

Методы генной инженерии

Генетическая инженерия и ее применение

Основная технология генетической инженерии

Ферменты в генной инженерии

Векторы, используемые для клонирования ДНК

Гены и их получение

Транскрипция

Трансляция

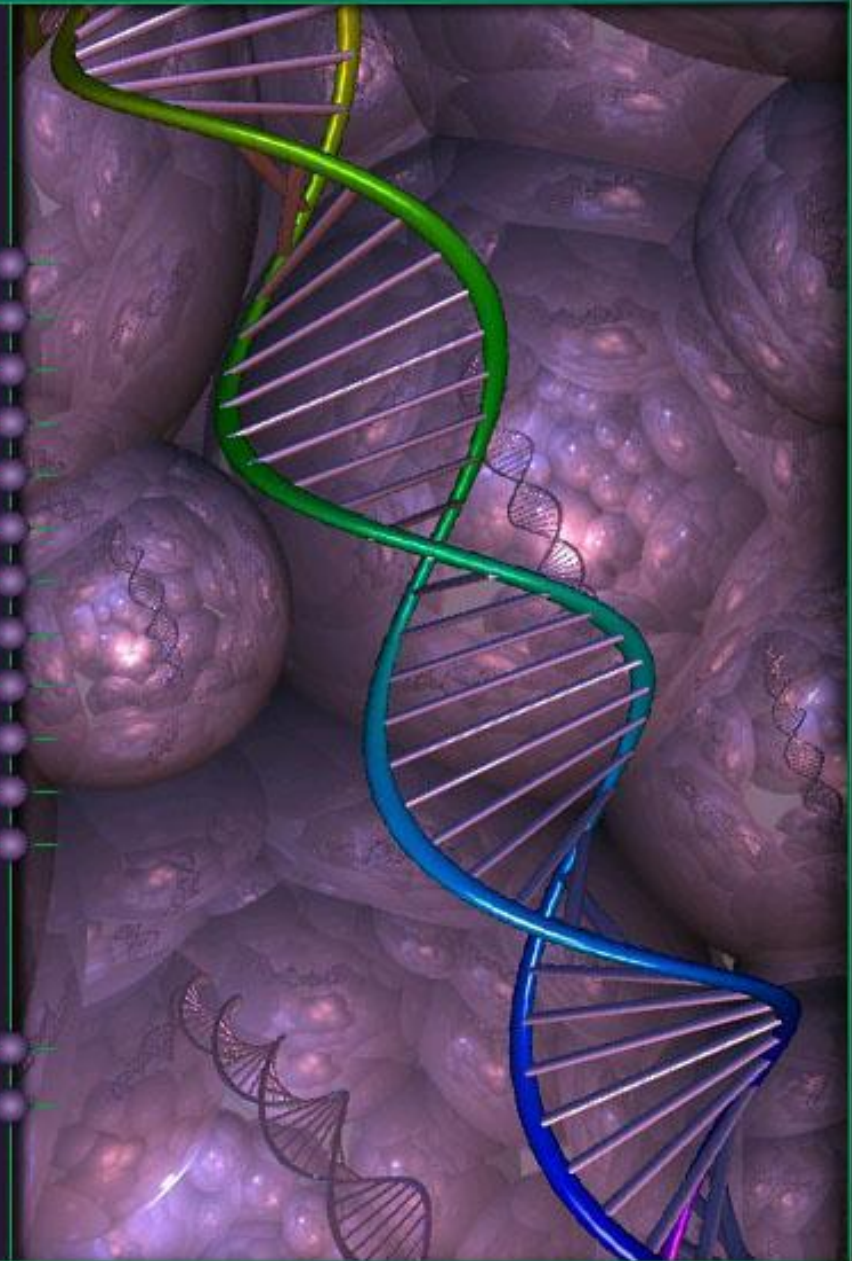
Введение генов в бактерии и их экспрессия

Экспрессия генов в дрожжах

Методы получения трансгенных животных

Клонирование овцы методом переноса ядра

Трансгенные растения



Генетическая инженерия и ее применение

Генетическая (генная) инженерия является наиболее интенсивно развивающейся областью биотехнологии. Она основана на молекулярно-биологических, иммунохимических и биохимических методах, позволяющих путем операций в пробирке (*in vitro*) переносить генетическую информацию из одного организма в другой, придавая ему новые уникальные свойства.

Генетическая инженерия находит широкое практическое применение в различных отраслях народного хозяйства.



Сельское хозяйство – внедрение биологических методов защиты растений



Микробиологическая промышленность – производство интенсивных штаммов микроорганизмов



Фармакологическая промышленность – расширение спектра лекарственных средств

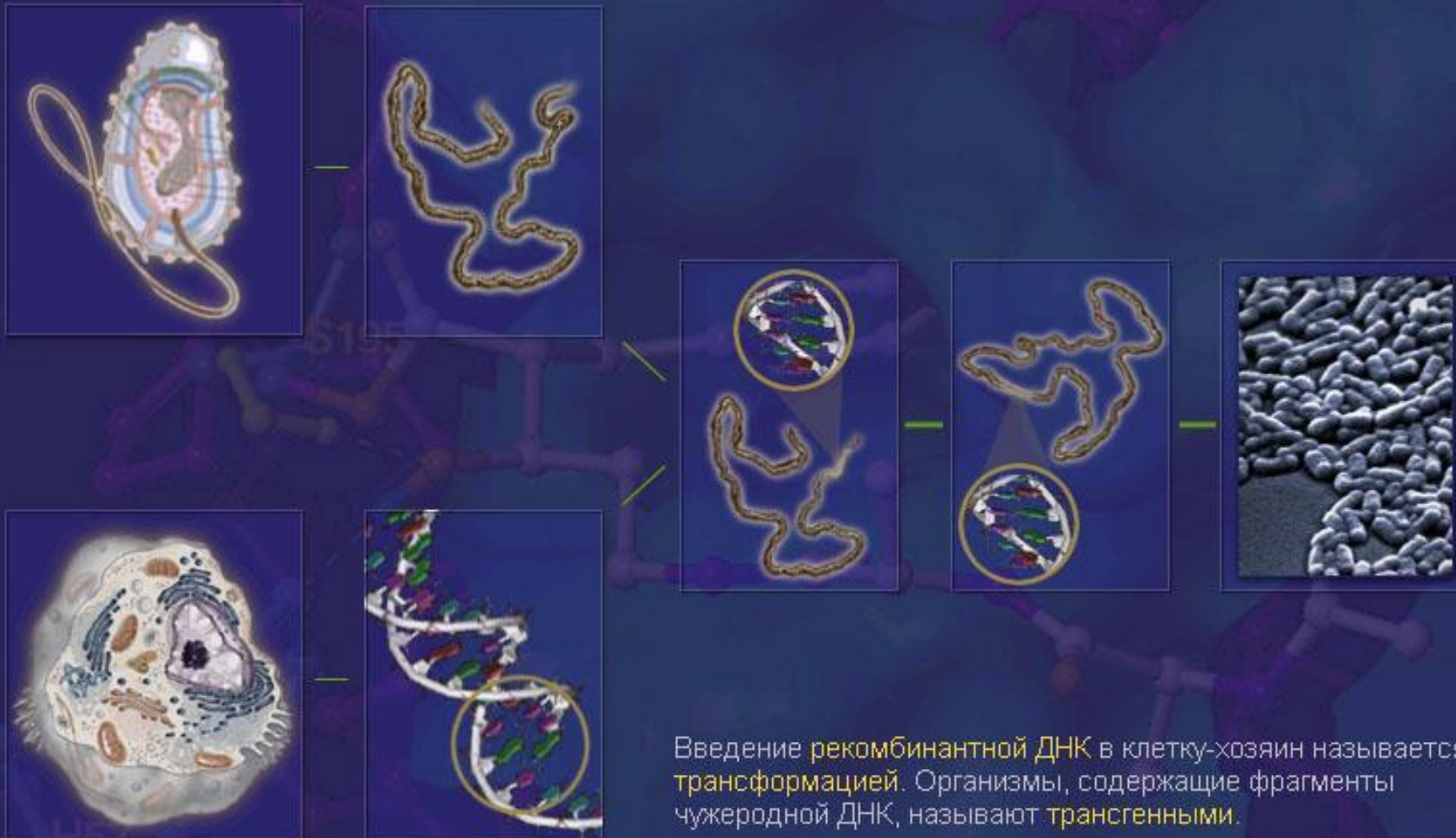


Пищевая промышленность – производство новых, высокоактивных ферментных препаратов

Основная технология генетической инженерии

В основе генетической инженерии лежит технология получения **рекомбинантной ДНК**. Эта технология включает ряд последовательных экспериментальных процедур, в ходе которых осуществляется перенос **ДНК** (дезоксирибонуклеиновой кислоты) одного организма в другой.

Технология получения **рекомбинантной молекулы ДНК**

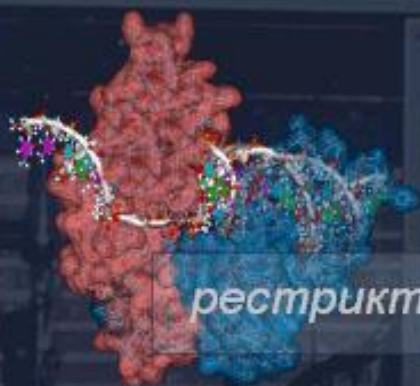


Введение **рекомбинантной ДНК** в клетку-хозяин называется **трансформацией**. Организмы, содержащие фрагменты чужеродной ДНК, называют **трансгенными**.

Ферменты в генной инженерии

Важная роль в проведении генно-инженерных работ принадлежит ферментам, участвующим в формировании рекомбинантных ДНК.

Ферменты



рестриктазы

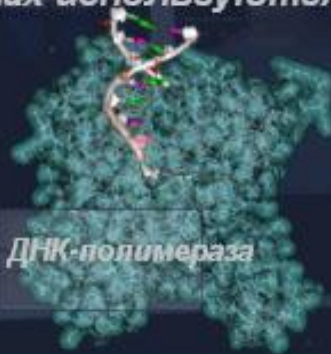


ДНК-лигазы

Помимо **рестриктаз** и **ДНК-лигаз** в генно- инженерных работах используются и другие **ферменты**:



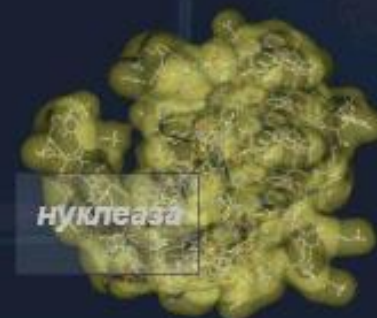
Ревертаза



ДНК-полимераза



терминальная
трансфераза



нуклеаза

Векторы, используемые для клонирования ДНК

Объединение разных **генов** в молекуле **ДНК** бесполезно, если вновь образованные **рекомбинантные ДНК** не будут **реплицироваться** в клетке-хозяине. Таким образом, если одна часть рекомбинантной молекулы ДНК несет нужный ген, который предполагается **клонировать**, то другая должна содержать информацию, необходимую для репликации в клетке рекомбинантной ДНК. Чтобы решить эту проблему, используют клонирующие **векторы** («вектор» от латинского vector – переносчик).

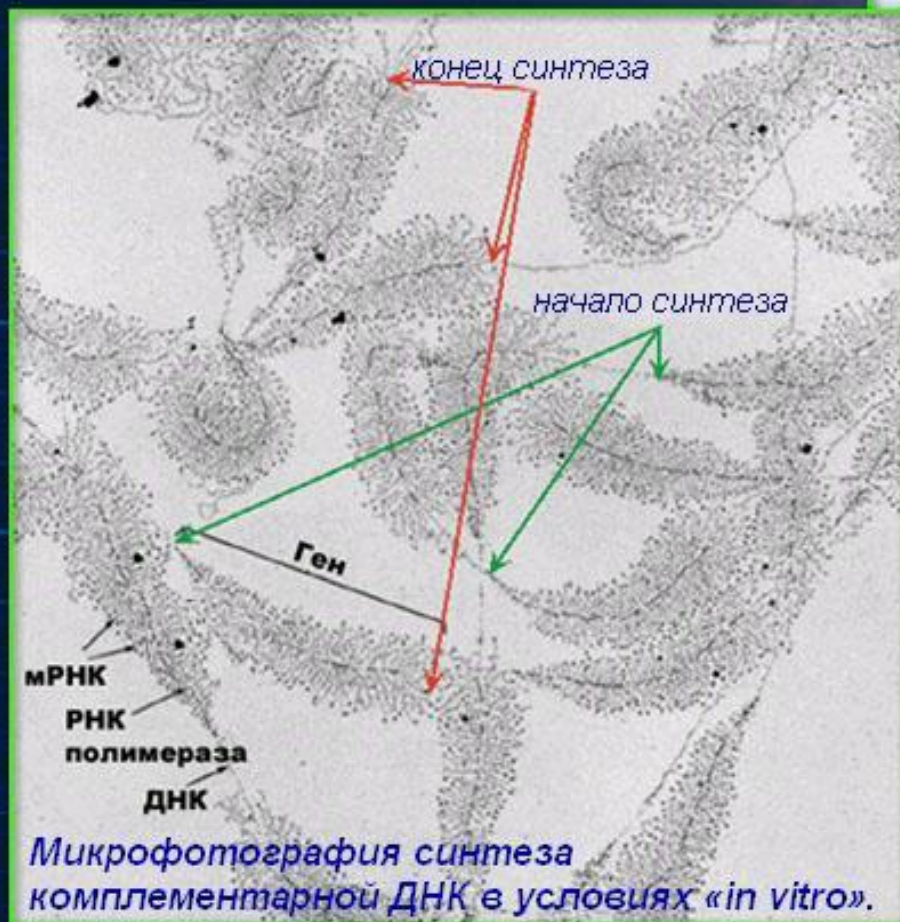
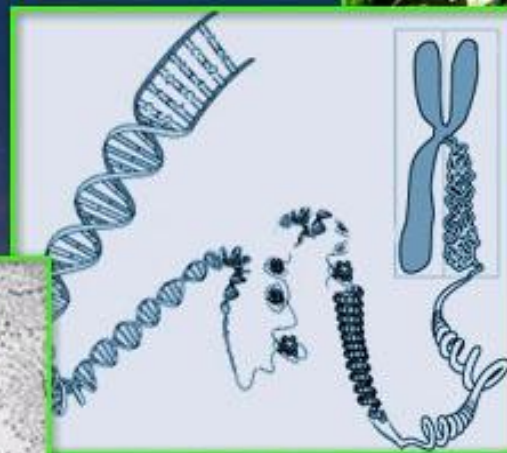
Клонирующие векторы должны иметь малый размер, хорошую проницаемость в **клеточной мембране**, способность размножаться в клетке **реципиента**, а также иметь такую область в молекуле **ДНК**, в которую можно встроить фрагмент чужеродной молекулы ДНК.

Плазмиды – небольшие внехромосомные кольцевые молекулы **ДНК**. Часто в плазмидах содержатся **гены** деградации ксенобиотиков, устойчивости к **антибиотикам**. У растений часто применяется **T1-плазмида** *Agrobacterium tumefaciens*.



Гены и их получение

Основной единицей наследственности любого организма являются **гены**. Они представляют собой участки молекулы **ДНК**, расположенной в **хромосоме**.

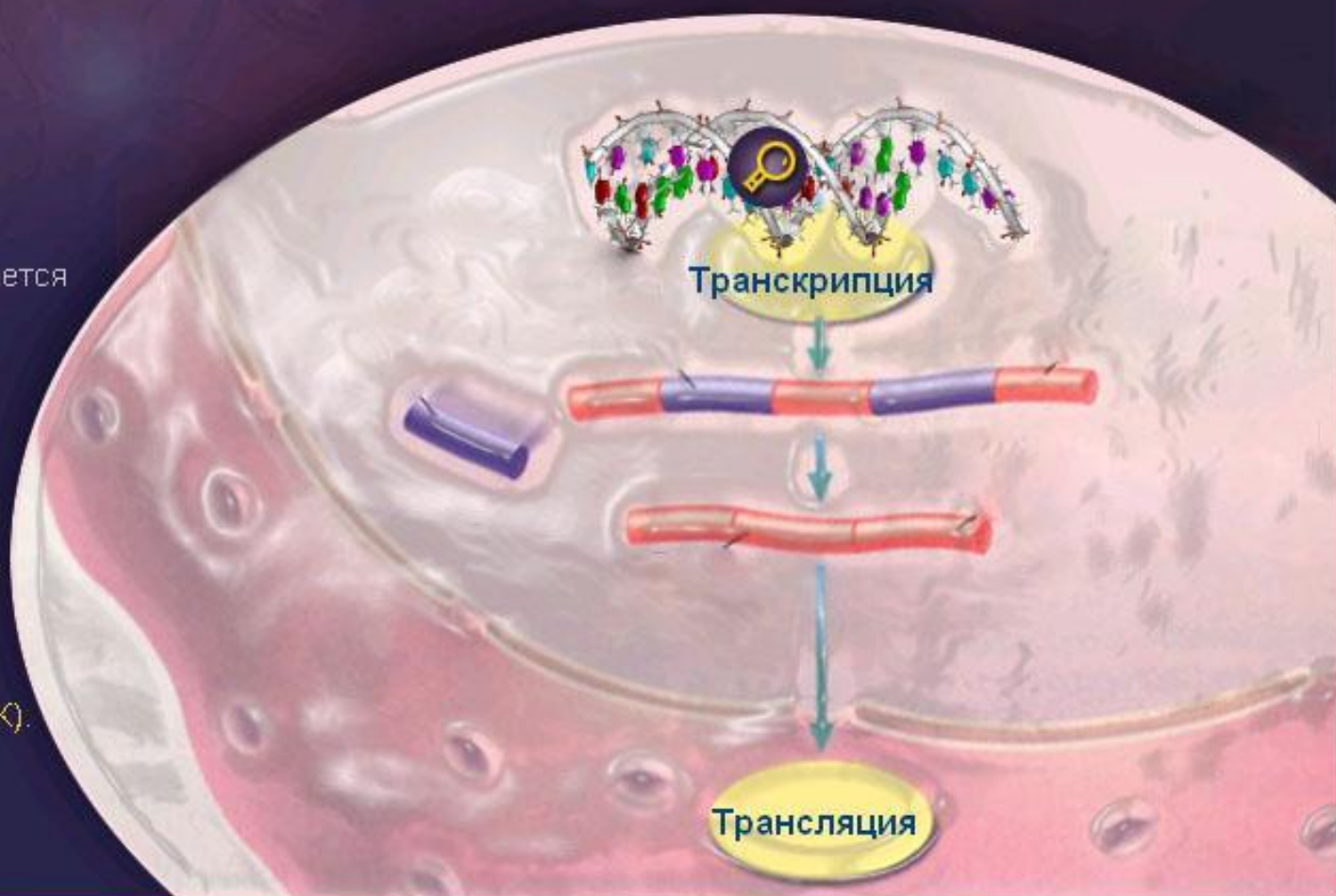


В простейшем случае один **ген** содержит информацию о структуре одного **белка**, в более сложном – о нескольких белках. Информация о генах, их положении в **геноме** и методах получения важна для генетической инженерии.

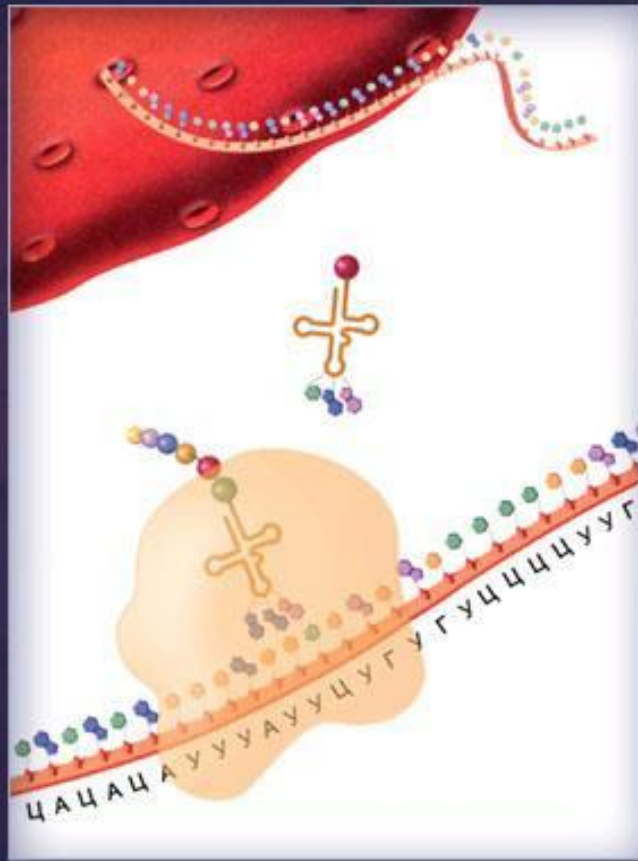
Транскрипция

Информация в **генах**, кодирующих **белки** (**структурных генах**), расшифровывается в ходе двух последовательных процессов: синтеза РНК (**транскрипции**) и синтеза белка (**трансляции**). Эти процессы обеспечивают правильный перевод зашифрованной в **ДНК** генетической информации с языка **нуклеотидов** язык **аминокислот**. Последовательность аминокислот в **белке** задает его структуру и функции. Когда у клетки возникает потребность в каком-то белке, то включается **транскрипция** соответствующего **структурного гена**, а когда такая потребность исчезает, **транскрипция** выключается.

Транскрипция начинается со связывания РНК-полимеразы с промотором. Далее последовательно копируется весь структурный ген (кодирующая область) – от первого нуклеотида до последнего – с образованием матричной РНК (мРНК).



Трансляция

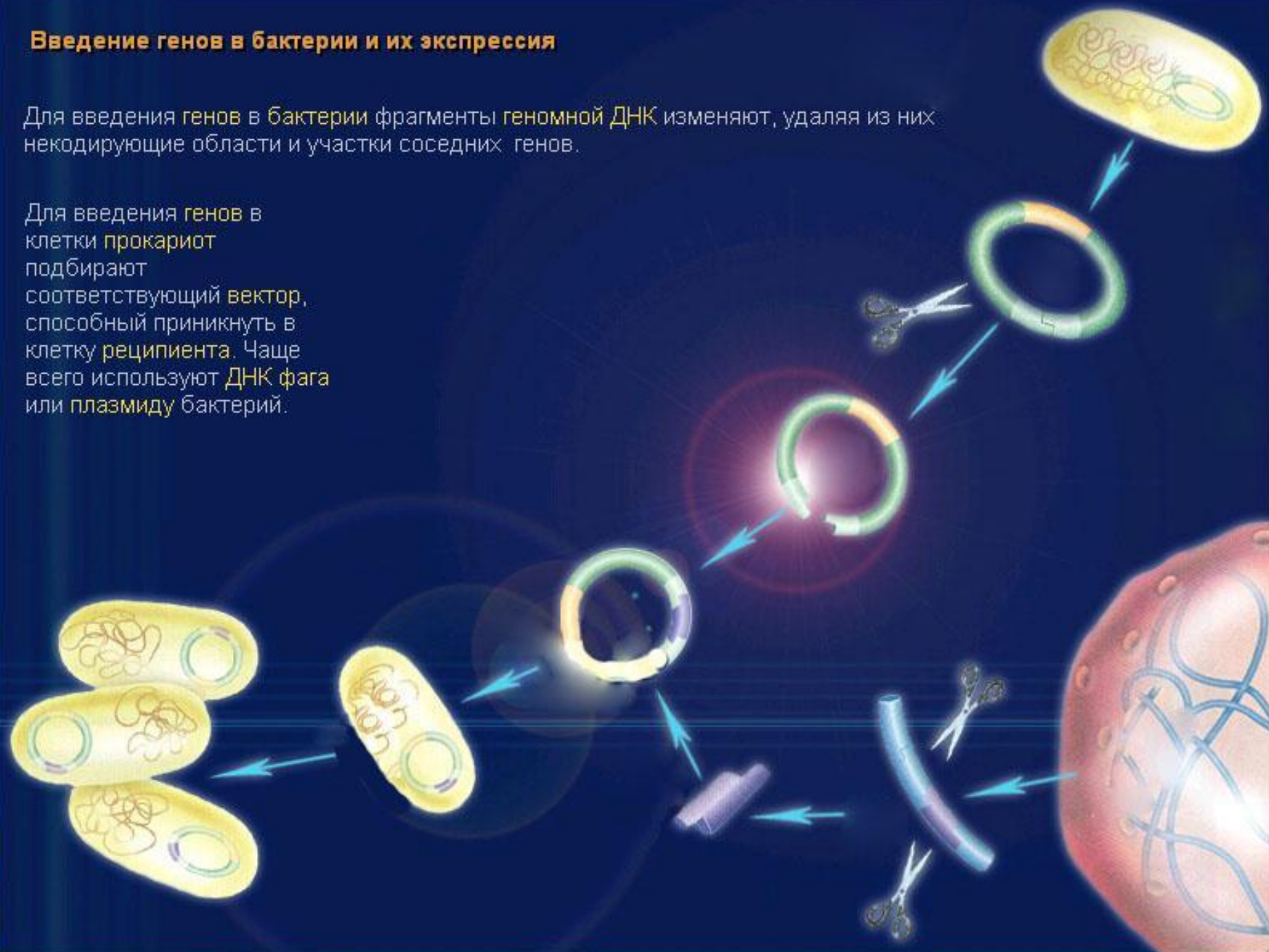


Трансляция начинается со связывания мРНК с малой рибосомной субъединицей. Затем происходит комплементарное спаривание первого кодона мРНК с антикодоном инициаторной транспортной РНК, несущей метионин. К образовавшемуся комплексу присоединяется большая рибосомная субъединица и образуется комплекс инициации, готовый к синтезу полипептидной цепи.

Введение генов в бактерии и их экспрессия

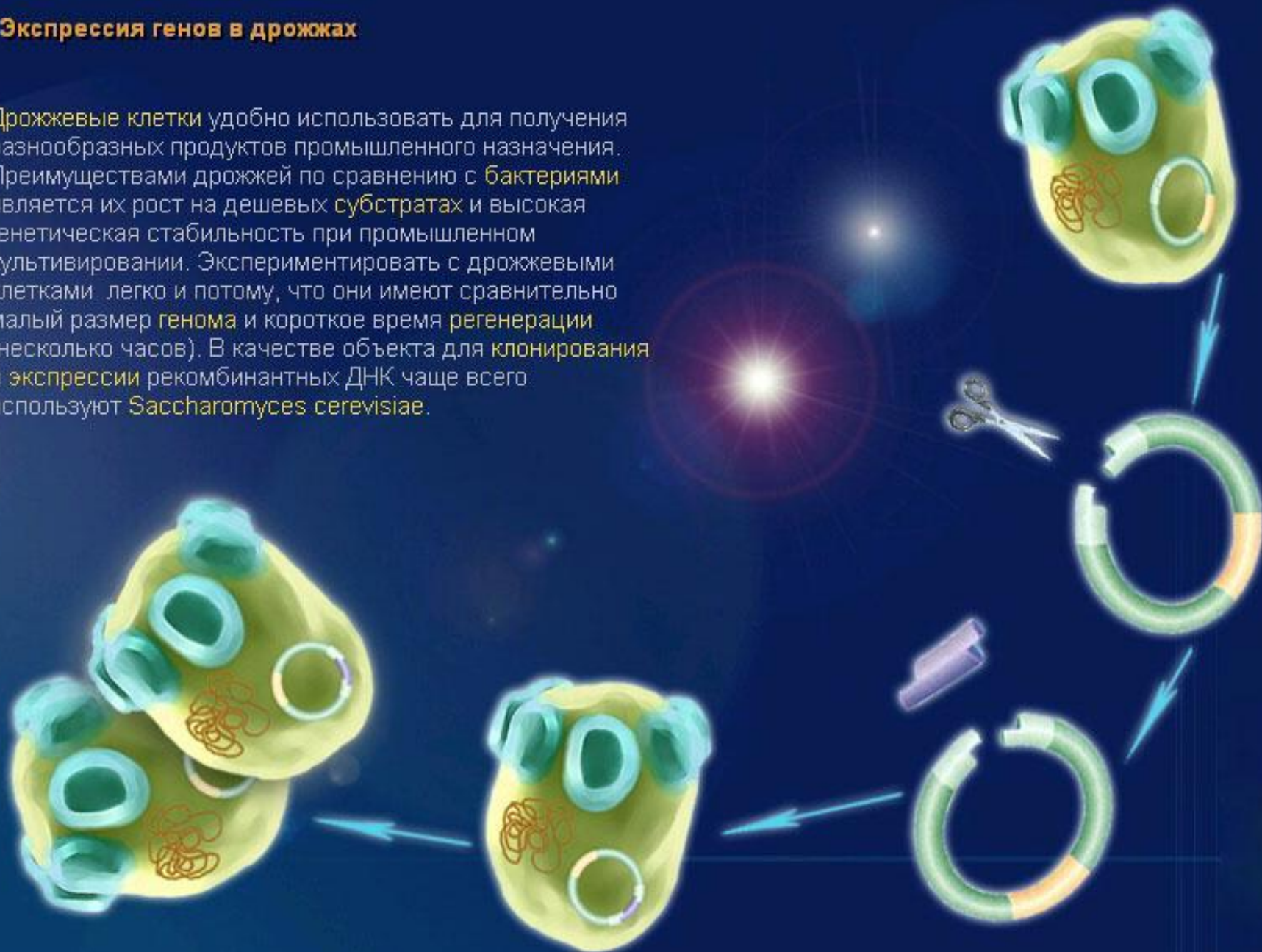
Для введения генов в бактерии фрагменты геномной ДНК изменяют, удаляя из них некодирующие области и участки соседних генов.

Для введения генов в клетки прокариот подбирают соответствующий вектор, способный проникнуть в клетку реципиента. Чаще всего используют ДНК фага или плазмиду бактерий.



Экспрессия генов в дрожжах

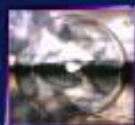
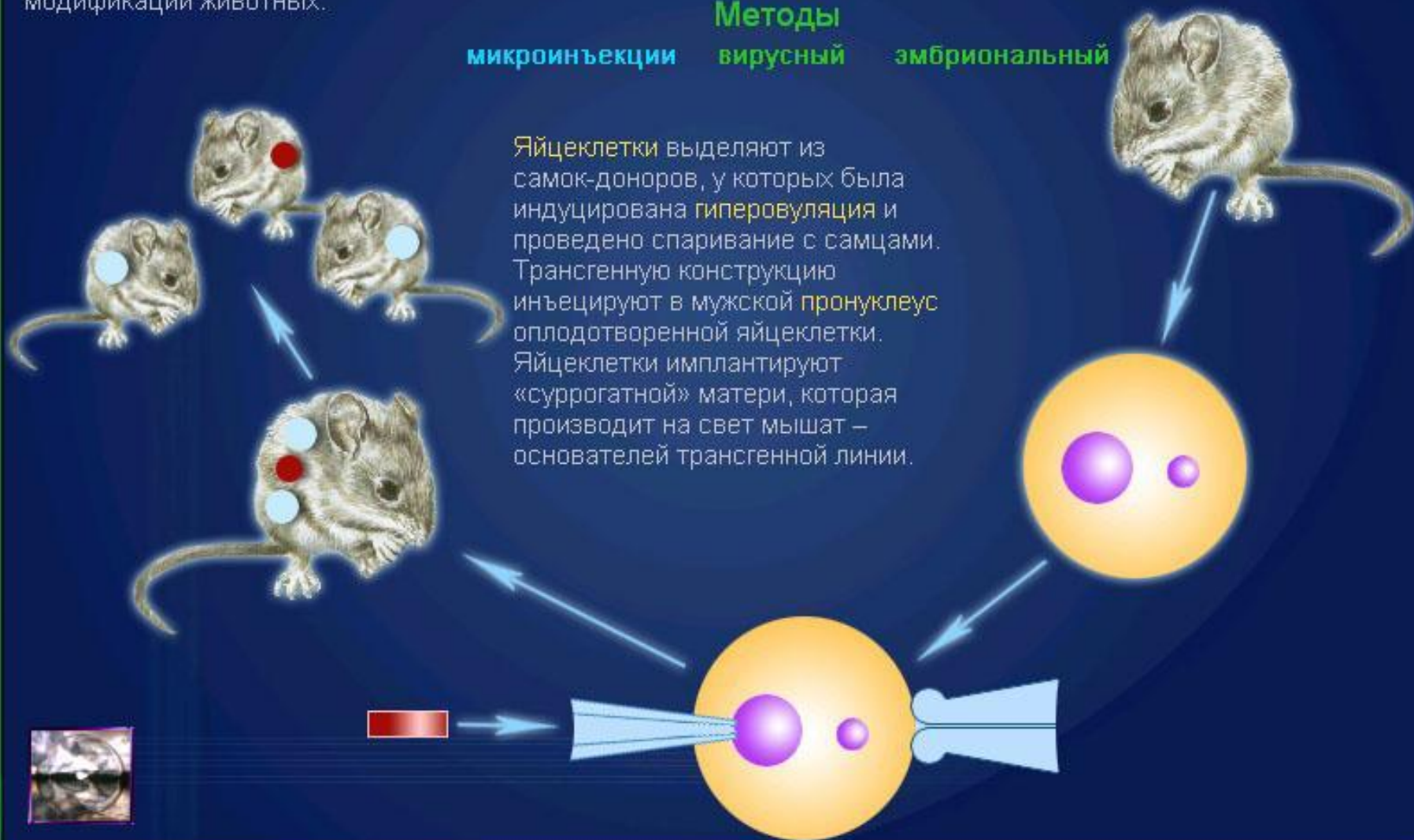
Дрожжевые клетки удобно использовать для получения разнообразных продуктов промышленного назначения. Преимуществами дрожжей по сравнению с бактериями является их рост на дешевых субстратах и высокая генетическая стабильность при промышленном культивировании. Экспериментировать с дрожжевыми клетками легко и потому, что они имеют сравнительно малый размер генома и короткое время регенерации (несколько часов). В качестве объекта для клонирования и экспрессии рекомбинантных ДНК чаще всего используют *Saccharomyces cerevisiae*.



Методы получения трансгенных животных

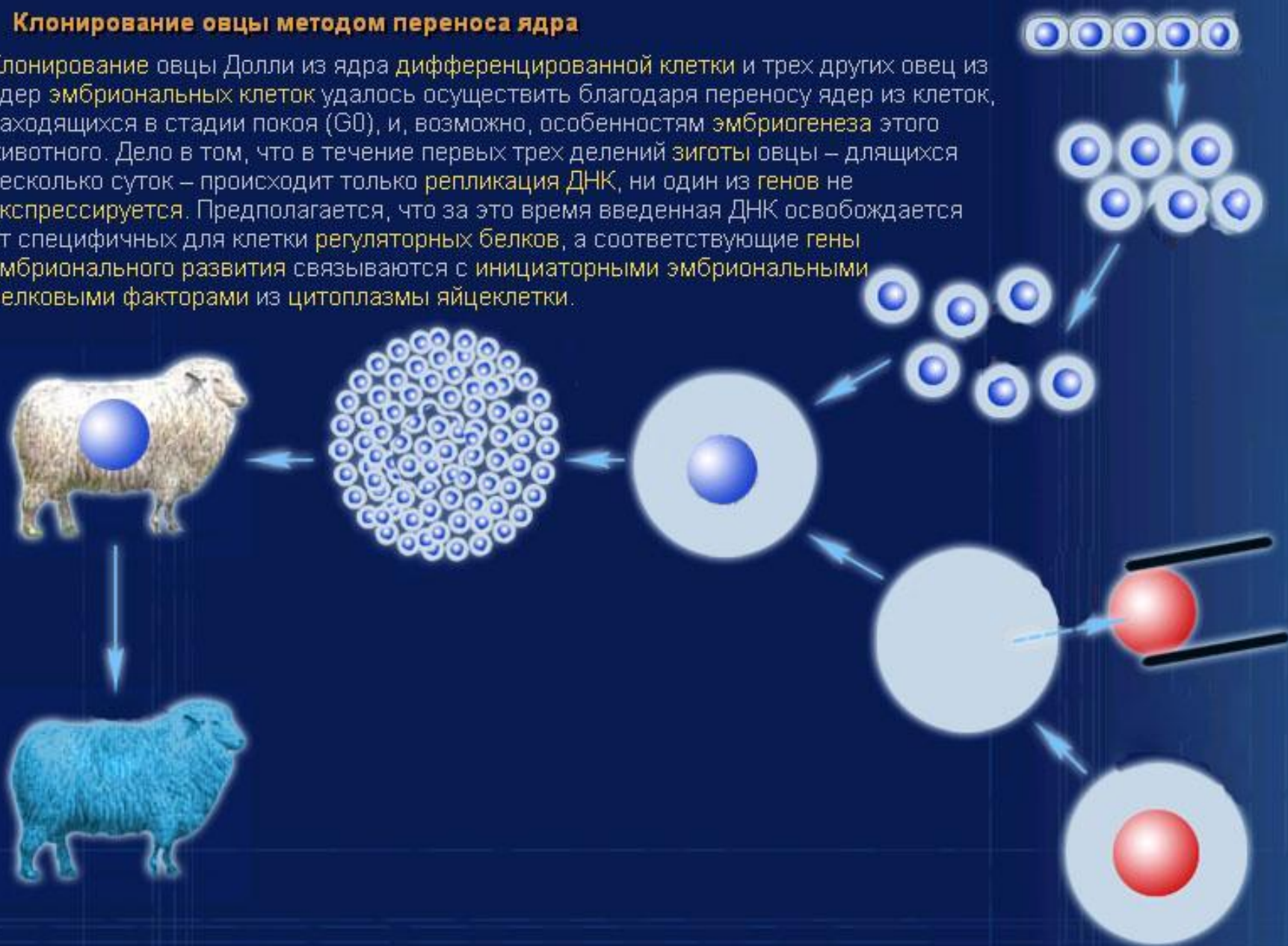
Развитие методов генной инженерии, позволяющих целенаправленно создавать новые ДНК-носители генетической информации и встраивать их в геном клетки, которая могла бы дать начало клеткам зародышевой линии, открывает новые перспективы в генетической модификации животных.

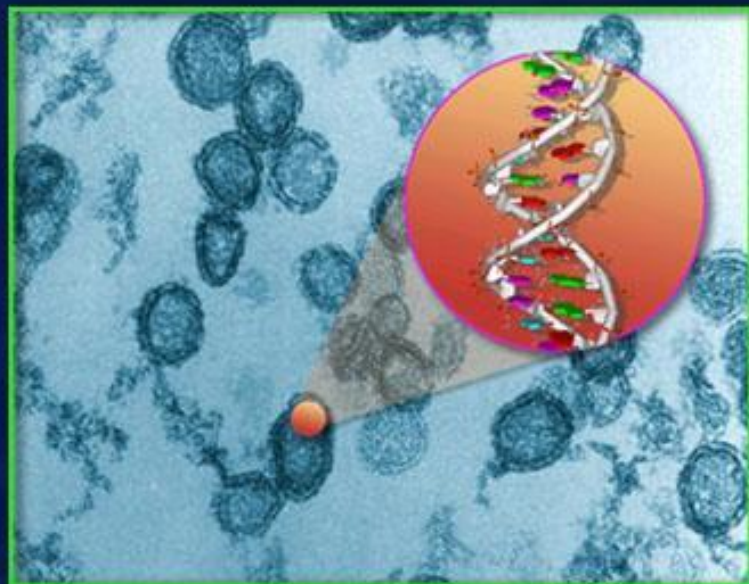
Методы
микроинъекции вирусный эмбриональный



Клонирование овцы методом переноса ядра

Клонирование овцы Долли из ядра дифференцированной клетки и трех других овец из ядер эмбриональных клеток удалось осуществить благодаря переносу ядер из клеток, находящихся в стадии покоя (G0), и, возможно, особенностям эмбриогенеза этого животного. Дело в том, что в течение первых трех делений зиготы овцы – длящихся несколько суток – происходит только репликация ДНК, ни один из генов не экспрессируется. Предполагается, что за это время введенная ДНК освобождается от специфичных для клетки регуляторных белков, а соответствующие гены эмбрионального развития связываются с инициаторными эмбриональными белковыми факторами из цитоплазмы яйцеклетки.





Липосомы – это сферические образования, состоящие из **фосфолипидов**. Упаковка рекомбинантных ДНК в липосомы позволяет защитить генетический материал от разрушающего действия **нуклеаз**, находящихся в клетках. Для введения ДНК в клетки растений наиболее пригодны липосомы, состоящие из **фосфатидилсерина** и **холестерина**.

Лекарственные средства, полученные на основе рекомбинантных микроорганизмов

1. Моноклональные антитела как лекарственные средства

2. Тромболитики и антикоагулянты

3. Аминокислоты

4. Синтез L-аскорбиновой кислоты

5. Гормональные препараты

Инсулин

Соматотропный гормон (СТГ) или гормон роста человека

Эритропоэтин

6. Вакцины

7. Цитокины

Моноклональные антитела как лекарственные средства

После связывания антигена с интактным антителом запускаются реакции иммунного ответа

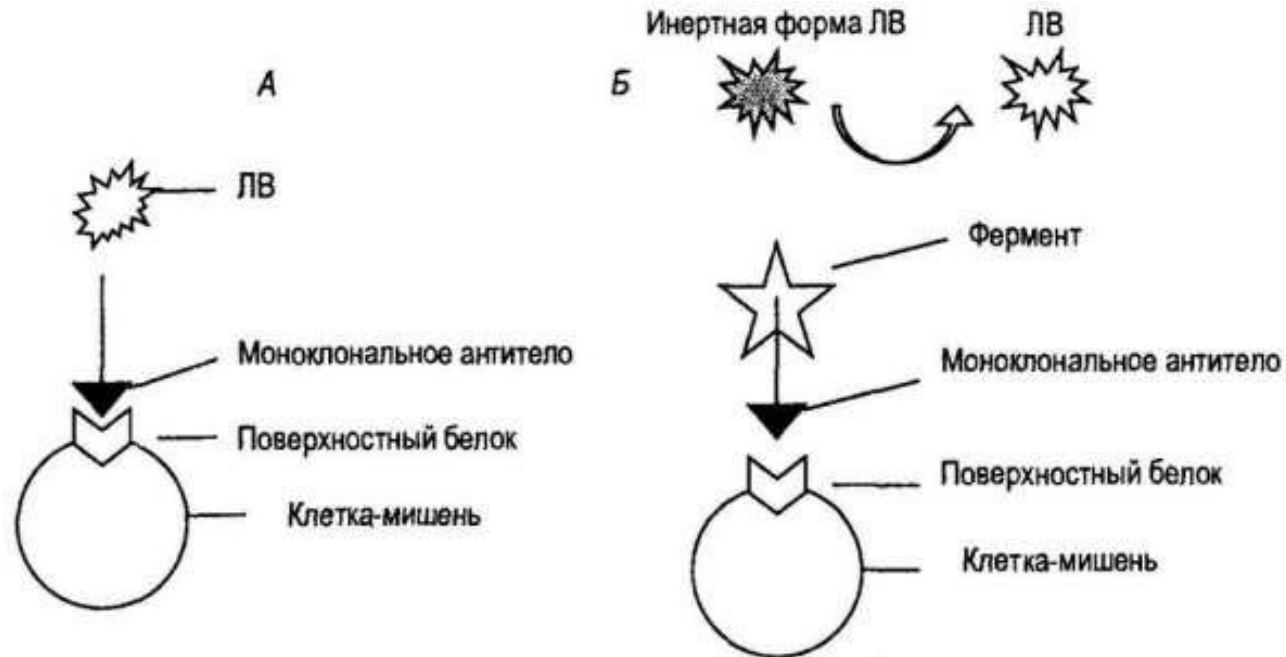


Рис. 13. Схематическое изображение системы целевой доставки ЛВ, основанной на использовании моноклональных антител (по Б. Глику, Дж. Пастернаку): А – молекула ЛВ присоединена к моноклональному антителу; Б – к моноклональному антителу присоединен фермент, превращающий инертную форму ЛВ в активную только в непосредственной близости от клетки-мишени

Тромболитики и

антикоагулянты

В норме молекулы фибрина в образующейся тромбе расщепляются ферментом, способствующим растворению фибрина *in vivo* – сериновой протеиназы плазмина, который образуется из плазминогена под действием активатора (рис. 14).

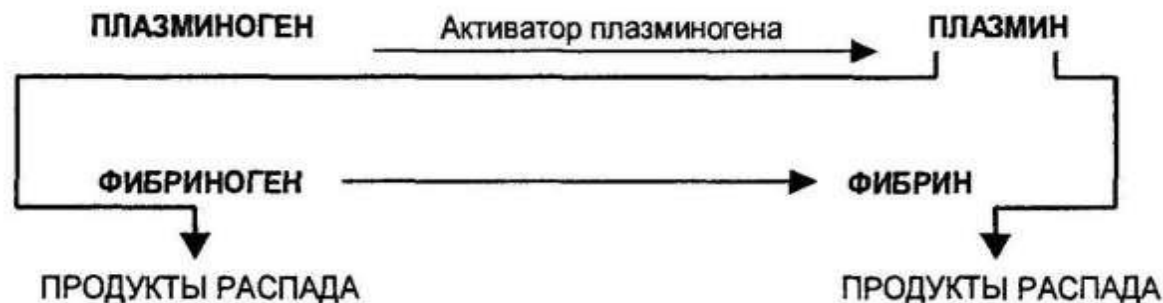


Рис. 14. Активация плазминогена с превращением его в плазмин и разрушение плазмином двух субстратов (фибриногена и фибрина) в крови

Тромболитическая терапия, осуществляемая **активаторами плазминогена тканевого типа (ТАПг)**, широко используется при лечении острого инфаркта миокарда, закупорки мозговых и коронарных артерий, эмболии легких.

Антикоагулянты. Гепарин и его производные принадлежат к числу наиболее безопасных препаратов. В медицинской практике используются препараты низкомолекулярного или фракционного гепарина - *логипарин, фраксипарин, далтепарин, кливарин*. Их относят к гепаринам II поколения. Получают низкомолекулярные гепарины методом ферментативной деполимеризации высокомолекулярного гепарина с помощью бактериальной гепариназы. В настоящее время гирудин получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Ген гирудина экспрессирован в *S. cerevisiae* (фирмы «Francgene», «Sanofi», Франция); для очистки препарата использована ВЭЖХ.

Аминокислот

ы

В промышленном масштабе аминокислоты получают, в основном, экстракцией из белковых гидролизатов или очисткой продуктов метаболизма двух неспорулирующих грамположительных почвенных бактерий - *Corynebacterium* или *Brevi bacterium* spp. Обычно для повышения продуктивности этих микроорганизмов используют мутагенез с последующим отбором штаммов — сверхпродуцентов определенных аминокислот, но такой способ получения штаммов требует много времени и эффективность его невелика. Альтернативные подходы — выделение и изменение специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций. Например, генноинженерный способ получения аминокислоты *триптофана*, синтезируемой *C. glutamicum*, одного из видов *Corynebacterium*. Для этого в клетки *C. glutamicum* дикого типа введена копия гена, кодирующего антранилатсинтазу, фермента, лимитирующего синтез триптофана.

Синтез L-аскорбиновой

кислоты

В настоящее время для крупномасштабного производства L-аскорбиновой кислоты (витамина С) используют преимущественно трудоемкий процесс, включающий одну микробиологическую стадию и несколько химических. Исходным субстратом для него является D-глюкоза. На последнем этапе этого процесса 2-кето-L-гулоновая кислота (2- KLG) превращается в кислых условиях L-аскорбиновую кислоту.

Гормональные препараты *Инсули*

В настоящее время в медицин^Нской практике используют инсулины трех типов:

- короткодействующие с быстрым началом эффекта;
- средней продолжительности действия;
- длительного действия с медленным проявлением эффекта.

Компания «Eli Lilly» в массовом производстве человеческого инсулина использует технологию рекомбинантных ДНК, помещая кДНК гена человеческого проинсулина в *E. coli* или *S. cerevisiae* и гидролизую наработанный проинсулин до молекулы инсулина. Человеческие инсулины этой фирмы носят название «Хумулин».

Контроль качества генноинженерного инсулина предполагает контроль дополнительных показателей, характеризующих стабильность рекомбинантного штамма и плазмиды, отсутствие постороннего генетического материала в препарате, идентичность экспрессируемого гена и др. (всего 22 показателя).

Соматотропный гормон (СТГ) или гормон роста человека

Рекомбинантный соматотропин, получивший название *соматрем*, стал вторым (после человеческого инсулина) биосинтетическим фармацевтическим препаратом. СТГ, биологически чистый и свободный от вирусных загрязнений, впервые был получен в 1980 г. фирмой «Genentech». Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках кишечной палочки, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на NH₂-конце молекулы (гормон обладает биологической активностью нативного гормона и даже большим эффектом, чем гормон роста из гипофиза, по-видимому, по причине большей чистоты).

Эритропоэт

ИН
гормон гликопротеиновой природы, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку эритропоэтин-чувствительных клеток в морфологически распознаваемые эритробласты. С использованием генноинженерной технологии в культуре клеток млекопитающих (штамм СНО) получают рекомбинантный человеческий эритропоэтин. Производство препарата основано на комбинации иммуноаффинной и ионно-обменной хроматография и позволяет получать практически гомогенный, мономерный, полностью активный белок, не содержащий значимых примесей. Уже много лет, получаемый по новой технологии, эритропоэтин является, ведущим продуктом предприятия Amgen - Калифорния (США). Годовой оборот от его производства составляет более 3

Вакцины

Технология рекомбинантных ДНК позволяет создавать новое поколение вакцин более безопасных и эффективных, менее дорогих, не имеющих ограничений в применении.

При этом используют разные подходы:

1. Патогенный микроорганизм модифицируют, убирая гены, ответственные за вирулентность, при этом сохраняется способность штамма вызывать иммунный ответ. Получаются живые вакцины, содержащие непатогенные микроорганизмы, которые не могут ревертировать и становиться патогенными.
2. Гены или их сегменты, кодирующие основные антигенные детерминанты (белки) патогенных микроорганизмов, экспрессируют в альтернативном хозяине, например *E. coli*, получают нужный продукт в большом количестве и используют его как вакцину. Такие вакцины, содержащие лишь отдельные компоненты патогенного микроорганизма, называют субъединичными вакцинами. Достоинства субъединичных вакцин состоят в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могут быть причиной нежелательных побочных эффектов в организме-хозяине. *Недостатки субъединичных вакцин* — очистка специфического белка высока по стоимости, его конформация после выделения может отличаться от той, которую он имеет в составе вирусного капсида или оболочки, что может повлечь изменение его антигенных свойств.

Вакцины

ы

3. Клонированные гены, кодирующие основные антигенные детерминанты патогенного организма, встраивают в геном непатогенного носителя (обычно вируса) и получают живую безопасную, не содержащую болезнетворных микроорганизмов вакцину. Живые вакцины, как правило, более эффективны, чем неживые или субъединичные.

Противогерпетические вакцины. Противосальмонеллезные вакцины.

Цитокины

ы

Экзогенный человеческий ИФН получают, используя технологию рекомбинантных ДНК. **Процедура выделения кДНК интерферонов состоит в следующем:**

- Из лейкоцитов человека выделяют мРНК, фракционируют ее по размерам, проводят обратную транскрипцию, встраивают в сайт модифицированной плазмиды.
- Полученным продуктом трансформируют *E. coli*, образовавшиеся клоны подразделяют на группы, которые идентифицируют.
- Каждую группу клонов гибридизируют с ИФН - мРНК.
- Из образовавшихся гибридов, содержащих кДНК и мРНК, выделяют мРНК, проводят ее трансляцию в системе синтеза белка.
- Определяют интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержат клон с кДНК, гибридизировавшийся с ИФН - мРНК; повторно идентифицируют клон, содержащий полноразмерную ИФН - кДНК человека.

Главное:

- 1 Генетическая (генная) инженерия позволяет путем операций в условиях *in vitro* переносить генетическую информацию из одного организма в другой, используя для этого функционально активные генетические структуры – рекомбинантные дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК).
- 2 Рекомбинантные (или гибридные) ДНК образуются при объединении фрагментов ДНК, выделенных из различных организмов.
- 3 В создании рекомбинантных ДНК участвуют различные ферменты: рестриктазы, ДНК-лигазы, ревертазы, ДНК-полимеразы.
- 4 Генная инженерия основана на получении гибридных молекул ДНК и введении этих молекул в клетки других организмов.
- 5 Векторы – это молекулы ДНК, способные соединяться с чужеродной ДНК, переносить ее в другую клетку и обеспечивать репликацию (воспроизведение). В качестве векторов в генно-инженерных работах чаще всего используют ДНК плазмид и вирусов.

Проверьте свои знания



1

Какие ферменты необходимы для конструирования рекомбинантных ДНК?

А	рестриктазы
Б	ДНК-лигазы
В	инвертазы
Г	гидроксилазы

2

Что является основой генетической инженерии?

А	создание рекомбинантной ДНК
Б	выделение ДНК из организма
В	расщепление ДНК на фрагменты
Г	выделение хромосом
Д	получение плазмид

Проверьте свои знания



3

Какое определение неверно?

А	Ген – это участок молекулы ДНК, расположенный в хромосоме
Б	Ген – это участок молекулы ДНК, расположенный в хлоропласте
В	Ген – это участок молекулы ДНК, расположенный в митохондрии
Г	Ген – это участок молекулы ДНК, расположенный в оболочке

4

Отметьте векторы, которые наиболее часто используются при проведении генно-инженерных работ.

А	плазмиды
Б	вирусы
В	бактерии
Г	дрожжи