

Лекция 8. Генетическая инженерия: молекулярные основы

Содержание:

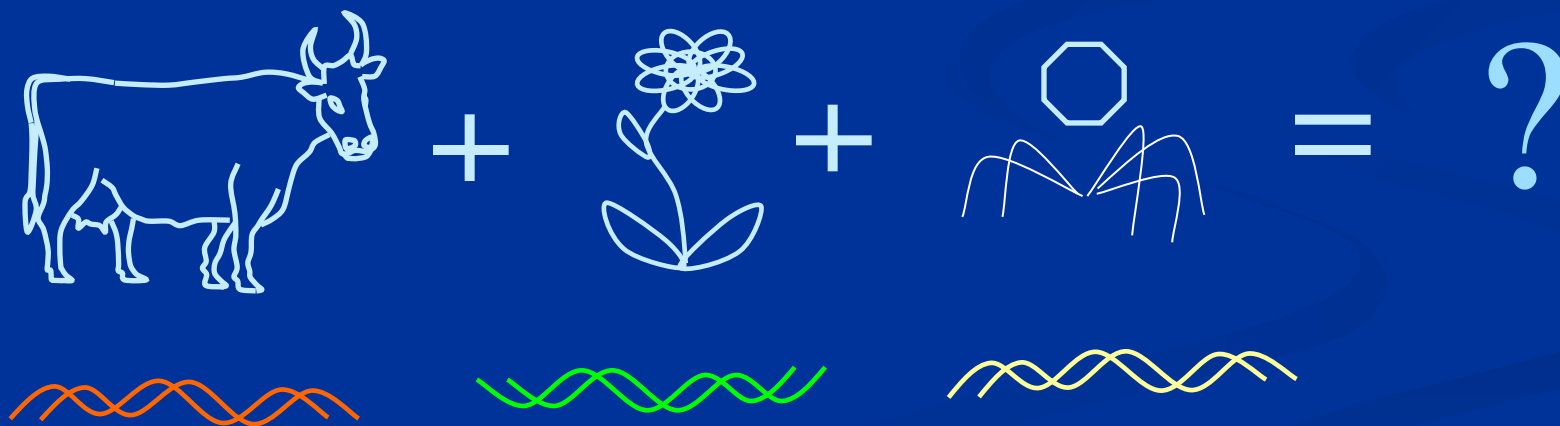
1. Предмет, задачи, история возникновения генетической инженерии.....
2. Строение и свойства ДНК.....
3. Ферменты генетической инженерии.....
4. Методы создания рекомбинантных ДНК.....

1

Предмет, задачи, история возникновения генетической инженерии

Генетическая инженерия - конструирование в искусственных условиях функционально активных генетических структур – рекомбинантных ДНК.

Рекомбинантные ДНК – молекулы ДНК, образованные путем соединения фрагментов ДНК, взятых от разных организмов.



Значение технологии рекомбинантных ДНК

Научное познание живой материи:

возможность получения генетического материала (количества вещества генов) для последующего изучения геномов живых организмов



Управление живой материей на молекулярном уровне:

- генетическая трансформация (модификация) живых организмов – получение животных, растений и микроорганизмов с заданными свойствами;
- белковая инженерия – создание неприродных форм белков на основе видоизмененных генов

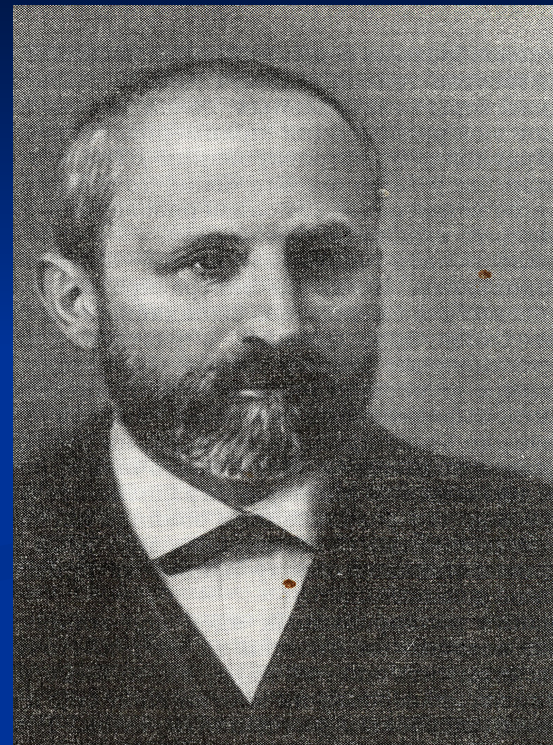
От открытия ДНК – к ДНК-технологиям

1871 г. – открытие ДНК

Ф. Мишер выделил из изолированных ядер клеток гноея вещество, содержащее 14% азота и 2,5% фосфора, которое по составу нельзя было отнести ни к какому классу известных в то время веществ.

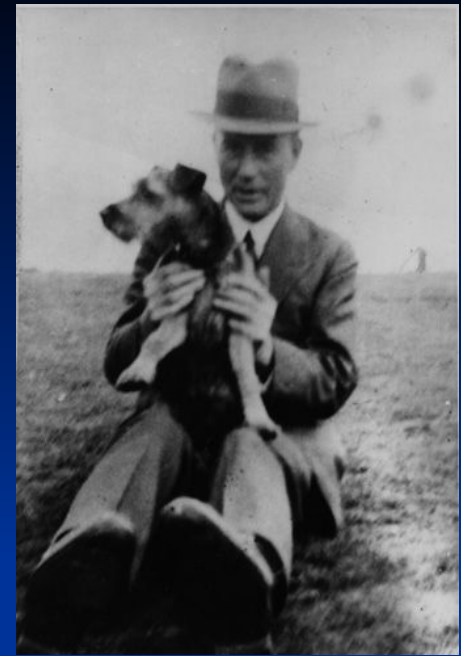
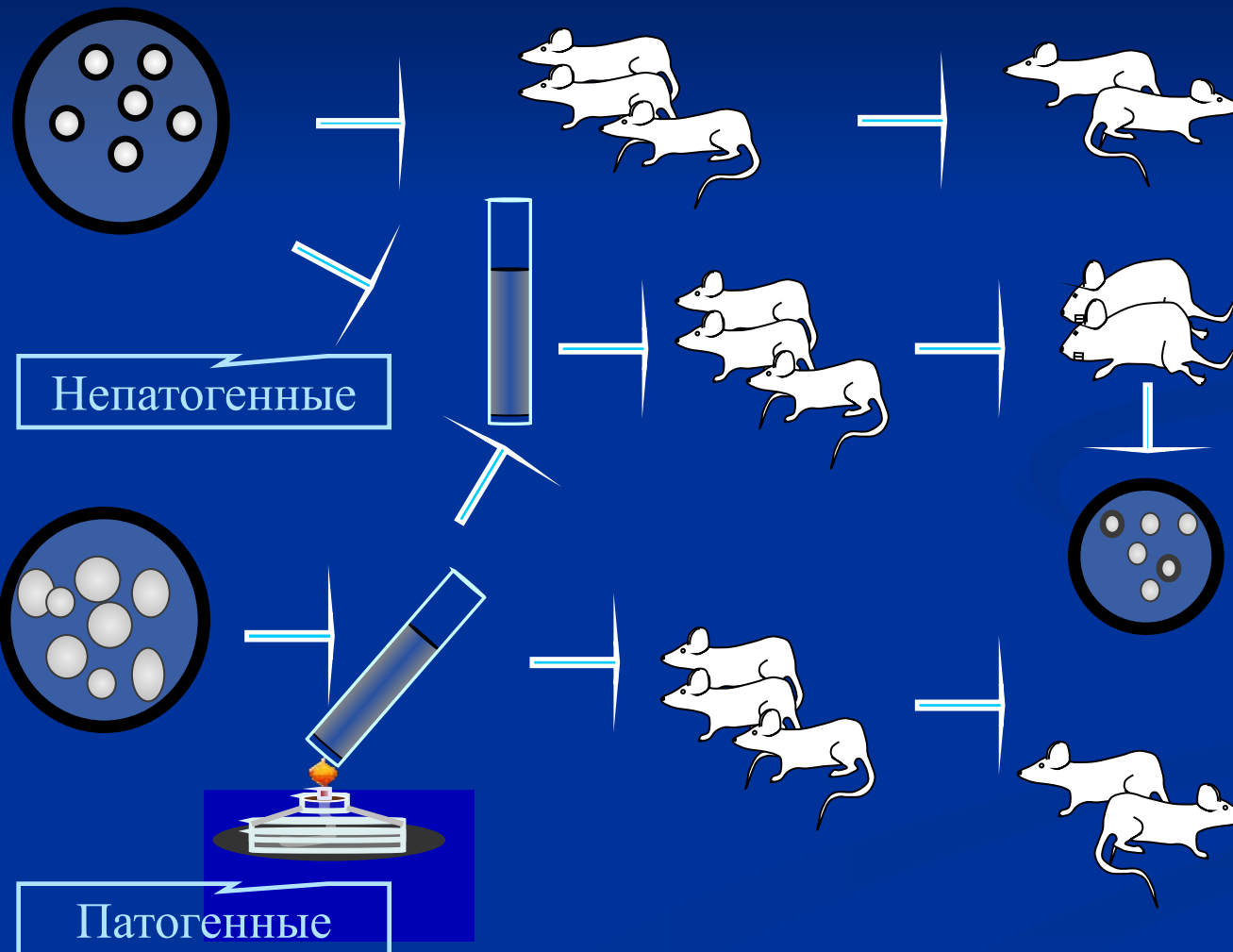
Мишер назвал это вещество «нуклеином» (от *лат.* нуклеус – ядро).

Это был первый препарат, содержащий по современным оценкам до 30% ДНК



Фридрих Мишер
(1843 – 1895),
швейцарский химик

1928 г. — Ф. Гриффитс, открытие
генетической трансформации у
пневмококков.



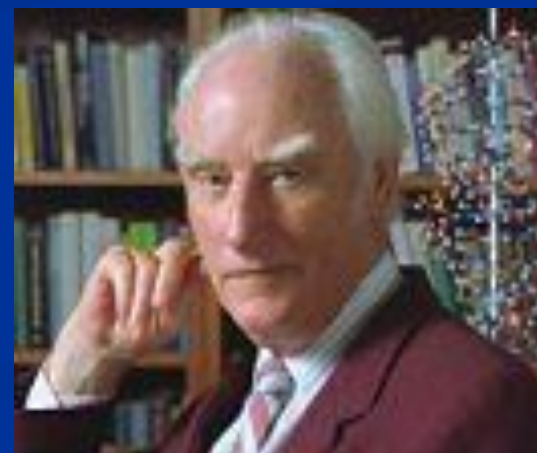
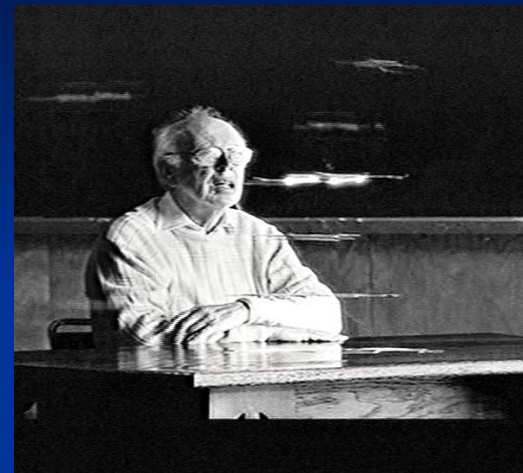
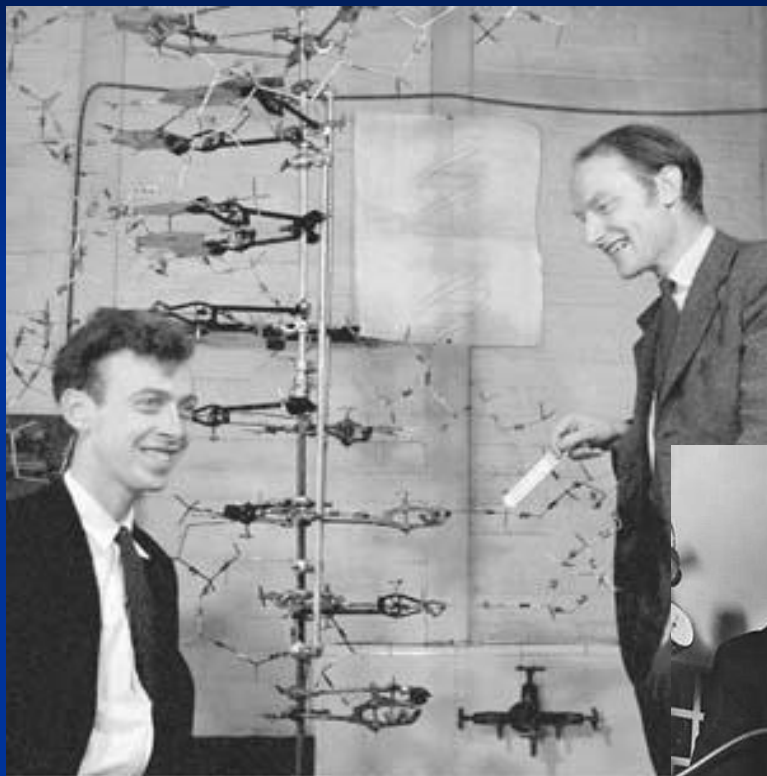
Фредерик Гриффитс
(1881 – 1941)
английский
микробиолог

1944 г., О. Эвери – доказательство
роли ДНК как носителя
наследственной информации.

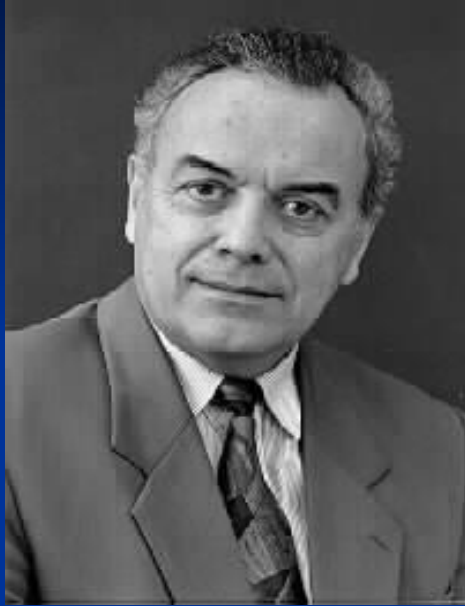


Освальд Эвери,
американский биолог

1953 г. – Ф. Крик, Д. Уотсон, М. Уилкинс – открытие химической структуры ДНК

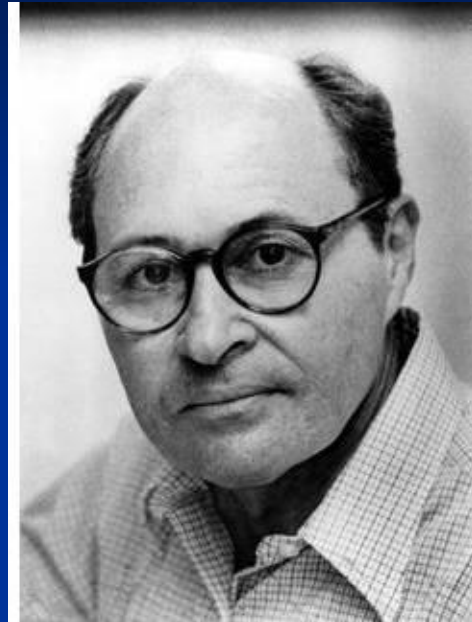


1960 - гг. — открытие рестриктаз — ферментов, разрезающих молекулу ДНК («молекулярные ножницы»)



Вернер Арбер

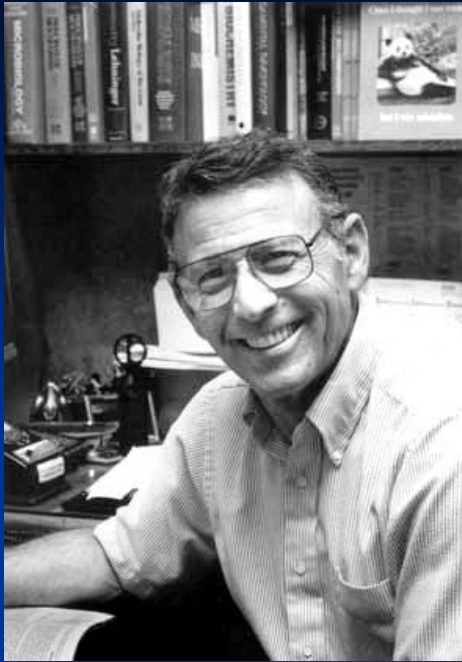
швейцарский ученый
молекулярный биолог



Дэниэл Натанс
американский
микробиолог и генетик.

В 1978 г. присуждена
Нобелевская премия по
физиологии и медицине
«за обнаружение
рестрикционных
ферментов и их
применение в
молекулярной генетике»

1972 -73 гг. - рождение генетической инженерии



Пол Берг

Создание первой рекомбинантной молекулы ДНК: вирус SV40, бактериофаг λ и *E. coli*.



Герберт Бойер

Создание технологии клонирования изолированных генов в клетках бактерий в составе плазмид (векторов)



Стенли Коэн

*«Нуклеиновые кислоты в основе своей просты.
Они лежат у истока самых фундаментальных
биологических процессов роста и наследования. ...»*

М. Вилкинс. Нобелевская лекция, 1962 г.

2

Строение и свойства ДНК

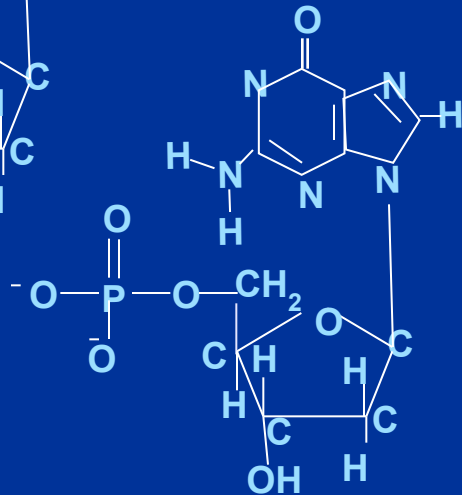
ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) - биополимер, состоящий из мономерных молекул - нуклеотидов.

В состав ДНК входят 4 типа нуклеотидов:

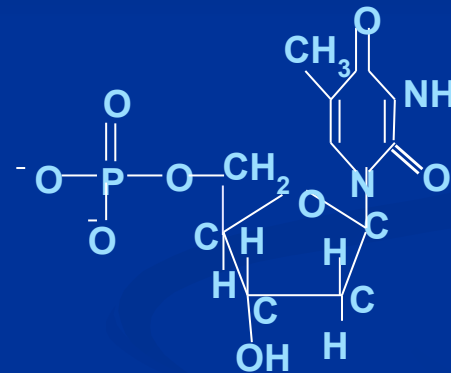
аденозин



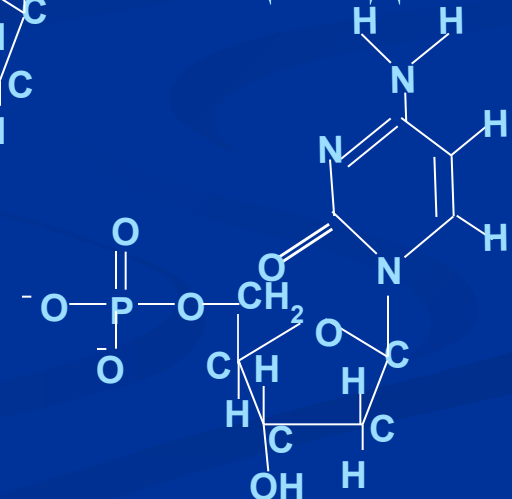
гуанозин



тимидин

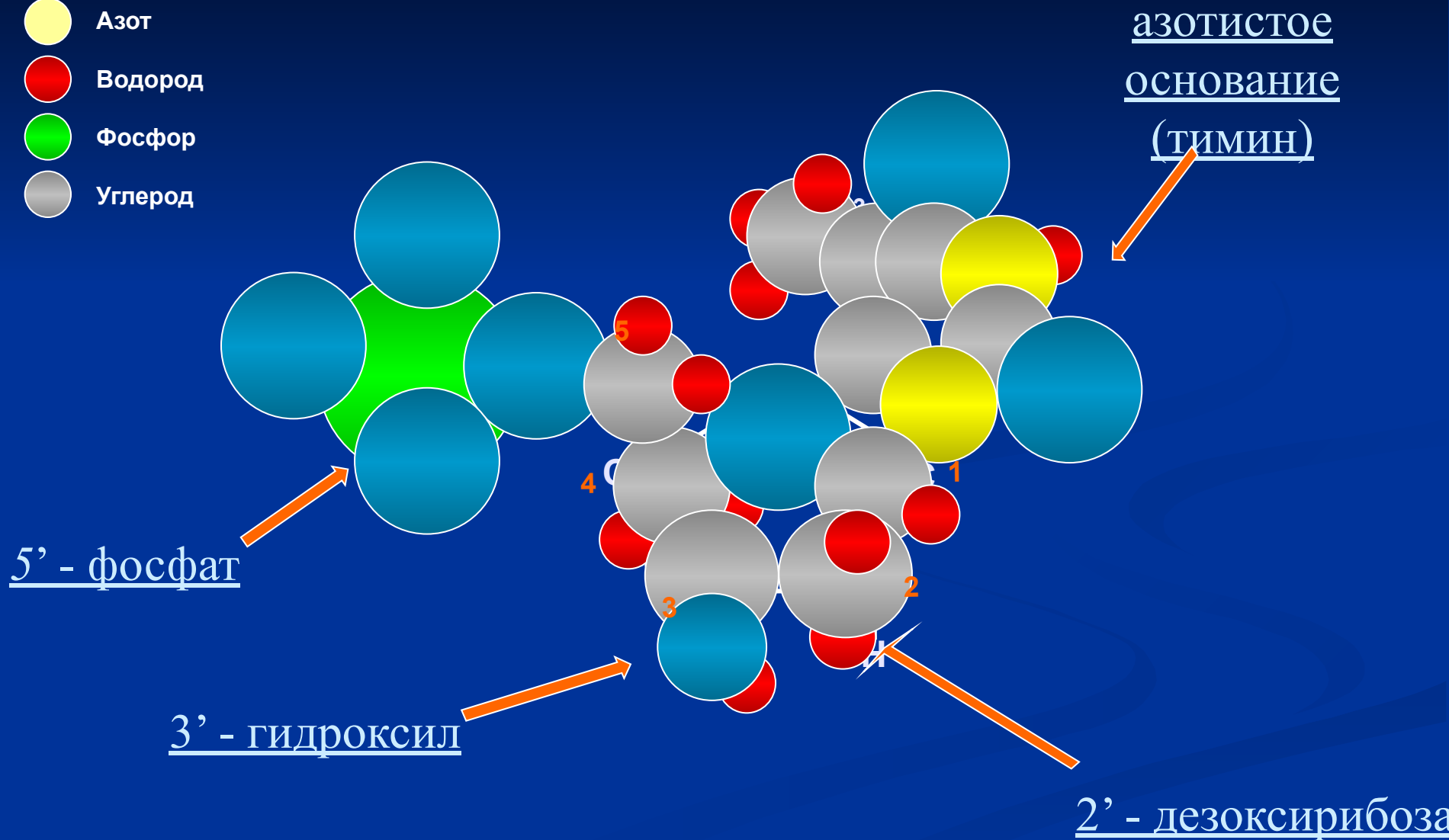


цитидин



Состав нуклеотида (тимидин)

- Кислород
- Азот
- Водород
- Фосфор
- Углерод

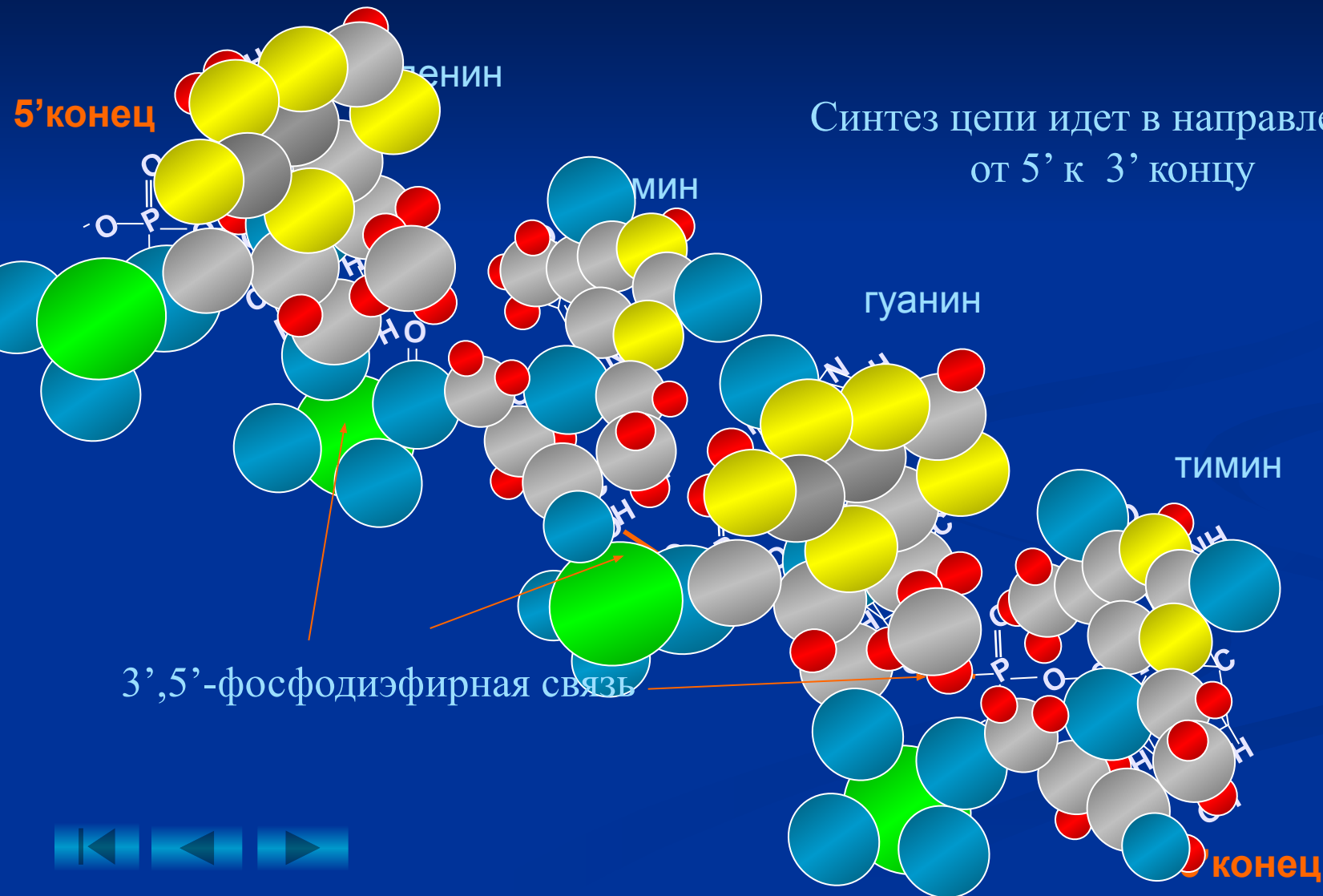


Как образуется полимерная молекула?

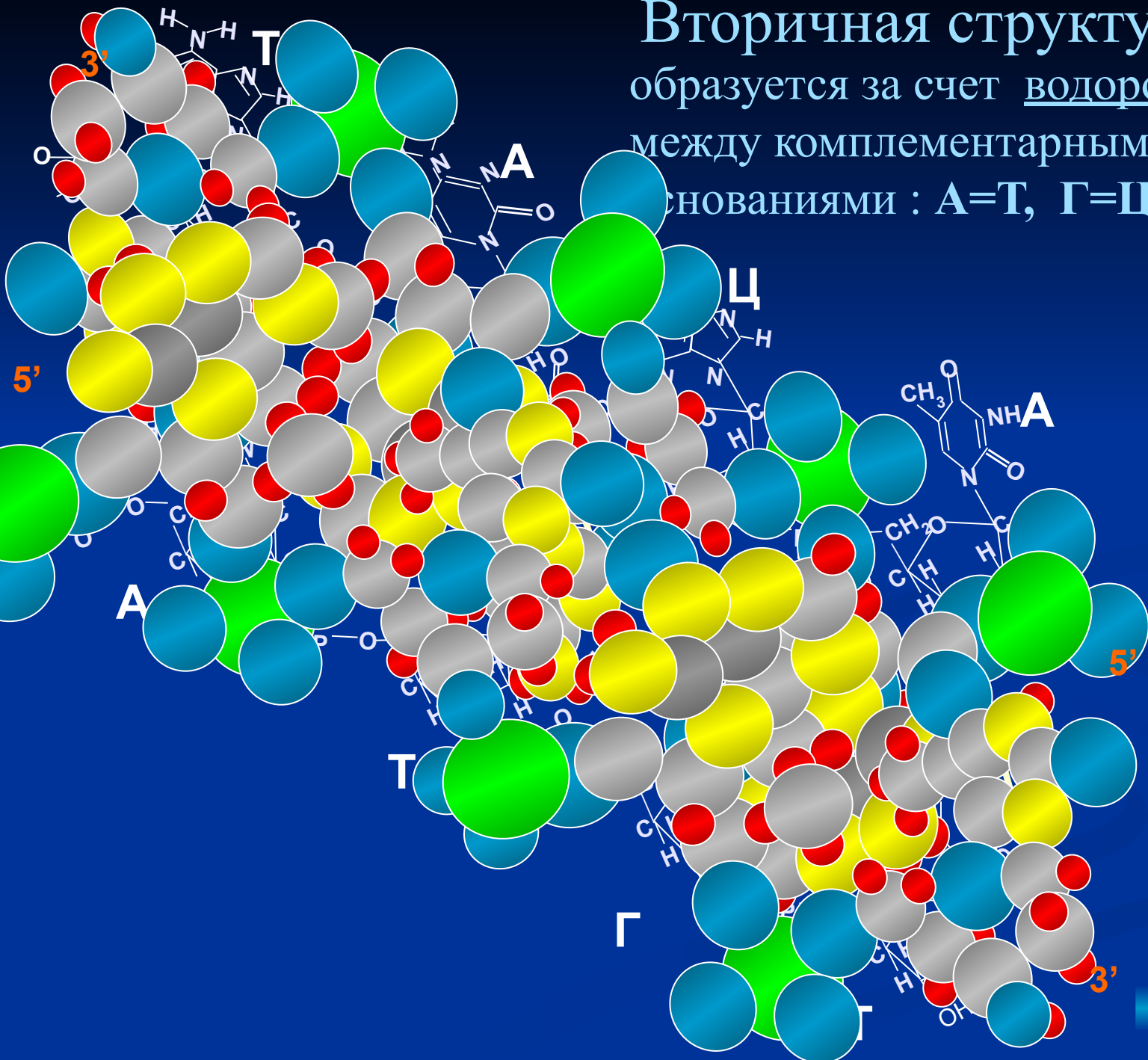
Молекула ДНК имеет несколько уровней структурной организации.

Первичная структура ДНК

образуется за счет возникновения 3',5'-фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксилом и 5'-фосфатом соседних нуклеотидов



Вторичная структура ДНК
образуется за счет водородных связей
между комплементарными азотистыми
основаниями : А=Т, Г=Ц



Взаимное расположение цепей в молекуле - антипараллельное



Двойная спираль ДНК –
две антипараллельные цепи
закручены вокруг продольной
оси.



Размер молекулы ДНК измеряется числом пар нуклеотидов, за единицу измерения взята **килобаза** - тысяча пар нуклеотидов, или оснований (т.п.н.).

Молекулярная масса 1 т.п.н. $\sim 6,6 \cdot 10^5$;
длина — 340 нм.

Escherichia coli - $4 \cdot 10^6$ п.н., $M = 2,6 \cdot 10^9$, $l = 1$ мм;

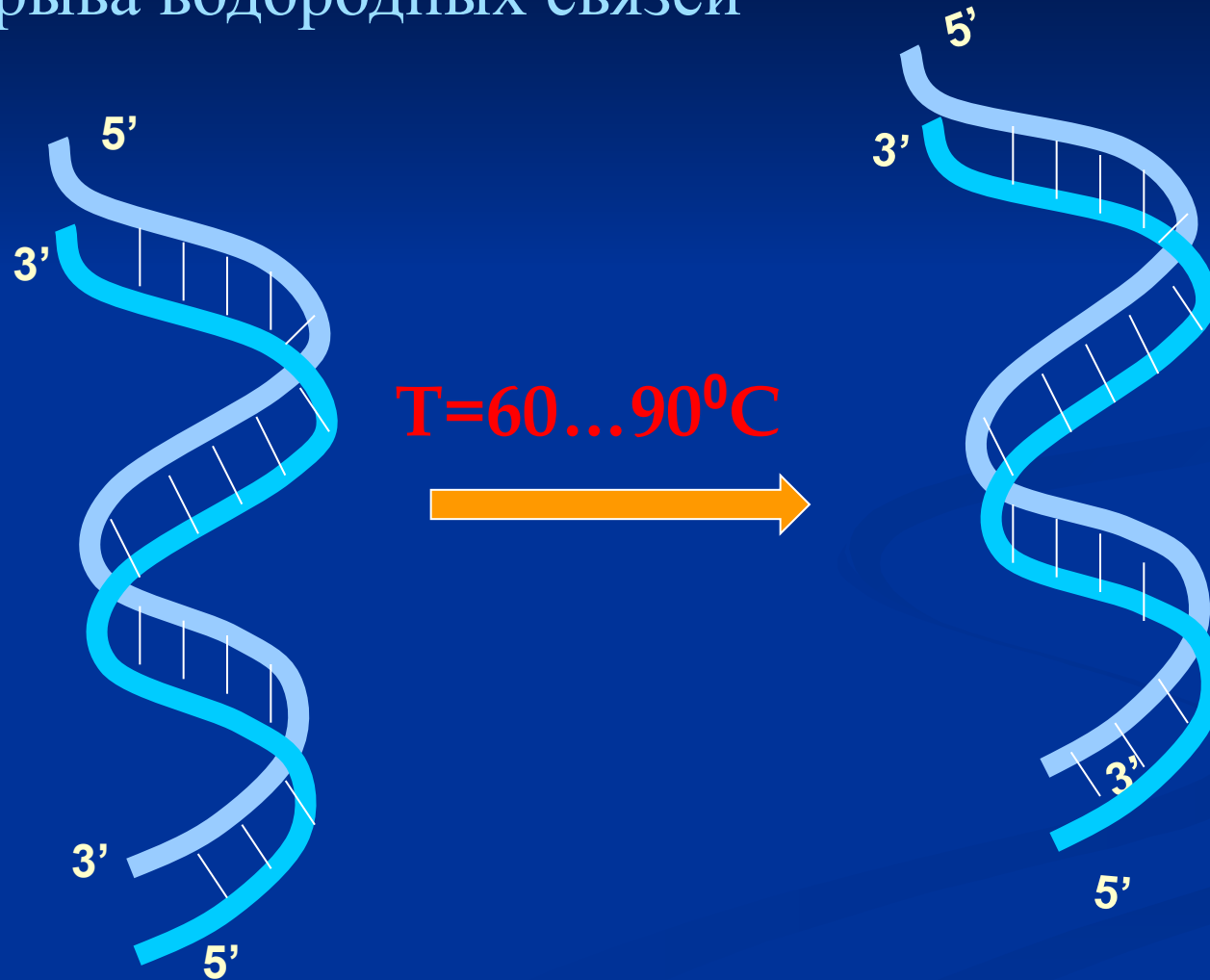
Drosophila melanogaster - $l = 15-16$ мм

Homo sapiens - $l = 2$ м!

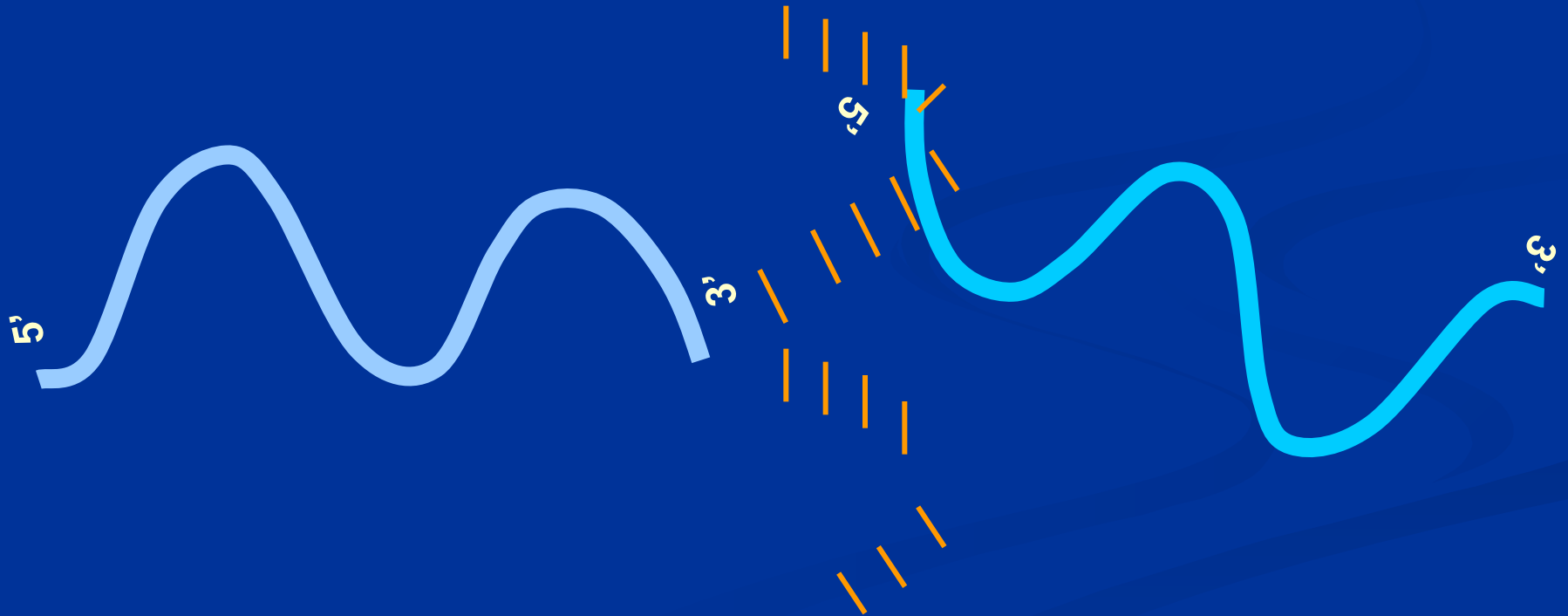
Свойства ДНК



Денатурация - плавление ДНК, разрушение вторичной структуры молекулы ДНК вследствие разрыва водородных связей



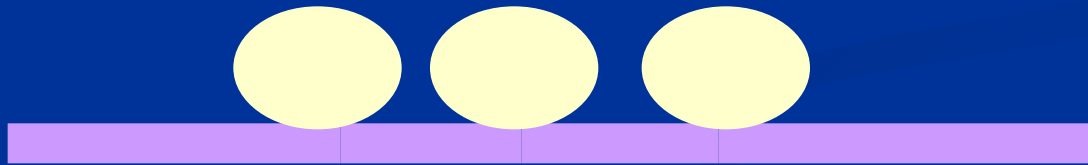
Ренатурация - отжиг ДНК, восстановление вторичной структуры вследствие образования водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями



3

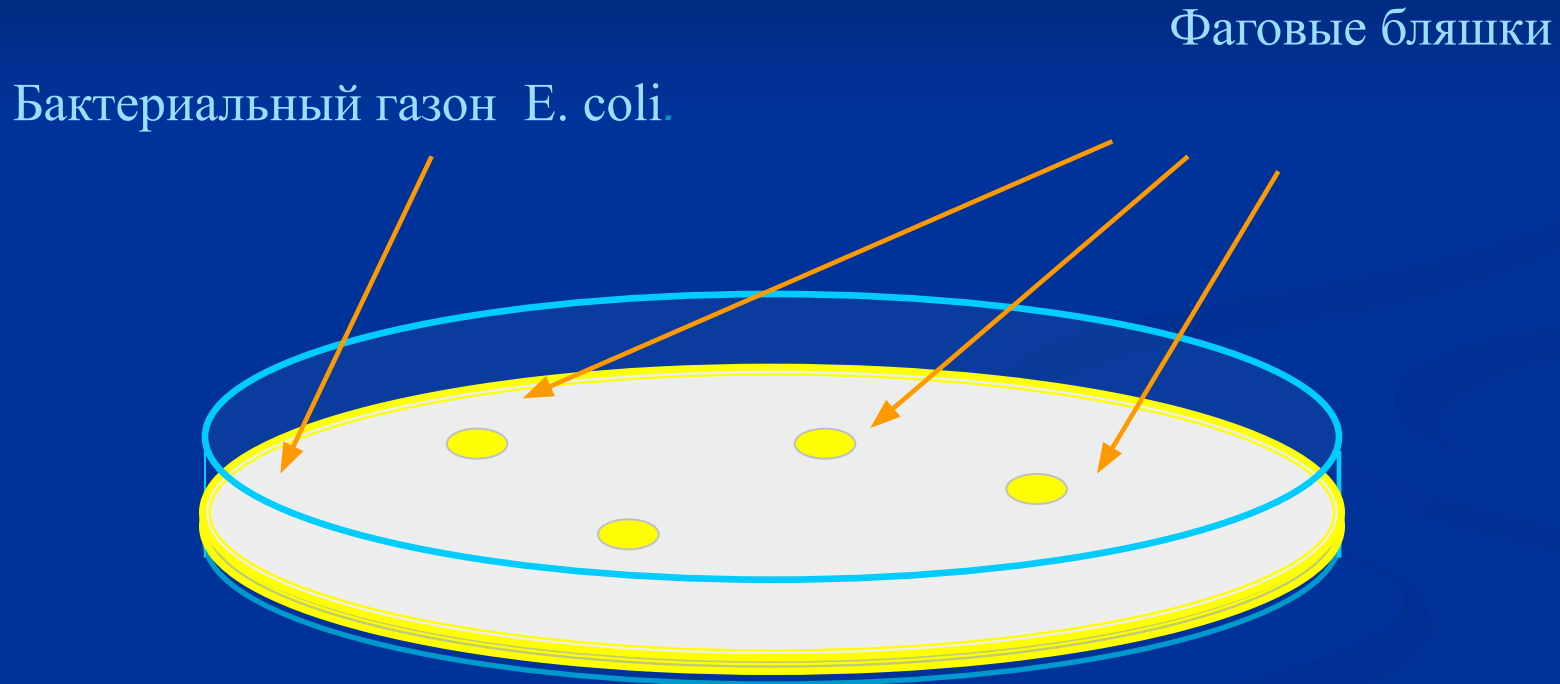
Ферменты генетической инженерии

1. Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции)
ферменты, расщепляющие фосфодиэфирную связь и
разрезающие молекулу ДНК на отдельные
фрагменты.



Рестриктазы открыты и выделены В. Герсбергом в 1962 г.
в опытах по инфицированию бактериофагом λ
штаммов *E. coli*.

От англ. *restriction* – ограничение.



Номенклатура рестриктаз:

при обозначении рестриктаз используют родо-
видовое название микроорганизма из которого
выделен фермент:

Escherichia coli

Рестриктаза

Bacillus subtilis

Рестриктаза

Свойства рестриктаз:

- **Субстратная специфичность** - способны распознавать определенную последовательность нуклеотидов на молекуле ДНК, в которой происходит разрыв – **сайт узнавания, сайт рестрикции**
- **Отсутствие видовой специфичности** – расщепляют ДНК организмов разных видов

В генетической инженерии используются рестриктазы 2-го класса – узнают последовательности, одинаково читаемые по обеим цепям – **палиндромы**.

Разрыв молекулы ДНК происходит в сайте узнавания.

Палиндромы – слова, одинаково читающиеся слева направо и справа налево

НАГАН

КАЗАК

ШАЛАШ

ОН ДИВЕН ПАЛИНДРОМ И НИ МОРД НИ ЛАП НЕ ВИДНО

-- 5'ГАТЦ^{3'} --

-- 3'ЦТАГ^{5'} --

-- 5'ЦЦNNNГГ^{3'} --

-- 3'ГГNNNЦЦ^{5'} --

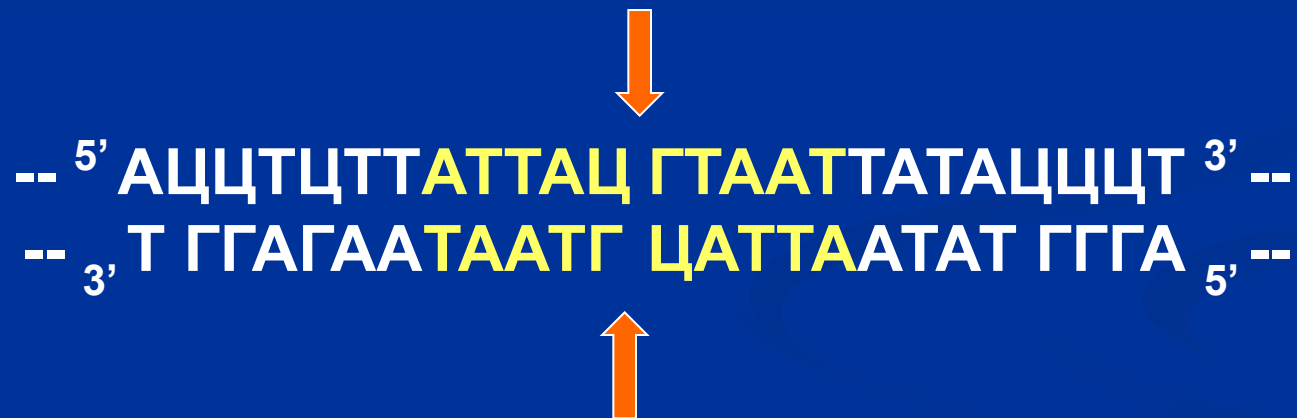
-- 5'АТТАЦГТААТ^{3'} --

-- 3'ТААТГЦАТТА^{5'} --



Характер расщепления сайта рестрикции

- По оси симметрии – с образованием «тупых» концов



□ Ступенчато – с образованием «липких» концов

- с выступающими 5'-концами



- с выступающими 3'-концами



Некоторые рестриктазы 2 класса

Микроорганизм-источник фермента	Фермент	Сайт рестрикции
<i>Escherichia coli</i>	Eco	Г ↓ ААТТЦ
<i>Bacillus megaterium</i>	Bme	↓ ГАТЦ
<i>Metanococcus aeolicus</i>	Mae	↓ ГТНАЦ
<i>Thermus thermophilus</i>	Tth	ГАЦN ↓ NГТЦ
<i>Providencia stuarti</i>	Pst	ЦТГЦА ↓ Г

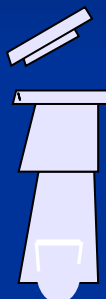
Получение рестриктных фрагментов



Г↓AATTЦ

Eco

ЦАТТГТ ТТТ Г Г ААТТЦЦЦТЦААТГАТЦГТАГААТТЦАТЦГАТЦАТАЦЦЦАТГАААТАЦЦАТГАТЦААТГАА
ГТААЦААААЦЦ ТТАА ГГГАГТТАЦТАГЦАТЦТТААГТАГЦТАГТАТГ Г ГТАЦТТТАТ ГГ ТАЦТАГТТАЦТТ



↓ГАТЦ

Bme

ЦАТТГТ ТТТ Г ГААТ Т ЦЦЦТЦААТГАТЦГТА Г ААТТЦАТЦГАТЦАТАЦЦЦАТГАААТА ЦЦАТ ГАТЦААТГАА
ГТААЦААААЦЦ ТТАА Г Г ГАГТТАЦТАГЦАТ Ц ТТААГТАГЦТАГТАТГ Г ГТАЦТТТАТ ГГ ТА ЦТАГТТАЦТТ



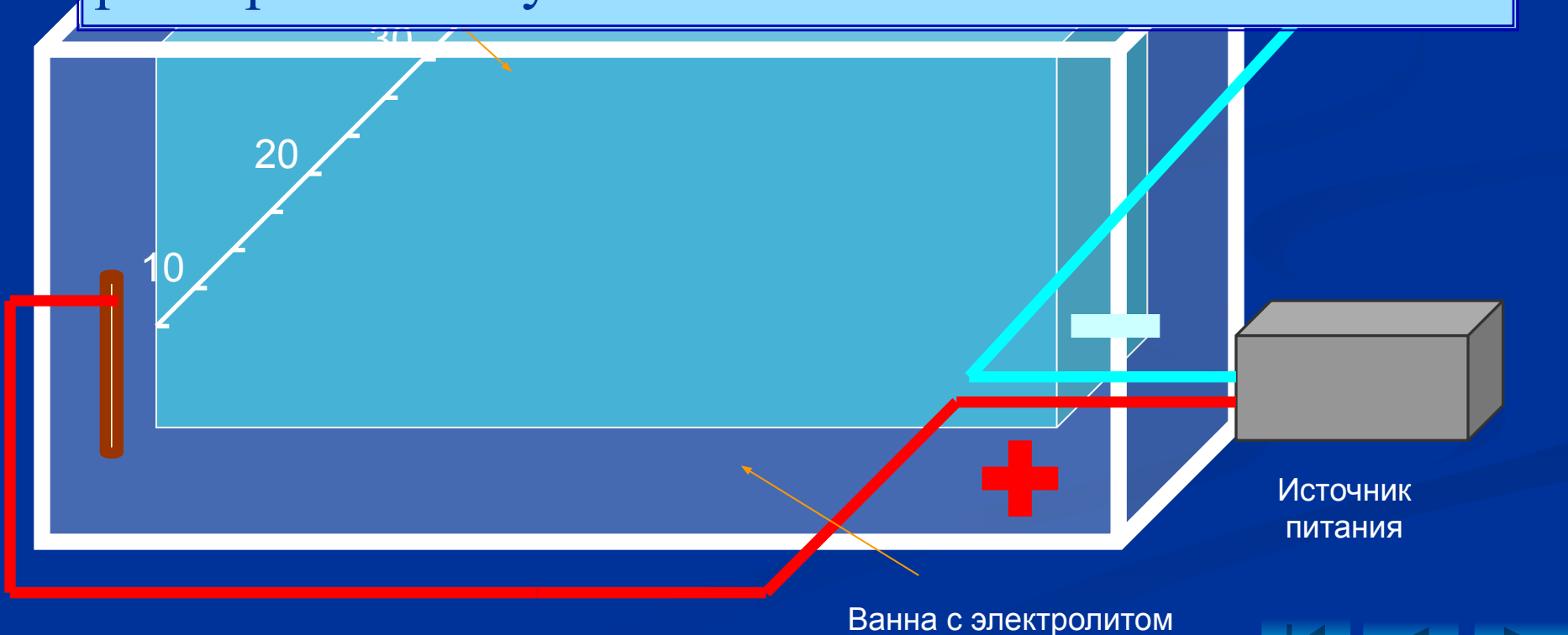
↓ГАТЦ
Г↓AATTЦ

Eco + Bme

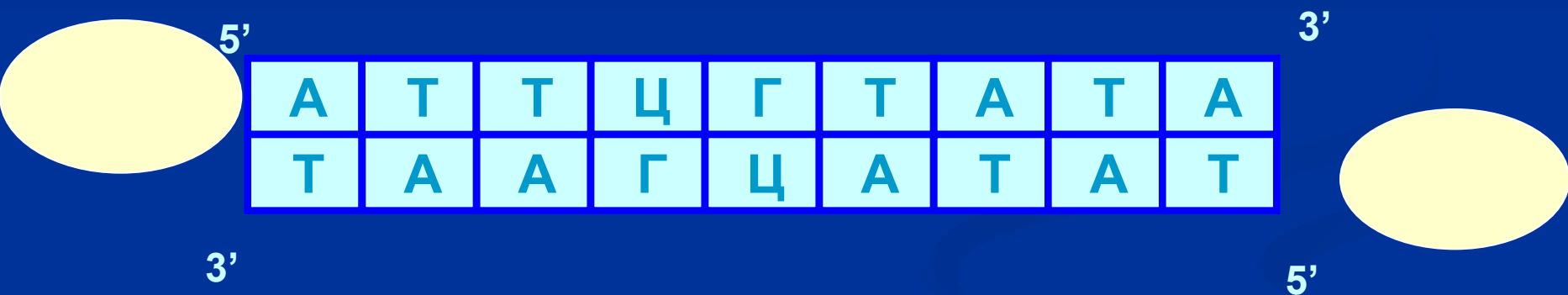
ЦАТТГТ ТТТ Г Г ААТТЦЦЦТЦААТГАТЦГТА Г ААТТЦАТЦГАТЦАТАЦЦЦАТГАААТА ЦЦАТ ГАТЦААТГАА
ГТААЦААААЦЦ ТТАА ГГГАГТТАЦТАГЦАТ ЦТТААГ ГТАГ ЦТАГТАТГ Г ГТАЦТТТАТ ГГ ТА ЦТАГТТАЦТТ

Разделение фрагментов электрофорезом

Электрофорез – метод разделения биологических макромолекул (ДНК и белков) в электрическом поле по их электрическому заряду, обусловленному размером молекулы.



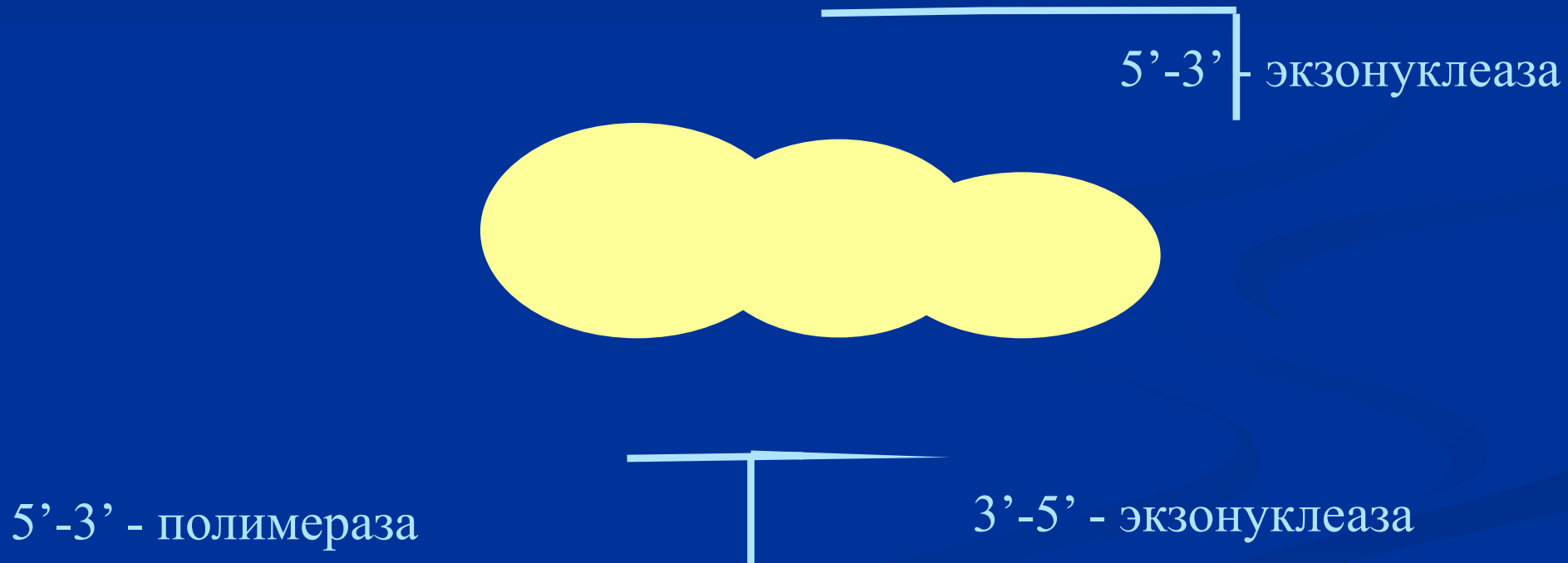
2. Экзонуклеазы — ферменты, гидролизующие фосфодиэфирную связь с 5' или 3' конца. Отщепляют от молекулы ДНК отдельные нуклеотиды.



3. Лига́зы – ферменты, катализирующие образование фосфодиэфирной связи и способствующие сшиванию разных фрагментов ДНК в единую молекулу.



4. ДНК-полимераза – фермент, катализирующий синтез полимерной молекулы ДНК на ДНК- матрице, способствующий репликации (удвоению) ДНК.



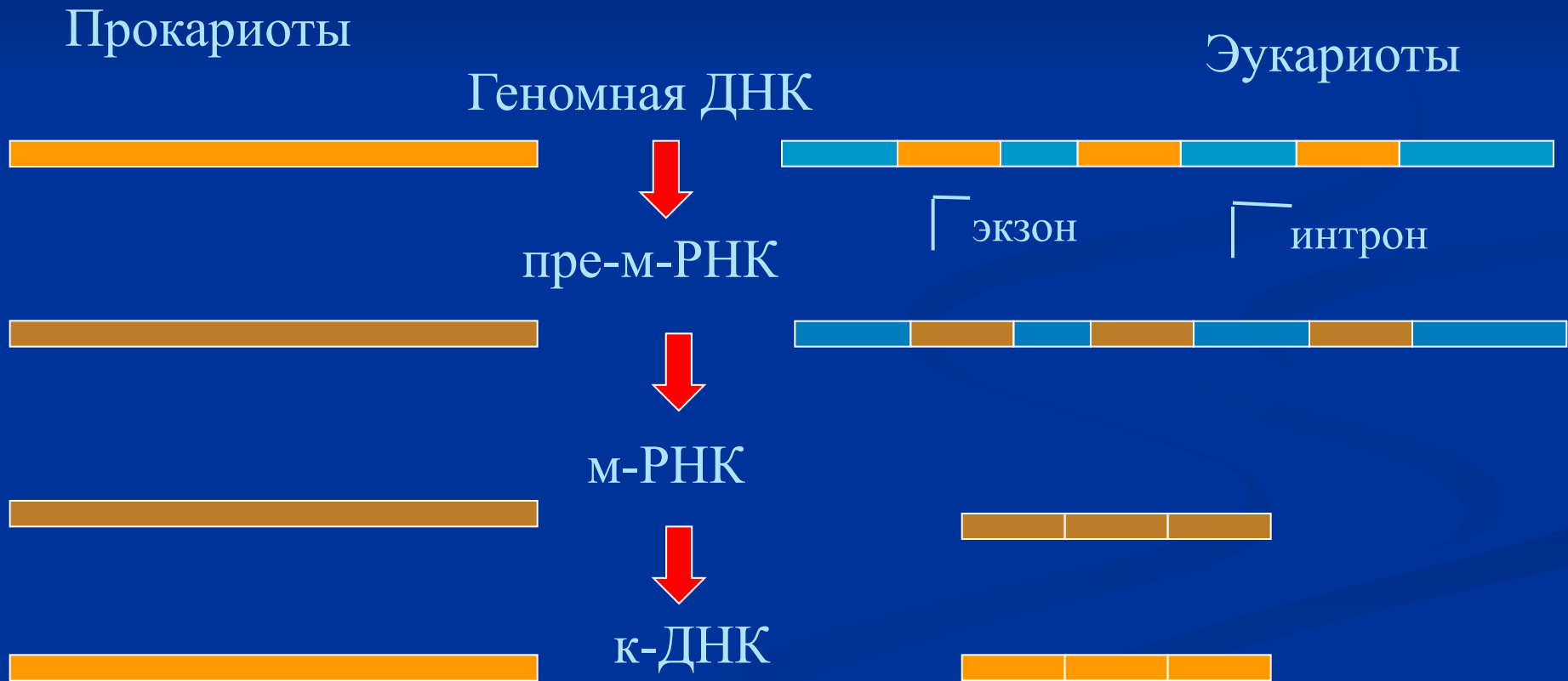
Для реакции полимеризации необходимы:

- ДНК – матрица
- Праймер (ДНК-затравка), комплементарный 3'-концу матрицы
- Свободные нуклеотиды
- Фермент ДНК-полимераза



5. Обратная транскриптаза (ревертаза) – фермент, катализирующий синтез ДНК на РНК-матрице.

Комплементарная ДНК эукариот короче геномной ДНК, т.к. не содержит интронов



6. Терминальная трансфераза – фермент, присоединяющий к 3'-концу ДНК отдельные нуклеотиды.



Гомополимерный липкий конец

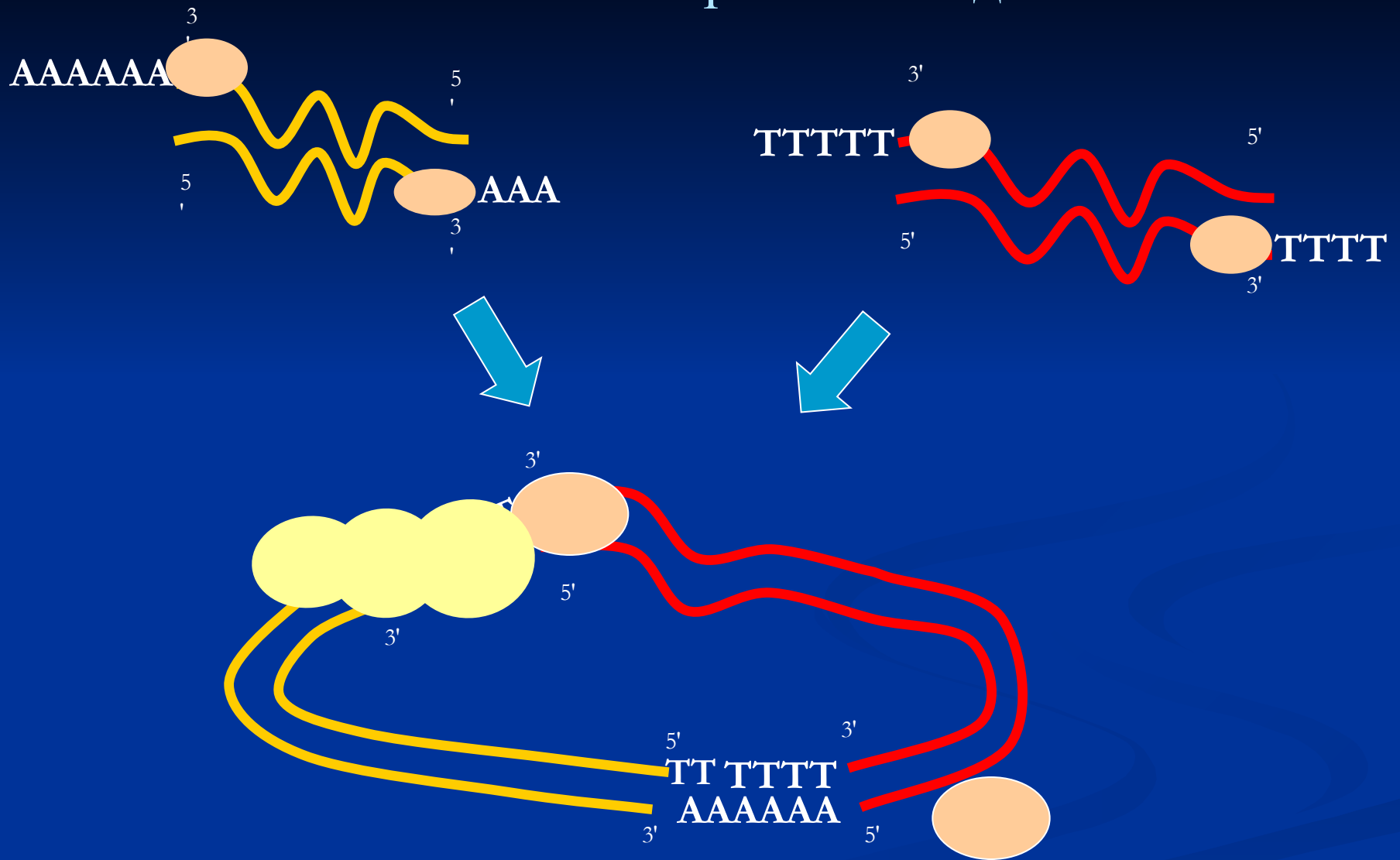
4

Методы создания рекомбинантных ДНК

1. Коннекторный метод (от англ. *to connect* – соединять) – основан на использовании терминальной трансферазы, синтезирующей на соединяемых фрагментах взаимокomплементарные липкие концы.

- вырезание рестриктазами фрагментов ДНК;
- синтез взаимокomплементарных концов на фрагментах ДНК;
- взаимодействие концов за счет водородных связей;
- сшивание лигазой;
- заделывание брешей ДНК-полимеразой

Схема коннекторного метода



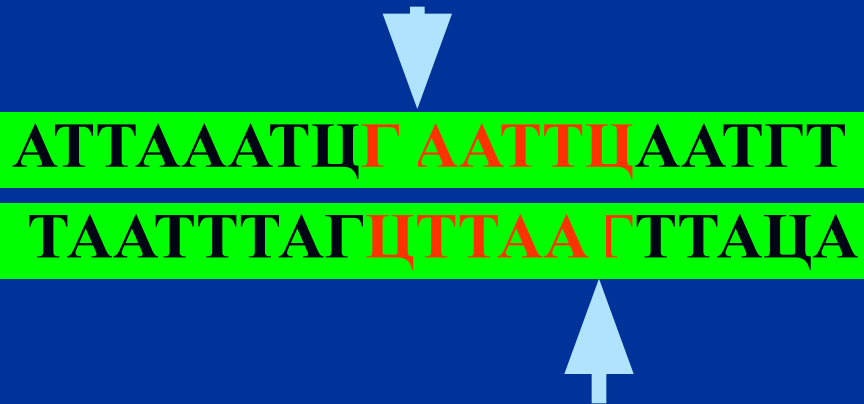
2. Рестриктазно-лигазный метод – основан на использовании рестриктаз, образующих у разрезаемых фрагментов ДНК липкие концы.

- вырезание одной и той же рестриктазой фрагментов ДНК с комплементарными липкими концами;
- соединение липких концов за счет водородных связей;
- сшивание лигазой, образование фосфодиэфирной связи;

Схема рестриктазно-лигазного метода



Eco



Если невозможно выделить разные фрагменты ДНК одной и той же рестриктазой, используется линкер.

Линкеры (от англ. link – звено (цепи), соединять) короткие синтетические фрагменты ДНК, содержащие сайты узнавания какой-либо рестриктазы.

Схема использования линкера



Варианты конфигурации рекомбинантных ДНК

Линейная



Кольцевая



Восьмерки и петли



Конец
