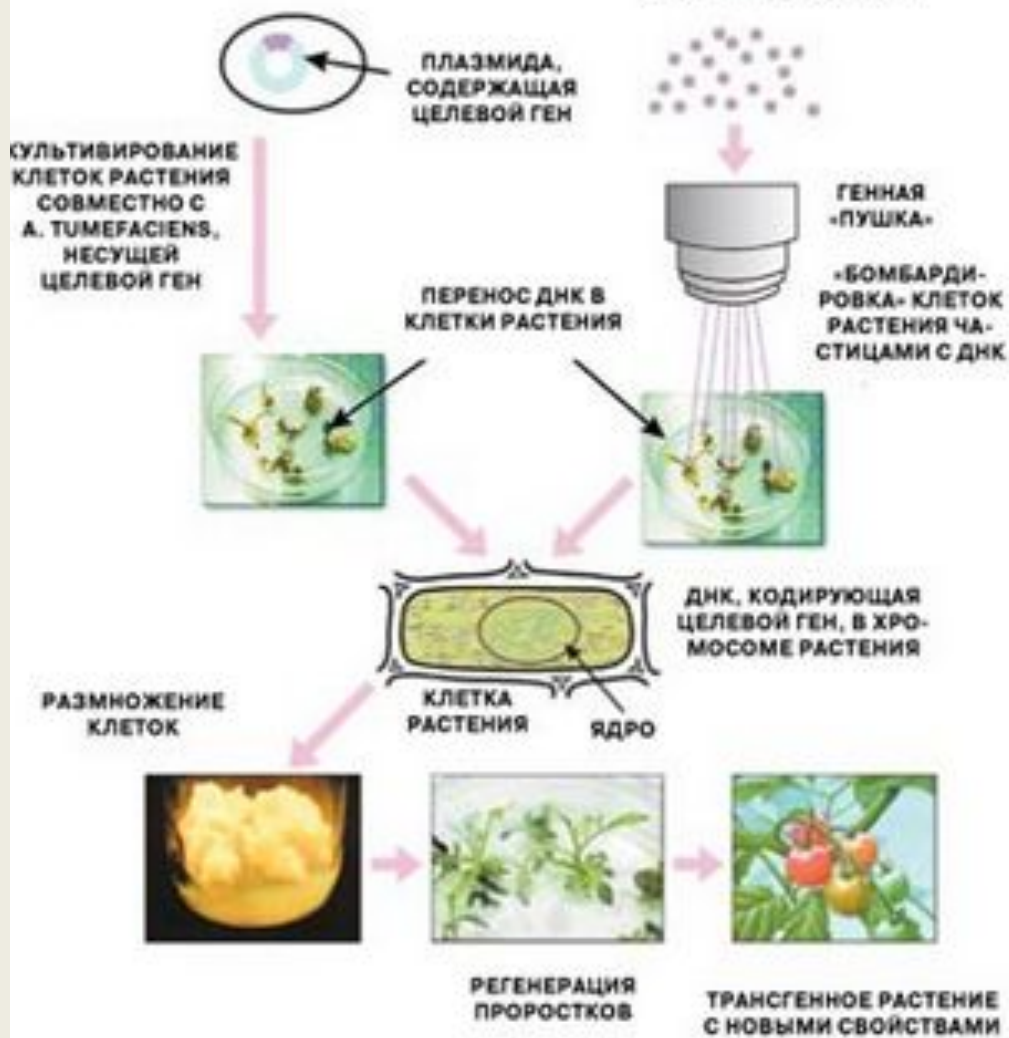


АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЙ МЕТОД

БАЛЛИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

ЧАСТИЦЫ, ПОКРЫТЫЕ ДНК, СОДЕРЖАЩЕЙ ЦЕЛЕВОЙ ГЕН



Векторы для растений можно
конструировать с помощью
фитовирусов. Вирусные векторы
чаще используют для получения в
клетках растений **ценных
рекомбинантных белков
нерастительного
происхождения**.



Эксперименты по генетической модификации животных требуют значительных затрат времени.

Трансгеноз – мощный инструмент для исследования молекулярных основ экспрессии генов млекопитающих и создания модельных систем, позволяющих изучать **болезни человека.**



Методы введения чужеродной ДНК в животные клетки:

1. Физические методы

(микроинъекция, электропорация,
слияние липосом).

2. При помощи векторов.



Для изучения экспрессии
перенесённых генов в
лабораторных условиях
используют животные клетки,
выращенные в **культуре**
перевиваемых клеточных
линий.



Стратегия получения трансгенных животных:

1. Клонированный ген в составе вектора вводят в ядро оплодотворённой яйцеклетки.
2. Далее яйцеклетку имплантируют в реципиентную женскую особь.
3. Отбирают потомков, которые содержат клонированный ген во всех клетках.
4. Скрещивают животных, которые несут клонированный ген в клетках зародышевой линии, и получают новую генетическую линию.

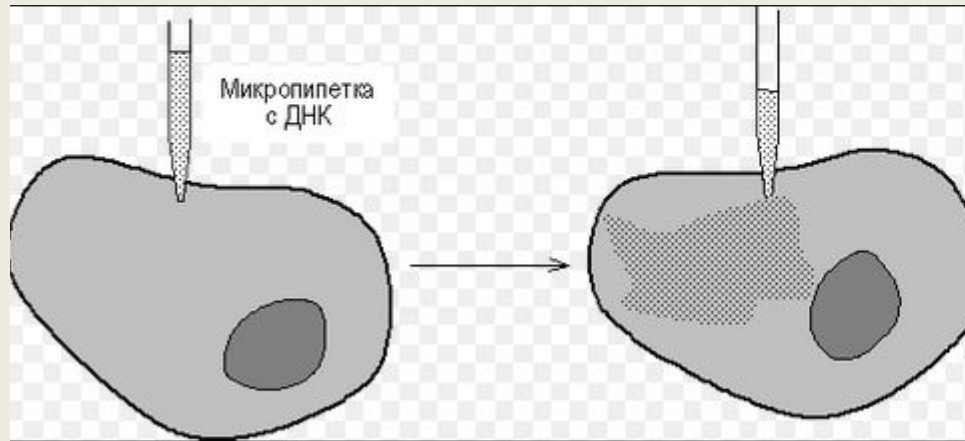




Основные схемы получения трансгенных животных:

1. Вектором на основе ретровируса животных инфицируют восьмиклеточный эмбрион, который потом имплантируется в самку. Этот способ считается наиболее эффективным.

2. Трансгенную конструкцию вводят путём инъекции в мужской пронуклеус оплодотворённой яйцеклетки, которая затем переносится в «суррогатную мать».





3. Стволовые клетки модифицируются в культуре, после чего их вводят в эмбрион на стадии бластоцисты.
4. Перенос клеток осуществляется при помощи дрожжевых хромосом. Это позволяет переносить несколько генов вместе с их собственными регуляторными последовательностями.

Вопросы, решаемые с помощью генетической инженерии:

1. Возможность точной диагностики и лечения многих заболеваний.
2. Повышение урожайности с/х культур.
3. Создание микроорганизмов, продуцирующих различные химические соединения и лекарственные препараты.
4. Создание пород животных с улучшенными признаками.
5. Переработка отходов.





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!