



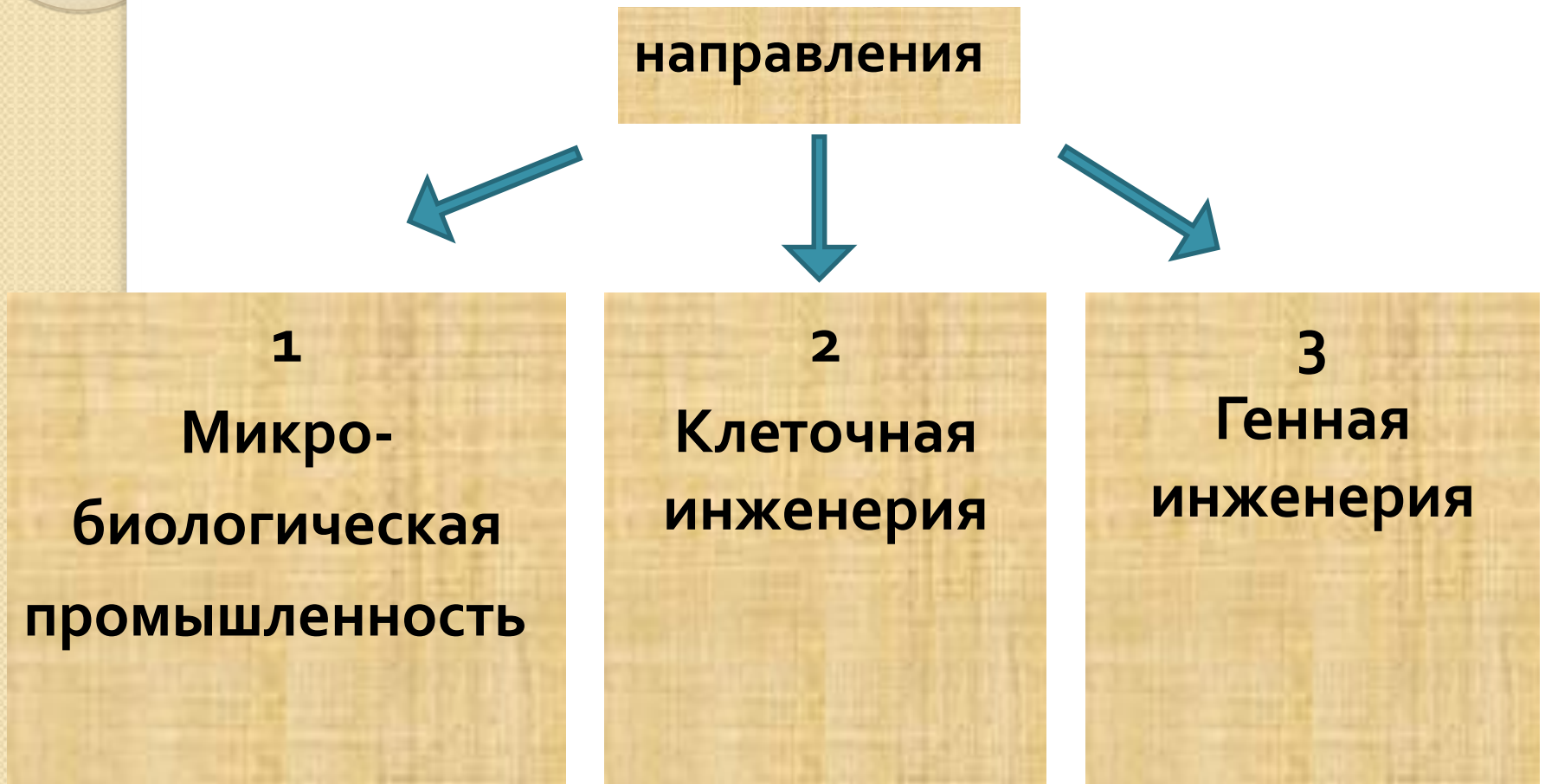
# биотехнология

Е.В. Левашко

2009

- **3.9 Биотехнология, ее направления.**  
Клеточная и генная инженерия, клонирование.
- **Роль клеточной теории в становлении и развитии биотехнологии.**
- **Значение биотехнологии для развития селекции, сельского хозяйства, микробиологической промышленности, сохранения генофонда планеты.**
- **Этические аспекты развития некоторых исследований в биотехнологии (клонирование человека, направленные изменения генома).**

**Биотехнология** – использование живых организмов (микроорганизмов, клеток и тканей других организмов) и биологических процессов в производстве.



# 1) Микробиологическая промышленность

- отрасль производства, базирующаяся на микробиологическом синтезе, то есть синтезе веществ с помощью микроорганизмов.
- С незапамятных времен на применении микроорганизмов основано хлебопечение, виноделие, пивоварение, сыроварение.
- В настоящее время на основе микробиологического синтеза получают белки, аминокислоты и витамины, служащие кормовыми добавками, антибиотики, ферментные препараты, бактериальные удобрения.
- Производится микробиологическая очистка сточных вод.

## 2) Клеточная инженерия – выращивание отдельных клеток или тканей на искусственных питательных средах.

- Из таких клеток могут сформироваться целые организмы растений, отдельные ткани животных, являющиеся по сути **клонами**, то есть потомками от митотических делений одной клетки. Основные методы – манипуляции с клетками: клеточная гибридизация, клонирование, суррогатное материнство и др.
- Клеточные технологии используются в племенном животноводстве, медицине, растениеводстве и микробиологии. Выращивание из клеток организмов редких видов может способствовать сохранению генофонда планеты.
- Для развития этой и других отраслей биотехнологии большое значение имело становление *клеточной теории*, обобщившей знания о строении и функционировании клеток как основах жизнедеятельности организмов всех царств живой природы.

**Генная инженерия** – искусственное создание организмов с новыми комбинациями генетического материала методами молекулярной генетики.

- Ген, который кодирует синтез нужного человеку белка, выделяют из организма, способного к синтезу этого белка, или синтезируют искусственно. Затем этот ген встраивают в геном другого организма, обычно бактерии. После этого бактерия способна синтезировать нужный белок, например, гормон или фермент.
- В перспективе возможно лечение методами генной инженерии наследственных и опухолевых заболеваний.
- Вмешательство в геном организмов связано с риском нежелательных последствий для человека и природы.

# Формальное (традиционное) понимание биотехнологии

- vermes – червь                      Luvbricidae



- Хлебопечение...

# Современное и новейшее понимание биотехнологии

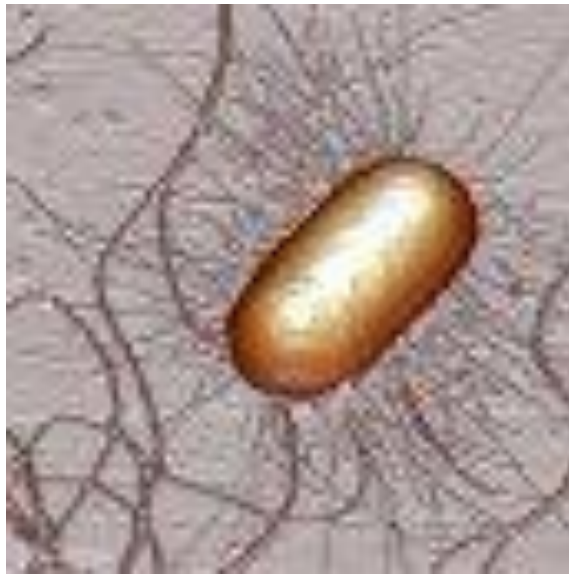
- Микробиологический синтез
- Молекулярная биотехнология с применением методов клеточной и генной инженерии



# Основные объекты Б.

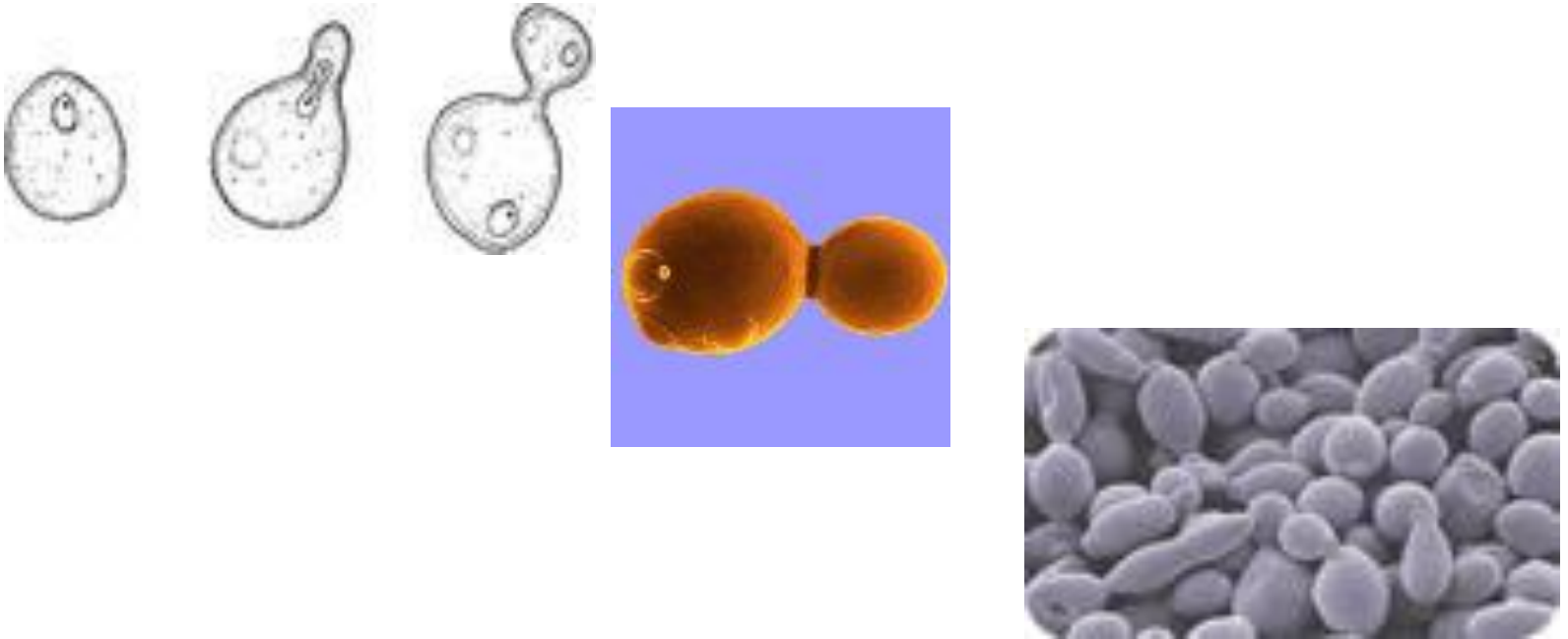
- бактерии кишечной палочки

*Escherichia coli*



Мезофильные, термофильные (ПЦР, 1984)  
психрофильные бактерии

# Saccharomyces cerevisiae



- **Культуры эукариотических клеток высших организмов**

# Термины

- **генномодифицированные клетки,**
- **питательные среды: простые, обогащенные, сложные,**
- **термостабильная ДНК-полимераза,**
- **праймер,**
- **клеточные линии,**
- **устойчивые клеточные линии,**
- **перевивание (субкультивирование) клеток.**

# Клеточная инженерия

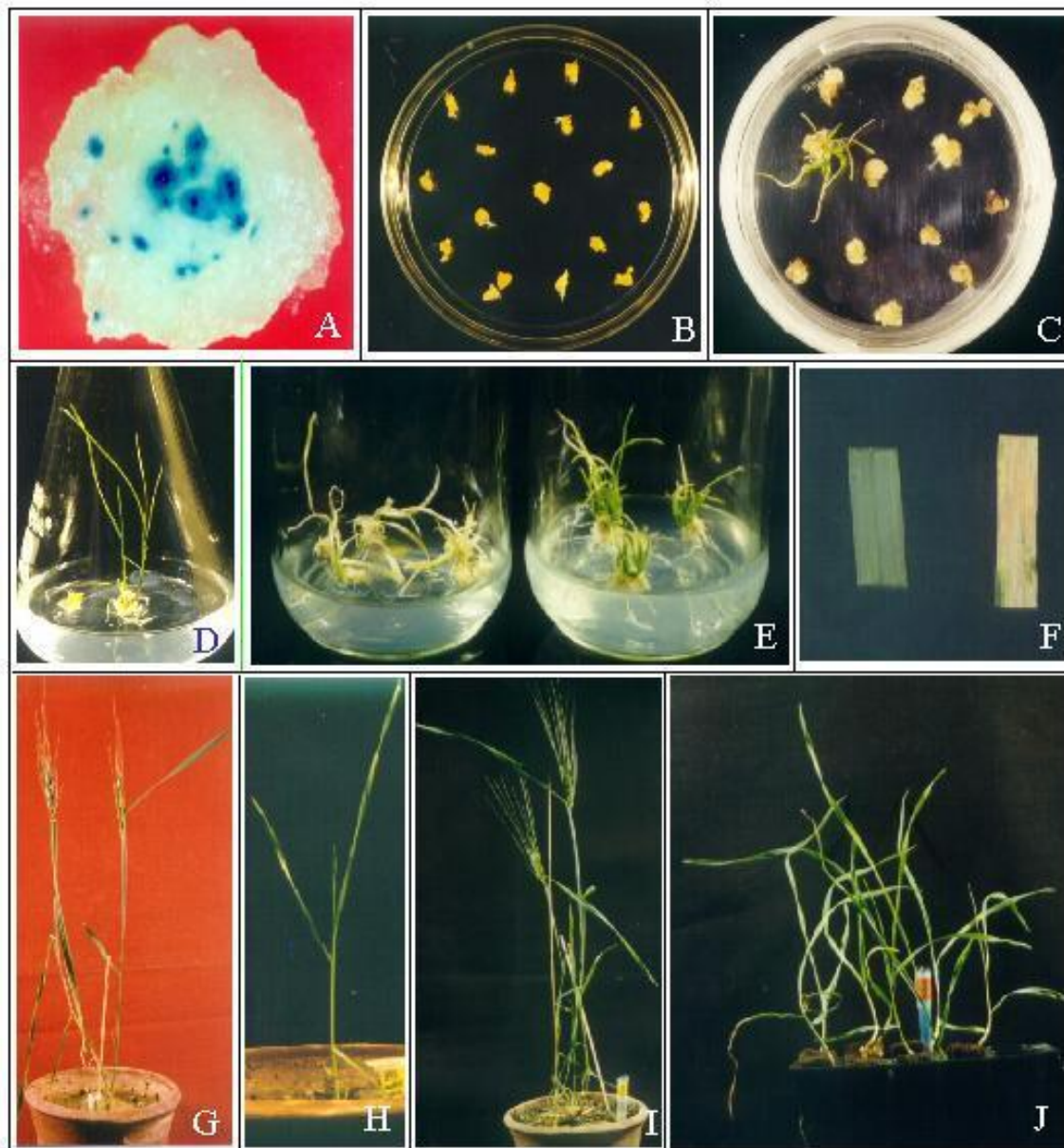
- *культивирование, гибридизация, реконструкция*

## Метод культуры клеток и тканей



лат. totus – весь,  
potencia – сила

а) Микро-  
клональное  
размножение



## б) Выращивание биомассы Вторичные метаболиты



# Дополнительные методы работы с культурами

- **получение гаплоидных организмов** из пыльцевых зерен, яйцеклеток, затем перевод в диплоидное состояние
- **соматическая гибридизация**
- **реконструкция клеток**
- **хромосомная инженерия**



# Клонирование позвоночных животных



1979

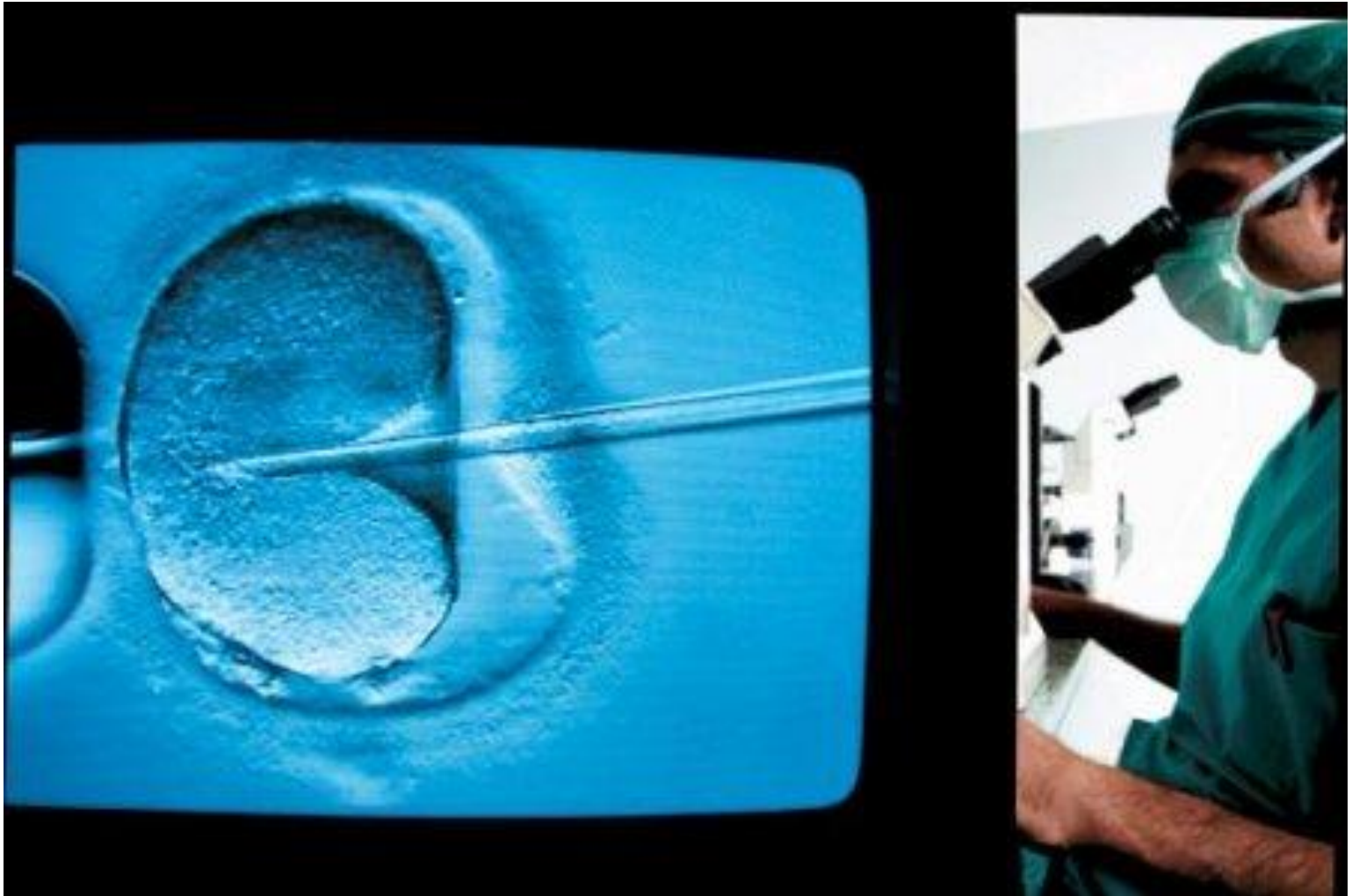
Стин Вилладсен

1988

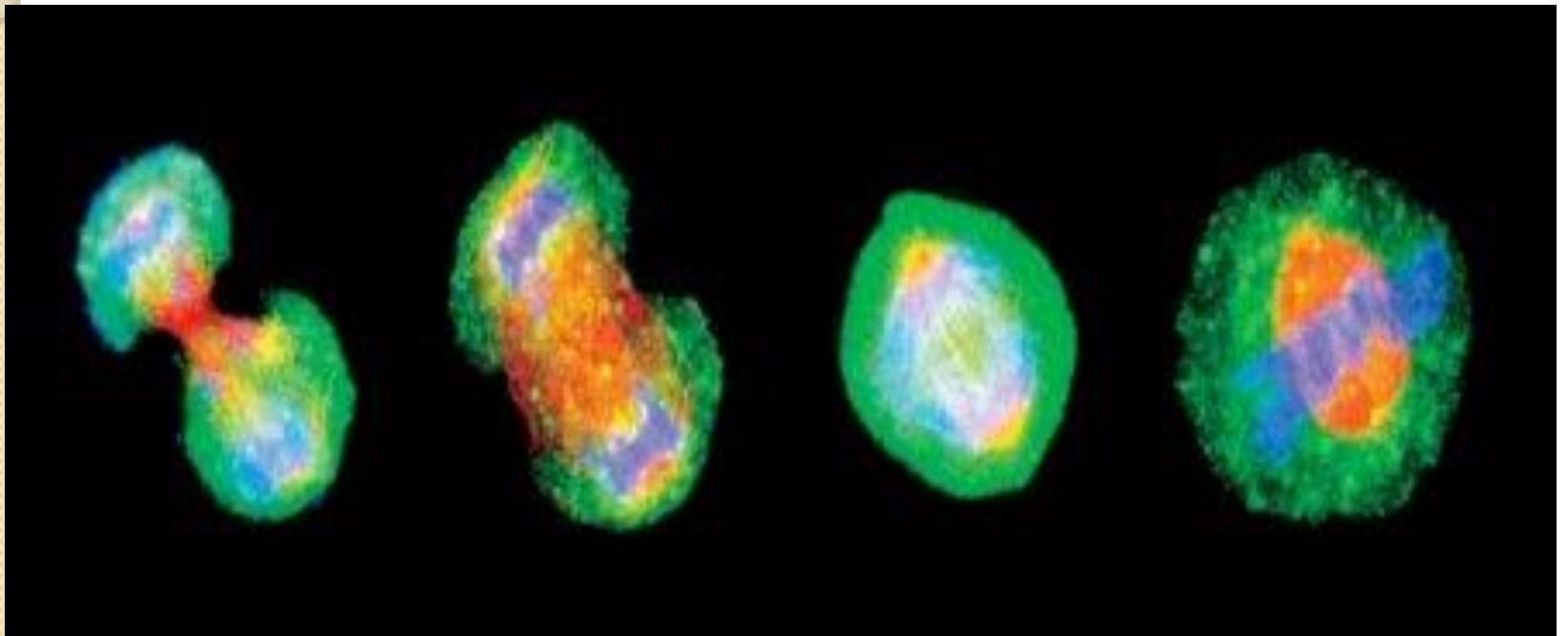


# Реконструкция клеток животных

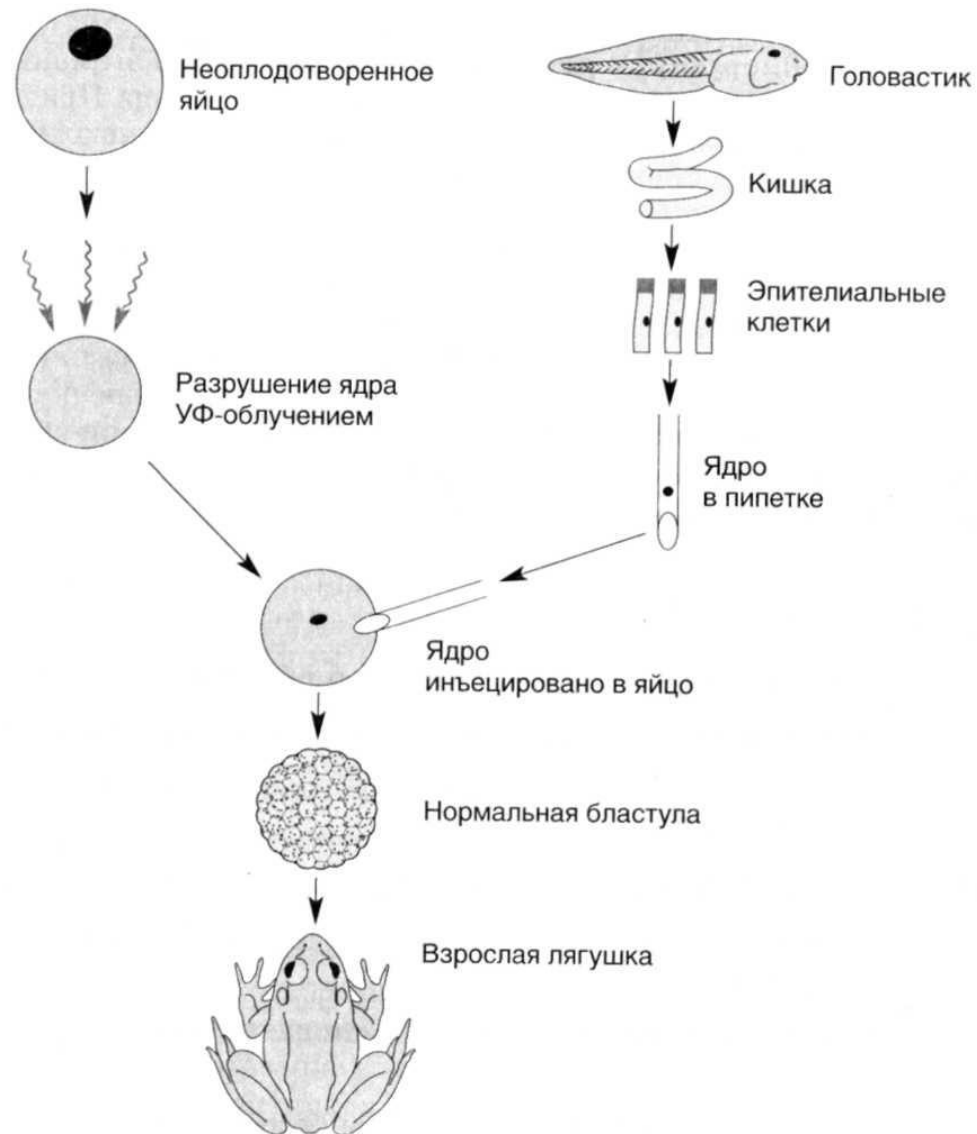
Р. Бриггс, Т. Кинг, 1952



# Получение организма из реконструированных клеток



# Опыт с лягушкой Д. Гердон



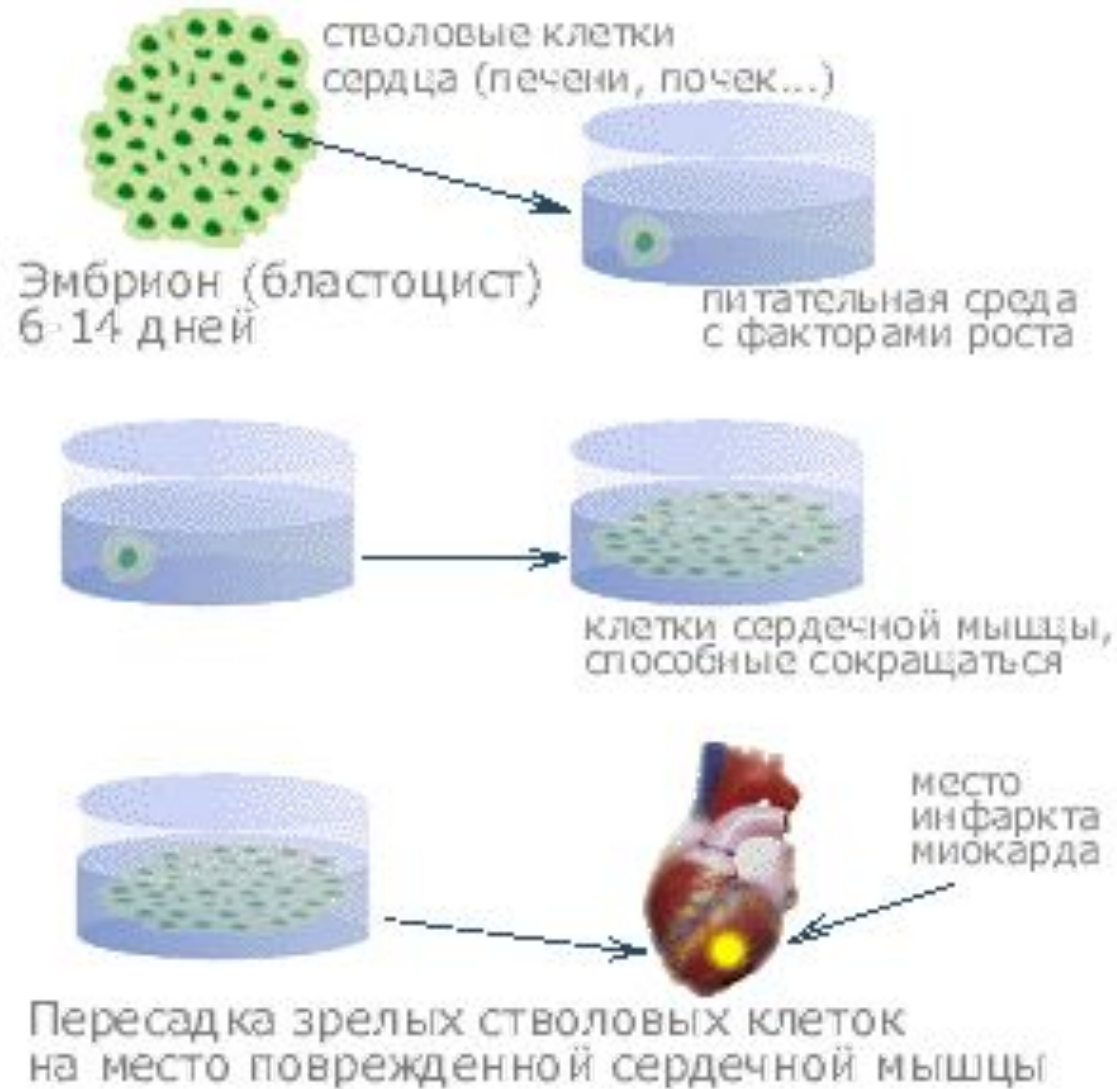
# Термины

- клон,
- стволовые клетки,
- бластоциста,
- бластоцит,
- имплантированное ядро,
- реконструированные зиготы,
- химерные организмы.

# Схема опыта с млекопитающими

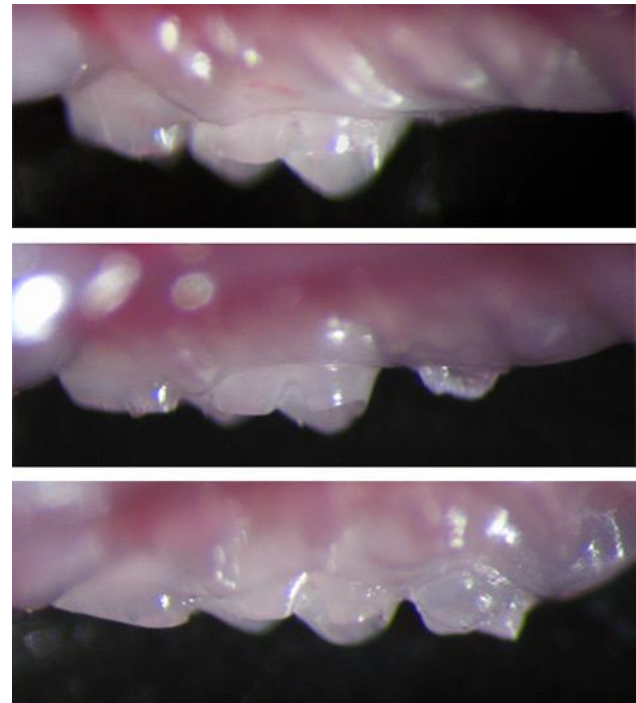


# Терапевтическое клонирование



# Из стволовых клеток впервые выращены полноценные зубы

- фото Takashi Tsuji/Tokyo University of Science.



Эпителиальные

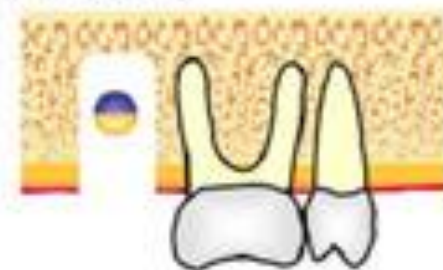
Культура с органом  
5-7 дней

Трансплантация



Зародыш  
зуба

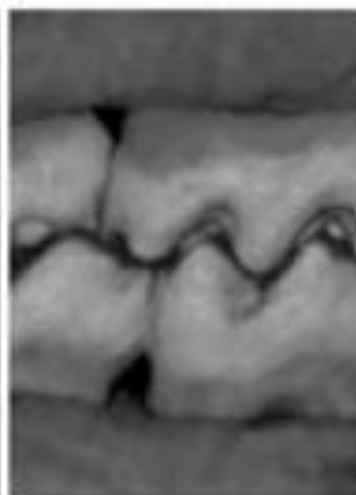
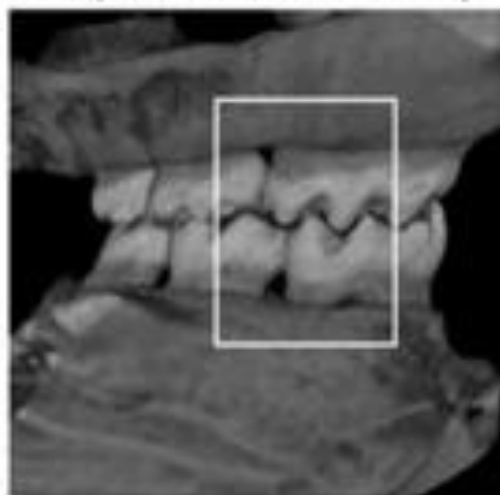
Коллагеновый  
гель



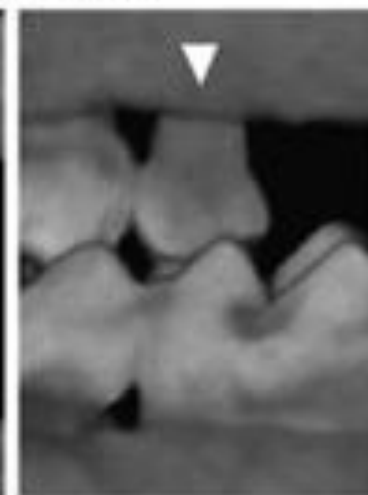
Мезенхимальные

Удаление и Трансплантированный  
залечивание раны биоинженерный зуб

Нормальный зуб



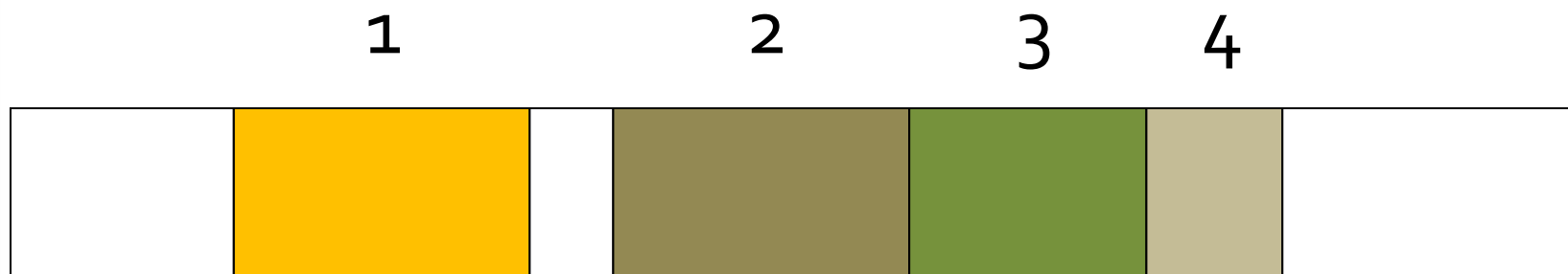
Биоинженерный зуб



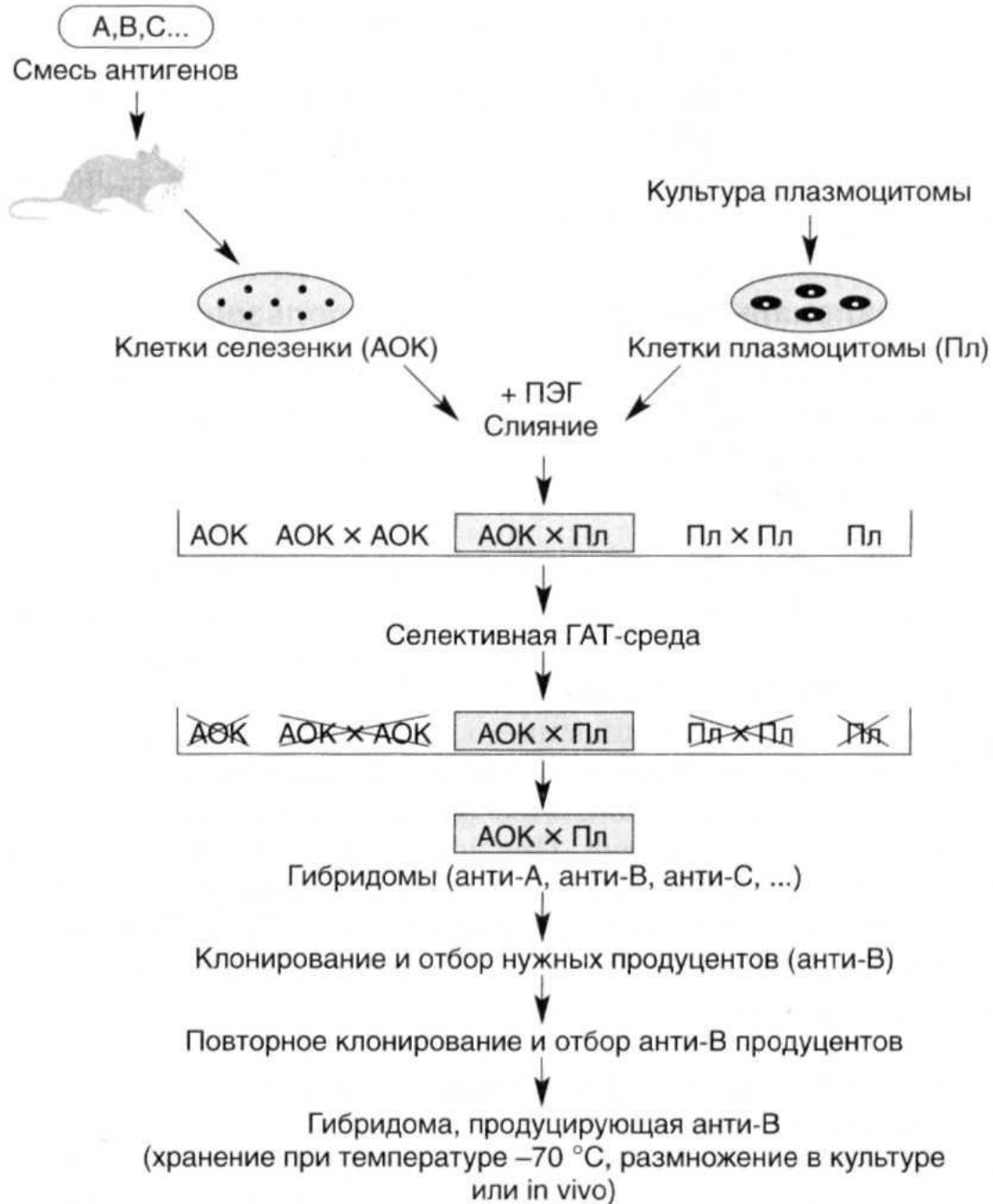


# Антитела и антигены

## Схема антигена



Поликлональные и  
моноклональные антитела





**Репродуктивное  
клонирование  
млекопитающих**



# Повторение опытов с другими млекопитающими



- Кошка Сиси (справа) — клон Рейнбоу. В ее генотипе есть и ген рыжего пигмента, но ее индивидуальное развитие сложилось так, что этот ген не проявился в окраске. Да и по характеру мать и дочь совсем не похожи. С этим столкнулись, например, Дуэйн Крамер и его коллеги — сотрудники Техасского сельскохозяйственно-политехнического университета, создавшие первую в мире клонированную кошку Сиси.

# Клонированные в RNL Bio щенки бигля.

Фото ©AFP



- Представители корейской биотехнологической компании RNL Bio заявили о разработке новой технологии клонирования, которая позволит в несколько раз снизить стоимость этого процесса. Утверждается также, что новая технология является на порядок более надежной, чем существующие аналоги. Подробности этого заявления приводит Reuters.



В процентах **Мышь Кошка Овца Корова Человек**  
**Пересадка ядра:** собственное ядро яйцеклетки заменяют ядром клетки клонируемого организма. Полученную клетку побуждают к делению

76 43 94 63 75

**Дробление клеток:** делящиеся клетки становятся бластоцистой, предшественником зародыша

49 28 23 34 4

**Пересадка зародыша:** развивающийся зародыш переносят в матку суррогатной матери и следят за появлением у нее признаков беременности

38 13 41 41 Клоны

человека

никогда не были доведены дальше стадии бластоцисты —

отчасти по этическим соображениям

**Успешное рождение:** если беременность проходит нормально, на свет появляется жизнеспособный клон

2 1 7 19

**Эффективность клонирования:** доля успешных попыток: от взятия яйцеклетки до рождения потомства

10, 5 2 1

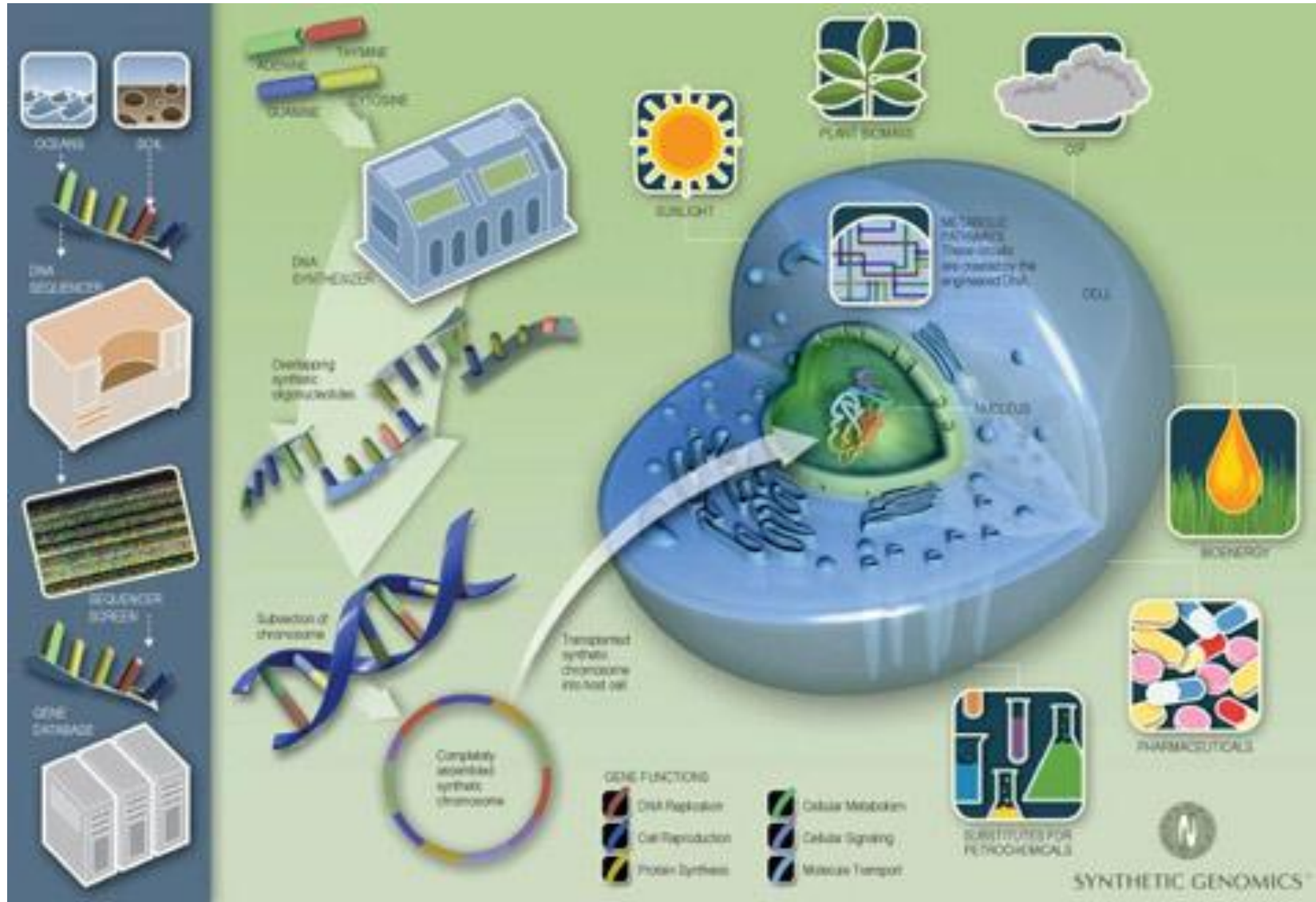
# Джеймс Уотсон



- **ничего аморального в использовании генетики на людях нет. "Я бы использовал её где угодно, если это поможет улучшить жизнь людей..."»**

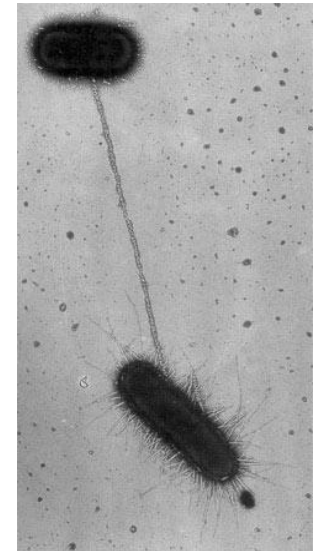
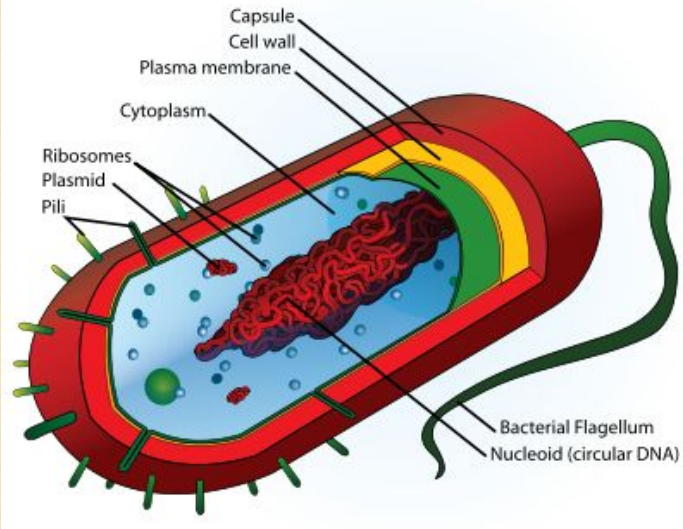


# Генная (генетическая) инженерия



# Природные механизмы передачи наследственной информации между клетками

- Трансформация Фактор Ф. Гриффитса
- Плазмиды, Половой процесс у бактерий



# Вирусы 1892 и бактериофаги 1915

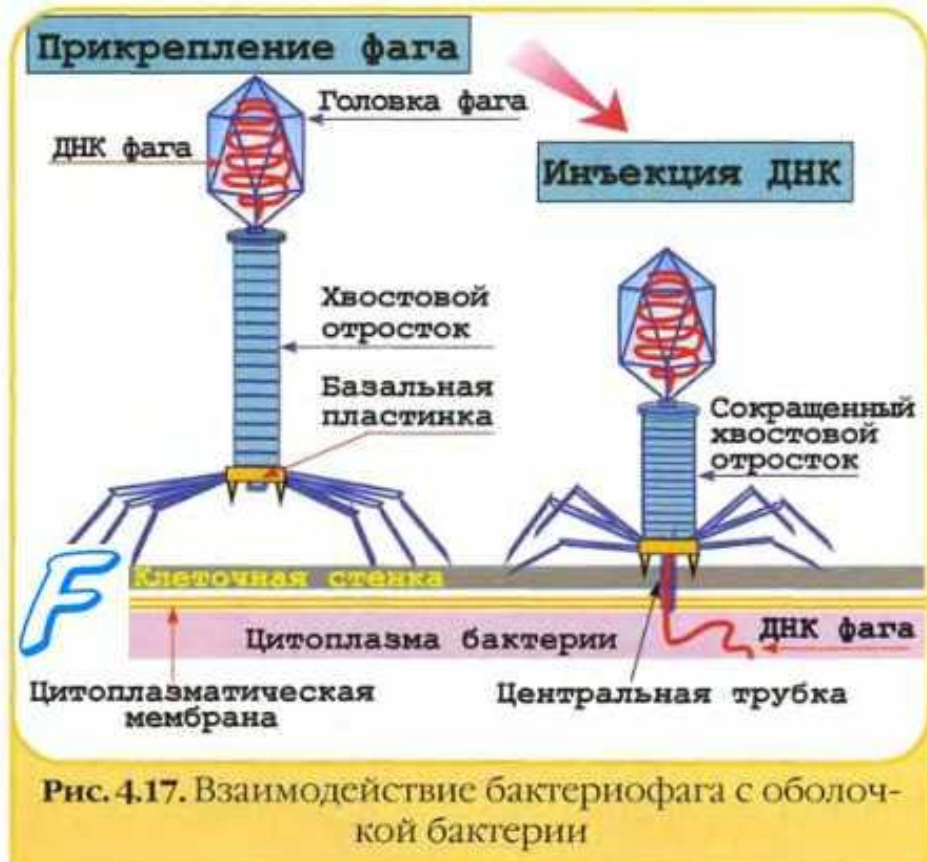
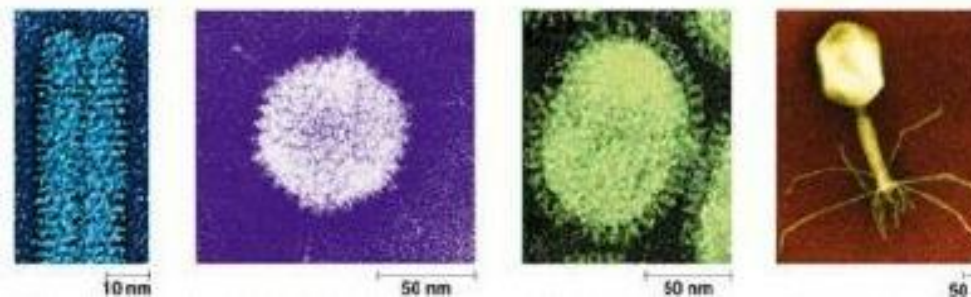
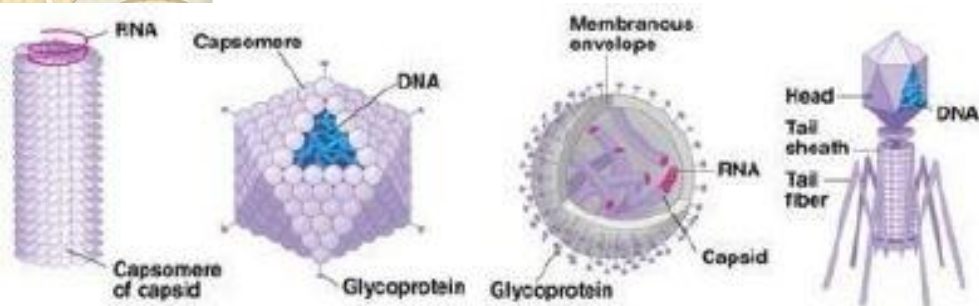
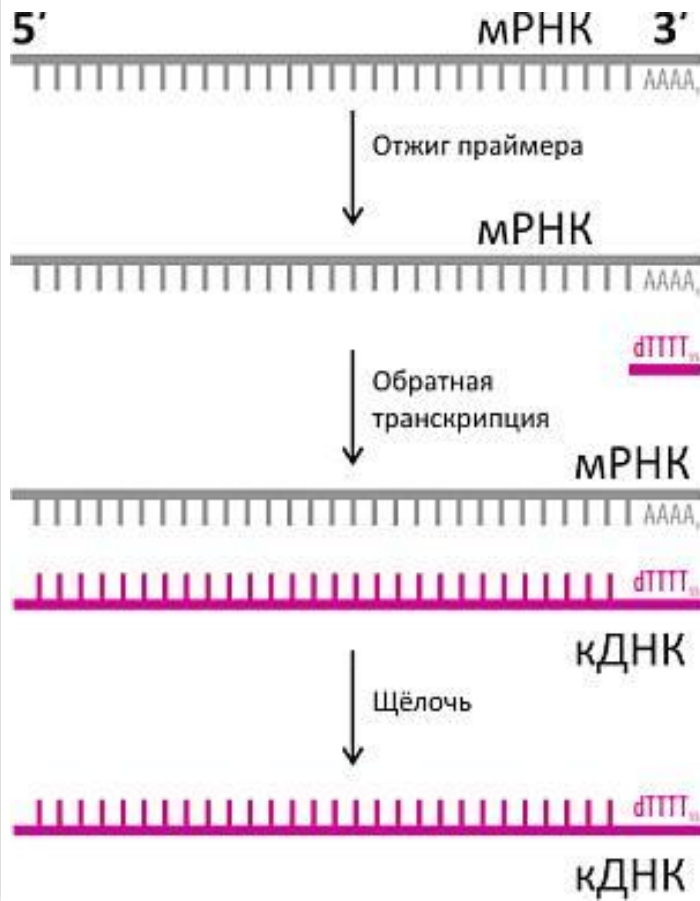


Рис. 4.17. Взаимодействие бактериофага с оболочкой бактерии

# Умеренные вирусы (лизогенные)

- Онкогенные вирусы (первый онкоген Src выделен в 1978)
- Вирус саркомы Рауса (в нем открыли обратную транскриптазу 1970)



**Схема обратной транскрипции**

# Трансдукция

— передача наследственного материала от одной клетки донора к клетке реципиенту с помощью умеренных бактериофагов

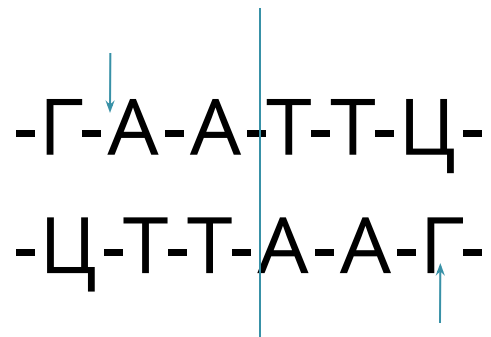
- 1952 Дж. Ледерберг, Н. Циндер (обнаружено на клетках бактерий в опыте в U-образной трубкой)
- Фаги  $\lambda$ , как носители для библиотеки генов использовались в программе «Геном человека» Имеют значение при **секвенировании** – определении последовательности нуклеотидов ДНК генов.



*Центр коллективного пользования дорогостоящим оборудованием для секвенирования ДНК был создан в 2000 году на базе Института Химической Биологии и Фундаментальной Медицины*

# Борьба бактерий против вирусов

## Рестриктазы и сайты узнавания



Липкие концы

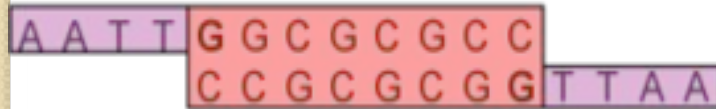
Метилазы

Лигазаы

# Использование рестриктазы



Eco RI site  
Restriction site in vector



Basic Nondirectional Linker

(Purple) Strick end ( AATT) ligates to EcoRI site.  
(Pink) New Restriction Site, not found in either insert or vector



Insertion of insert kills EcoRI site. New site is introduced (Ascl)  
Terminal base (C) has been changed to (G), killing EcoRI site.

5' A A T T G G C G C G C C 3'

A linker containing a single restriction site is palidromic,  
thus saving need to make a second primer.

## Использование природных инструментов и путей передачи в генной инженерии.

- Вырезать ген → встроить в клетку, вшить вектор:

плазмида или умеренный фаг

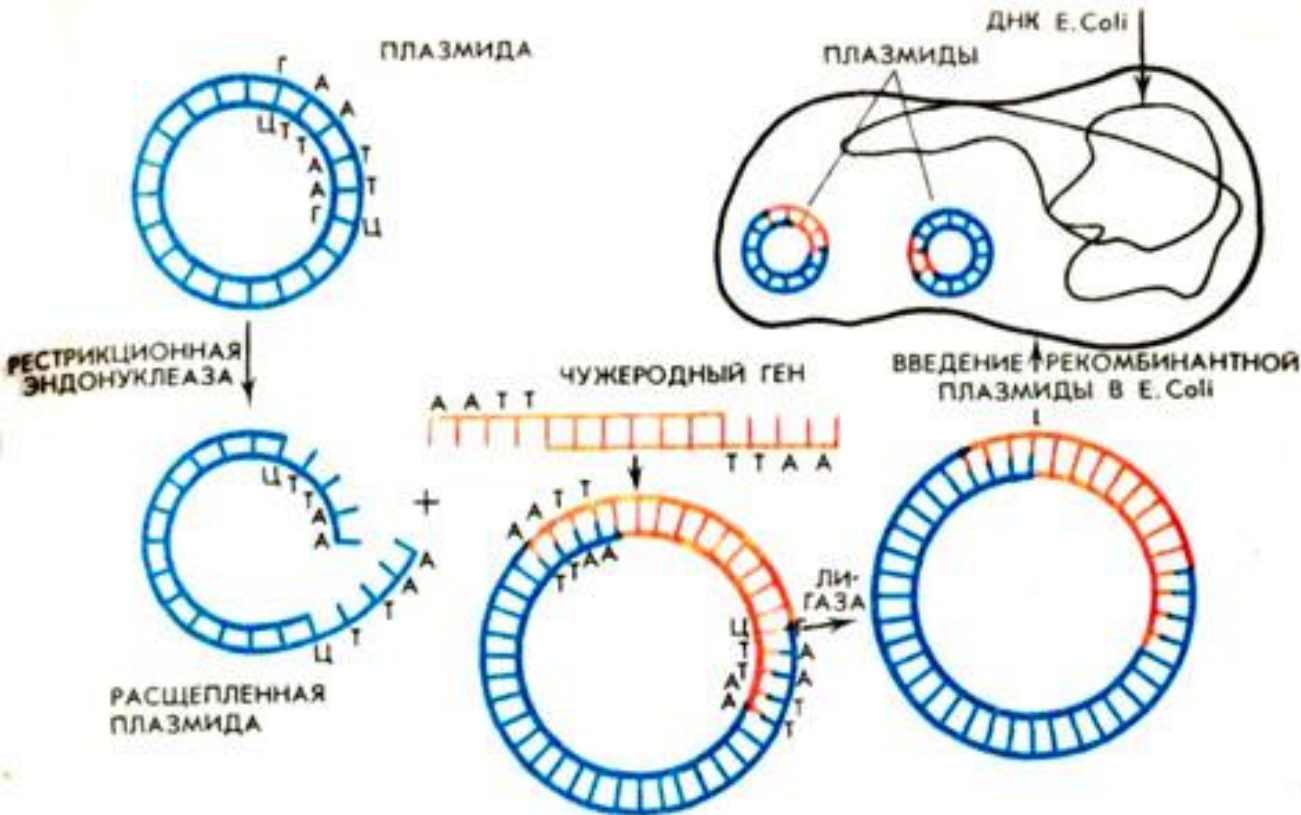
- мелкие

- с одним сайтом рестрикции (линкером)
- с селективным маркером
- с сайтом начала репликации

pBR322 – Ф. Боливар, Р. Родригес (p-plasmid)



# Конструирование клеток с измененной наследственностью (методика С.Коена и Г. Бойера 1971)

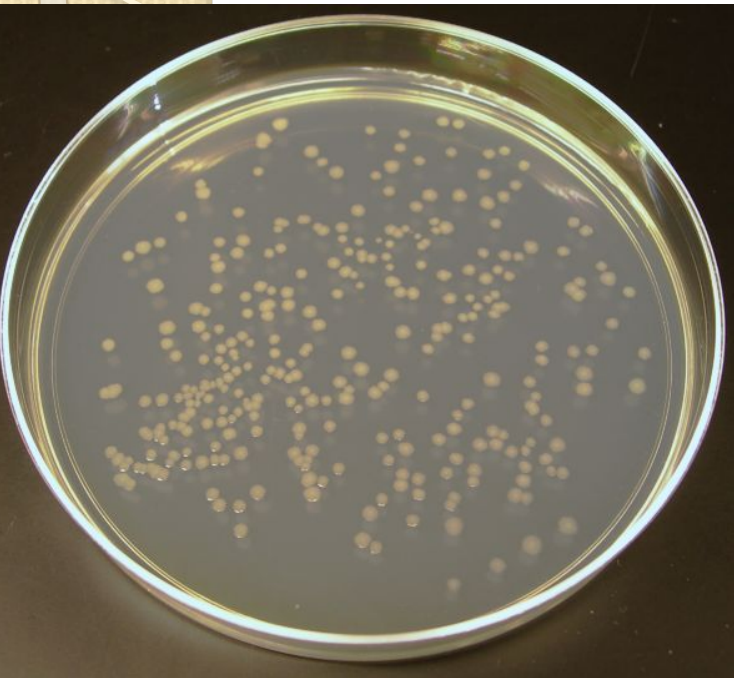


1. вектор-рестриктаза
2. ДНК с нужным геном – рестриктаза
3. смешивание
4. лигаза
5. Трансформация

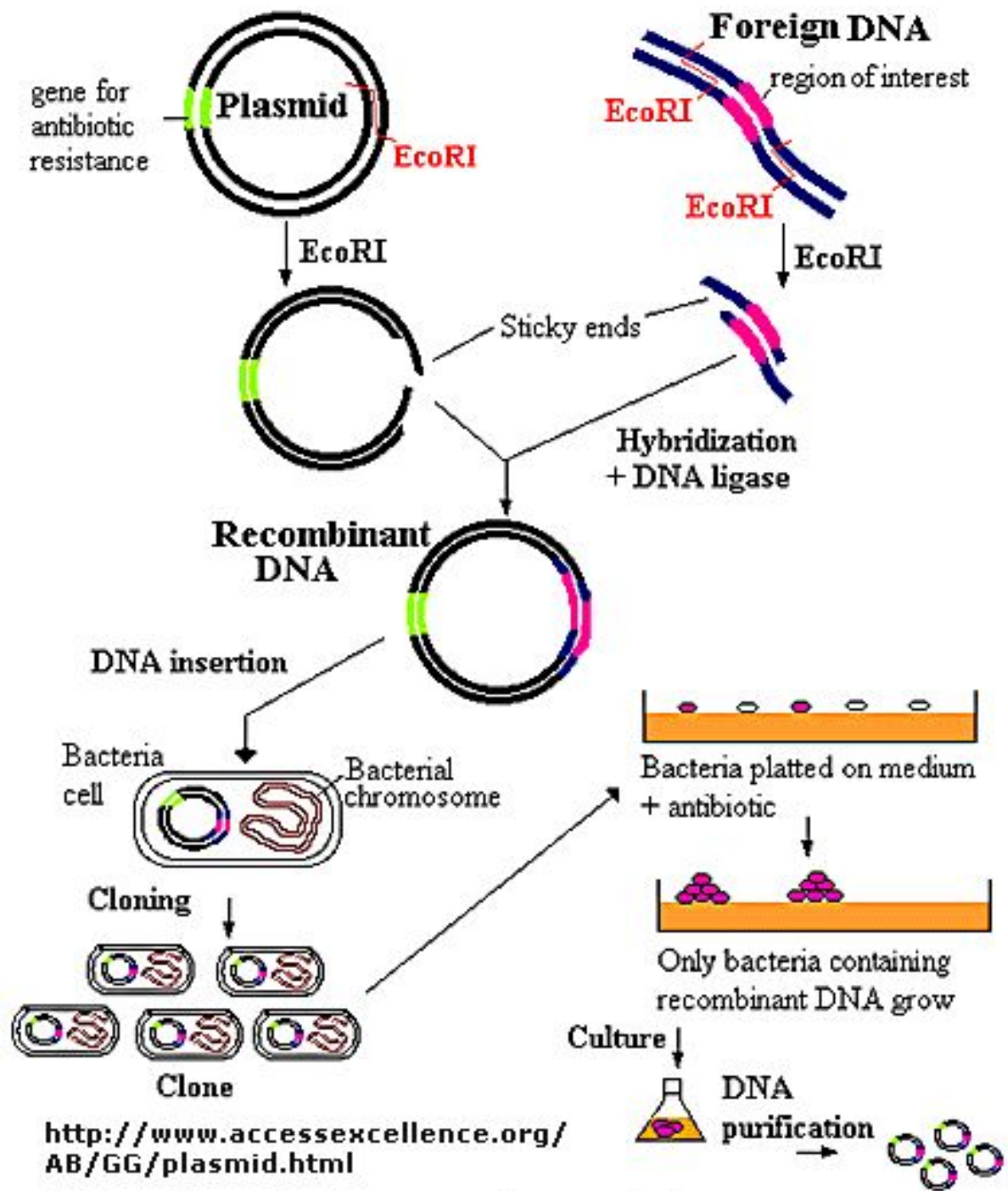
**Успех 1 из 1000**

Предварительная ПЦР, последующий отбор

## Отбор трансформированных бактерий: посев на среду для маркера, скрининг



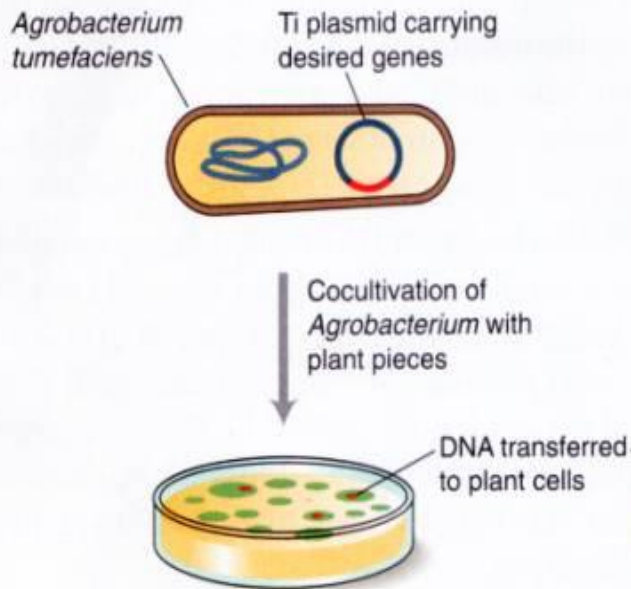
- отпечаток
  - – лизис, денатурация –
  - радиоактивный зонд
- 
- Культивирование трансформированных бактерий:  
клонирование и хранение рекомбинантных генов, считывание информации



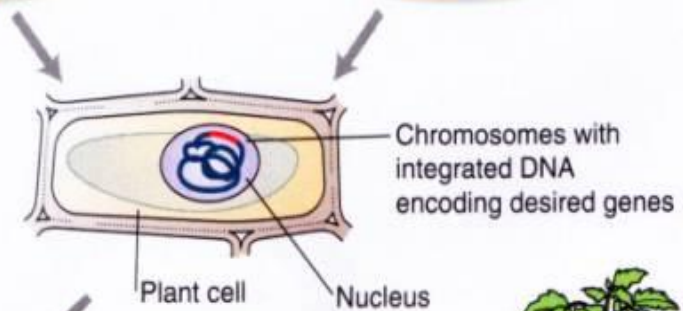
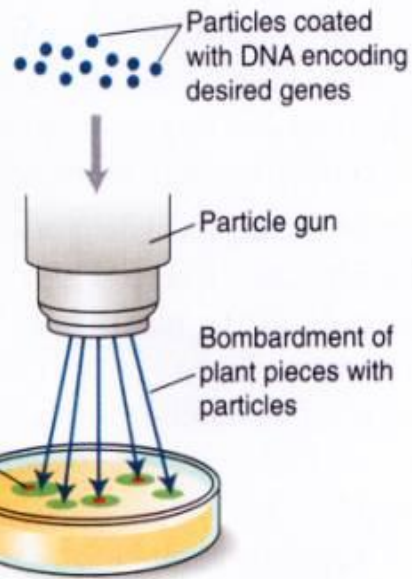
<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/plasmid.html>

# Cloning into a plasmid

## Agrobacterium method



## Particle gun method



Shoot regeneration followed by root regeneration



# Встраивание генов в эукариотический организм

SV<sub>40</sub>

# Отбор клеток (эукариот), которые получили нужный ген.



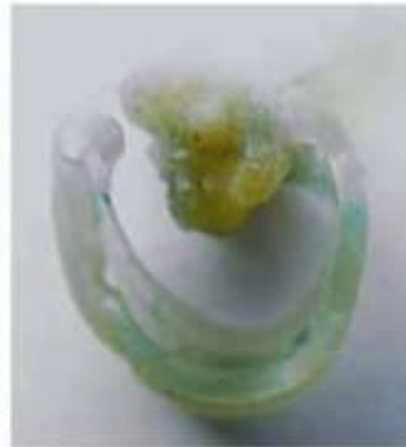
1



2



3



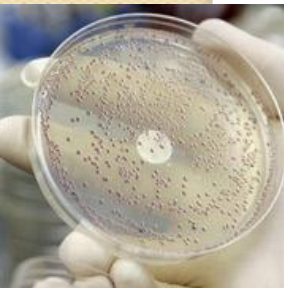
4

- При работе с растениями, маркером может быть ген устойчивости к гербициду.

# Практическая генная инженерия



ГМО (ГМП) «Нашей Газете» 18.10.2007 удалось пообщаться с Президентом Латвийского общества генетиков и селекционеров, профессором Латвийского Университета Исааком Рашалем. «как накормить 6 миллиардов населения, учитывая, что по прогнозам в 2050 году эта цифра увеличится до 10 миллиардов»... «В Балтийских странах никто созданием растений методом генетической инженерии не занимается»



- Созданы бактерии, способные синтезировать пластмассу

Ученым удалось создать приматов, которые не только светятся зеленым цветом, но и передают эту особенность потомкам



В США появилось много энтузиастов которые в домашних условиях занимаются генной инженерией: Meredith L. Patterson у себя в столовой пытается создать генетически модифицированную йогуртовую о, которая будет светиться зеленым светом, если в молоке есть меламин - токсичное вещество, используемое в производстве красок, лаков и пластмассы



1974 открытое письмо Комиссии по рекомбинантным

ДНК

# Биотехнология на службе экологии



Биологическая очистка сточных вод



Очистка водоемов и отстойников

Получение удобрений из навоза

отходов



биоремедиация – очистка  
от нефтепродуктов



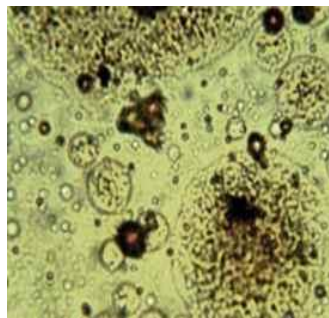
утилизация твердых жиров

получение газа (метан)

из отходов



бактериальные высокоэффективные  
удобрения



# Список литературы

- Основы биотехнологии: 10-11 классы: учебное пособие для учащихся общеобразовательных учреждений / Е.А. Никишова. – М.: Вентана-Граф, 2008. 160 с. – (Библиотека элективных курсов)
- Основы биотехнологии: 10-11 классы: методическое пособие / Е.А.Никишова. – М.: Вентана-Граф, 2008. 160 с. – (Библиотека элективных курсов).
- Клетки и ткани: учебное пособие / Д.К. Обухов, В.Н. Кириленкова. – М.: Дрофа, 2007. – 287 с. – (Элективные курсы).
- Клетки и ткани: методическое пособие / Д.К. Обухов, В.Н. Кириленкова. – М.: Дрофа, 2007. – 287 с. – (Элективные курсы).
- Генетика от А до Z/ Первая часть:  
<http://gleb-kudr.habrahabr.ru/blog/48533/>
- Журнал "Биотехнология" публикует экспериментальные статьи и аналитические обзоры по всем аспектам современной биотехнологии, является единственным журналом, который публикует работы в данной области, выполняемые во всех странах СНГ



Спасибо за внимание!

