

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ

Лекция 5



Перспективы развития генетической инженерии



- 1
•Получение ДНК зондов для исследования структуры и функций и экспрессии генов
- 2
•Дальнейшее развитие «обратной генетики»: зная белок, выделяют и модифицируют, кодирующий его ген, и получают белок с новыми свойствами
- 3
•Развитие и совершенствование генной терапии: методологии лечения наследственных болезней
- 4
•Получение ГМО, трансгенных растений и животных с полезными для человека свойствами



ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

РЕКОМБИНАЦИЯ

Словарь



Рекомбинация – процесс реорганизации генома, обмен участками ДНК

Виды рекомбинационных событий



- Перетасовка хромосом в мейозе
- Случайный характер слияния гамет при оплодотворении
- Обмен фрагментами между гомологичными хромосомами

Классификация рекомбинационных явлений



**Гомологичная
(общая,
кроссинговер)**

- Основана на спаривании комплементарных цепей ДНК
- Требуется общая (по всей длине молекулы) гомология между рекомбинирующими участками

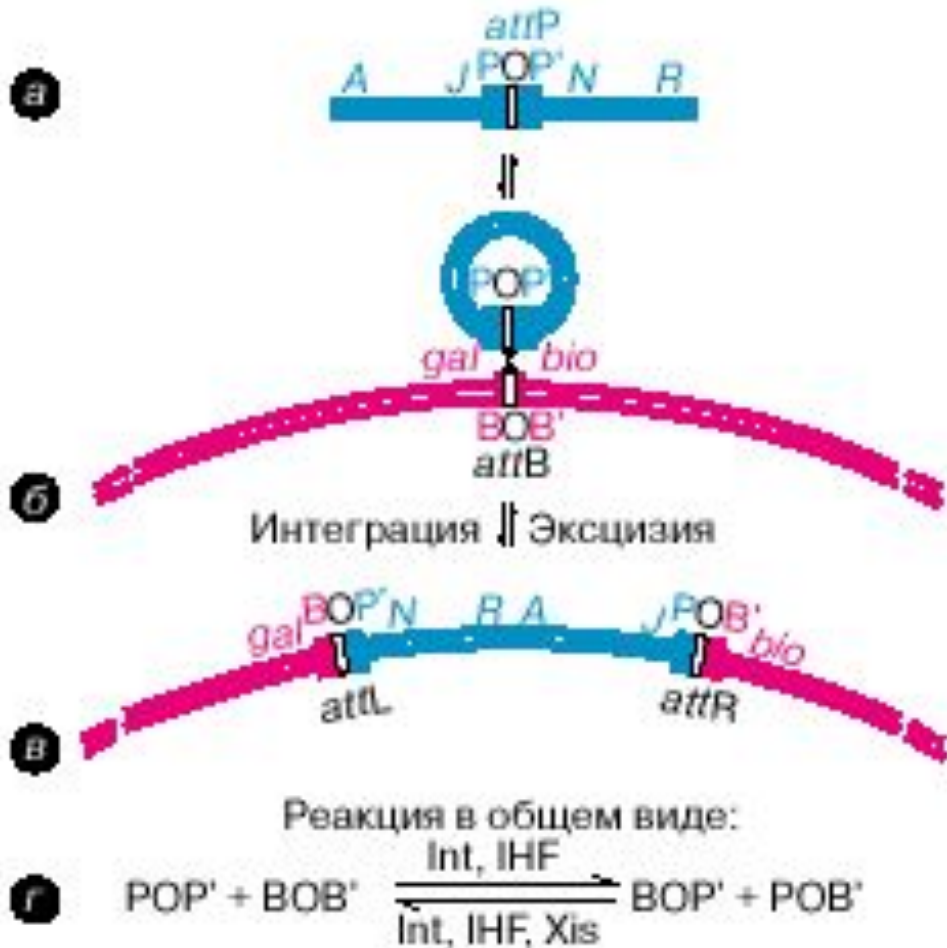
**Сайт-
специфическая**

- Происходит между последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков гомологии, обычно 15-30 п.н.

Незаконная

- это сборная группа процессов, где рекомбинация происходит без гомологии между молекулами ДНК

Схема сайт-специфической рекомбинации бактериофага лямбда



А) линейная (вирионная) ДНК фага

Б) ДНК фага после инфекции в *E. coli* замыкается в кольцо, и находящийся в ней сайт attP вступает в рекомбинацию с сайтом attB в хромосоме бактерии

В) продукт рекомбинации - профаг в составе хромосомы бактерии

Г) запись процесса рекомбинации в общем виде



ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

РЕКОМБИНОГЕНЕЗ

Методы селекции

СОВРЕМЕННЫЕ



РЕКОМБИНОГЕНЕЗ

позволяет кардинально изменять живые организмы на генетическом уровне, вплоть до создания **НОВЫХ ВИДОВ** с новыми заданными свойствами

Клеточная инженерия

*культивирование
гибридизация
реконструкция*

Белковая инженерия

*рациональный дизайн
направленная эволюция*

Генетическая инженерия

*метод рекомбинантных ДНК
или
молекулярное клонирование*

Открытие явления трансформации



1928 г.

открытие явления трансформации



Фредерик
Гриффит

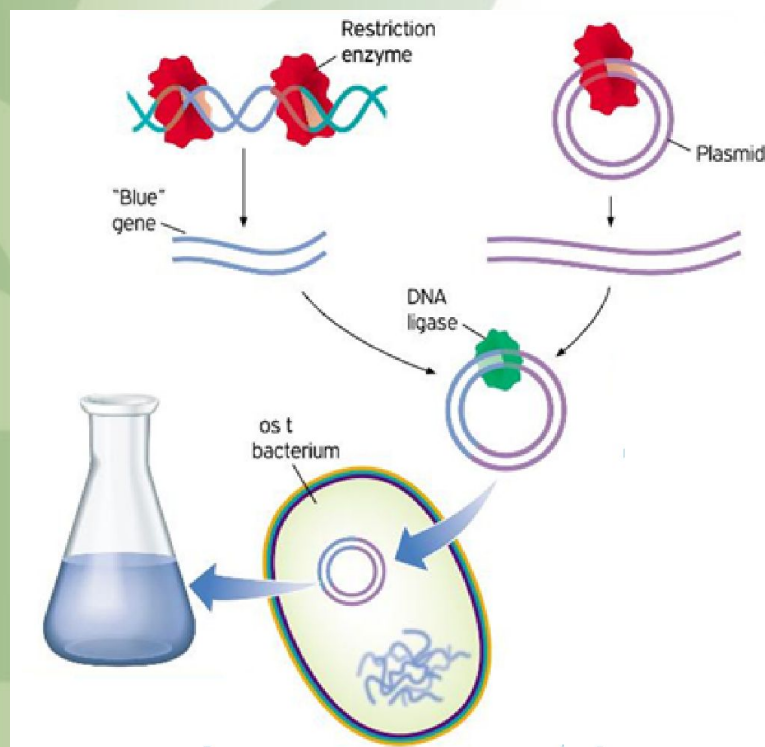
Streptococcus pneumoniae – пневмококки.
Бактерии, вызывающие пневмонию.

1. Капсульный S-штамм – патогенный
2. Бескапсульный R-штамм – непатогенный

Генетическая инженерия или молекулярное клонирование



Метод создания новых генетических программ путем конструирования и внесения новой генетической информации в уже существующие живые организмы

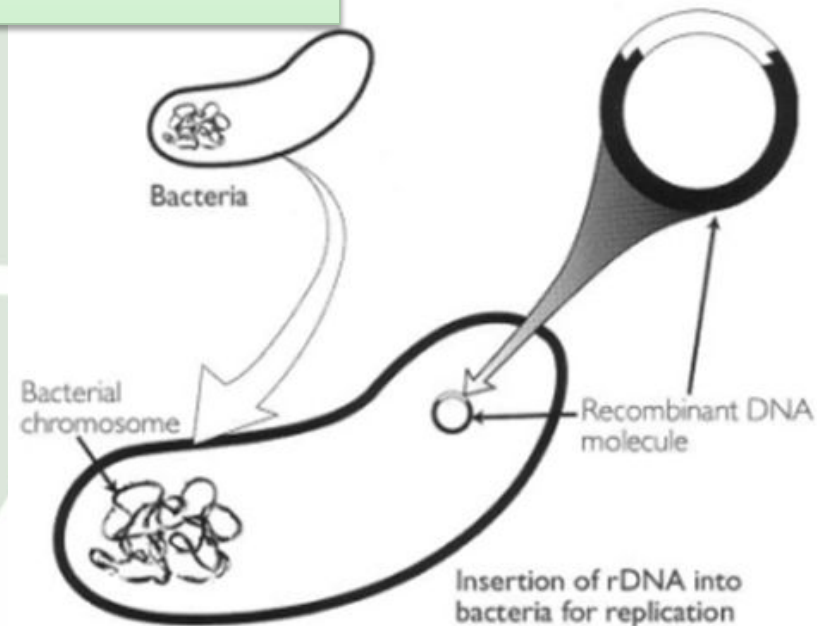
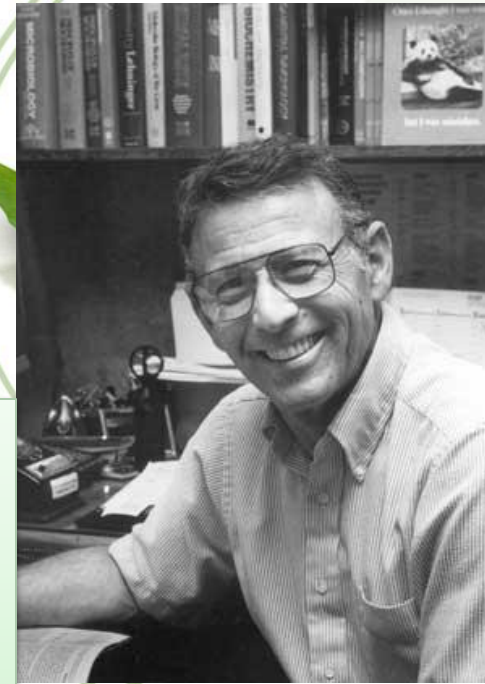


История метода

Berg, Paul (США)
(р. 1926)
Нобелевская премия
по химии, 1980

1972 г. – появление методологии

**Пол Берг сконструировал rДНК из
фрагмента ДНК вируса SV40,
бактериофага λ и оперона *E. Coli***





Поль Берг



Стенли Коэн



Герберт Бойер



Анни Чанг

**1972 г. Анни Чанг
Герберт Бойер
Поль Берг
Стенли Коэн**

**установили, что при помощи ферментов
рестриктаз можно порезать две любые
молекулы ДНК и сделать из них одну
*рекомбинантную ДНК***



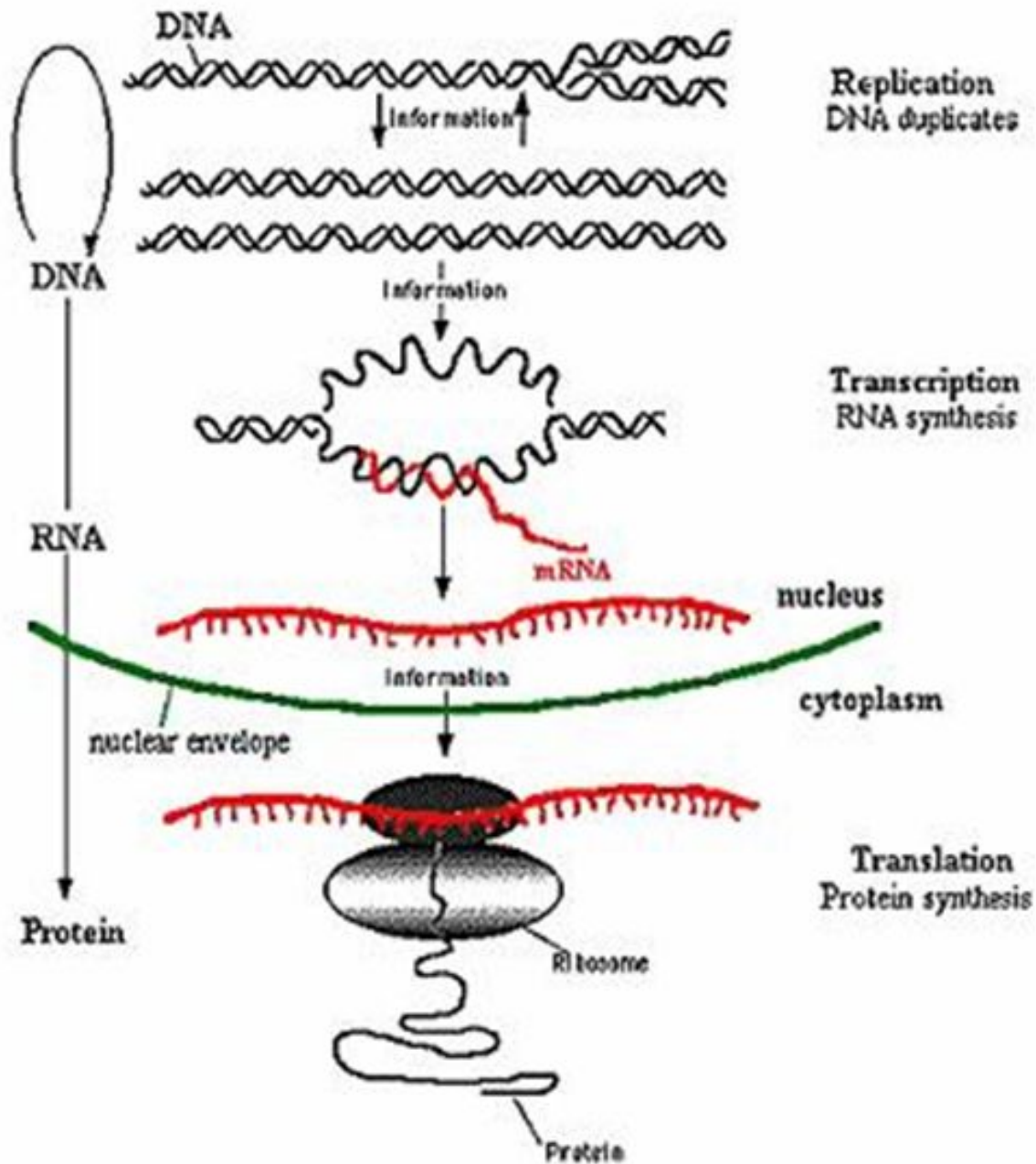
ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ФЕРМЕНТОВ



«Генетическая инженерия – потомок молекулярной генетики, но своим рождением обязана успехам генетической энзимологии и химии нуклеиновых кислот, так как инструментами молекулярного манипулирования являются ферменты»

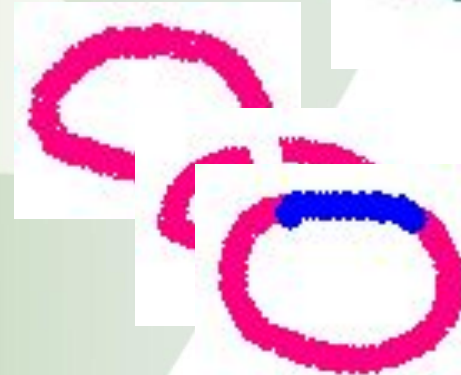
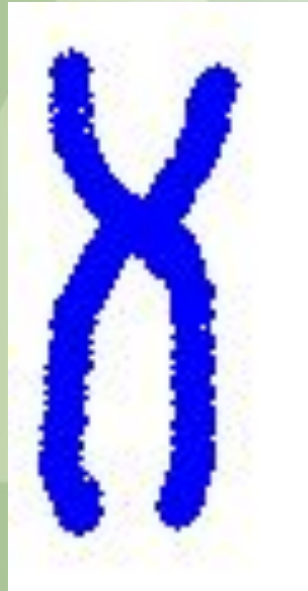
З.И.Абрамова



The Central Dogma of Molecular Biology

Рестриктазы (1962 г. В. Арбер)	Фрагментируют молекулы ДНК, внося разрывы путем гидролиза обеих цепей ДНК
Ревертазы (1970 г. Г. Темин)	Синтезируют ДНК на матрице РНК
ДНК-полимеразы (1958 г. А. Корнберг)	Синтезируют ДНК на матрице ДНК
ДНК-лигазы (1967 г. М. Геллерт)	Лигируют фрагменты ДНК за счет формирования фосфодиэфирных связей между нуклеотидами
Терминальные трансферазы (1962 г. Боллум)	Достраивают к концам двойной спирали ДНК к одной из нитей пуриновые, а к другой пиримидиновые нуклеотиды
Эндонуклеазы бактериофага (1975 г. Грей)	Отщепляют 3'-концы двойной спирали ДНК

Суть метода



Словарь



Рекомбинантная ДНК – искусственно сконструированная ДНК, несущая фрагменты генетической информации разных организмов

Трансгенез – процесс перенос гена или группы генов из одного организма в другой и создание условий для его/их экспрессии

Векторы – системы доставки трансгена, обеспечивающие его интеграцию, амплификацию и экспрессию

ТЕХНИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ



I этап Получение гена



II этап Создание рекомбинантной ДНК



III этап Создание трансгенного организма



IV этап Отбор модифицированных систем



ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

I ЭТАП. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНА

I этап Получение гена



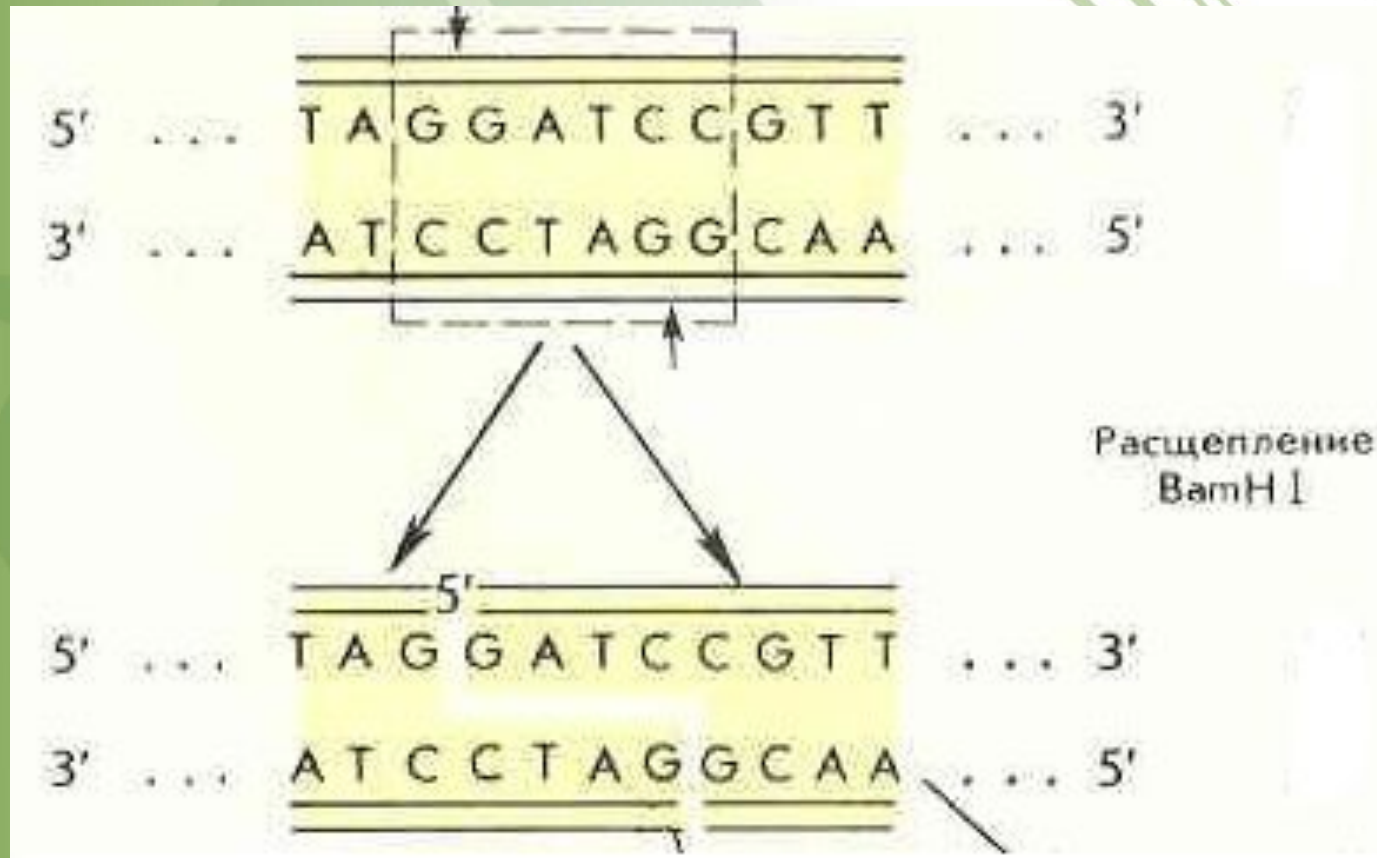
Цель:

получение гена-матрицы для молекулярного клонирования

Методы:

- 1) рестриктазный
- 2) химико-ферментативный синтез
- 3) синтез на основе мРНК

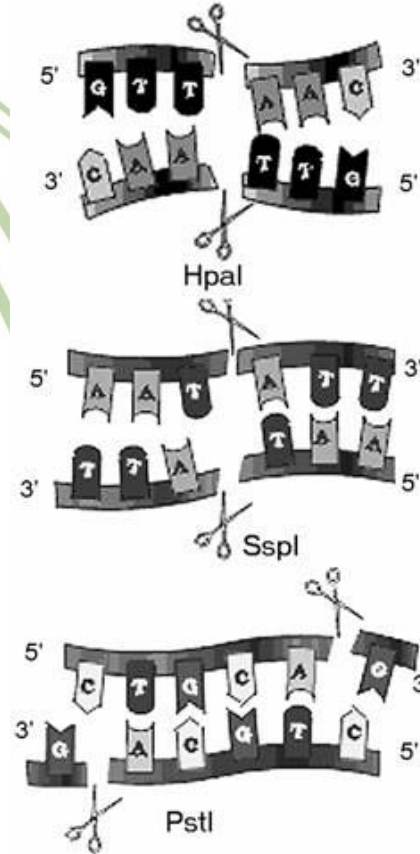
Рестриктазы – ферменты, узнающие особые последовательности нуклеотидов в ДНК (сайты рестрикции)



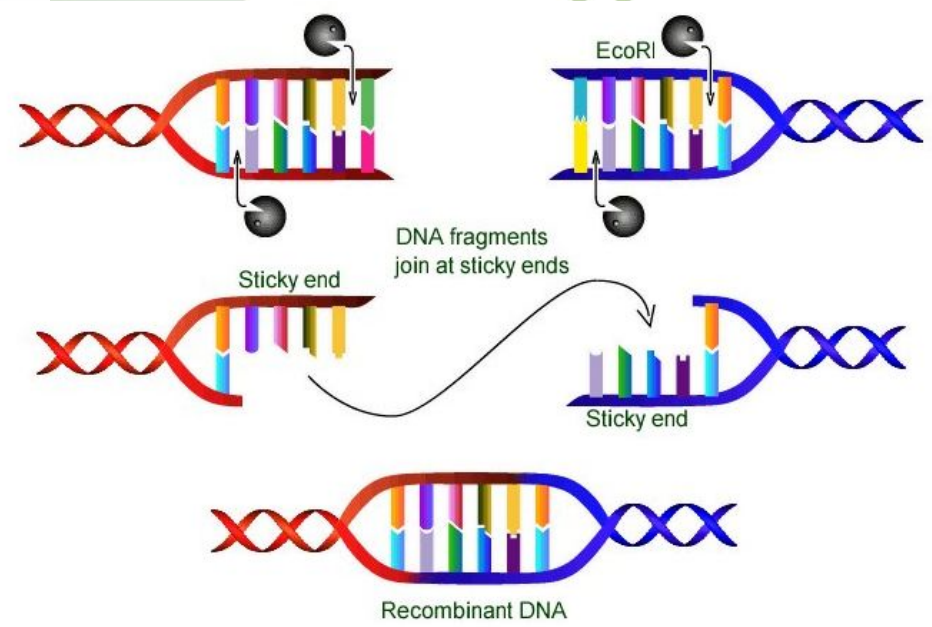
Рестриктазы.

Типы рестрикции.

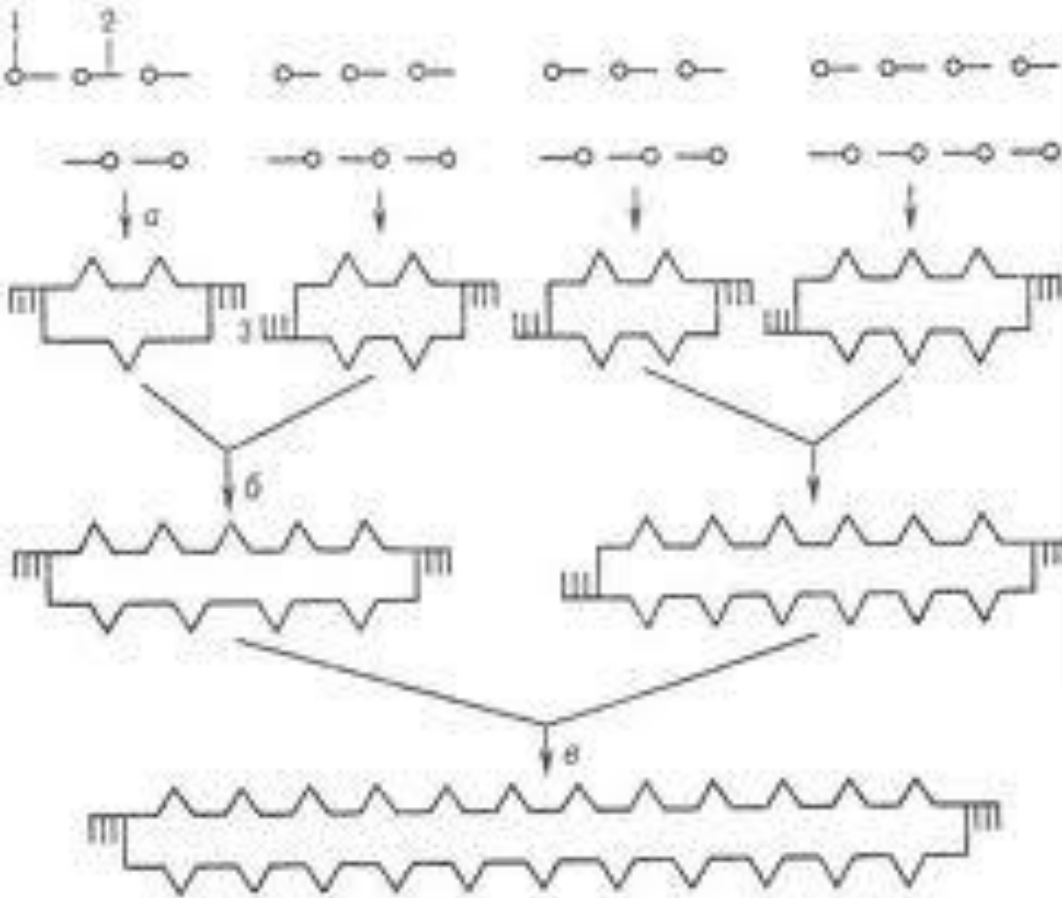
- 1 тип
 - узнают сайт рестрикции и вносят разрез неподалёку, в произвольной точке
- 2 тип
 - узнают сайт рестрикции и вносят разрез в фиксированной точке внутри сайта
- 3 тип
 - узнают сайт рестрикции и вносят разрез отступив на несколько нуклеотидов от конца сайта



<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'—GGATCC—3' 3'—CCTAGG—3'
<i>Cof</i> I	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	5'—GCCG—3' 3'—CGCG—5'
<i>Dra</i> I	<i>Deinococcus radiophilus</i>	5'—TTTAAA—3' 3'—AAATTT—5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	5'—GAATTC—3' 3'—CTTAAG—5'
<i>Eco</i> RII	<i>Escherichia coli</i>	5'—CCAGG—3' 3'—GGTCC—5'



Химико-ферментативный синтез гена

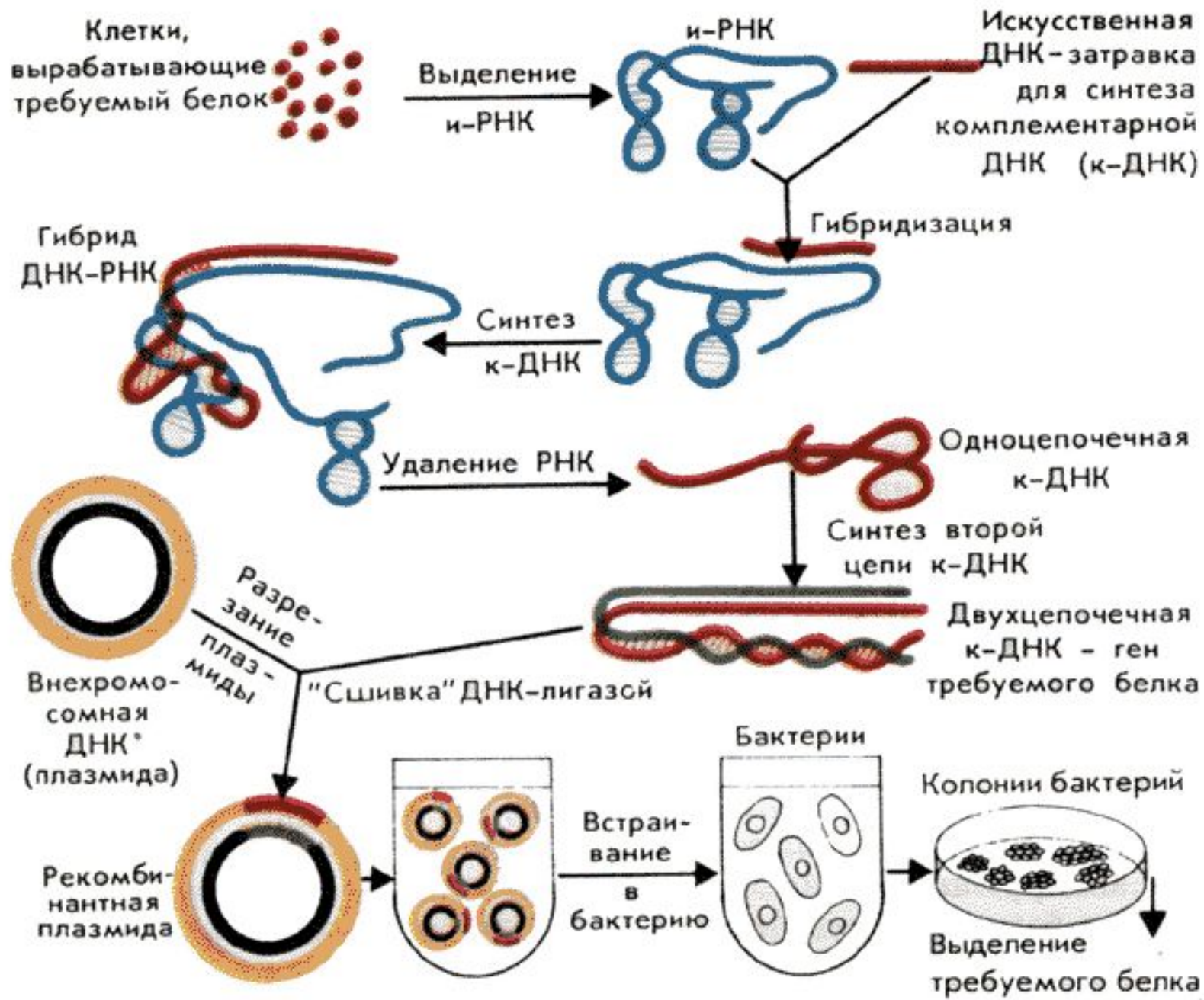


Разработан Х. Кораной

- 1) хим. синтез комплементарных, взаимоперекрывающихся олигонуклеотидов
- 2) соединение (лигирование) олигонуклеотидов с помощью фермента Т4 ДНК-лигазы.

Синтез на основе мРНК





Клетки, вырабатывающие требуемый белок

Выделение и-РНК

и-РНК

Искусственная ДНК-затравка для синтеза комплементарной ДНК (к-ДНК)

Гибрид ДНК-РНК

Гибридизация

Синтез к-ДНК

Удаление РНК

Одноцепочечная к-ДНК

Синтез второй цепи к-ДНК

Двухцепочечная к-ДНК - ген требуемого белка

Внехромосомная ДНК* (плазмида)

Разрезание плазмиды

"Сшивка" ДНК-лигазой

Рекомбинантная плазмида

Встраивание в бактерию

Бактерии

Колонии бактерий

Выделение требуемого белка



ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

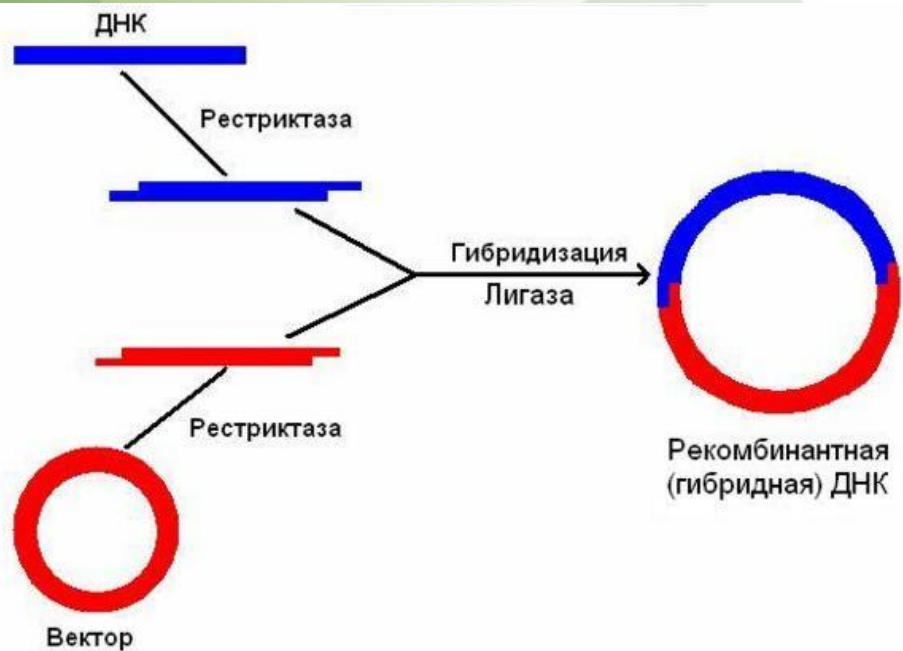
II ЭТАП. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

I этап Получение гена



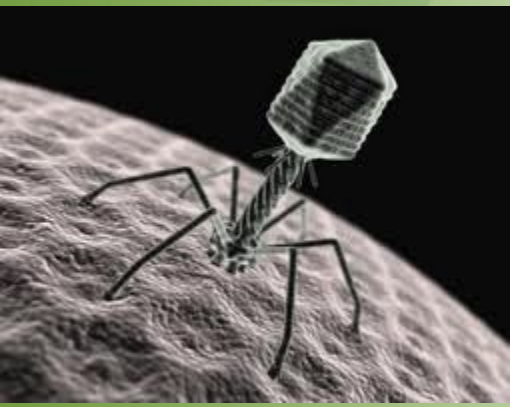
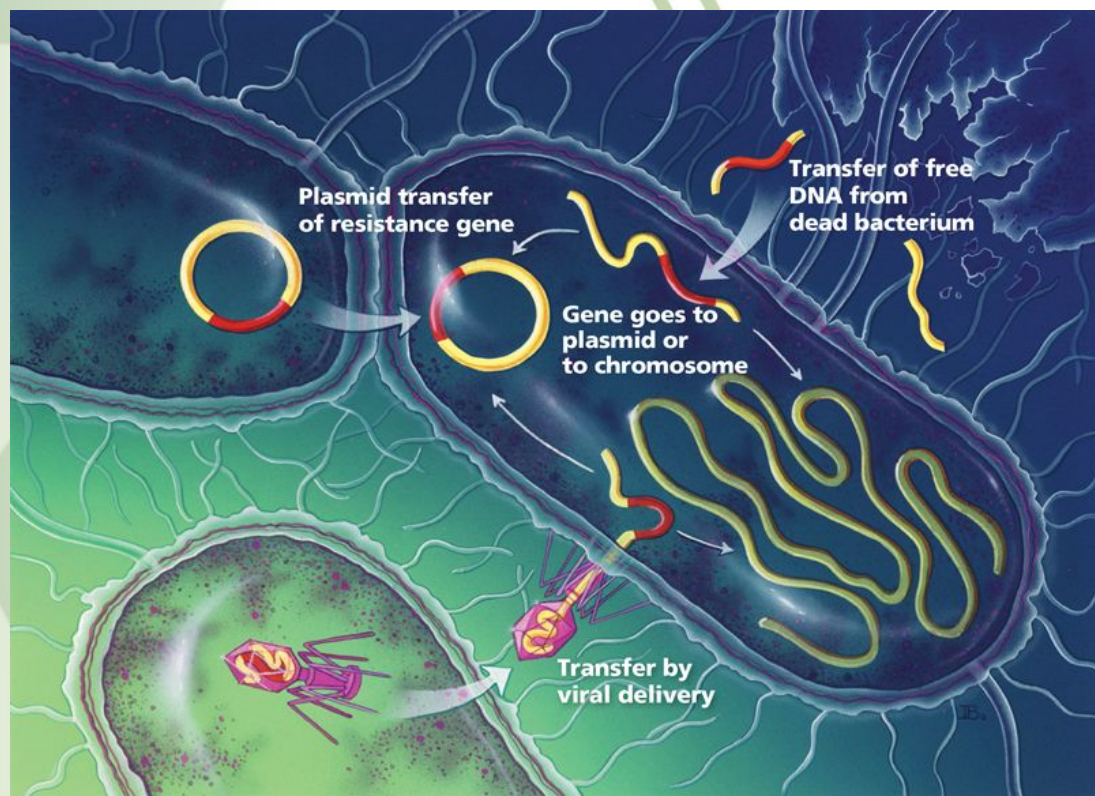
II этап Создание рекомбинантной ДНК

Цель:
внесение гена-матрицы (трансгена) в вектор



ВЕКТОРА (лат. *vector* – несущий)

молекулы способные к самостоятельной репликации и обеспечивающие интеграцию, амплификацию и экспрессию трансгена



Словарь



Амплификация – увеличение количества копий
гДНК (трансген + вектор)

Интеграция – встраивание гДНК в ДНК хозяина

Экспрессия – транскрипция трансгена аппаратом
клетки хозяина

Требования к векторным молекулам



- Нести сайты рестрикции в участках, не влияющих на репликацию
- Иметь специфические и сильные промоторы транскрипции, а также терминаторы
- Быть способными к автономной репликации
- Содержать специфические маркеры

Классификация векторов по реципиентным системам



Вектора прокариот

Естественные
плазмиды
бактериофаги

Искусственные
космиды
фазмиды
бакмиды

Вектора эукариот

Естественные
плазмиды
вирусы

Искусственные
челночные векторы

Словарь

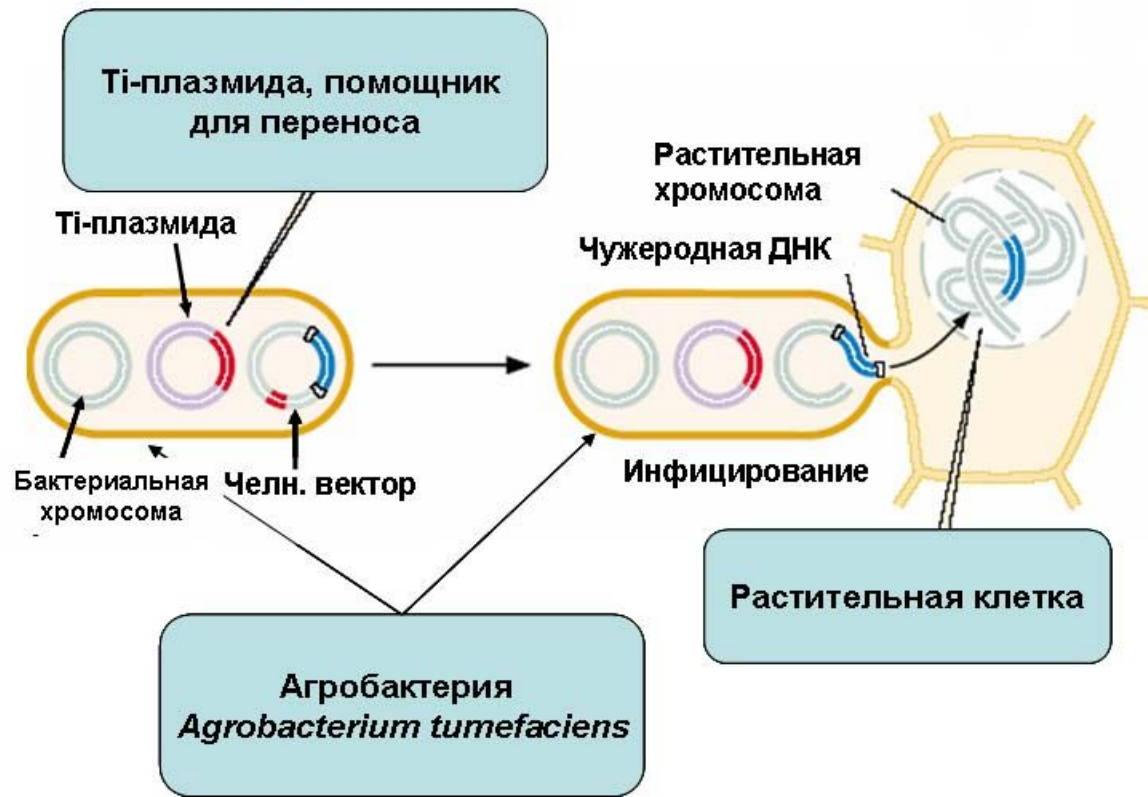
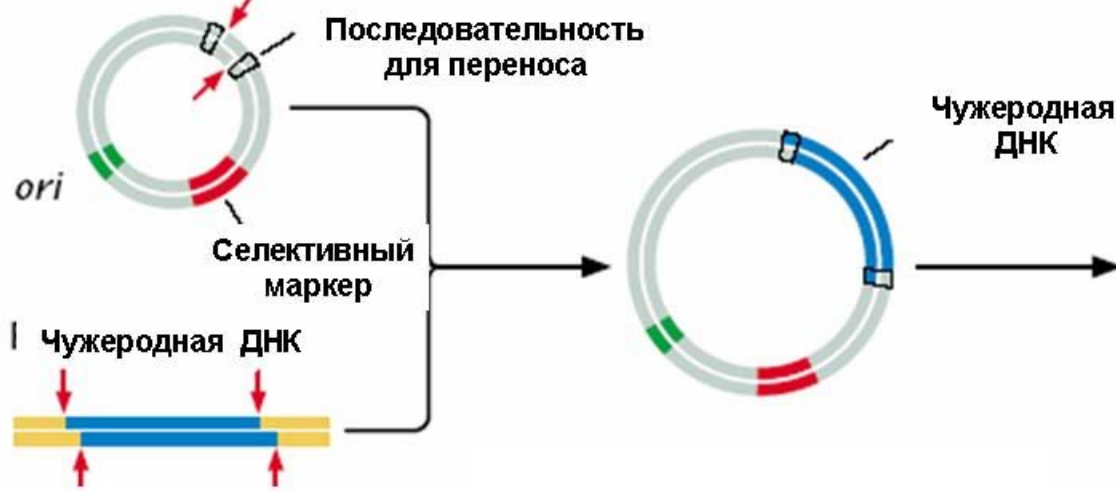


Бакмиды – челночные векторы на основе генома бакуловируса, способные существовать в клетках *E.coli*

Космиды – плазмидные векторы, в которые встроен участок генома фага λ , обеспечивающий возможность упаковки молекулы в фаговую частицу

Фазмиды – векторы, которые содержат генетические элементы плазмид и бактериофагов

Челночный вектор – плазмида, способная к репликации в клетках разных хозяев



Классификация векторов по функциям



Клонирующие

вектора, обеспечивающие репликацию гибридной молекулы в клетке

Экспрессирующие

вектора, обеспечивающие правильную и эффективную экспрессию чужеродной ДНК в клетке-реципиенте

Интегративные

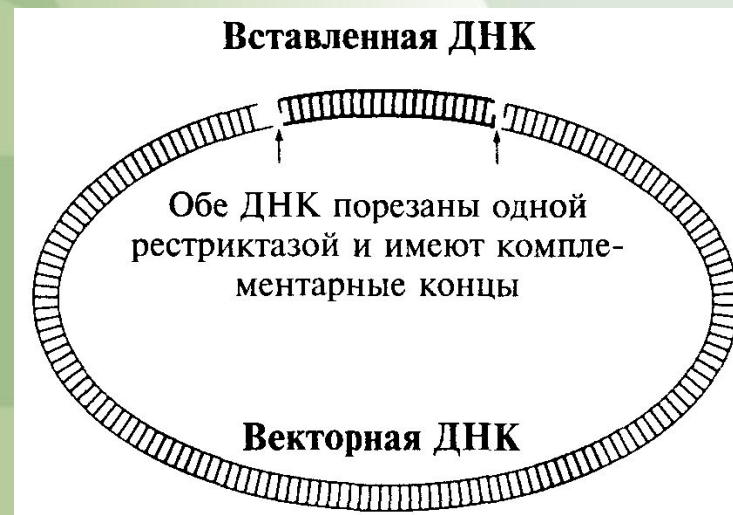
вектора, обеспечивающие интеграцию чужеродной ДНК в геном реципиента

I этап Получение гена



II этап Создание рекомбинантной ДНК

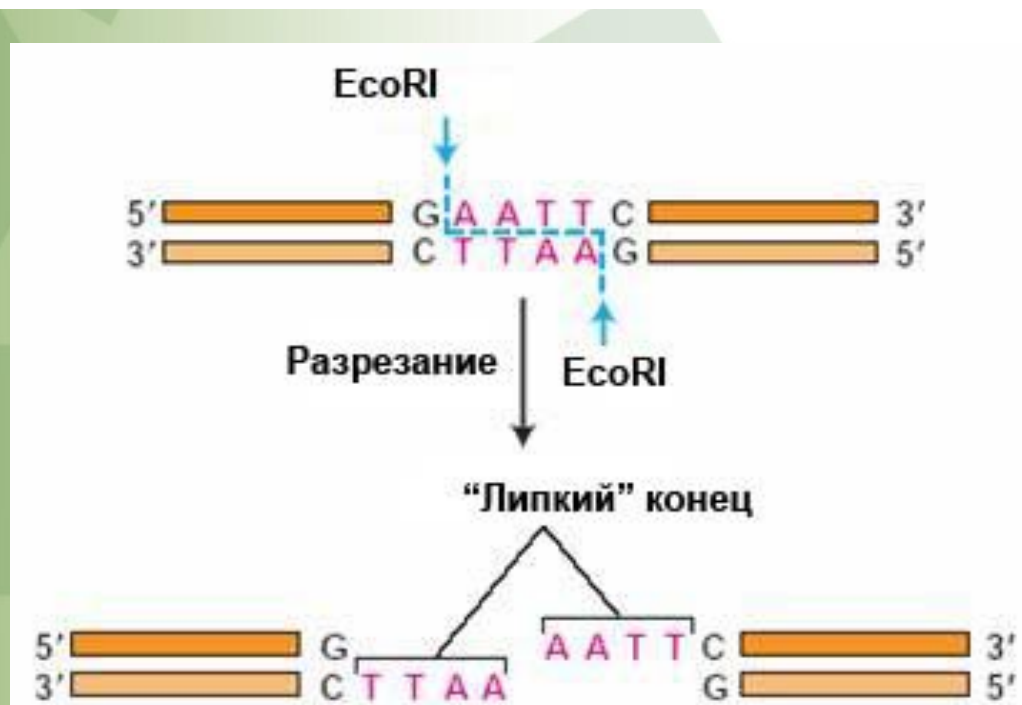
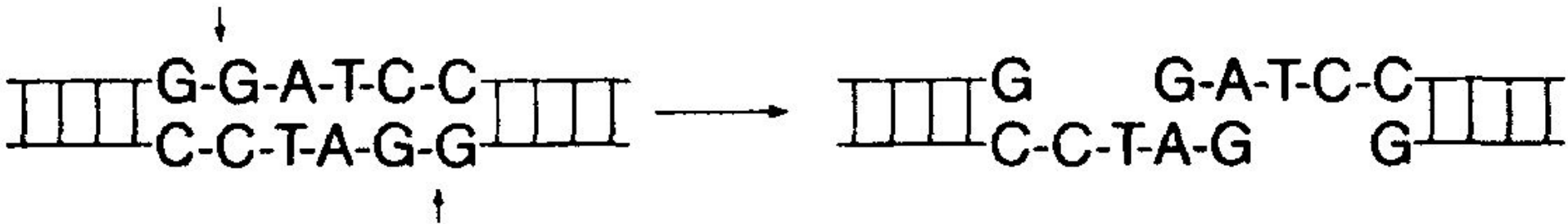
**Методы введения гена в вектор:
рестриктазно-лигазный
коннекторный**



Рестриктазо-лигазный метод



Применим для гена и вектора с комплементарными «липкими» концами

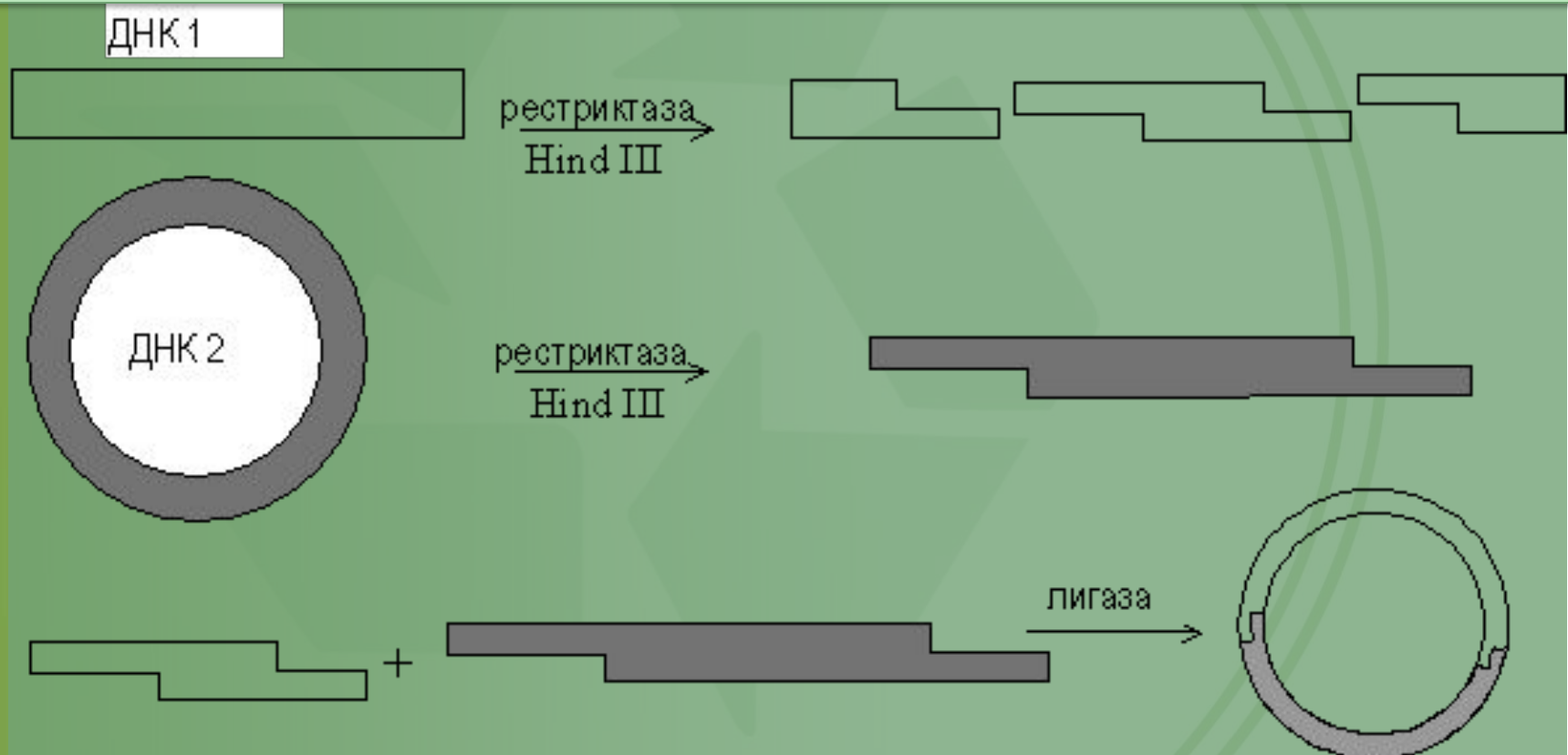


Рестриктазо-лигазный метод



Впервые был применен С. Коэном в 1973 году.

Рестриктазы, вносят в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образуют "ступеньку"



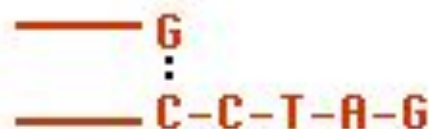
MOLECULE A



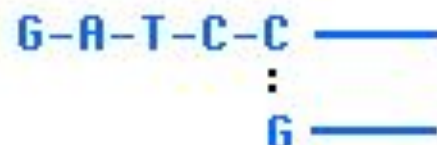
MOLECULE B



Digest each with same restriction endonuclease, **BamHI**



Sticky ends



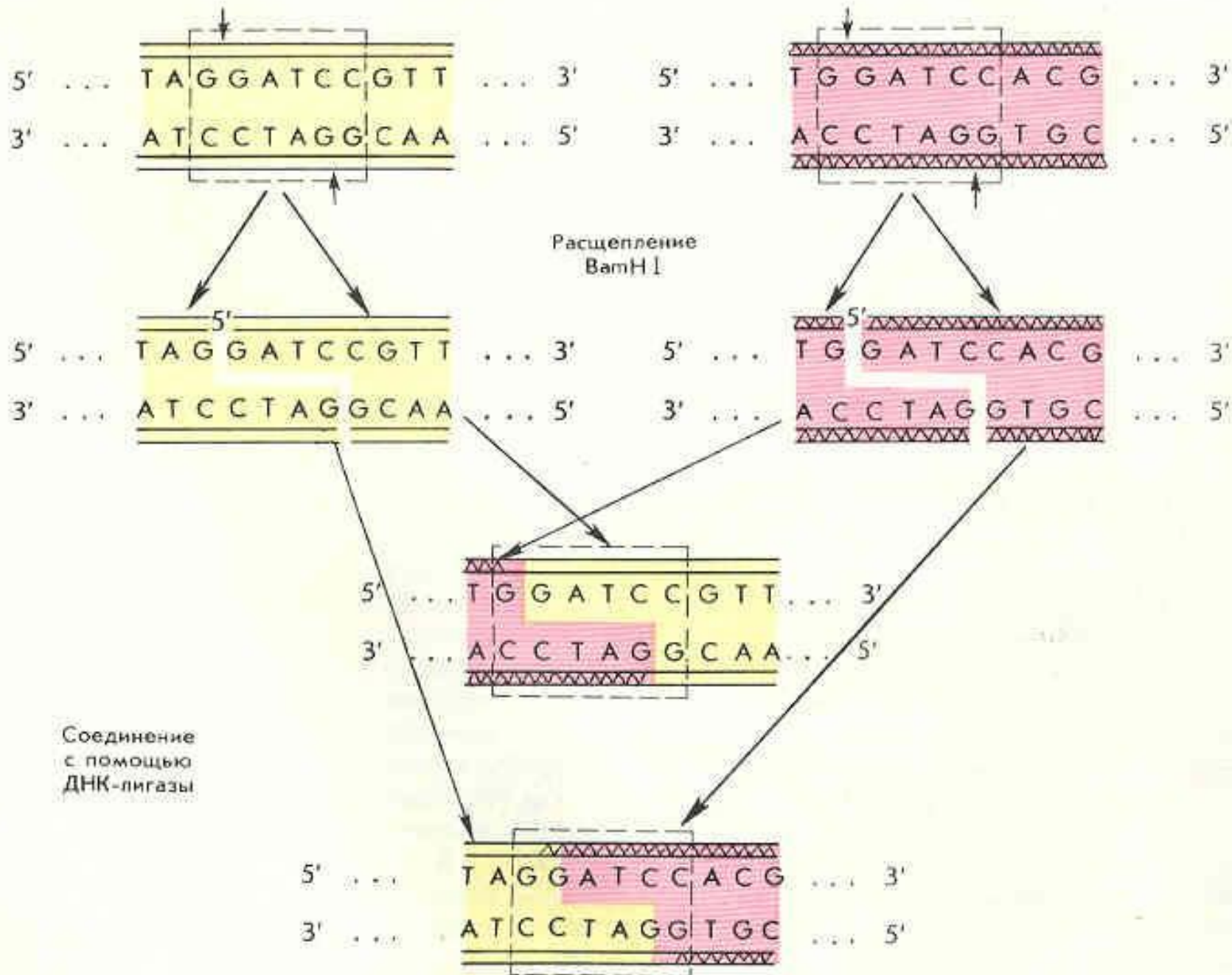
Mix



Seal with **DNA ligase** (⊙)



Recombinant DNA



Коннекторный метод



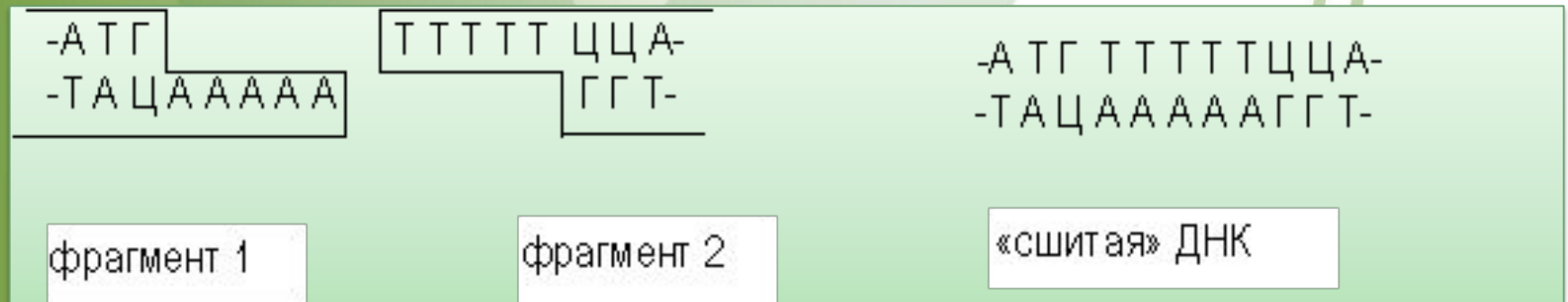
Применим для гена и вектора с некоплементарными «тупыми» концами

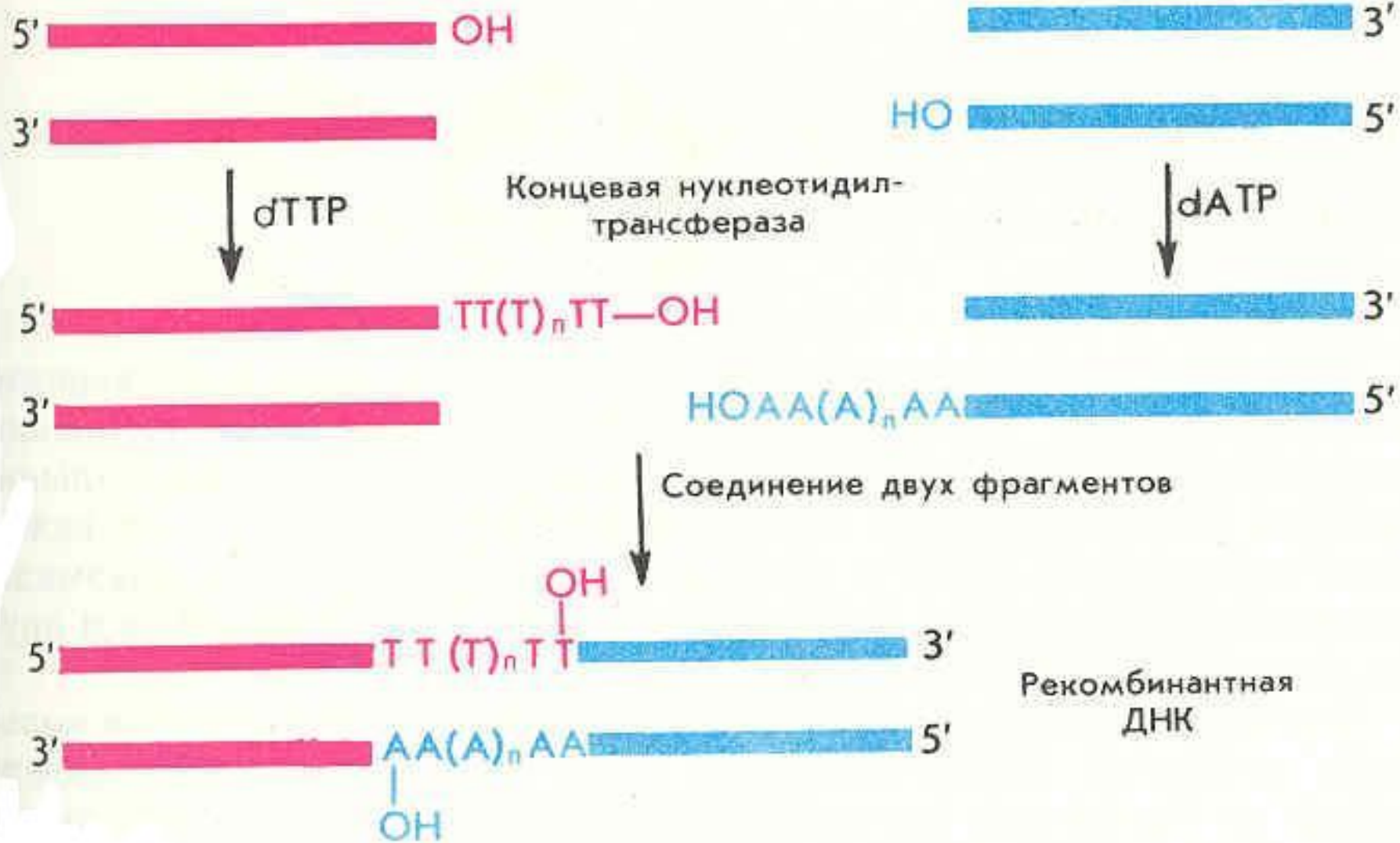
Впервые был выполнен в 1972 году П.Бергом.

Экзонуклеаза отрезает «тупые» концы

Терминальная трансфераза пришивает линкерные молекулы к 3'-концам фрагментов ДНК вектора достраивают одноцепочечные олиго (dA)-сегменты, а к 3'-концам фрагмента трансгена олиго (dT)-сегменты

линкеры соединяются за счет комплементарности (dA)- и (dT)-последовательностей







ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

III ЭТАП. СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННОГО ОРГАНИЗМА

I этап Получение гена



II этап Создание рекомбинантной ДНК



III этап Создание трансгенного организма

Цель:

введение гена-матрицы в организм-реципиент

Методы введения рДНК в клетку:

конъюгация

трансдукция

трансфекция

трансформация



Методы введения рДНК в клетку-реципиент



Естественные



Конъюгация

Трансфекция

Трансдукция

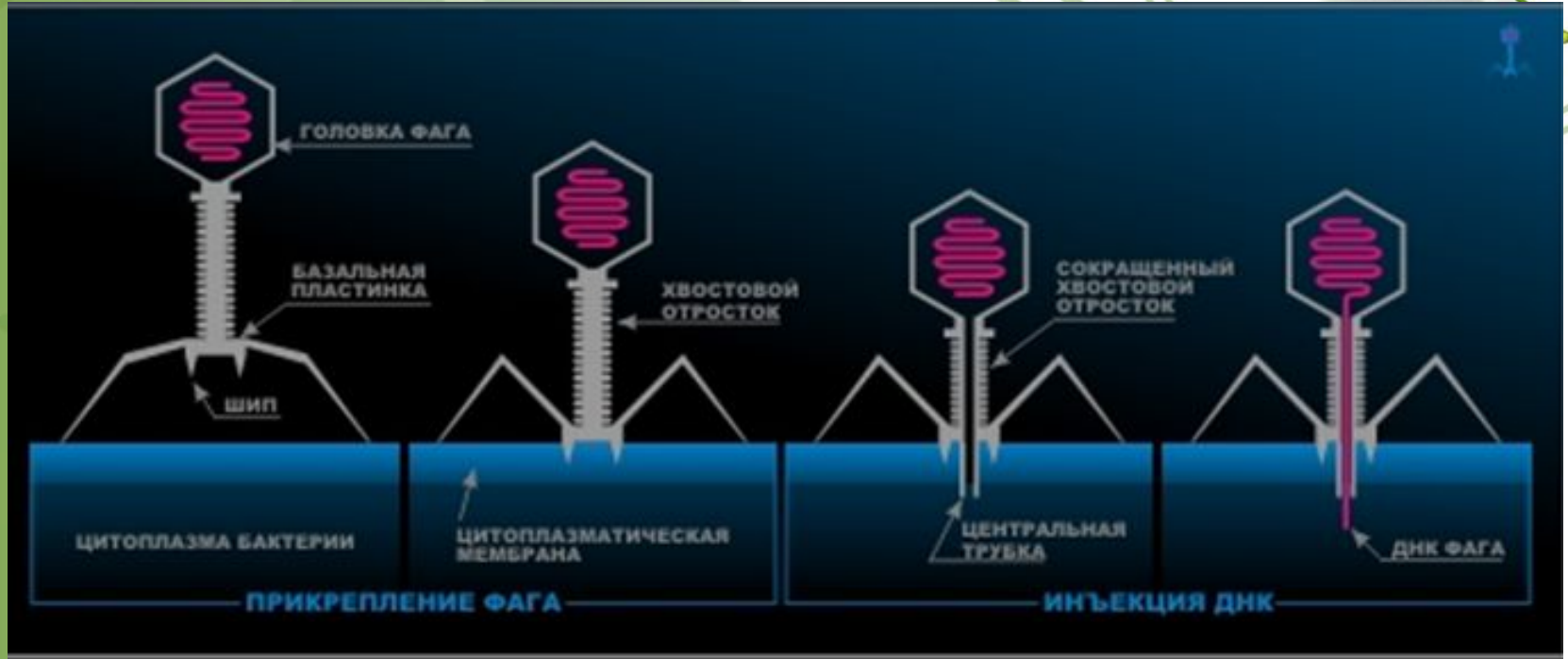
Искусственные



Трансформация

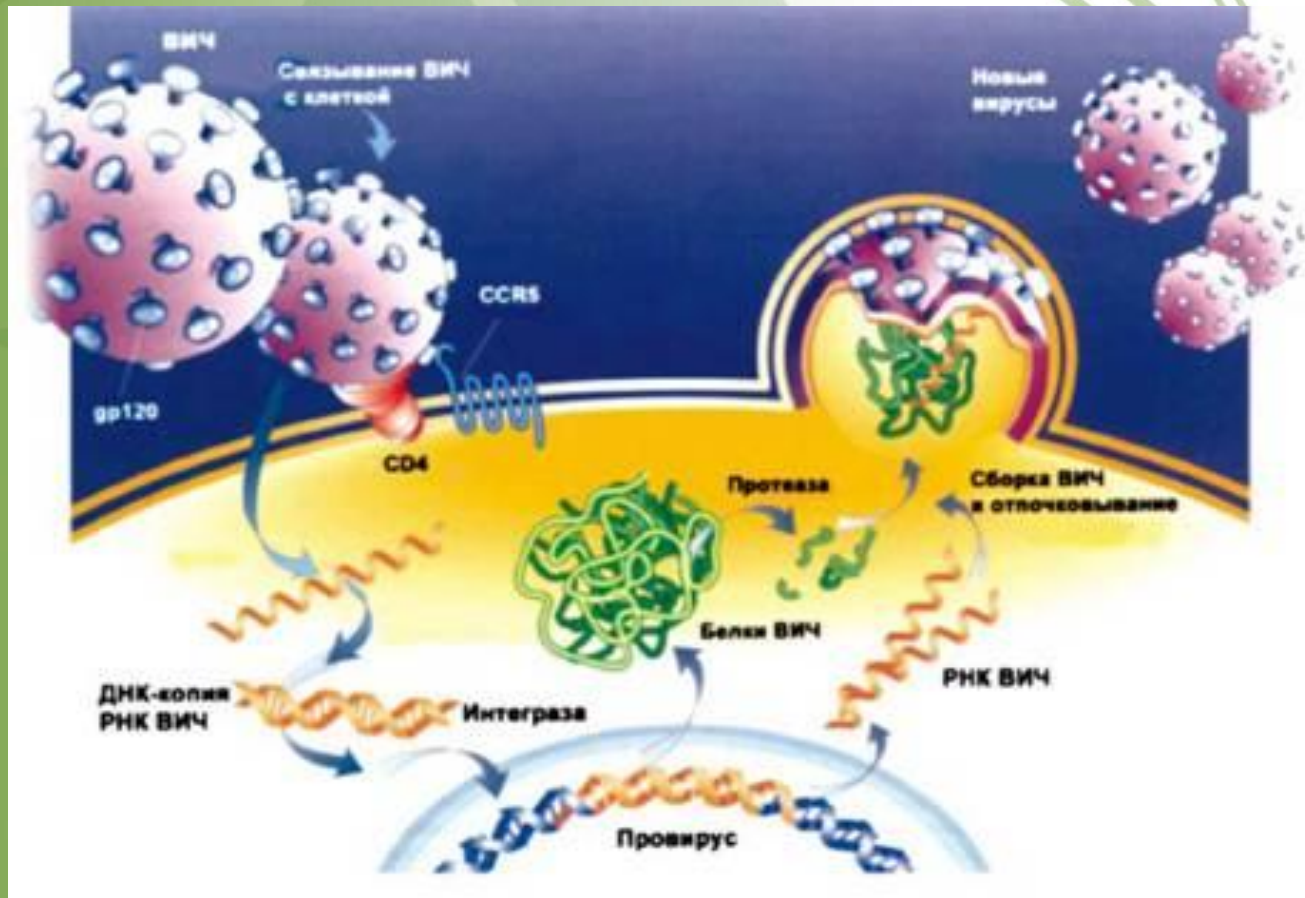
Методы введения гДНК в клетку-реципиент трансдукция

(вектор с элементами генома бактериофага)



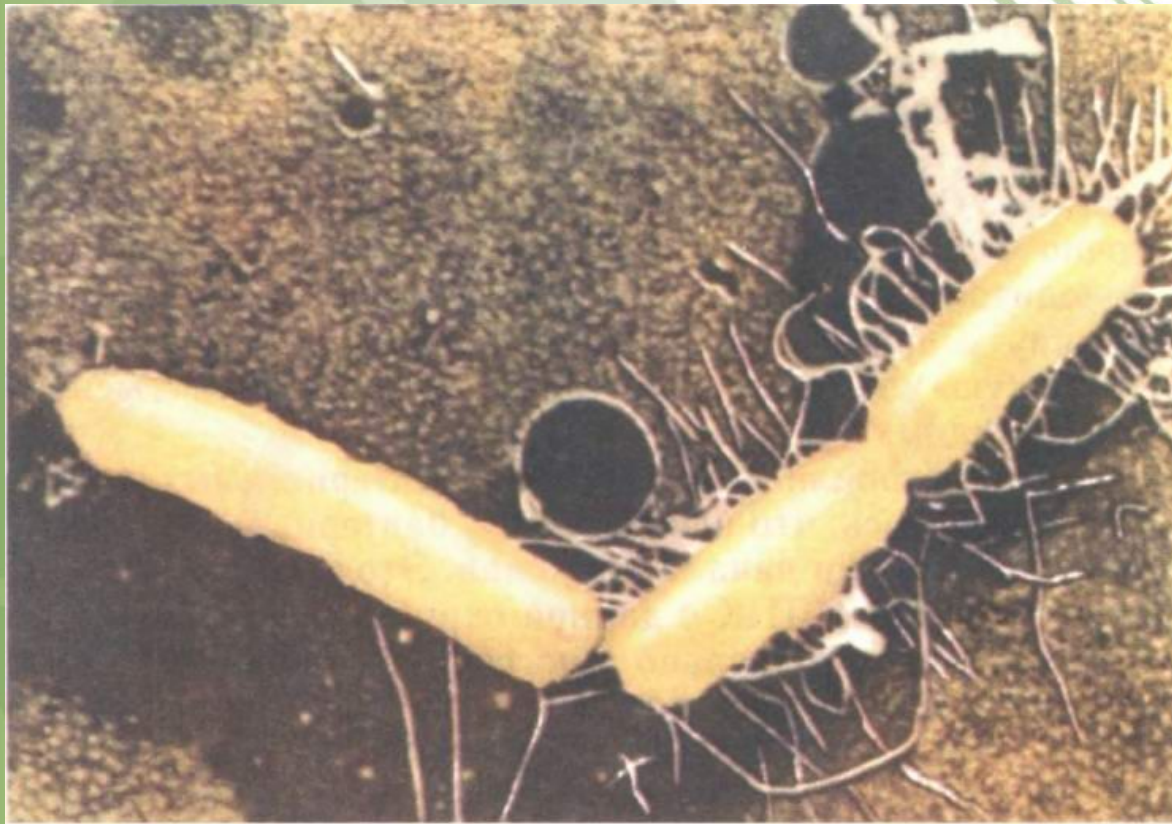
<http://sd1.uchebalegko.ru>

Методы введения гДНК в клетку-реципиент трансфекция (вектор с элементами генома вируса)



Методы введения гДНК в клетку-реципиент конъюгация

(вектор с элементами генома плазмид)



Методы введения гДНК в клетку-реципиент трансформация (при физиологической некомпетентности)



микроинъекция



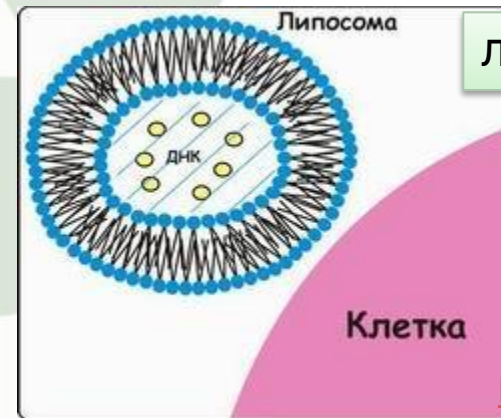
электропорация



биобаллистика



липофекция





ТРАНСГЕНЕЗ. МИКРООРГАНИЗМЫ. Лекция 5

IV ЭТАП. ОТБОР

I этап Получение гена



II этап Создание рекомбинантной ДНК



III этап Создание трансгенного организма



IV этап Отбор модифицированных систем

Цель:

оценка результата молекулярного клонирования

Методы:

маркерный, иммунологическая детекция, скрининг, картирование, секвенирование



Методы отбора



1. Отбор клеток, несущих вектор

2. Отбор клеток, несущих ген-мишень

Отбор по векторам

Селективные, репортерные маркеры



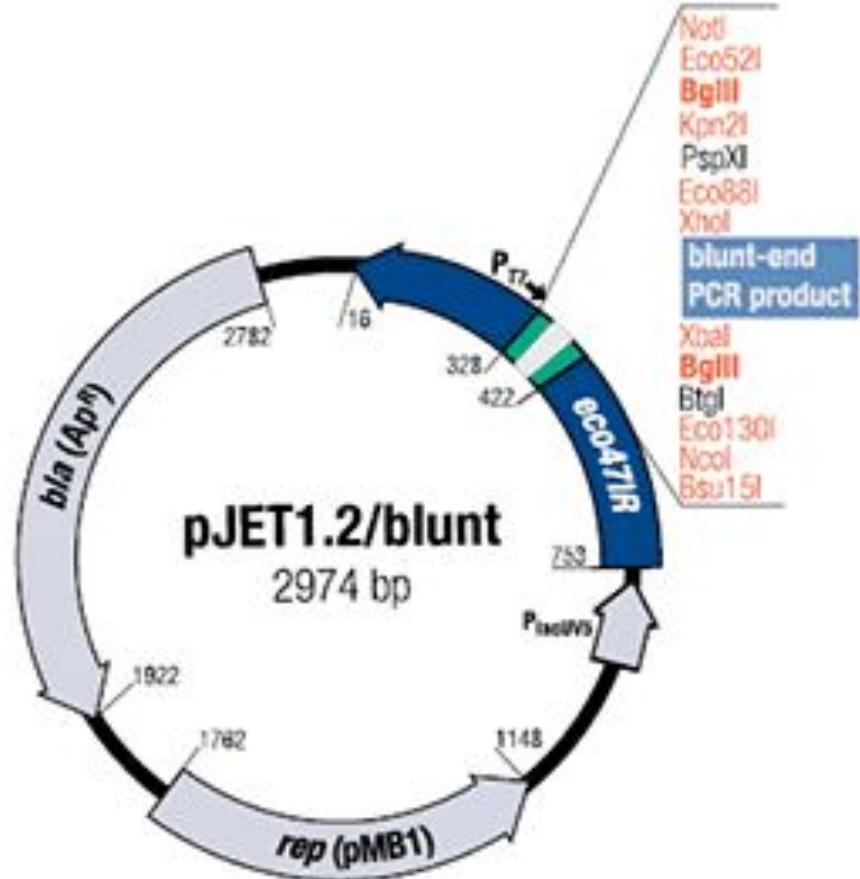
- а) Применение репортерных (маркерных) генов первого, второго и третьего поколений:**
 - NPT-ген (неомицинфосфотрансфераза и других антибиотикоустойчивых генов)
 - GUS-ген (глюкуронидаза)
 - GFP-ген (greenfluorescenceprotein)
- б) Селекция клеток на средах с антибиотиками**
- в) Обнаружение продуктов экспрессии репортерных генов и/или их активности**



в верхнем правом углу много мелких названий – это перечислены сайты рестрикции

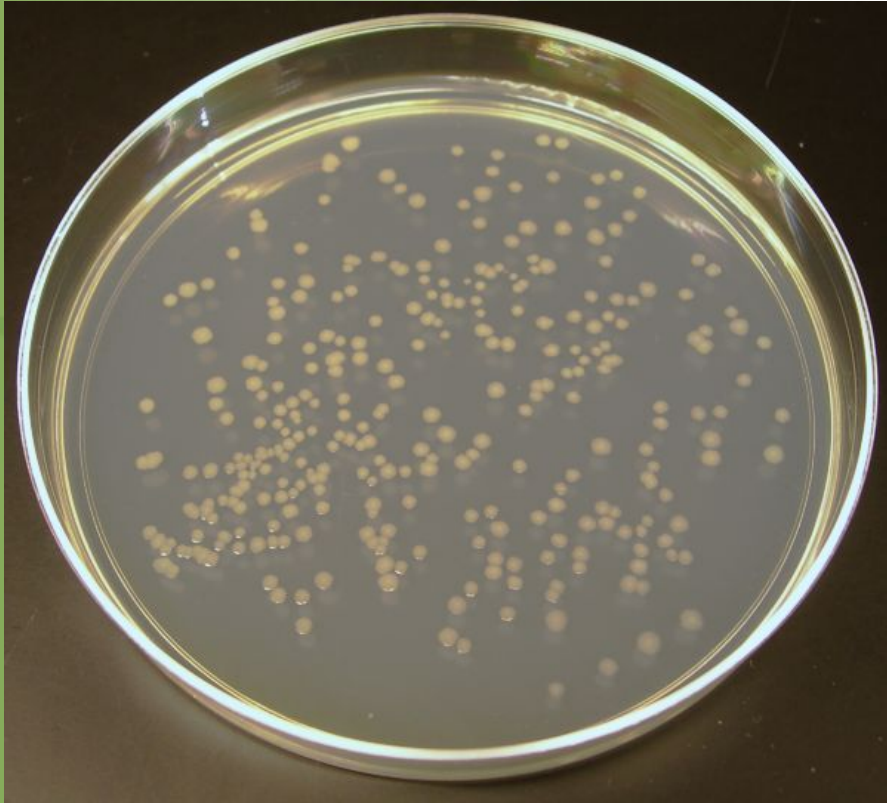
Rep – это участок отвечающий за репликацию (размножение) плазмиды в клетке

Amp^r – репортерный ген устойчивости к антибиотику – ампициллину



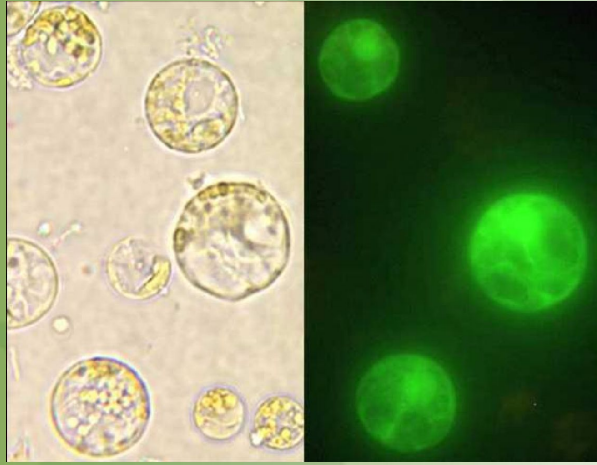
Отбор по векторам

Устойчивость к антибиотику



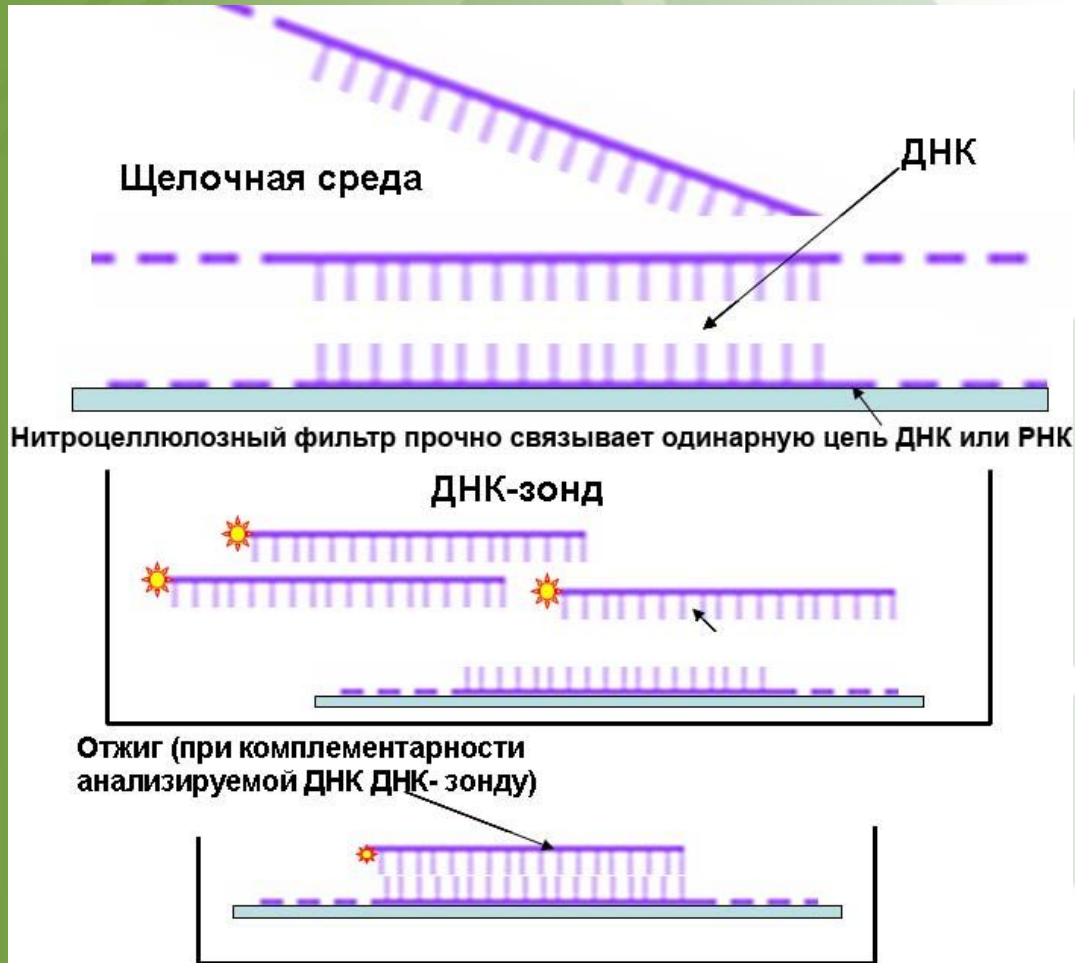
Отбор по векторам.

GFP



Отбор по трансгену

блот-анализа по Саузеру



1. Синтезируют меченые нуклеотиды (ДНК зонды)
2. Фрагмент целевой ДНК переводят на нитроцеллюлозный фильтр.
3. Связавшиеся молекулы ДНК обрабатывают щелочным раствором, в результате одна нить ДНК «отрывается» от другой.
4. На фильтр наносят раствор с ДНК-зондом, комплементарные участки совпадают, происходит гибридизация.
5. Сканируют фильтр

Первые достижения

ИНСУЛИН

ИНТЕРФЕРОН

СОМАТОТРОПИН



Гипофизарная карликовость

