



«Московский технологический университет»
Институт тонких химических технологий
Кафедра биотехнологии и промышленной фармации

Микроорганизмы – инструменты научных исследований

- Группа ХБМО-01-17
- Студенты:
Волков Тимофей
Лылова Евгения
Тузова Елена
- Преподаватель:
Сафина Дина Рашидовна

Роль микроорганизмов в генной и белковой инженерии

Генная инженерия - совокупность методов молекулярной генетики, направленных на искусственное создание различных сочетаний генов.

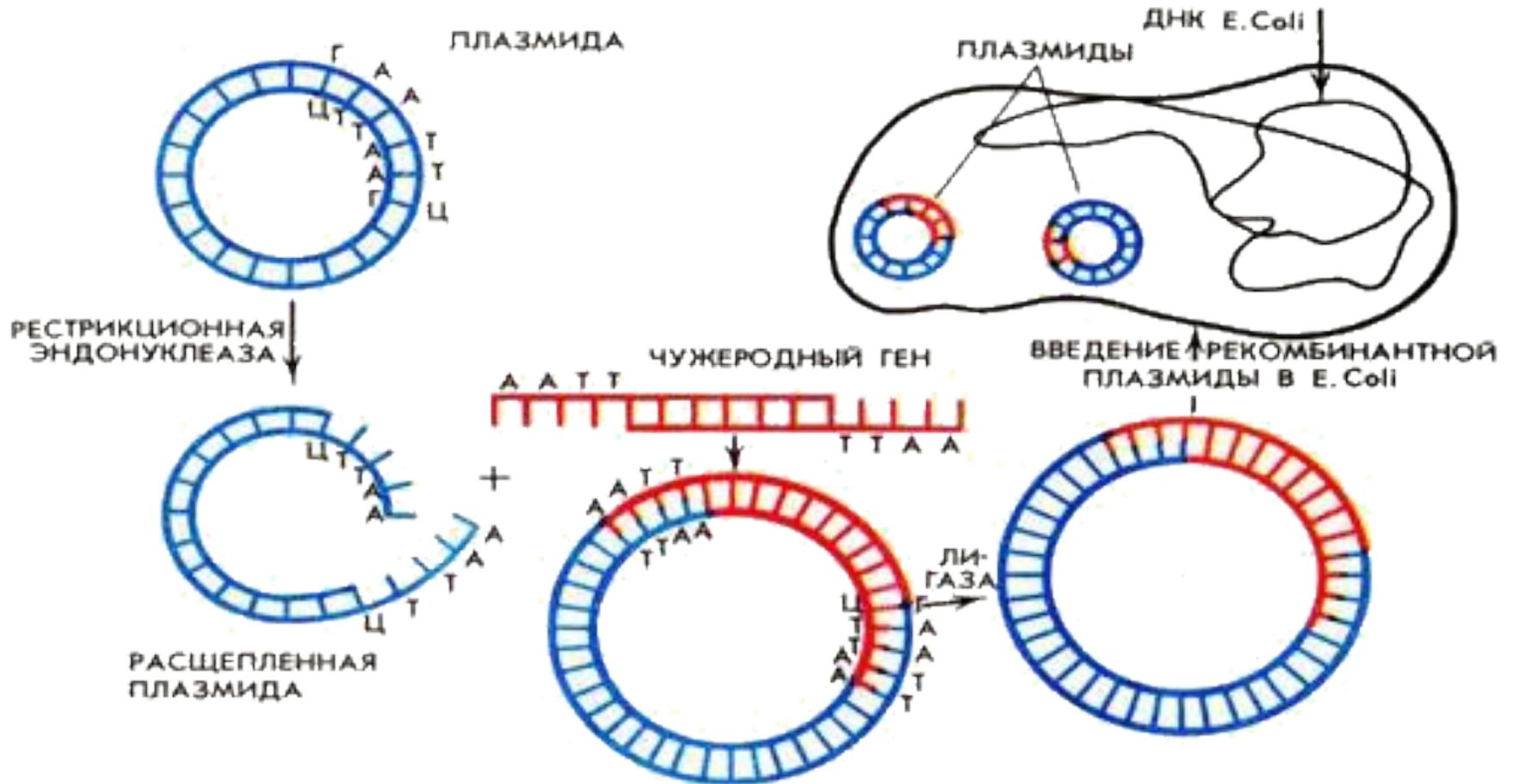
Цели генной инженерии:

- Получение клеток, способных нарабатывать некоторые человеческие белки.
- Изучение строения и функций генетического аппарата.
- Выведение новых видов организмов.
- Модификация организмов, привитие необходимых свойств.
- Замещение генов, дефекты которых вызывают наследственные заболевания.

Основные операции генной инженерии :

- Выделение из клеток ДНК, содержащей нужный ген.
- Разрезание ДНК на мелкие фрагменты с помощью ферментов.
- Соединение фрагментов ДНК с векторами, обеспечивающими перенос генетической информации в клетку.
- Клонирование нужного гена.
- Создание рекомбинантной ДНК из участков ДНК разного происхождения.
- Введение генетического материала в культивируемые клетки организма-хозяина или в его яйцеклетку.

Встраивание гена в клетку



Получение инсулина методом генной инженерии



Векторы в генетической инженерии

Вектор – генно-инженерная конструкция, используемая для переноса генетического материала в клетку и способная к саморепликации.

Свойства векторов

1. Длительное существование в популяции клеток-хозяев;
2. Наличие генетических или биохимических маркеров, позволяющих обнаруживать присутствие вектора в клетках;
3. Должны допускать встраивание чужеродной ДНК без нарушения своей функциональной целостности

Основные этапы конструирования векторов

1. Нарработка необходимого количества генетического материала (хромосомной или плазмидной ДНК с помощью ПЦР);
2. Выбор вектора;
3. Обработка вектора и встраиваемого фрагмента ДНК эндонуклеазами рестрикции (рестриктазами);
4. Соединение двух фрагментов с помощью ДНК-лигазы

Плазмидные векторы

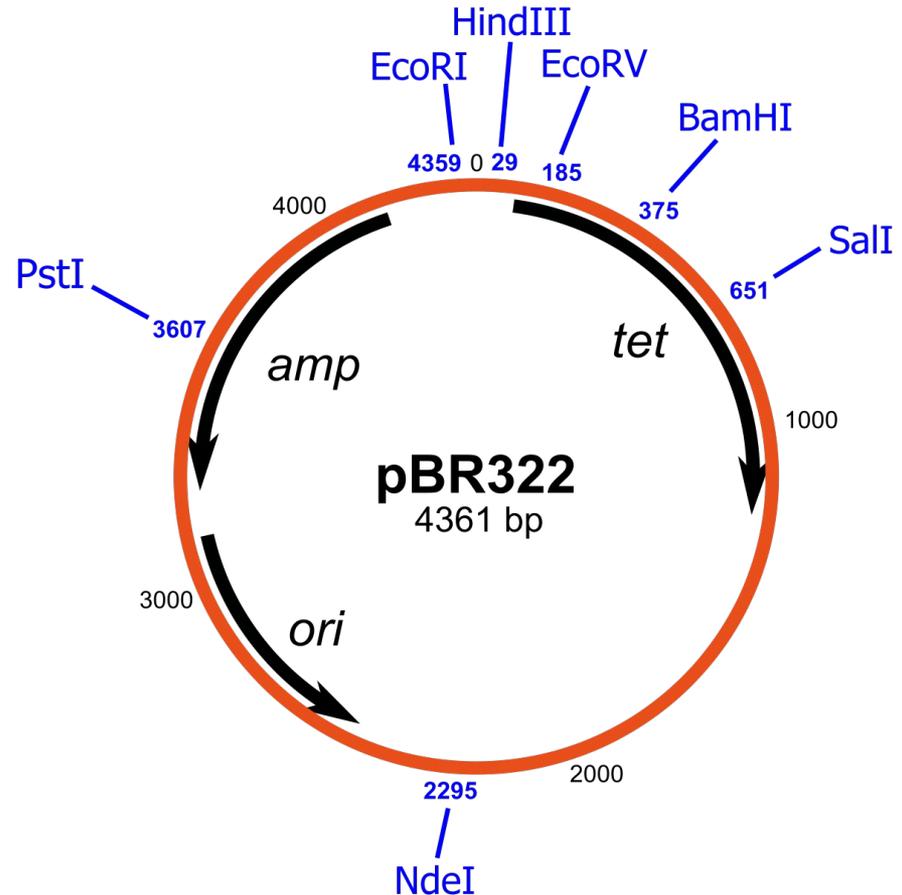
Плазмида – внехромосомная кольцевая ДНК, которая существует в автономном состоянии в цитоплазме.

- Ограничения на размер вставки чужеродной ДНК (не более 15000 п.о.);
- Низкокопийные (1-2 копии а клетку);
- Высококопийные (10-100 копий на клетку);
- Некоторые плазмиды несовместимы друг с другом

Плазмидный вектор pBR322

Особенности:

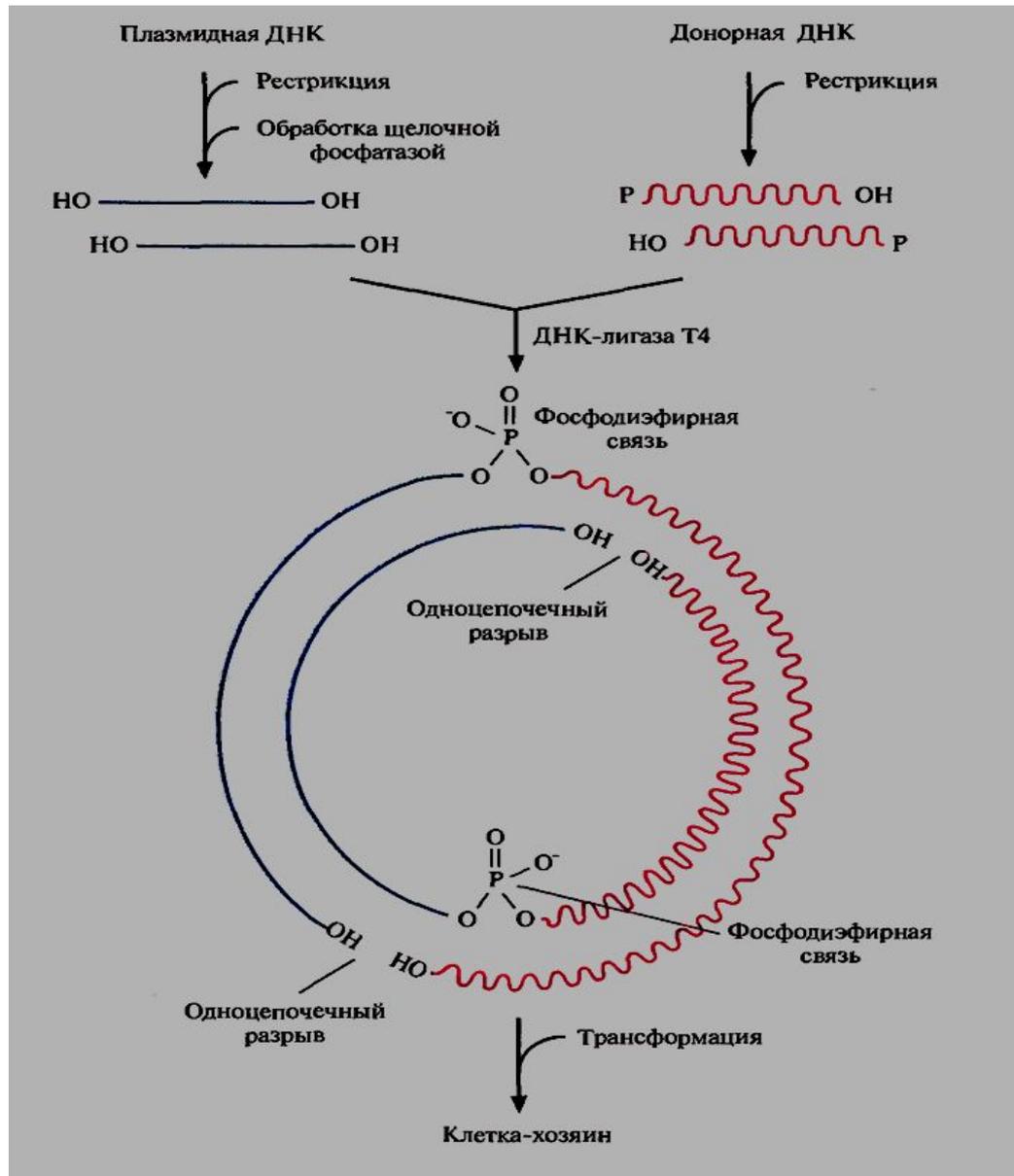
1. Наличие *ori* – точки начала репликации (позволяет поддерживать 10-20 копий на клетку);
2. Гены устойчивости к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tetr);
3. Малый размер (4361 п.о.)



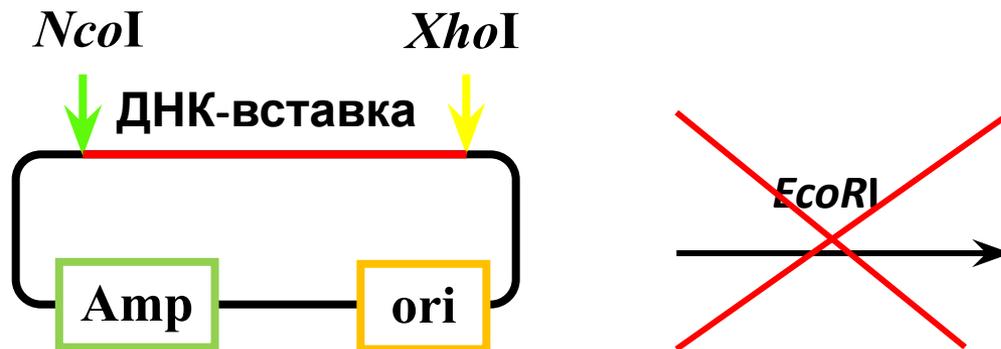
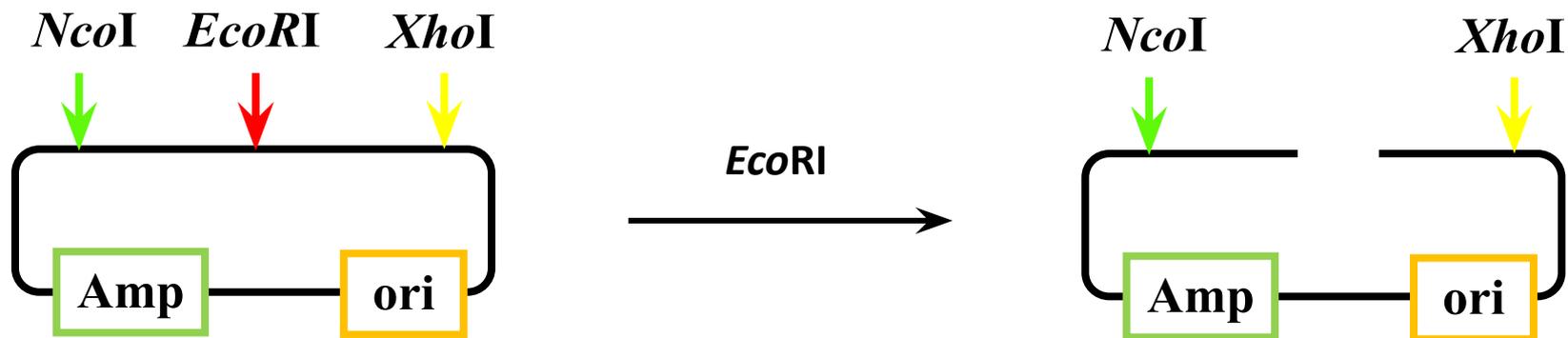
Методы первичного контроля вставки ДНК в плазмидный вектор

1. Обработка щелочной фосфатазой (липкие концы плазмиды без вставки не лигируются)
2. Обработка эндонуклеазой рестрикции (расщепление плазмид без вставки)

Механизм действия щелочной фосфатазы



Обработка эндонуклеазой рестрикции

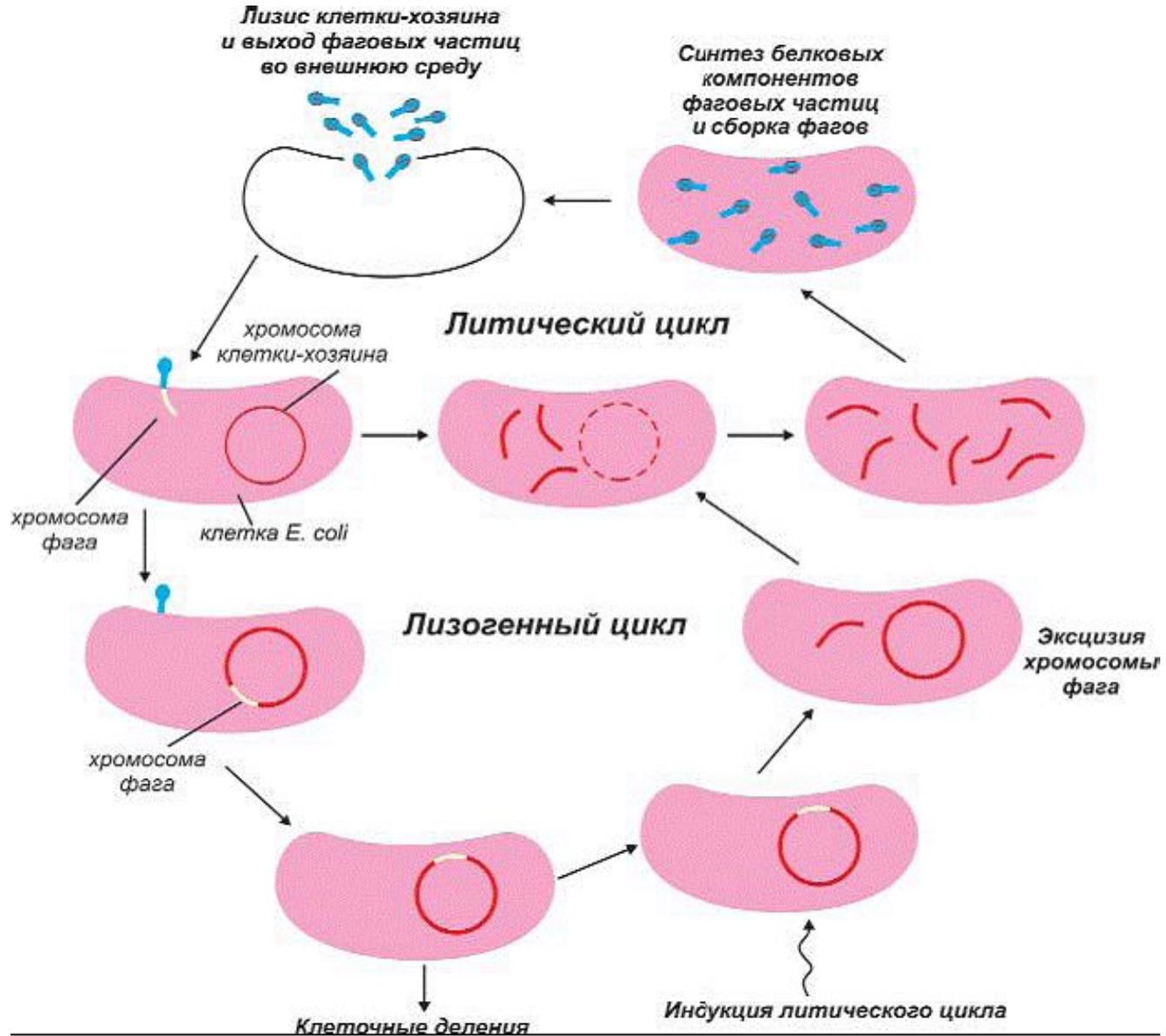


Векторы на основе фага λ

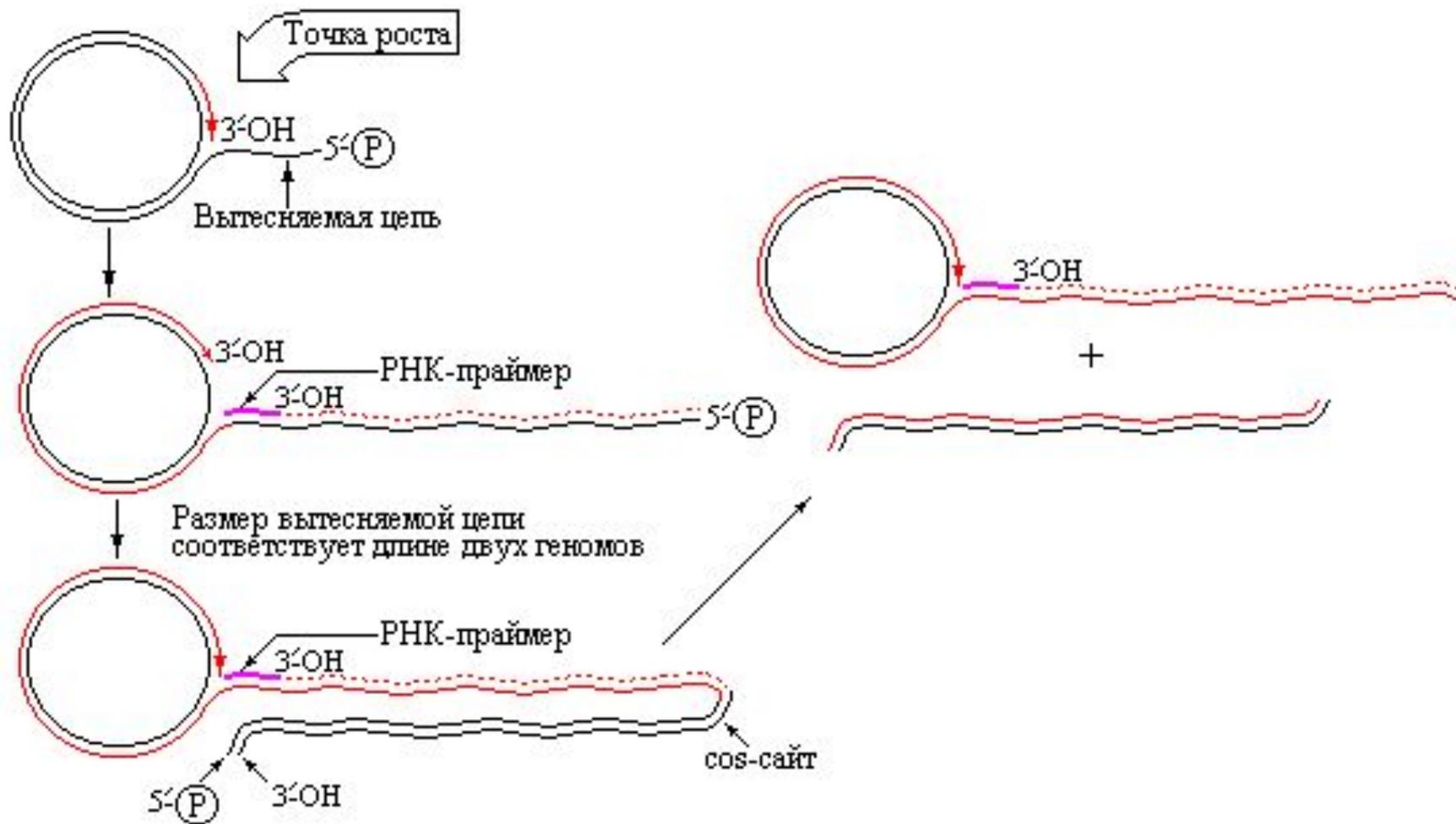
1. Почти треть генома фага λ несущественна и может быть заменена чужеродной ДНК;
2. Контроль над вставкой клонируемой ДНК (фрагменты ДНК, не содержащие вставки не упаковываются в фаговую частицу)
3. Позволяют клонировать фрагменты ДНК длиной 5-25 т.п.о.



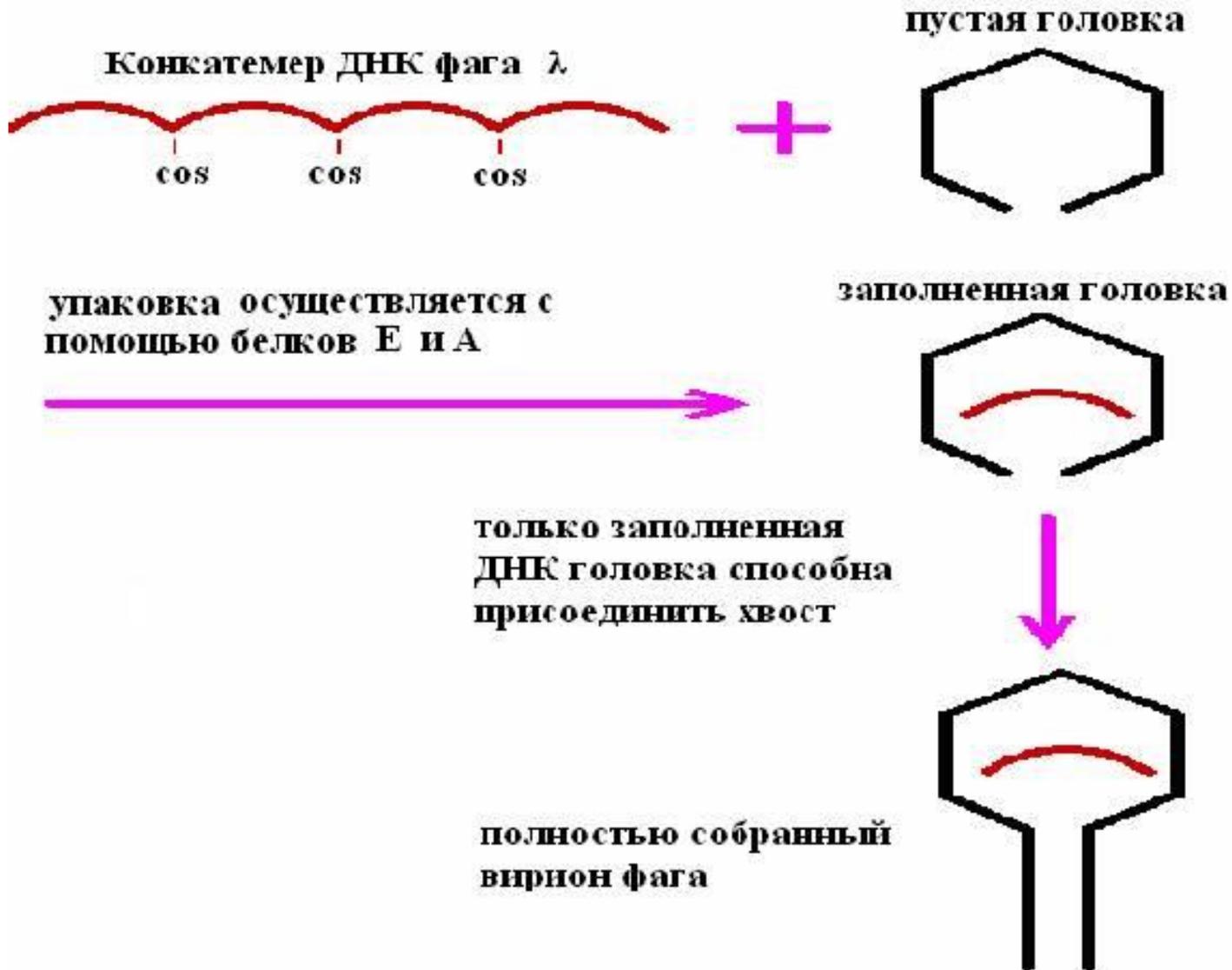
Жизненный цикл фага λ



Репликация по типу катящегося кольца



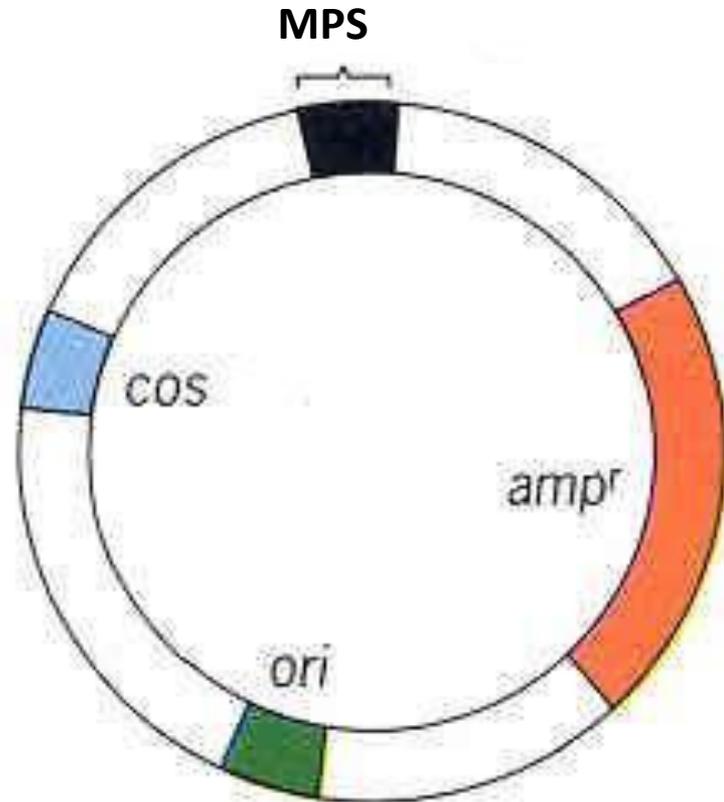
Упаковка ДНК фага λ

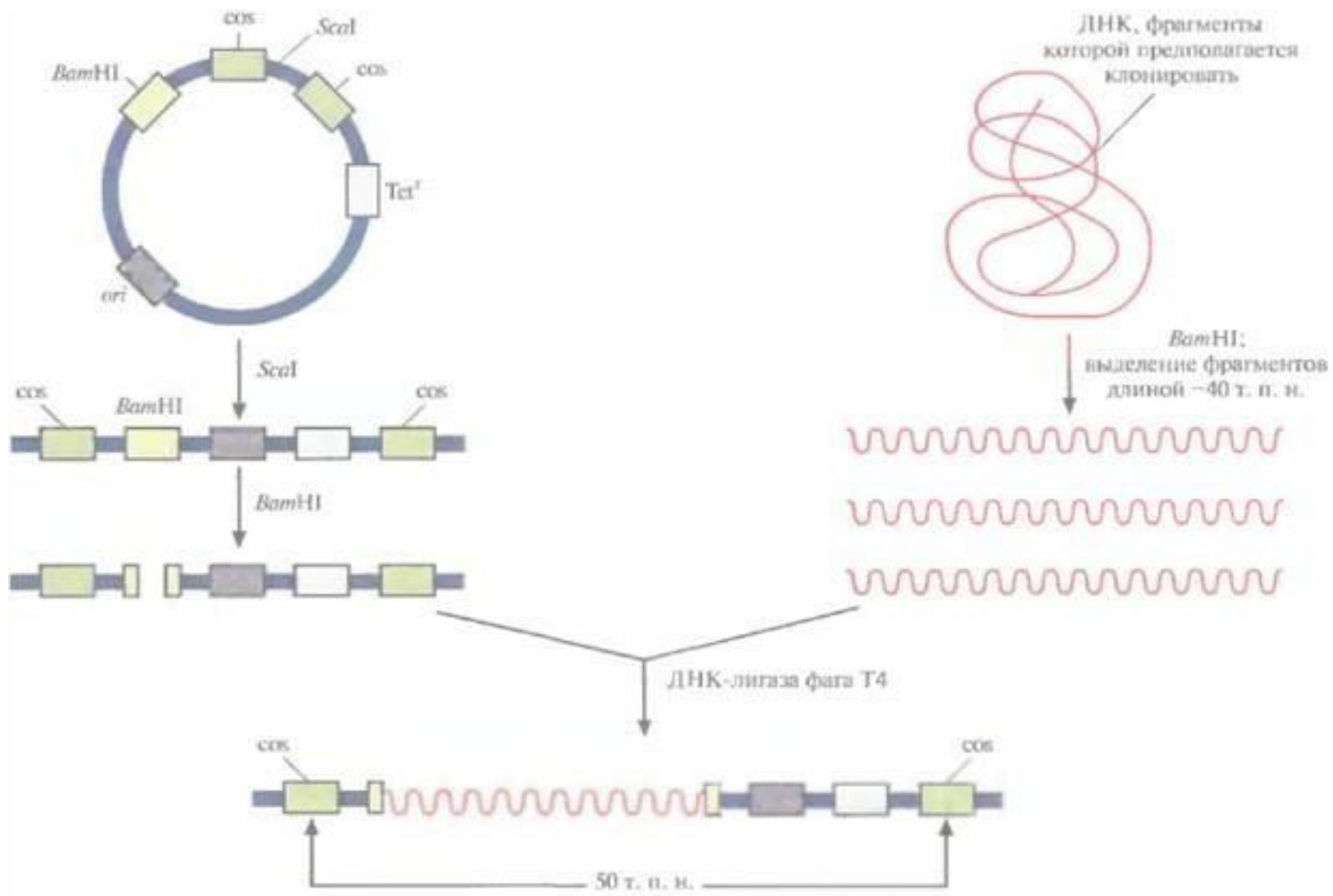


Космиды

Космиды – плазмидные векторы, в которые встроен Cos-сайт фага λ , обеспечивающий упаковку этой ДНК в фаг

- Позволяют клонировать фрагменты ДНК длиной 30-45 т.п.о.



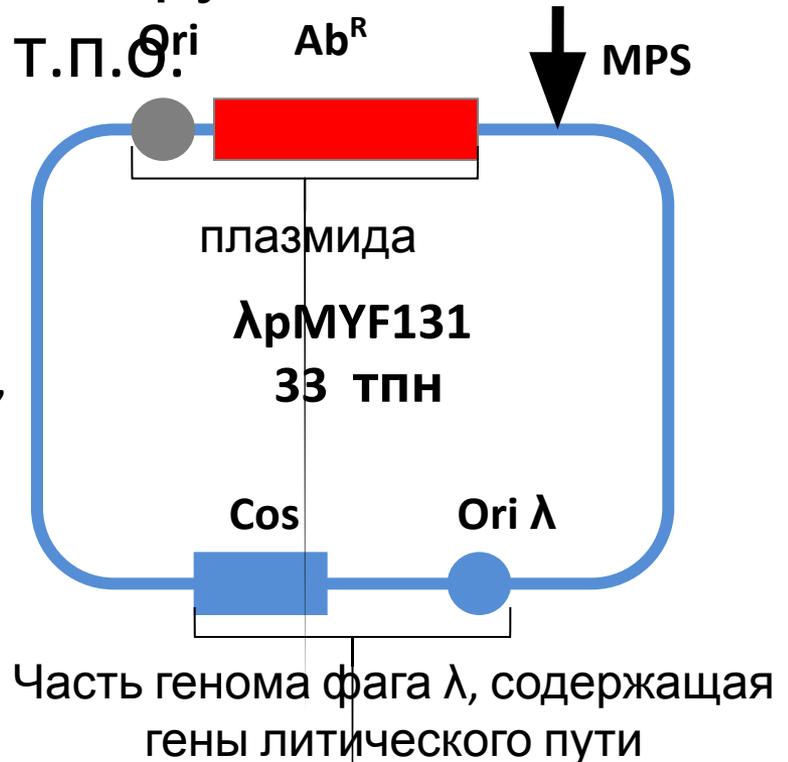




Фазмиды

Фазмиды (фагмиды) – векторы, созданные на основе фага и плазмиды и способные после встраивания чужеродной ДНК существовать и как фаг, и как плазида. Размер клонируемого фрагмента ДНК составляет 15 т.п.б.

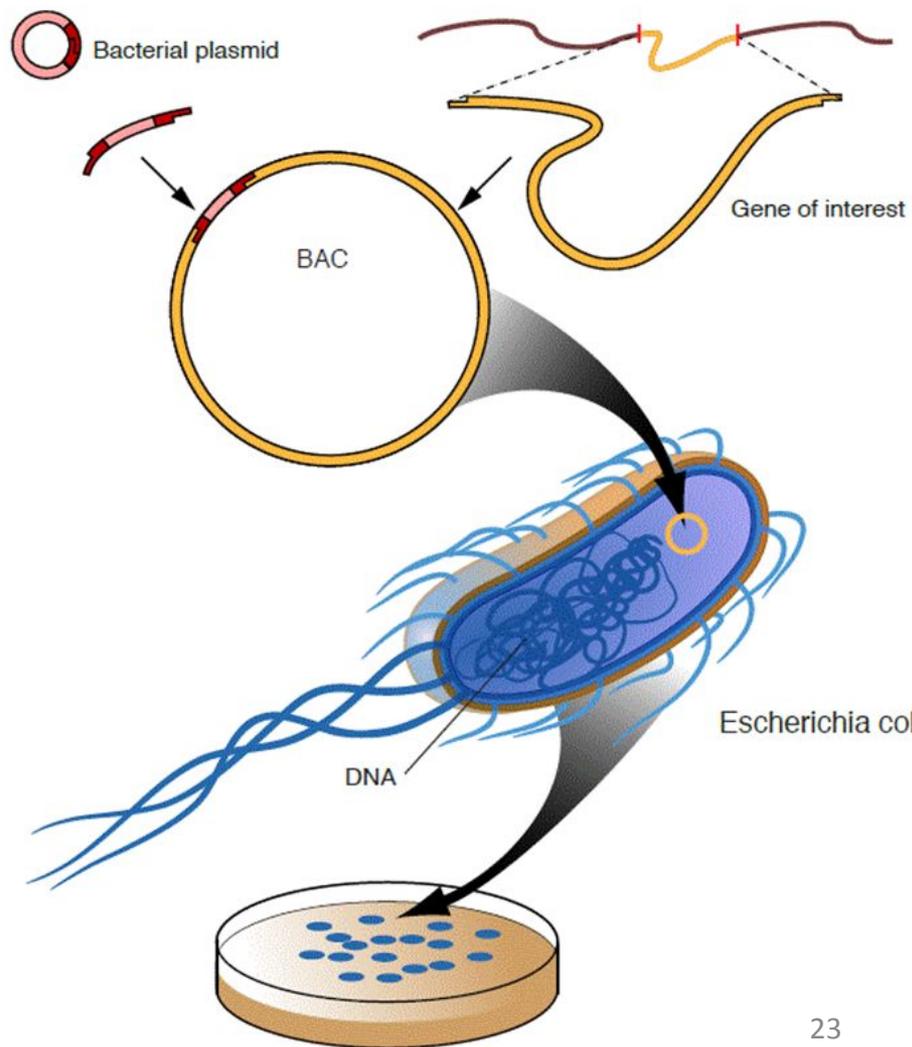
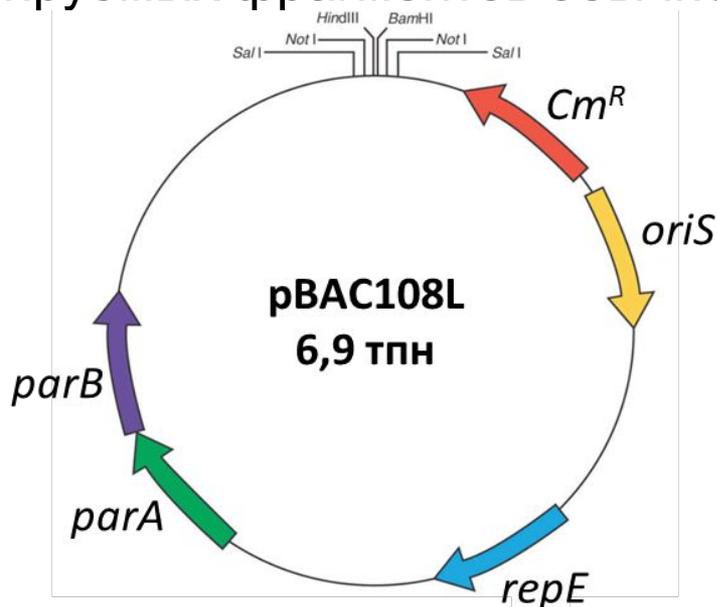
Для поддержания фазмиды в клетках в виде плазмиды используют штаммы *E. coli* лизогенные по фагу λ . Такие штаммы продуцируют фаговый белок-репрессор *ci*, подавляющий развитие фага по литическому пути. Для перевода фазмиды в фаговую форму меняют условия культивирования (например, повышают температуру) или используют другой штамм.



Бактериальные искусственные

ХРОМОСОМЫ

Бактериальные искусственные хромосомы (BAC, bacterial artificial chromosome) разработаны на основе F-плазмиды *E. coli*. Размер клонируемых фрагментов обычно 100-300 тпн.



oriS – ориджин репликации F-плазмиды

repE – ген, продукт которого обеспечивает репликацию плазмиды с *oriS*

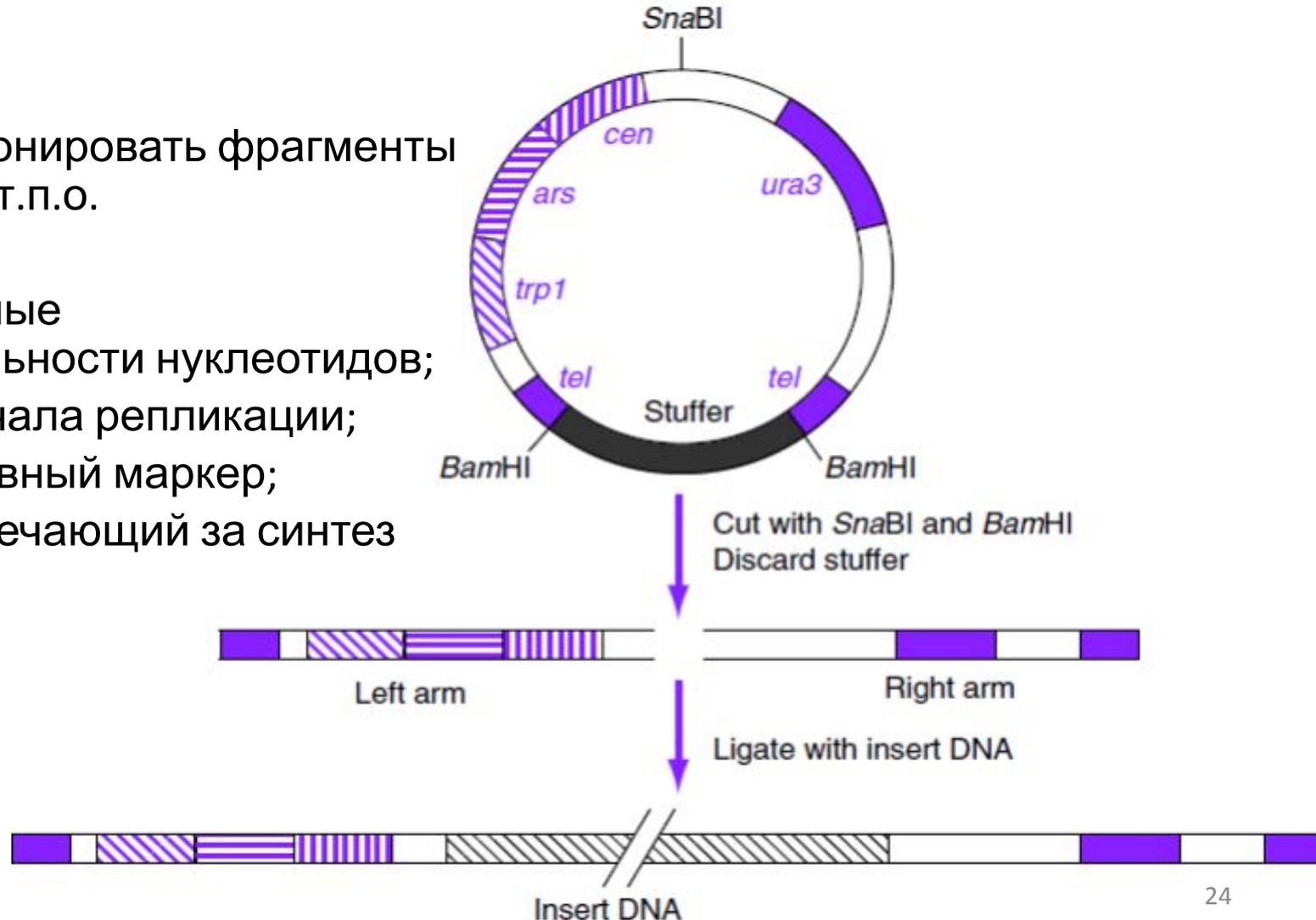
parA и ***parB*** – гены, продукты которых обеспечивают правильно расхождение плазмид по дочерним клеткам во время деления и поддерживают копийность плазмиды (1-2)

Искусственная хромосома дрожжей

YAC (Yeast Artificial Chromosome) – кольцевая молекула ДНК, существующая во внехромосомном состоянии в клетках дрожжей

Позволяет клонировать фрагменты ДНК 250-2500 т.п.о.

tel – теломерные последовательности нуклеотидов;
ars – точка начала репликации;
trp1 – селективный маркер;
ura3 – ген, отвечающий за синтез урацила



Введение рекомбинантных ДНК в клетки

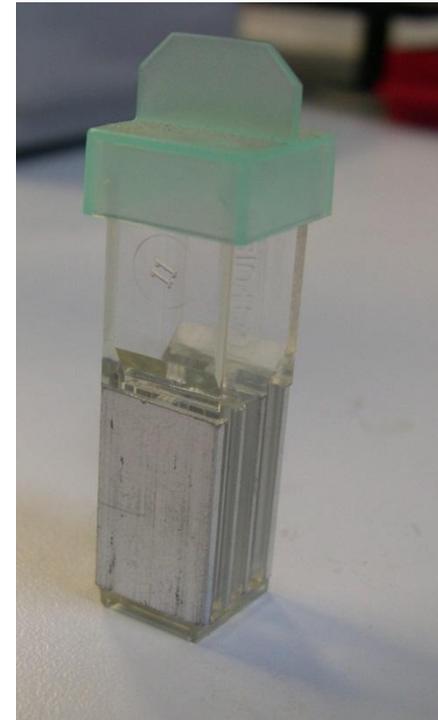
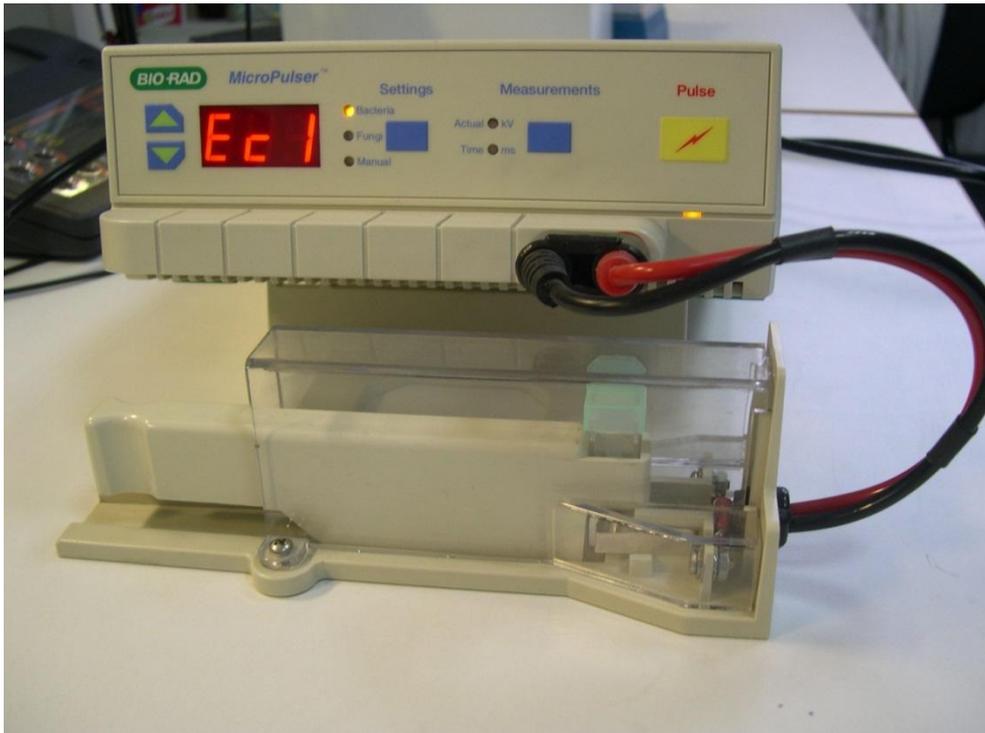
- **Трансформация** – процесс поглощения экзогенной ДНК бактериальными клетками.
- **Трансфекция** – образование зрелых фаговых частиц в результате поглощения бактериальными клетками ДНК бактериофагов
- **Компетентность клеток** – состояние бактериальных клеток, в котором они способны сорбировать экзогенную ДНК на своей поверхности и поглощать ее

Виды трансформации

- **Тепловой шок**

Клетки, предварительно обработанные раствором CaCl_2 , выдерживают 2 мин при 42°C , а затем резко охлаждают во льду.

- **Электропорация** – кратковременное воздействие электрического поля высокой напряженности.

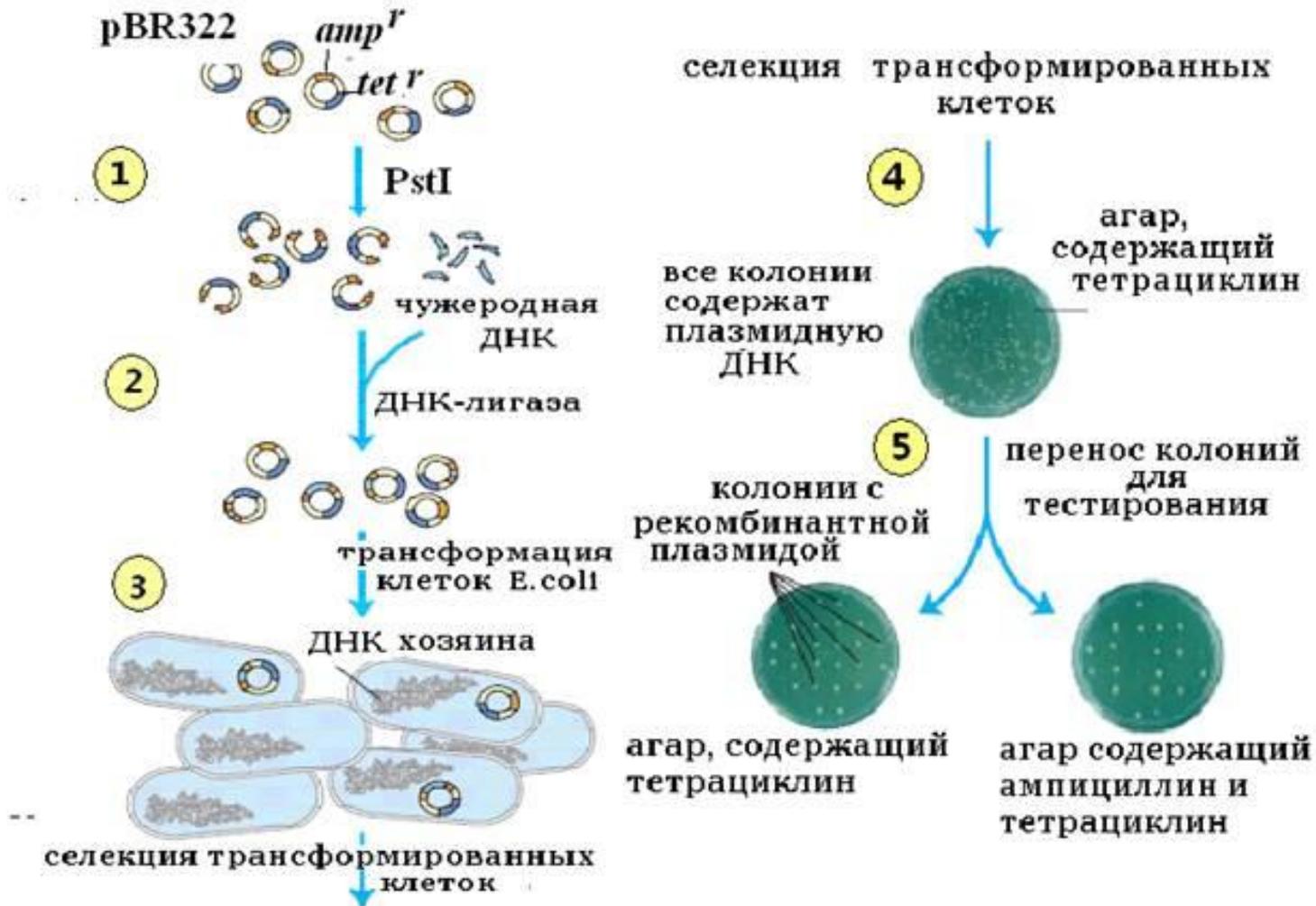


Идентификация клеток-
реципиентов со встроенным
геном-мишенью

Отбор проводится в 2 этапа

- Отбор клеток, несущих соответствующий вектор
- Отбор клеток, несущих ген-мишень

Отбор клеток, несущих соответствующий вектор



Отбор клеток, несущих нужный



Непосредственный анализ ДНК

- Прямое определение нуклеотидной последовательности ДНК
- гибридационный анализ с соответствующей ДНК/РНК

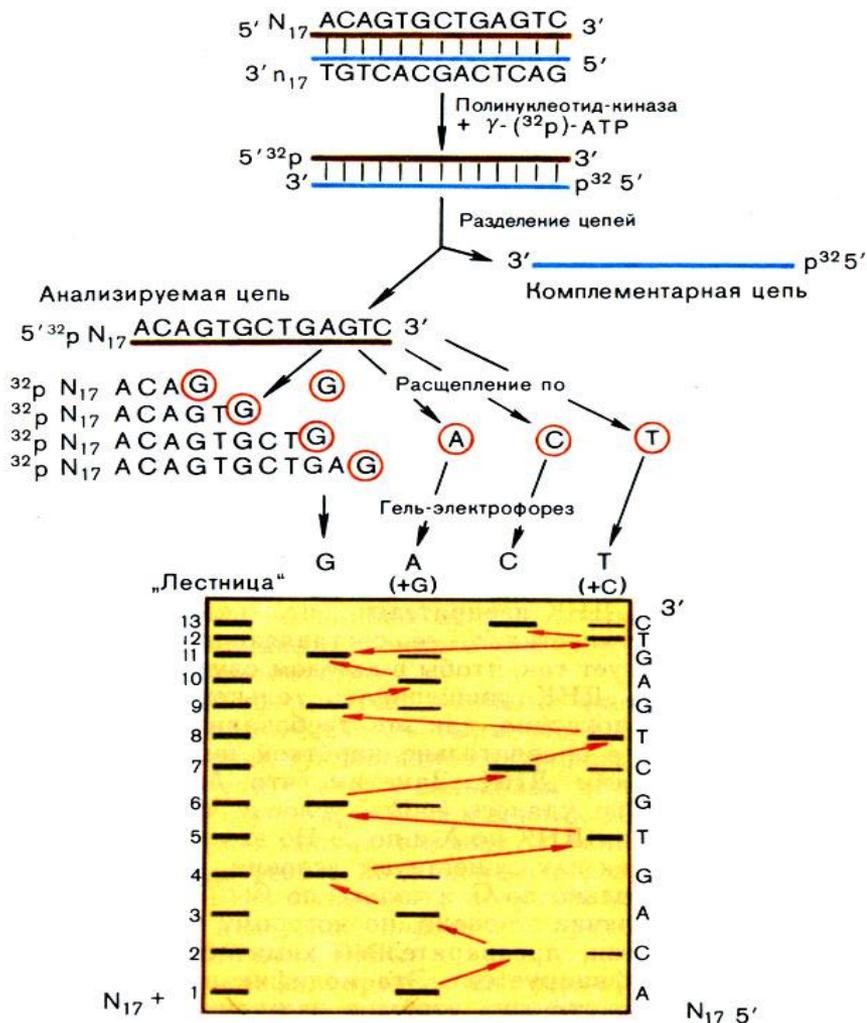
ген



Методы, основанные на выявлении признака, кодируемого геном-мишенью

- иммунологическая детекция
- культивирование селективных питательных сред
- определение по продукту гена-мишени

Метод Максама-Гилберта и метод Сенджера



Подвижность 18-членного олигонуклеотида — самая высокая в данном геле

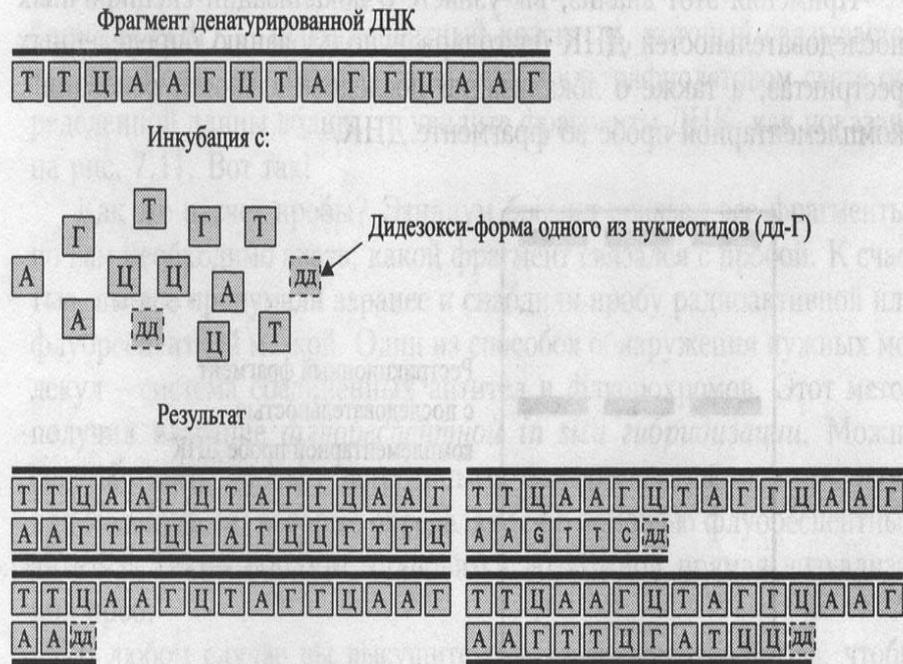
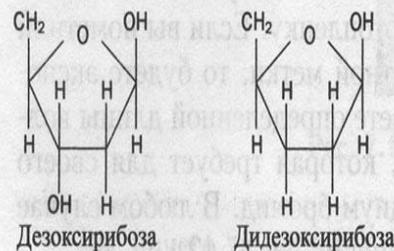
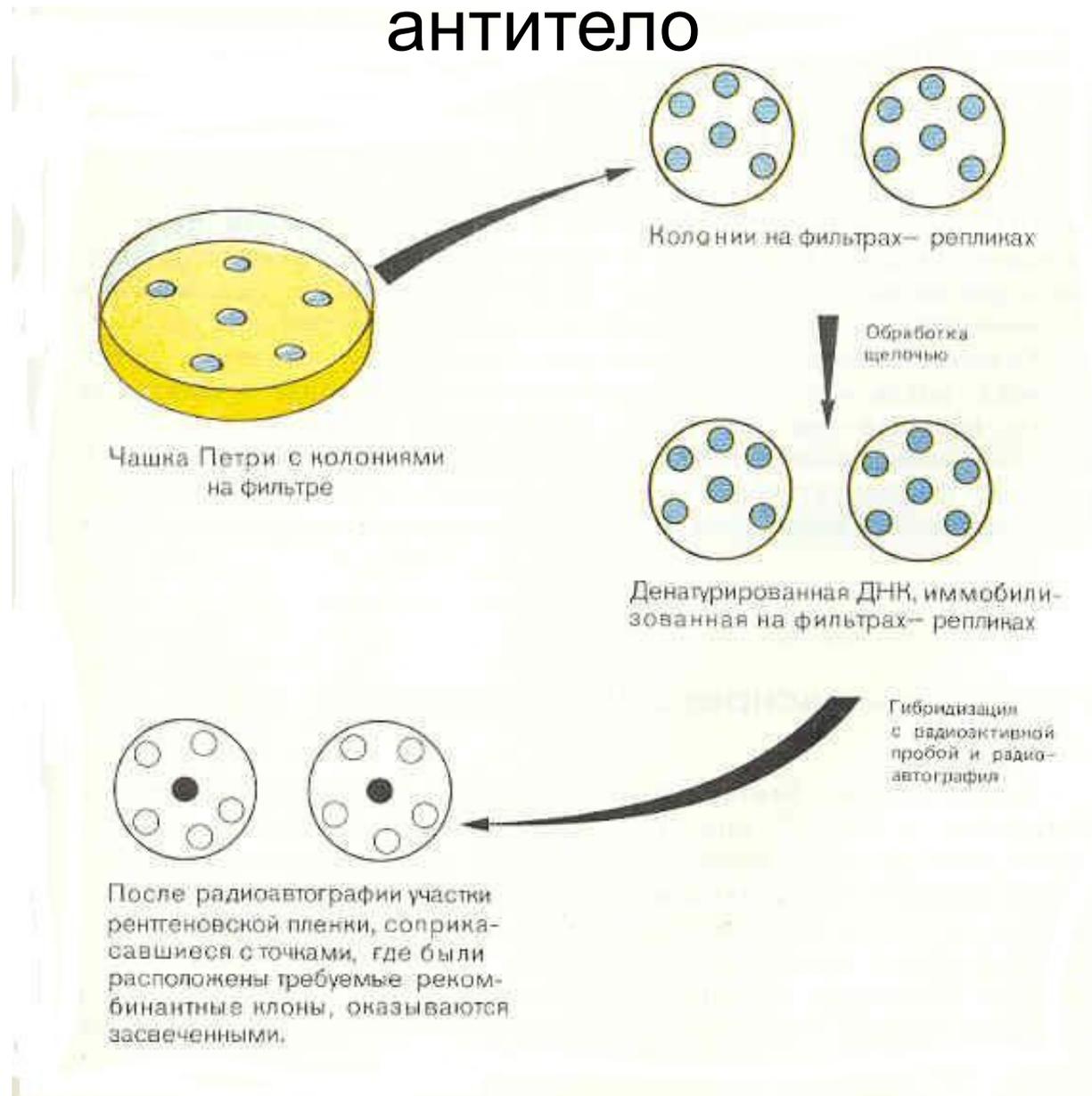


Рис. 7.13. Использование дидезоксинуклеотидов, чтобы прервать синтез ДНК

Отбор на основе взаимодействия антиген-антитело



Селекция микроорганизмов

Традиционные методы

Искусственный мутагенез

Отбор по продуктивности

Новейшие методы

Генная инженерия

1 способ

Основан на выделении нужного гена из генома одного организма и введение его в геном другого

2 способ:

Синтез гена искусственным путем и введение в геном бактерий

Классификация метаболитов

- 1. Молекулы с большой, до нескольких миллионов, молекулярной массой (ферменты и полисахариды).
- 2. Первичные метаболиты, соединения, необходимые для роста клетки (аминокислоты, нуклеотиды, витамины и др.).
- 3. Вторичные метаболиты, соединения, которые не требуются микроорганизмам для роста (антибиотики, алкалоиды и др.).

Различная регуляция пути синтеза на примере лизина и треонина

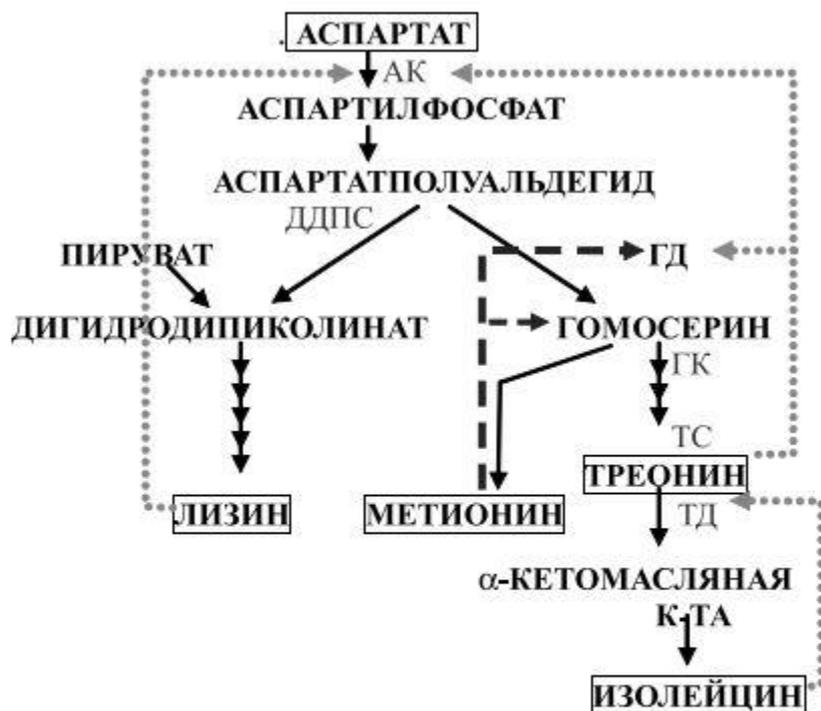


Рис. 1. Регуляция биосинтеза лизина и треонина у *Br. flavum*:
 АК – аспартаткиназа; ДДПС – дигидродипиколинатсинтаза;
 ГД – гомосериндегидрогеназа; ГК – гомосеринкиназа;
 ТС – треонинсинтаза; ТД – треониндезаминаза
→ – ингибирование
 - -> – репрессия



Рис. 2. Регуляция биосинтеза лизина и треонина у *E. coli*:
 АК – аспартаткиназа; ДДПС – дигидродипиколинатсинтаза;
 ГД – гомосериндегидрогеназа; ГК – гомосеринкиназа;
 ТС – треонинсинтаза; ТД – треониндезаминаза
→ – ингибирование
 - -> – репрессия

Выбор исходного штамма

Выбор исходного штамма зависит:

- 1) от природных свойств штамма;
- 2) от ограничений, связанных со сложностями систем регуляции синтеза как на генетическом, так и на аллостерическом уровнях.

Требования, предъявляемые к промышленным штаммам

Штаммы микроорганизмов, используемые в производстве, должны отвечать некоторым промышленным стандартам, а именно:

- обладать подходящими технологическими характеристиками: высокой продуктивностью, высокой скоростью роста (коэффициентом выхода биомассы), температурной устойчивостью, кислотной устойчивостью;
- фагоустойчивостью;
- генетической стабильностью;
- расти на рентабельных (дешевых и доступных) субстратах;
- продукты микробиологического синтеза должны быть экологически безвредны для человека и окружающей среды.

**Спасибо за
внимание!**