



Лекция 14.
**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИНЖЕНЕРИЯ
В БИОТЕХНОЛОГИИ**

Лектор: к.б.н. Ковзунова О.В.

865

1865



Грегор Мендель, скрещивая горох, описал законы наследственности.

1892

1892



Д.И. Ивановский впервые описал передачу болезнетворного начала посредством агентов, проходящих через бактериальные фильтры и позже названных вирусами.

1915-1917

1915-1917



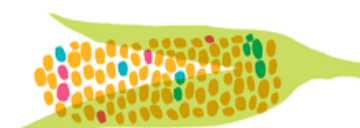
Фредерик Туорт и Феликс д'Эррель обнаружили вирусы бактерий — бактериофаги.

1940^e-1950^e

Описаны конъюгация и трансдукция — процессы переноса генетического материала между бактериальными клетками с помощью плазмид и фагов.

1940^e-1950^e

1948



Барбара Макклинток обнаружила в ДНК кукурузы транспозоны.

1948

1953

1956

1960^e

1967

1970

1953



С помощью рентгеновской кристаллографии установлена структура ДНК.

1956

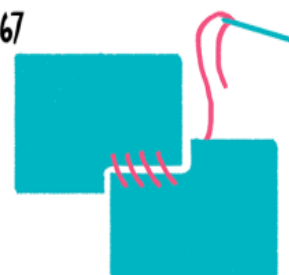


Артур Корнберг выделил ДНК-полимеразу I, первый из ферментов, способных копировать ДНК, и синтезировал с ее помощью цепь ДНК.



Изучены структура и функции мРНК и тРНК, расшифрован генетический код.

1967



Бернард Вайсс и Чарльз Ричардсон впервые показали T4-лигазу в действии.

1970



Гамильтон Смит выделил первую эндонуклеазу рестрикции II типа.

1970



Мортон Мандель и Акико Хига нашли способ делать клетки бактерий компетентными — способными лучше принимать ДНК из внешней среды.

1972



Пол Берг получил первую рекомбинантную ДНК.

1970

1973



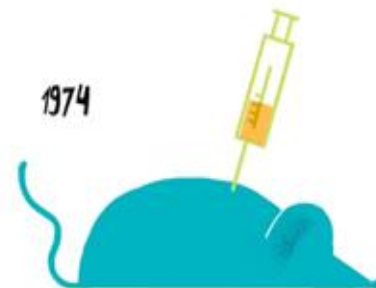
Герберт Бойер и Стэнли Норман Козн получили первый организм, содержащий рекомбинантную ДНК.

1974



Герберт Бойер и Стэнли Норман Козн получили первую бактерию, несущую эукариотический ген — ген рибосомной РНК лягушки.

1974



Рудольф Йениш создал первое трансгенное млекопитающее.

1975



Созвана Асиломарская конференция, регламентировавшая работу с рекомбинантными ДНК.

1975

1977



Созданы достаточно производительные методы секвенирования ДНК.

1977

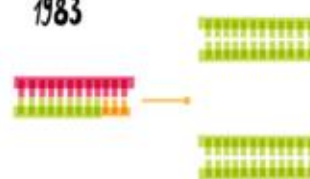
1978–1979

1978–1979



Genentech произвела первые рекомбинантные белки — соматотропин и инсулин.

1983



Кэри Муллис разработал метод ПЦР.

1983

1983



Появилось первое трансгенное растение.

1990

1990



Обнаружена РНК-интерференция, механизм которой в 1998 описали Крейг Мелло и Эндрю Файер.

1996

1996



Сконструированы сайт-специфические нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN).

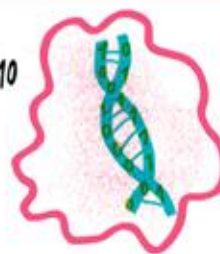
2003



Почти полностью прочитан геном человека.

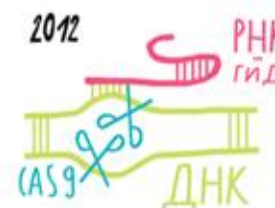
2003

2010



Группа Крейга Вентера и Гамильтона Смита создала Синтию — первый организм с полностью синтетической хромосомой.

2012



Разработана технология геномного редактирования CRISPR-Cas9.

2010

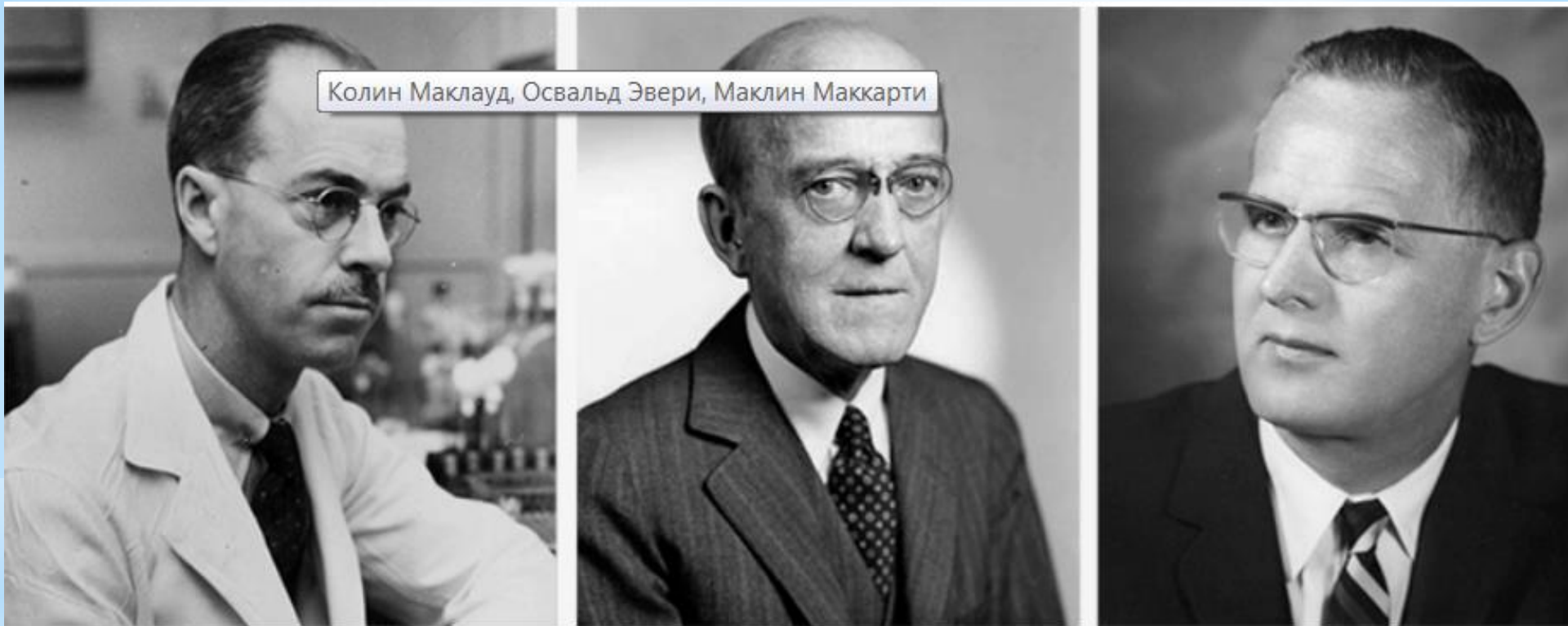
2012

2014

2014



Получена бактерия с расширенным генетическим кодом.



Колин Маклауд, Освальд Эвери, Маклин Маккарти

Рисунок 5. Они показали, что наследственная информация записана в ДНК: Колин Маклауд, Освальд Эвери, Маклин Маккарти.

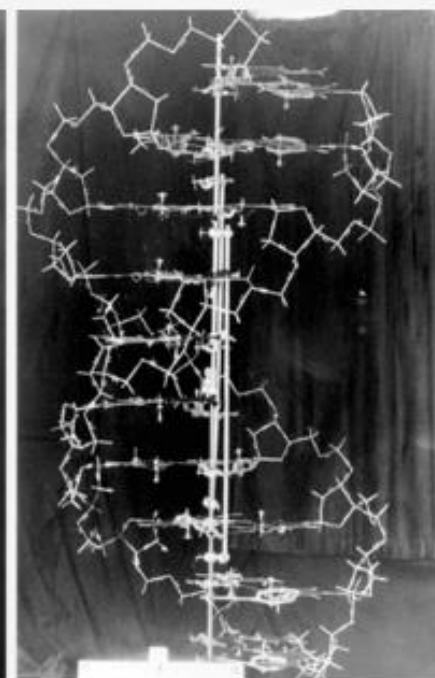


Рисунок 8. Им покорилась двойная спираль. Вверху — Морис Уилкинс и Розалинд Франклин с вошедшим в историю [Фото 51](#) — самой удачной рентгенограммой ДНК. Внизу — Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик со своей моделью ДНК. Им всё-таки удалось опередить другого талантливого ученого — [Лайнуса Полинга](#), известного своей любовью к аскорбинке и расшифровке структуры молекул.



Рисунок 10. Благодаря им мы можем резать ДНК только там, где нужно. Слева — Дэниел Натанс, в центре — Гамильтон Смит, справа — Вернер Арбер. За вклад в познание биологической функции рестриктаз и за внедрение их в лабораторную практику в качестве молекулярных «ножниц закройщика» все трое удостоены Нобелевской премии.





Рисунок 11. Благодаря им мы можем читать нуклеотидную последовательность ДНК. Слева — Фред Сенгер отмечает свою первую «нобелевку» — за секвенирование белка инсулина. Вторую он получит совместно с Гилбертом за разработку методов секвенирования ДНК. В центре — Андрей Дарьевич Мирзабеков занимался изучением динамики хроматина, разрабатывал микрочипы для анализа биомолекул, с 1989 по 1993 был вице-президентом организации «Геном человека» (HUGO). Справа — Уолтер Гилберт работал с Джеймсом Уотсоном, организовал несколько биомедицинских компаний и впервые озвучил термин «РНК-мир» [22].

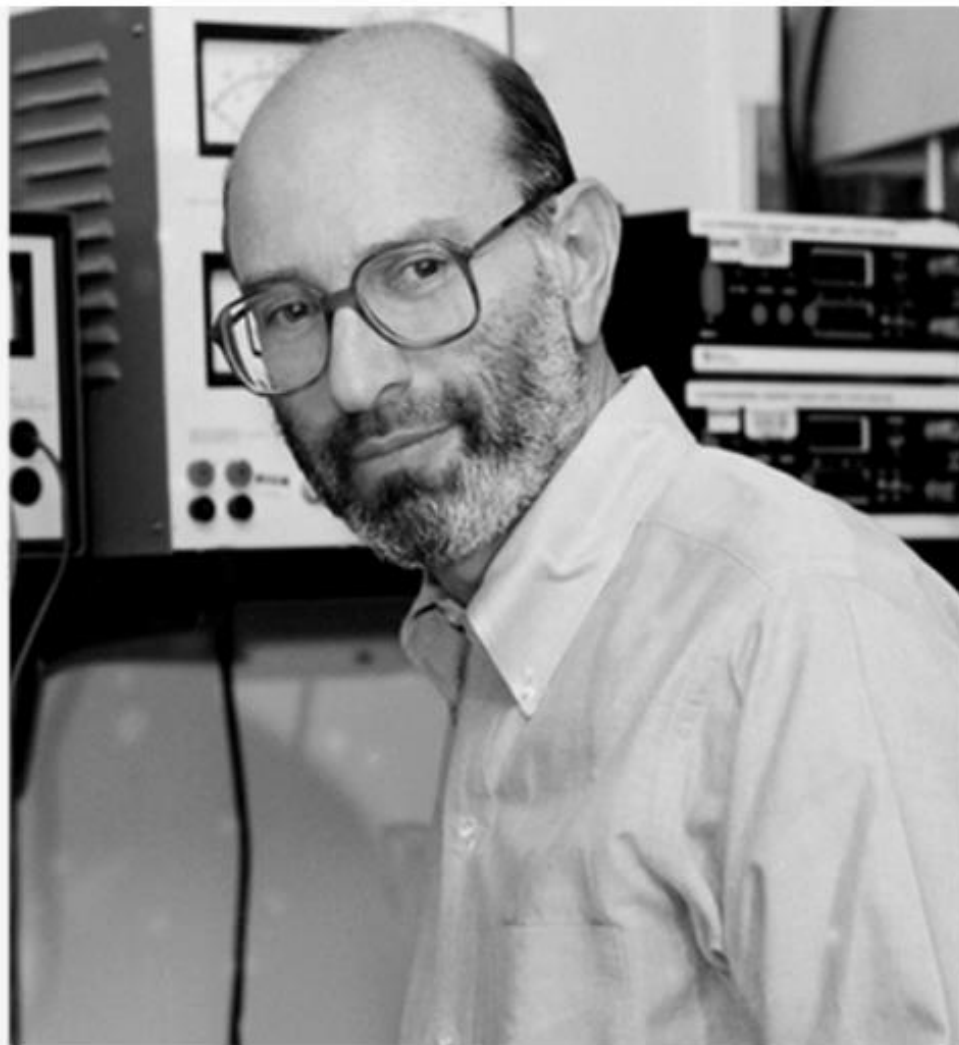
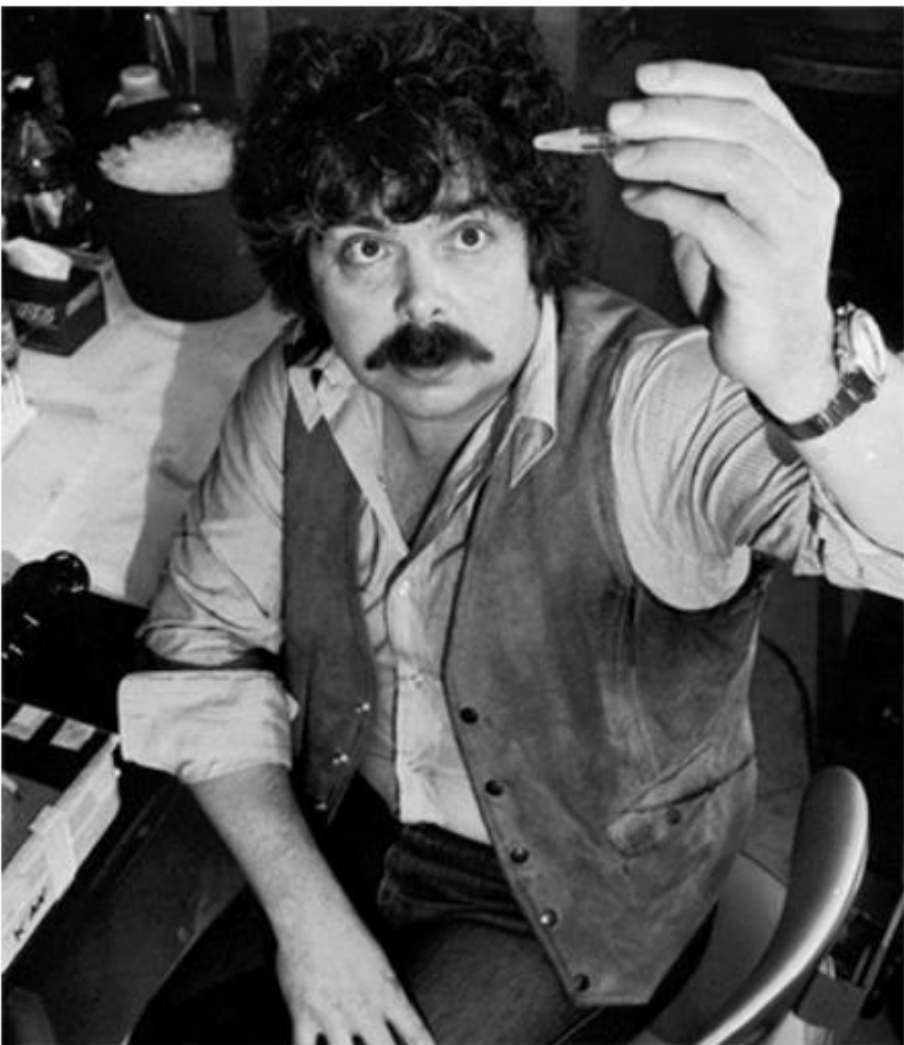
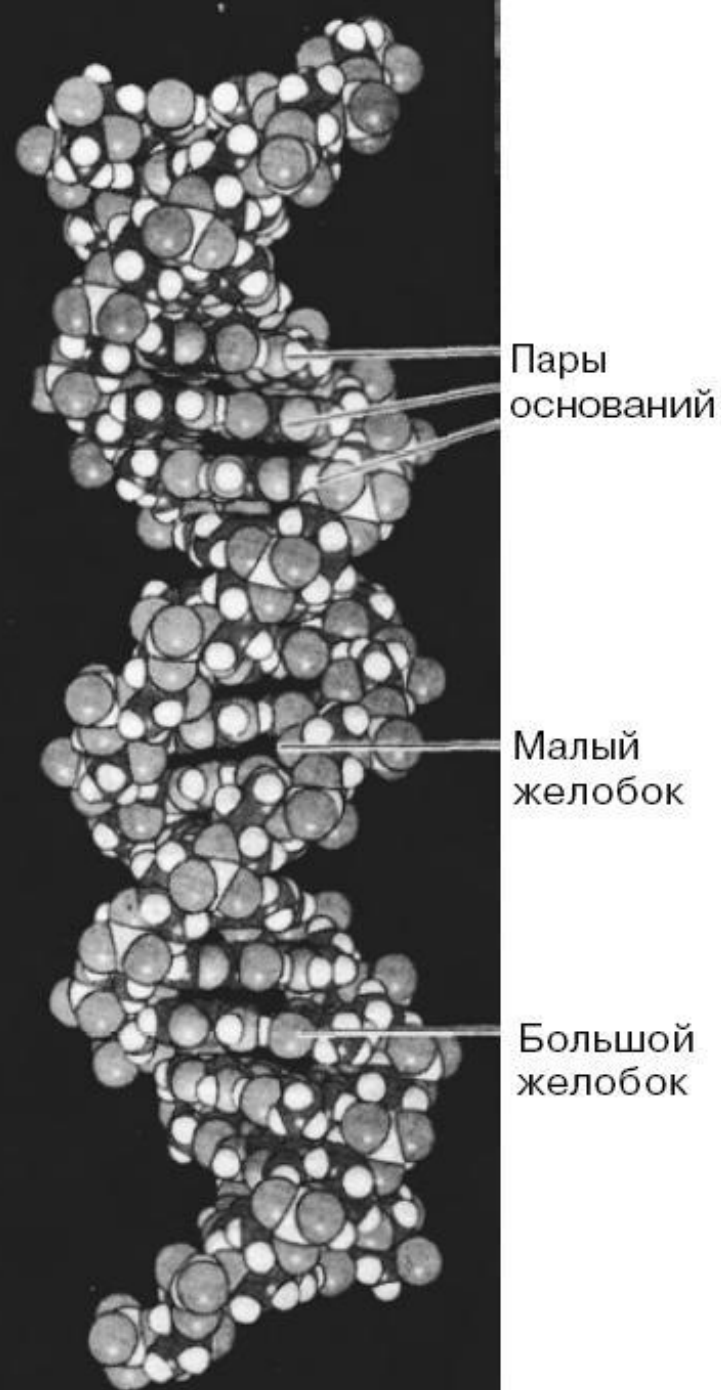
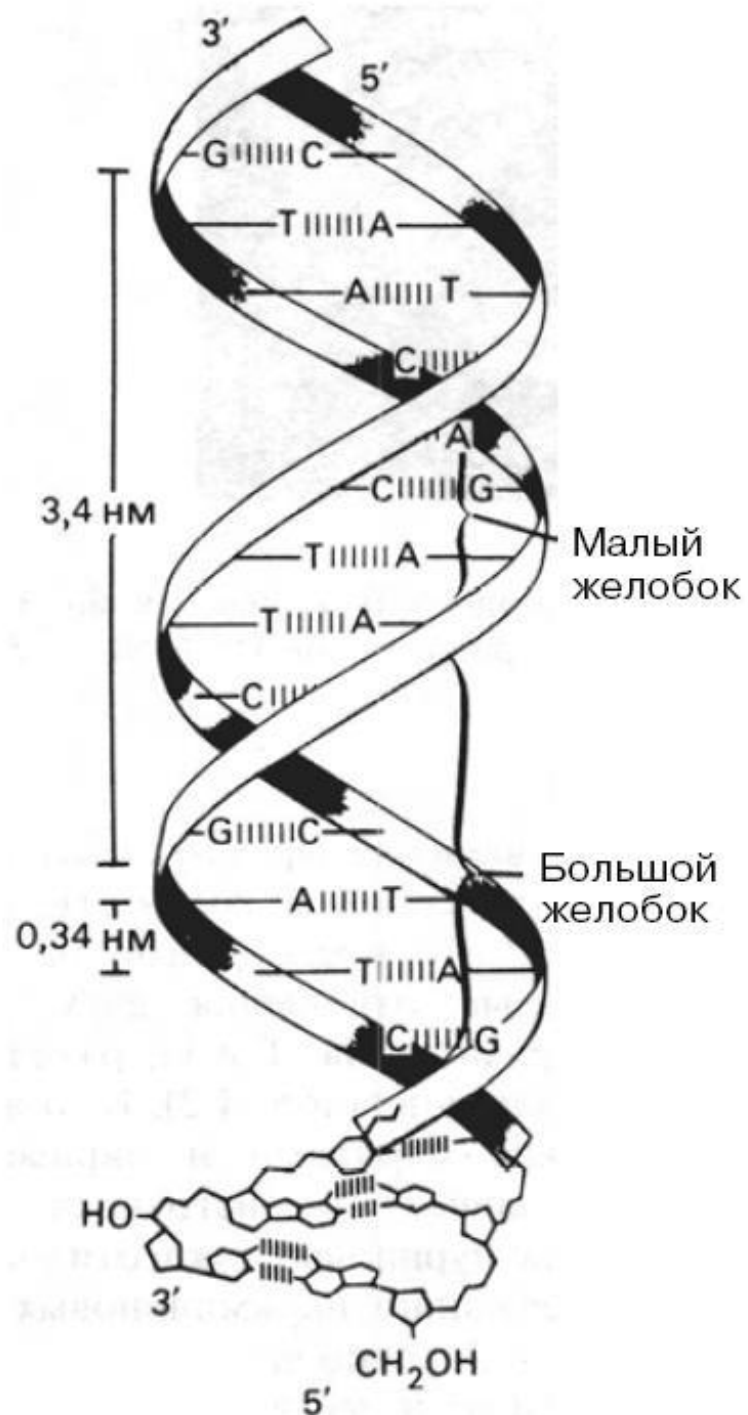


Рисунок 3. Герберт Бойер и Стэнли Козн — создатели первого трансгенного организма и обладатели первого генно-инженерного патента.



В основе генетической инженерии лежит целенаправленное конструирование искусственных генетических систем вне организма и их введение в живой организм с целью создания нового организма.

Трансгеноз, трансгенез - искусственный перенос чужеродных фрагментов ДНК (генов) в зародышевые клетки животных (зиготы, сперматозоиды, эмбриональные стволовые клетки или ранние эмбрионы) или в недифференцированные клетки растений (протопласты) с последующим получением из них нового организма (**трансгенный организм**), у которого эти экзогенные фрагменты ДНК присутствуют в составе генома всех типов клеток как менделирующие гены, которые экспрессируются и передаются по наследству.

Рекомбинантная ДНК

Рекомбинантная ДНК (или сокращенно рДНК) — это искусственно созданная цепь ДНК, полученная в результате сочетания двух или более последовательностей генов разных видов.

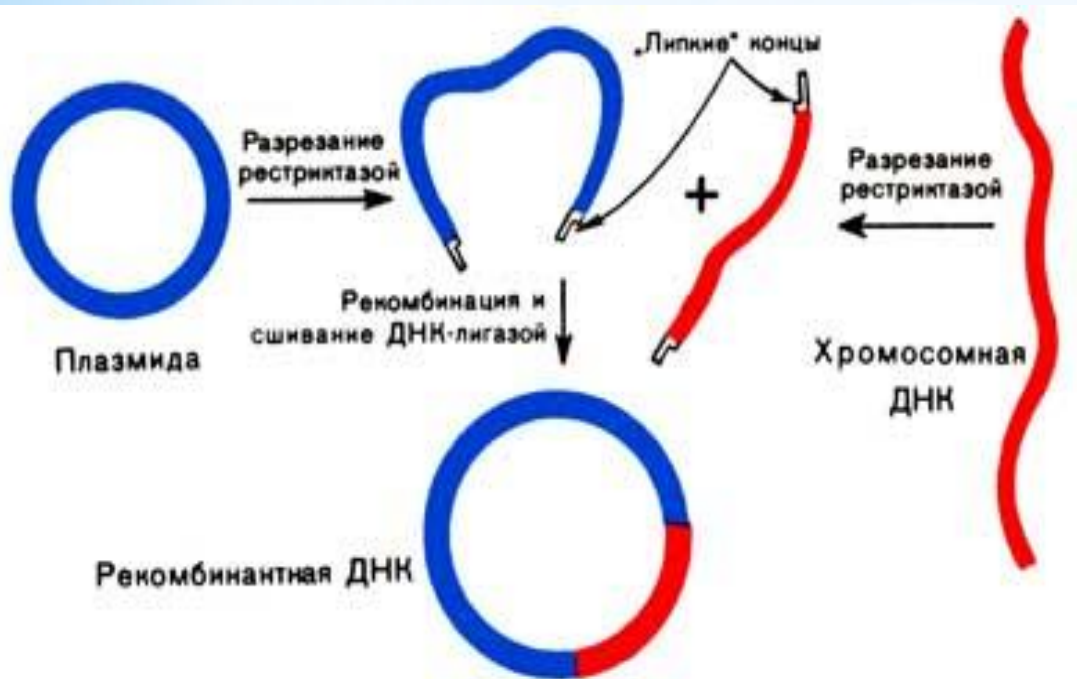


Рис. 23. Схема получения рекомбинантной ДНК по Кюену — Бойеру.

Технология получения рекомбинантных ДНК:

1. Расщепление ДНК эндонуклеазами
2. Секвенирование всех нуклеотидов
3. Конструирование рекомбинантной ДНК
4. Гибридизация нуклеиновых кислот
5. Клонирование ДНК путем введения в клетку/амплификация *in vitro*
6. Введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы

Ферменты применяемые при конструировании рДНК:
РЕСТРИКТАЗЫ – выделяют фрагменты ДНК
ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ - синтезируют ДНК на матрице
РЕВЕРТАЗЫ / ОБРАТНЫЕ ТРАНСКРИПТАЗЫ –
синтезируют на РНК
ЛИГАЗЫ – соединяют фрагменты ДНК

НОМЕНКЛАТУРА

1. Название фермента начинается с трехбуквенного *акронима*, в котором первая буква совпадает с первой буквой названия *рода*, а остальные – с первыми двумя буквами *вида* организма, в котором данный фермент был обнаружен.
2. Дополнительные буквы служат для обозначения конкретного *штамма* или *серотипа*.
3. Римские цифры присваиваются в порядке обнаружения ферментов данного типа у конкретного организма. Дополнительные буквы и цифры курсивом не выделяются, но отделяются пробелом.

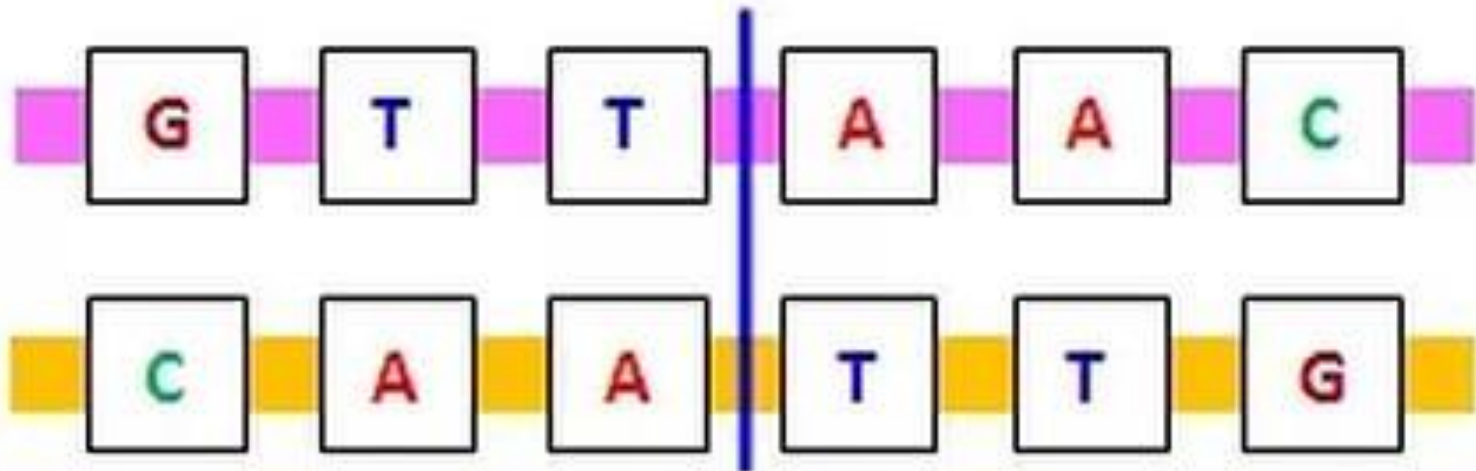
Например:

Bsu I – фермент первой системы рестрикции-модификации, обнаруженной у
Bacillus subtilis

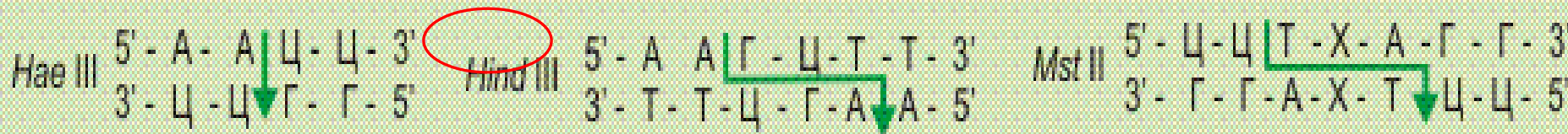
Рестриктазы

*рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы
рестрикции*

это ферменты, узнающие и атакующие
определенные последовательности нуклеотидов в
молекуле ДНК (**сайты рестрикции**).



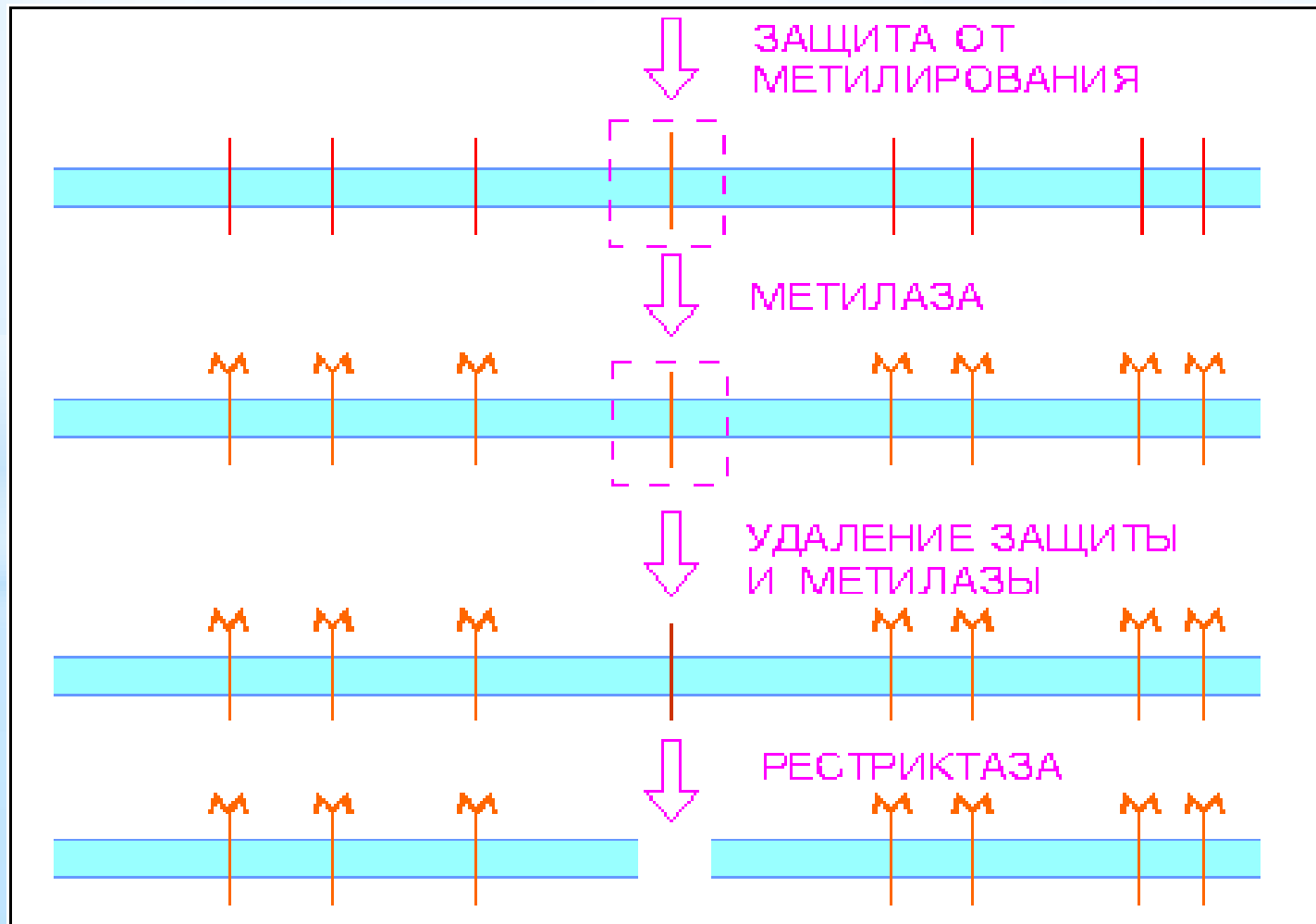
Рестриктаза Hpa I
(бактерия *Haemophilus parainfluenzae*)



в **1970 г.** Смит и Вилькокс выделили из *Haemophilus influenzae* первую рестриктазу, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК (Hind III).

Метилаза добавляет метильные группы к адениновым или цитозиновым остаткам в том же сайте, в котором связывается рестрикционный фермент.

В результате метилирования сайт становится устойчивым к рестрикции, т.е. **метилование защищает ДНК от разрезания.**



ДНК-метилазы

dam-метилазы

Осуществляет перенос метильных групп в N-положение аденина в последовательности GATC. В таком случае многие рестриктазы (например, *Bcl*I, *Mbo*I или *Cla*I), в состав сайтов рестрикции которых входит данная метилированная последовательность, перестают расщеплять ДНК по этим сайтам.

dcm-метилазы

Аналогичное действие на некоторые рестриктазы, например *Eco*RII, оказывает и dcm-метилаза, осуществляющая метилирование остатков цитозина по положению C5 в последовательностях CCAGG и CMe--CTGG.

Для того чтобы избежать нежелательного влияния этих метилаз на клонируемые ДНК, в качестве хозяев используют мутантные штаммы *E. coli*: dam и dcm. ДНК-метилазы бактериальных систем рестрикции и модификации применяют для блокирования *in vitro* соответствующих сайтов рестрикции на исследуемых фрагментах ДНК с целью получения под действием гомологичных рестриктаз фрагментов больших размеров.

Классификация рестриктаз

Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные последовательности

1 класс. Осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК. Имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей - модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной.

2 класс. Узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, поэтому в генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса. Они нуждаются в ионах Mg в качестве кофакторов.

3 класс. Узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей - модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной.

Изошизомеры - среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности.

Гетерошизомеры - ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Номенклатура рестриктаз

1) Аббревиатура названия каждого фермента является производной от бинарного названия микроорганизма, содержащего данную метилазорестриктазную систему. Составляют по правилу: к первой прописной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида.

Streptomyces albus - Sal, *Escherichia coli* - Eco

2) В случае необходимости добавляют обозначение серотипа или штамма, например, Eco B.

3) Различные системы рестрикции - модификации, кодируемые одной бактериальной клеткой, обозначают римскими цифрами: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).

4) Рестриктазы обозначают буквой **R** (R Hind III), метилазы - **M** (M Hind III).

Сайт рестрикции (участок узнавания)

короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая распознаётся ферментом эндонуклеазой рестрикции-модификации (рестриктазой).

Рестриктаза связывается с молекулой ДНК в точке расположения сайта рестрикции и перерезает цепочку нуклеотидов внутри сайта или в непосредственной близости от него.

Размер сайта рестрикции различных рестриктаз составляет, как правило, 4-6 нуклеотидов.

Сайты рестрикции в ДНК самой бактерии замаскированы посредством метилирования остатков А и С.

Например, фермент рестрикции EcoRI распознаёт симметричную последовательность GAATTC и перерезает цепочку между нуклеотидами G и A, оставляя на концах перекрывающиеся участки AATT.

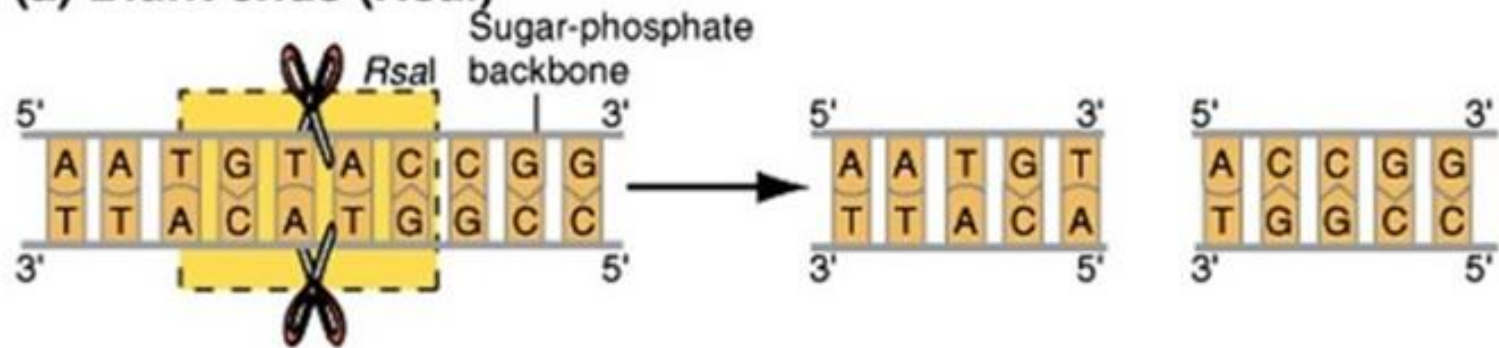
Механизм действия рестриктаз

Прямой	<u>ATGC</u> . . . <u>ATGC</u> TACG . . . TACG
Симметричный:	← <u>ATGC</u> . . . <u>CGTA</u> → TACG . . . GCAT
Инвертированный:	<u>ATGC</u> → . . . ← <u>GCAT</u> TACG . . . CGTA
Прямой комплементарный:	← <u>ATGC</u> . . . <u>TACG</u> → TACG . . . ATGC
ТААТ АТТА	Палиндром

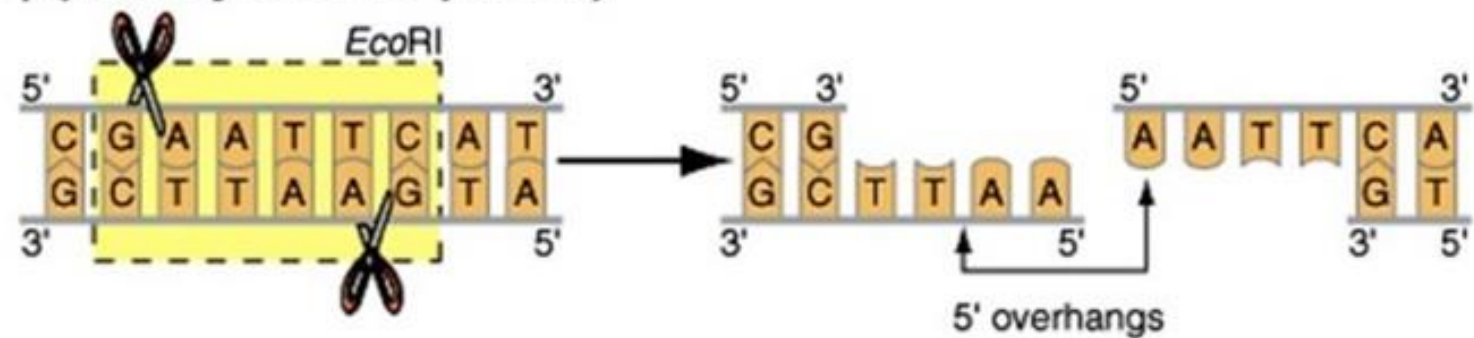
В качестве мишеней (сайт узнавания) часто выступают палиндромы из 4-6 пар оснований - сайты рестрикции. Сайт-мишень может быть полностью метилирован (обе цепи модифицированы), полуметилирован (только одна цепь метилирована) или не метилирован.

Реакция разрезания осуществляется в две ступени. Сначала разрезается одна цепь ДНК, а затем рядом разрезается другая. В областях, прилегающих с каждой стороны к сайту разрезания, может иметь место экзонуклеотическая деградация. Происходит эффективный гидролиз АТФ, роль которого еще не выяснена.

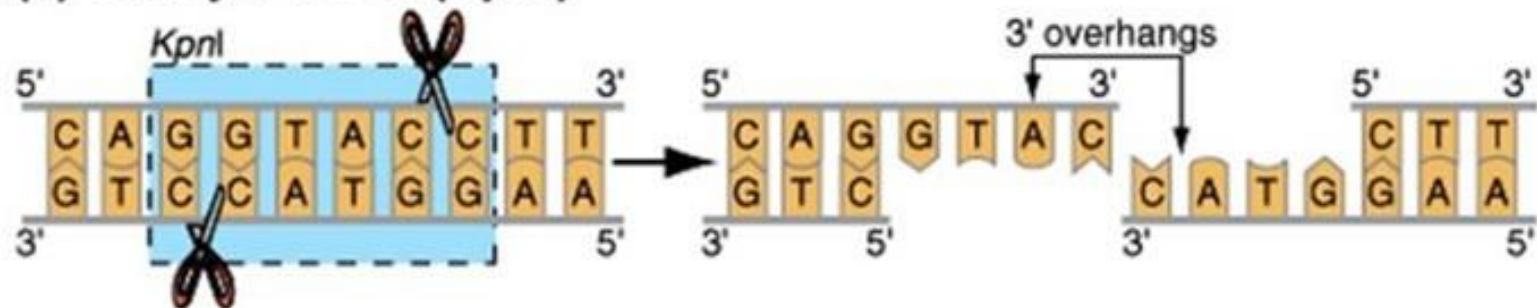
(a) Blunt ends (*RsaI*)



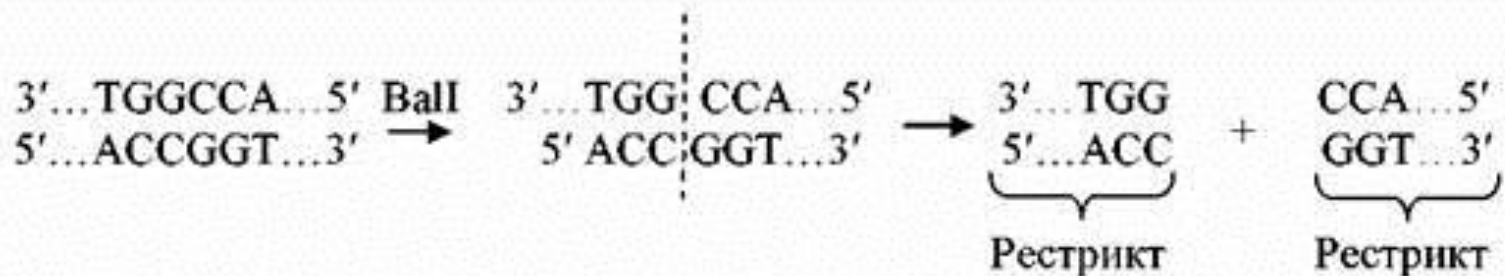
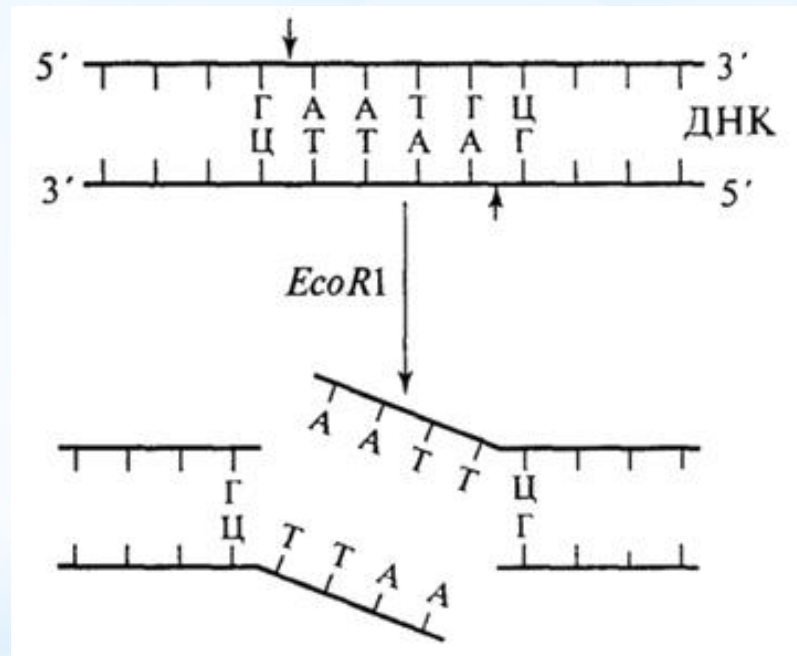
(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)



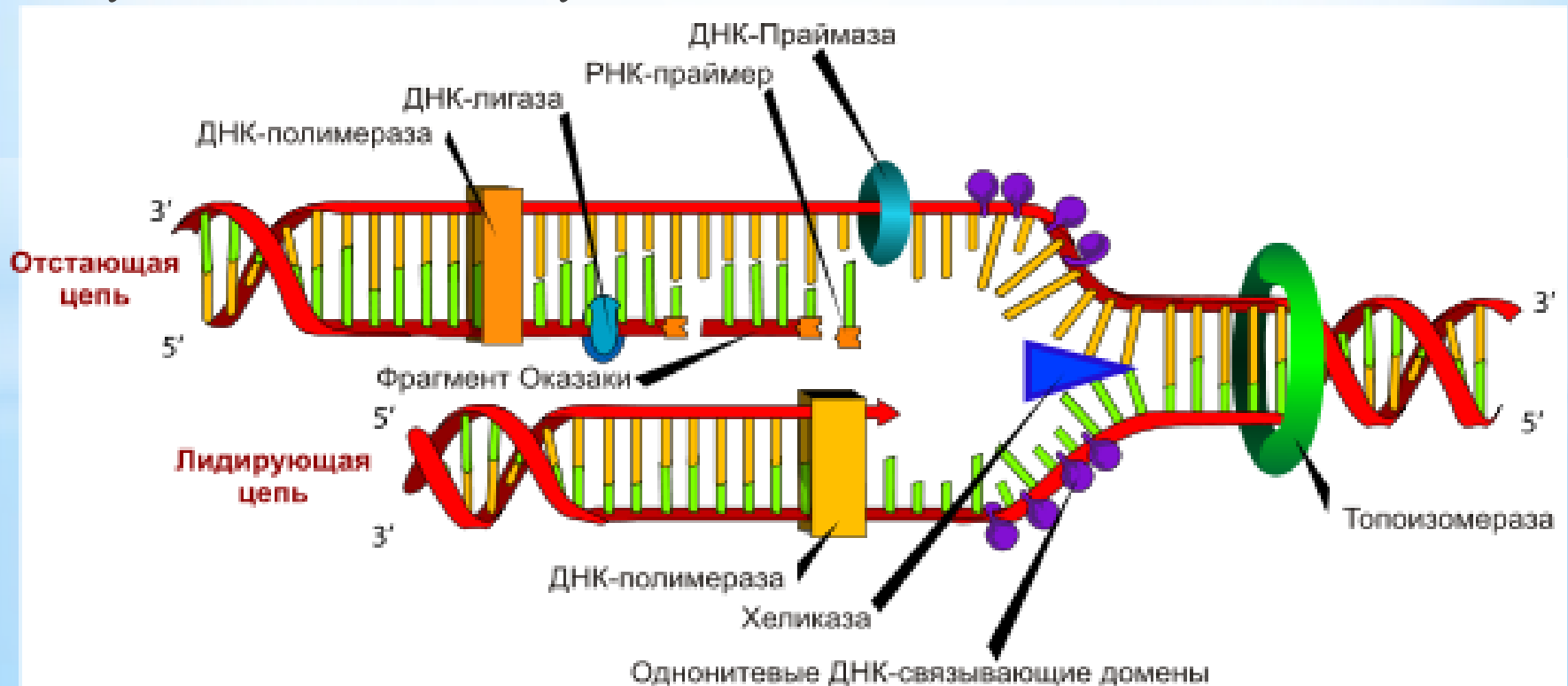
Механизм действия рестриктаз



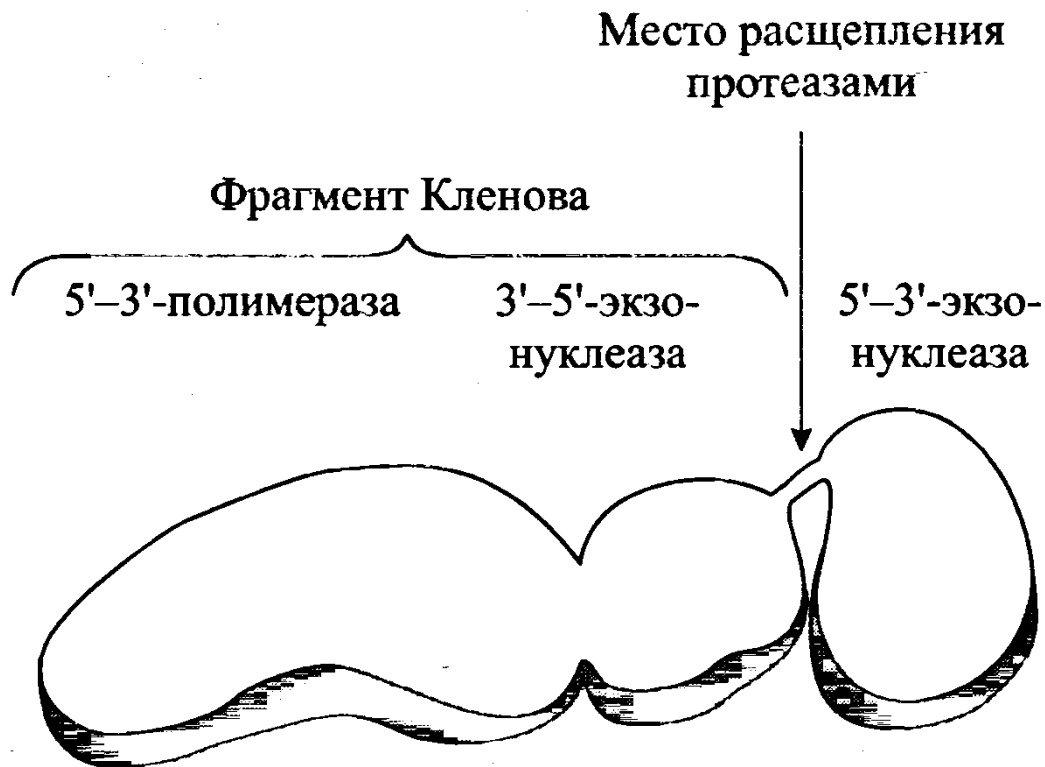
Полимеразы

ферменты, катализирующие образование макромолекул из низкомолекулярных веществ.

Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 109 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5' – 3' полимеразной, 3' – 5' экзонуклеазной, 5' – 3' экзонуклеазной.



ДНК-полимераза I *E. coli*



а) структура



б) модель
взаимодействия
с молекулой ДНК

Функции ДНК-полимеразы

5'-3' полимеразная активность.

Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента — праймера (затравки) с 3'-ОН концом.

3'-5' экзонуклеазная активность.

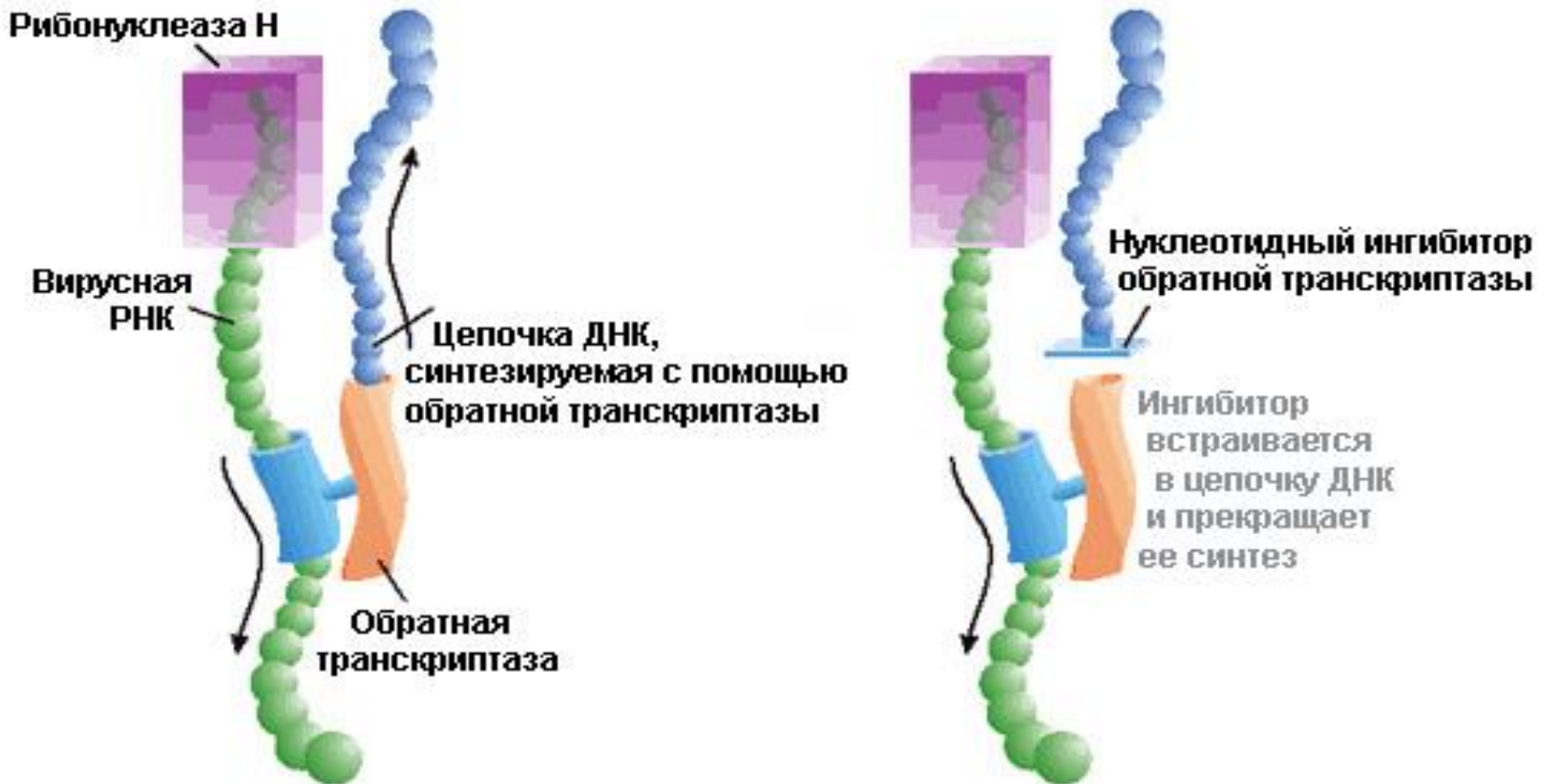
Гидролизует одноцепочечную или двухцепочечную ДНК с 3'-ОН конца. 3'-5' нуклеаза расщепляет диэфирную связь только в неспаренных участках ДНК.

5'-3' экзонуклеазная активность.

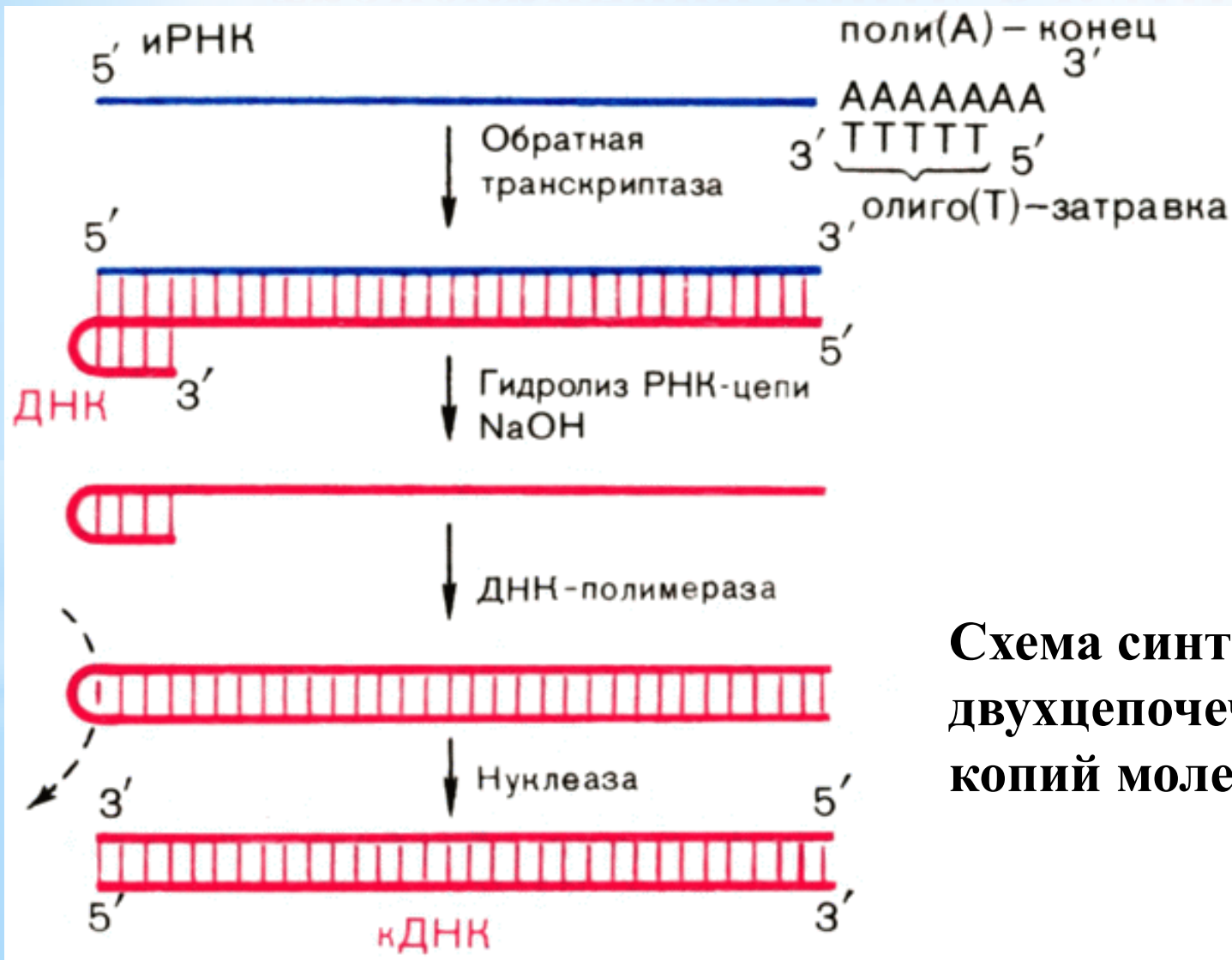
Деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'—5' экзонуклеазы 5'—3' экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК.

Обратная транскриптаза (ревертаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза)

- фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе обратной транскрипции



Обратную транскриптазу используют для транскрипции мРНК в кДНК

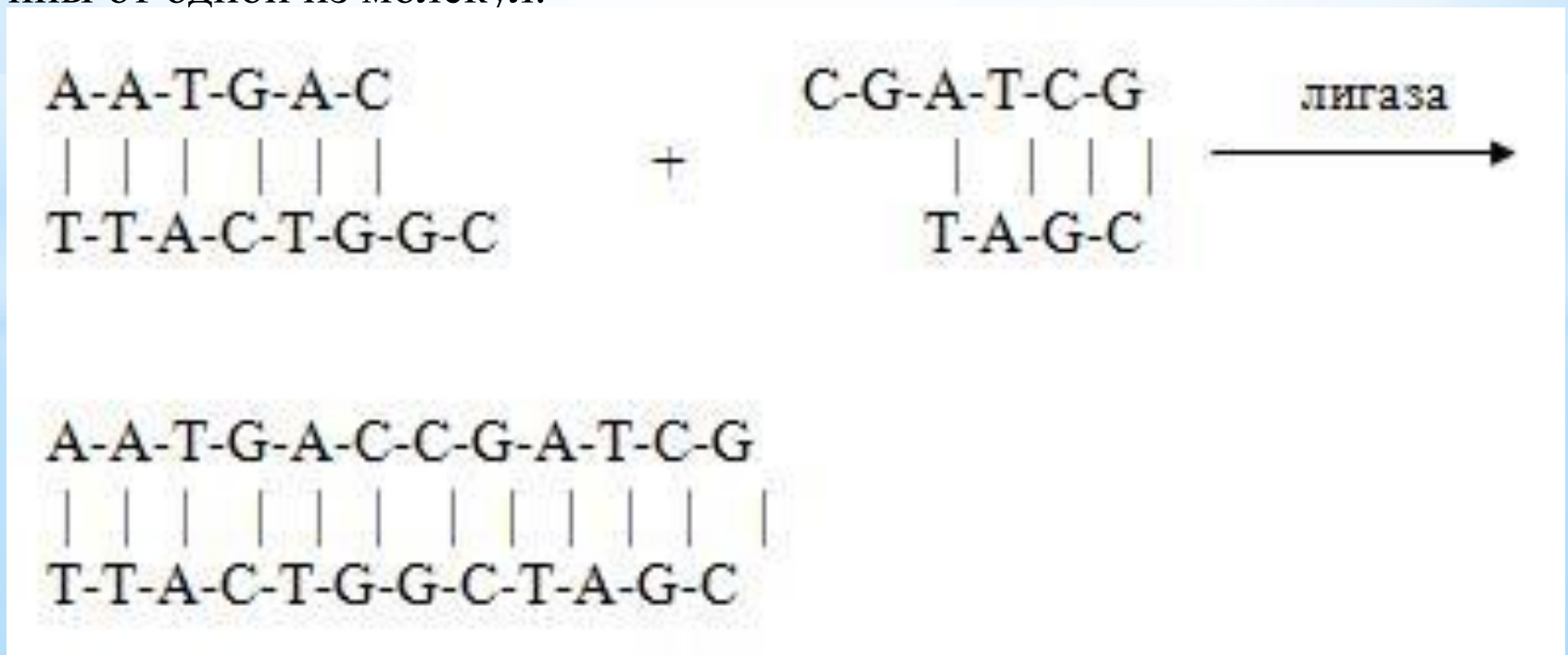


**Схема синтеза
двухцепочечных ДНК-
копий молекул РНК.**

Лигаза

фермент, катализирующий соединение двух молекул с образованием новой химической связи (лигирование).

- При этом обычно происходит отщепление (гидролиз) небольшой химической группы от одной из молекул.



ДНК-лигазы разделяют на два семейства в зависимости от используемого ими кофактора в качестве донора АМР:

АТР-зависимые лигазы обнаруживают у бактериальных и эукариотических вирусов, архей, дрожжей, млекопитающих и зубактерий.

NAD-зависимые ДНК-лигазы имеются почти исключительно у зубактерий.

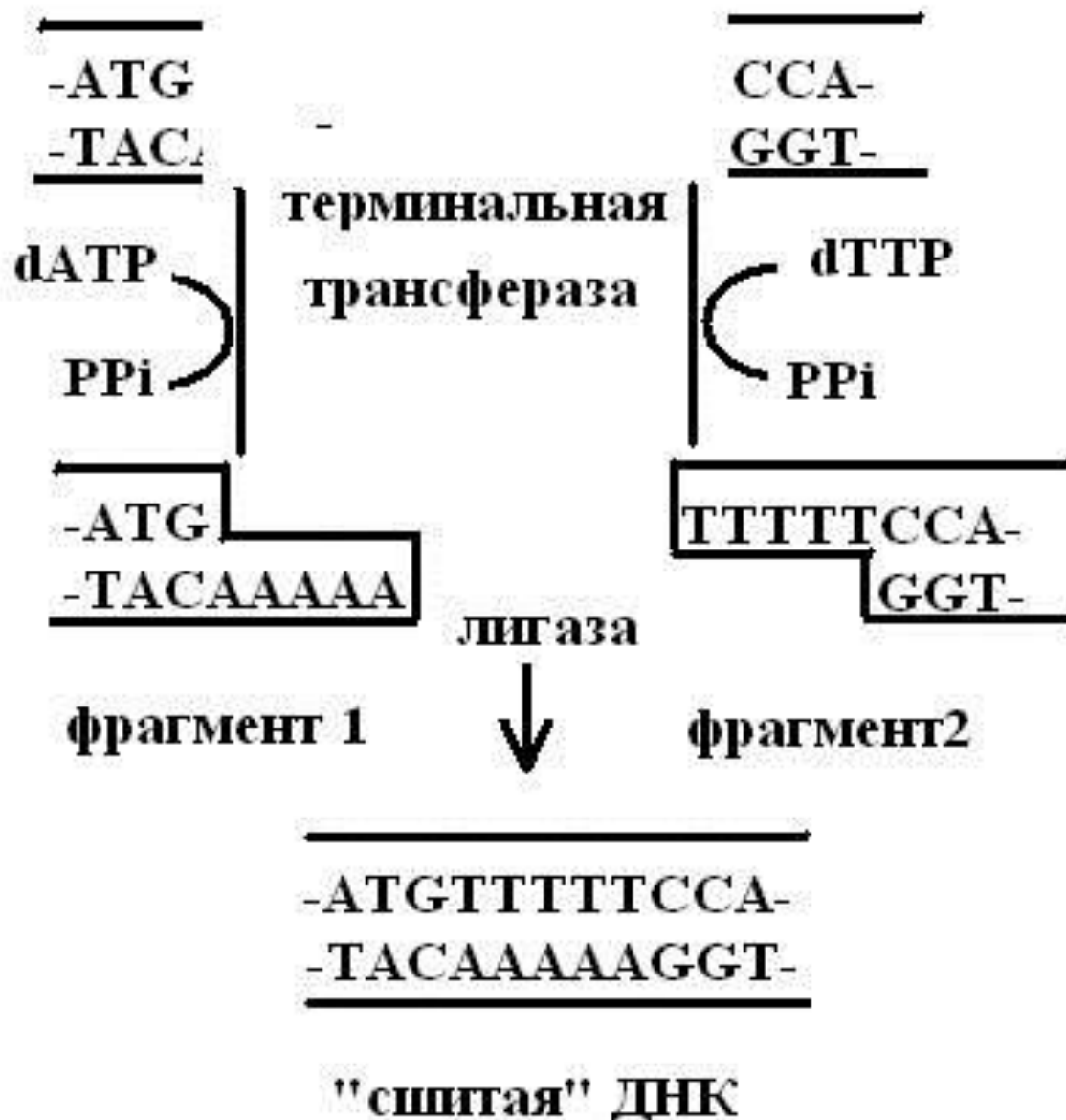
Единственное известное исключение в этом отношении составляют энтомопоксвирусы насекомых *Melanoplus sanguinipes* и *Amsacta moorei*.

Полинуклеотидкиназы

- осуществляют перенос γ -фосфатных групп АТР на 5'-ОН группы ДНК или РНК.

Полинуклеотидкиназа бактериофага T4 используется для введения радиоактивной метки в ДНК или РНК с целью получения радиоактивно меченых зондов или секвенирования нуклеиновых кислот.

Терминальная трансфераза



Осуществляет
последовательное
присоединение
AMP из пула
дезокси-
рибонуклеозид-
трифосфатов к 3'-
ОН-группам
молекул ДНК

Щелочные фосфатазы.

- Катализируют удаление 5'-фосфатных групп ДНК или РНК, а также расщепление макроэргических связей рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

История открытия



Апрель 1983 г – идея ПЦР

Декабрь 1983 г – осуществление ПЦР

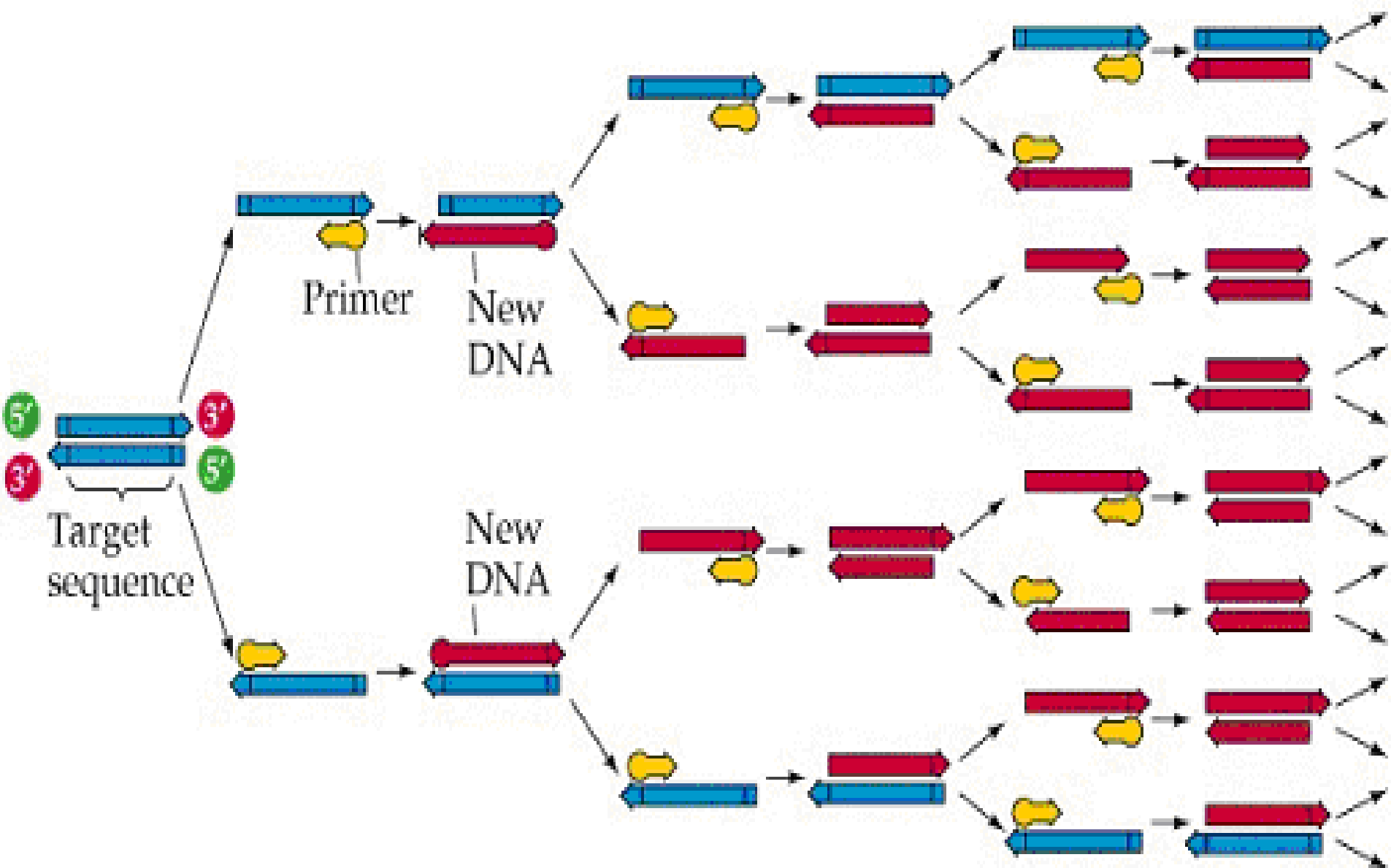
1993 г – Нобелевская премия по химии



Что такое ПЦР?

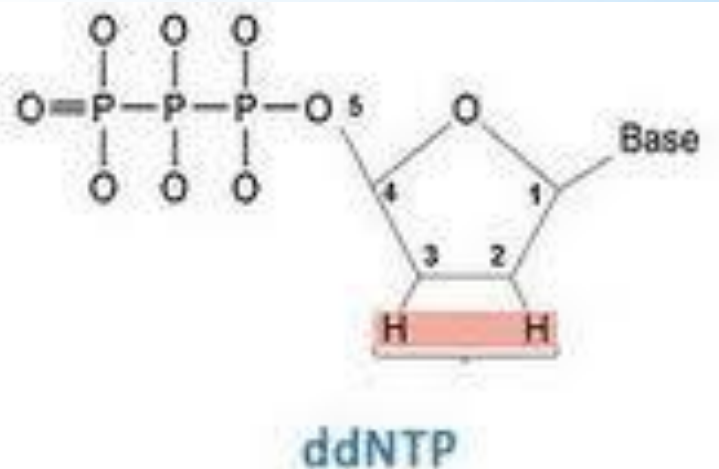
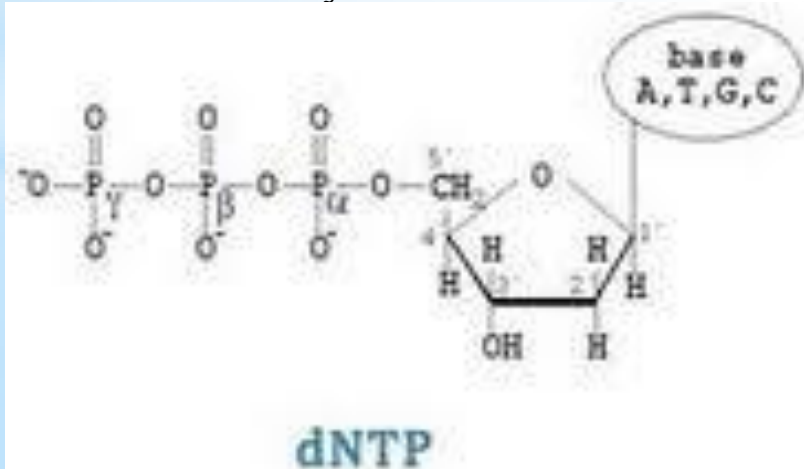
По сути, это упрощенная версия репликации бактерий, при которой возрастает количество копий специфической последовательности ДНК. Их называют ПЦР-продуктами или ампликонами.

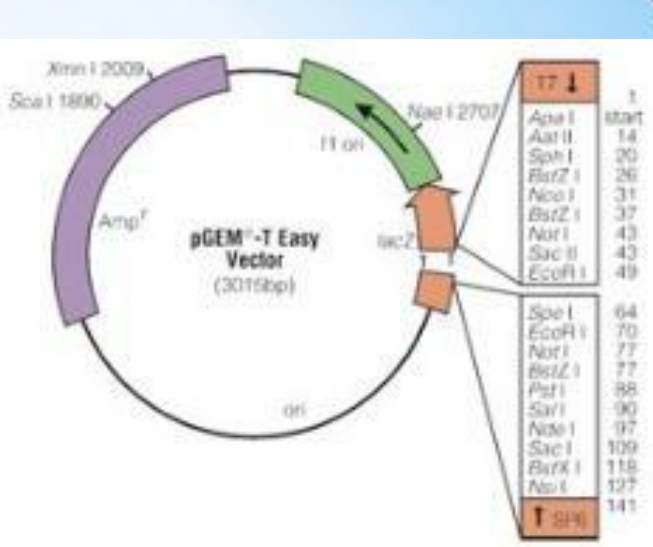
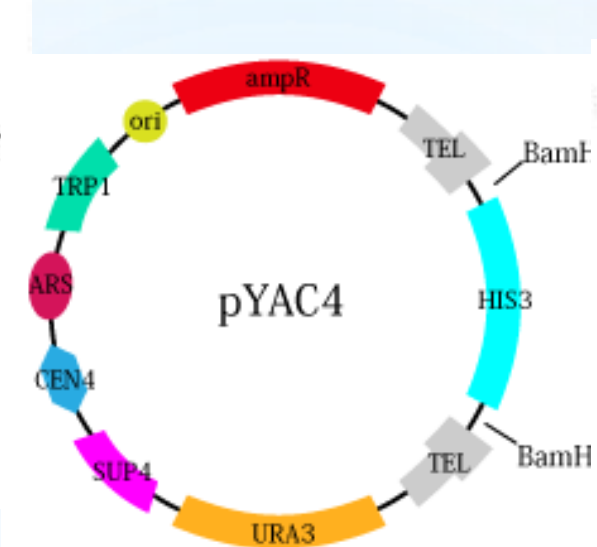
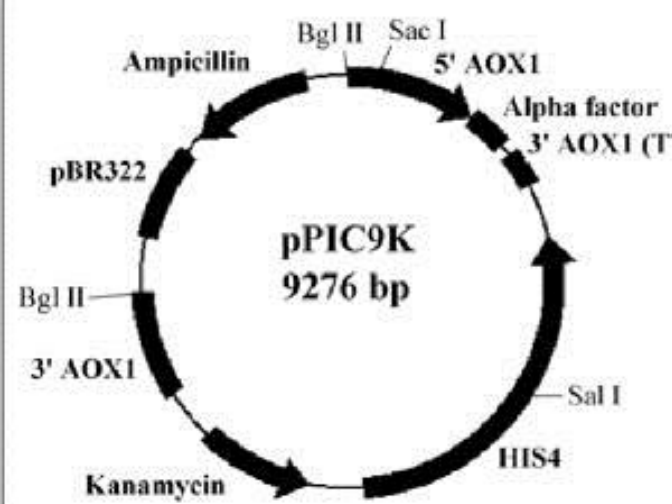
Что такое ПЦР?



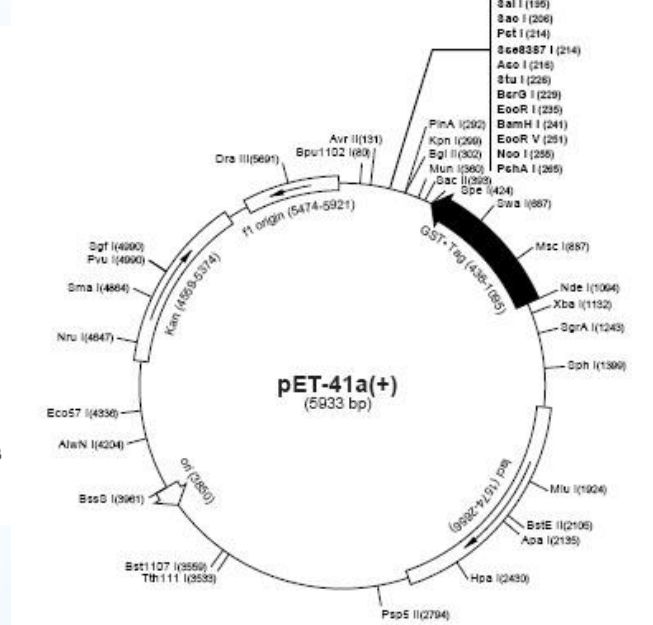
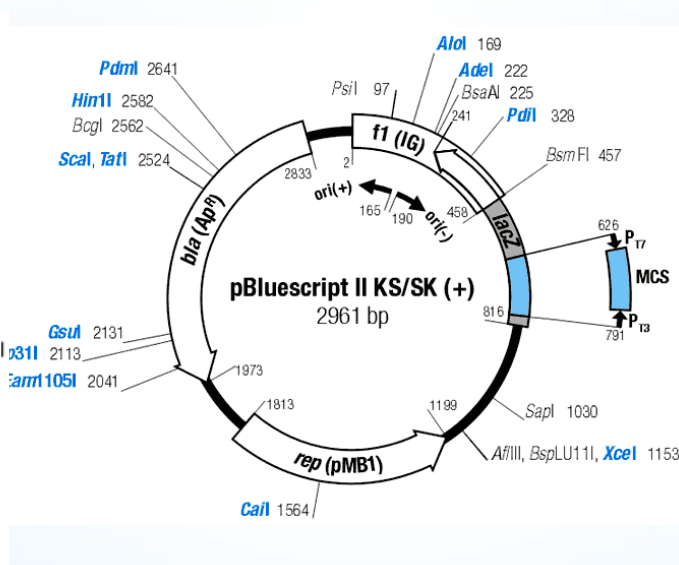
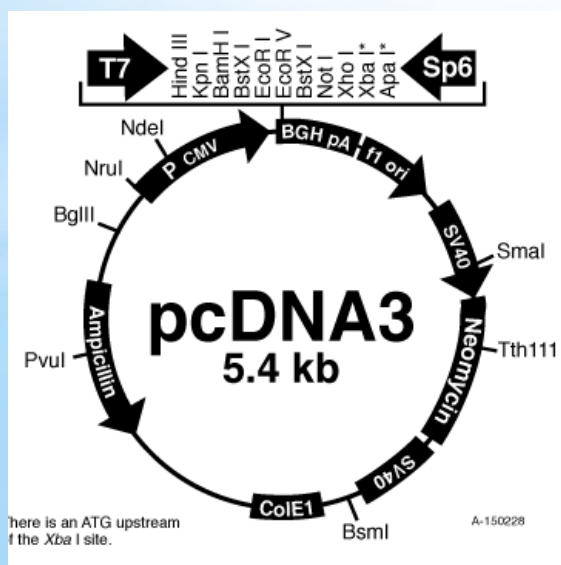
Секвенирование по Сэнглеру

В 1977 г. автор способ ферментативного секвенирования, получивший название метода терминирующих аналогов трифосфатов. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивали добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP еще и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), который способен включаться в растущую цепь ДНК, но не способен обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы. Отношение концентраций dNTP/ddNTP авторы подбирали экспериментально, так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требовалось провести четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой из реакций. После этого полученные продукты разгонялись в полиакриламидном геле на соседних дорожках и по расположению полос определялась последовательность нуклеотидов.





ВЕКТОРЫ



there is an ATG upstream of the Xba I site.

A-150228

Что такое вектор?

Вектор – молекула ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала другой клетке.

Свойства векторов

- 1. Способность к автономной репликации;**
- 2. Емкость вектора;**
- 3. Наличие маркерного гена.**

Свойства векторов

По функциям:

1. Векторы для клонирования
2. Векторы для экспрессии
3. Векторы для трансформации

По месту применения:

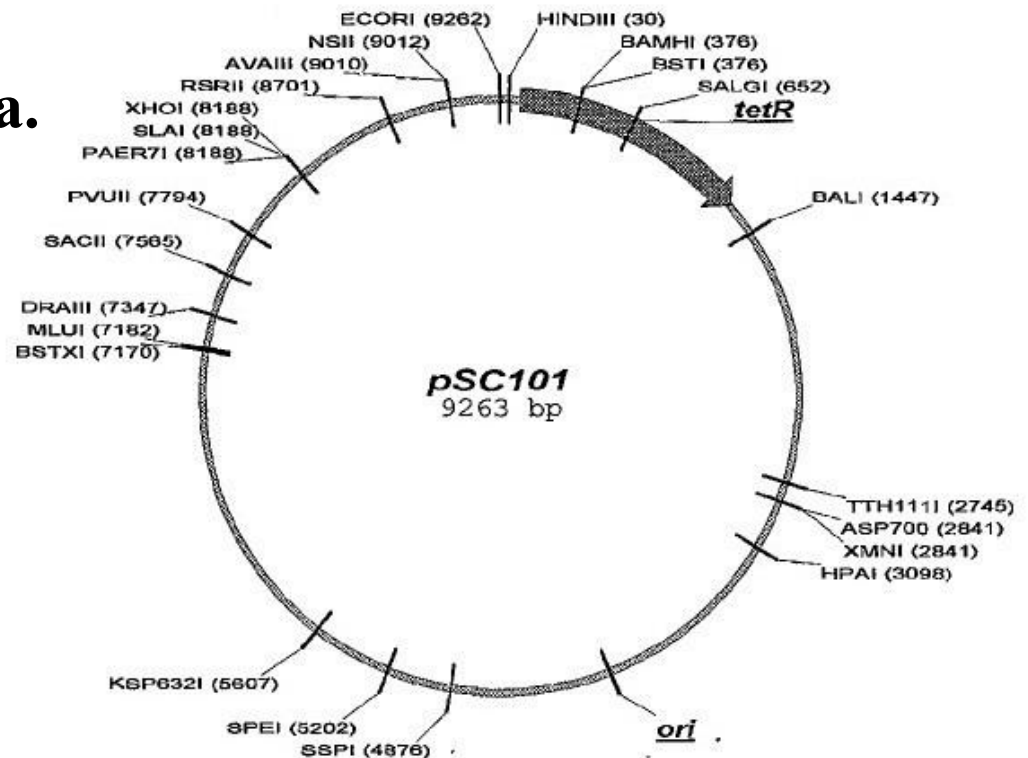
1. Бактериальные
2. Эукариотические
3. Челночные (бинарные) (shuttle).

Плазмидная ДНК бактерий

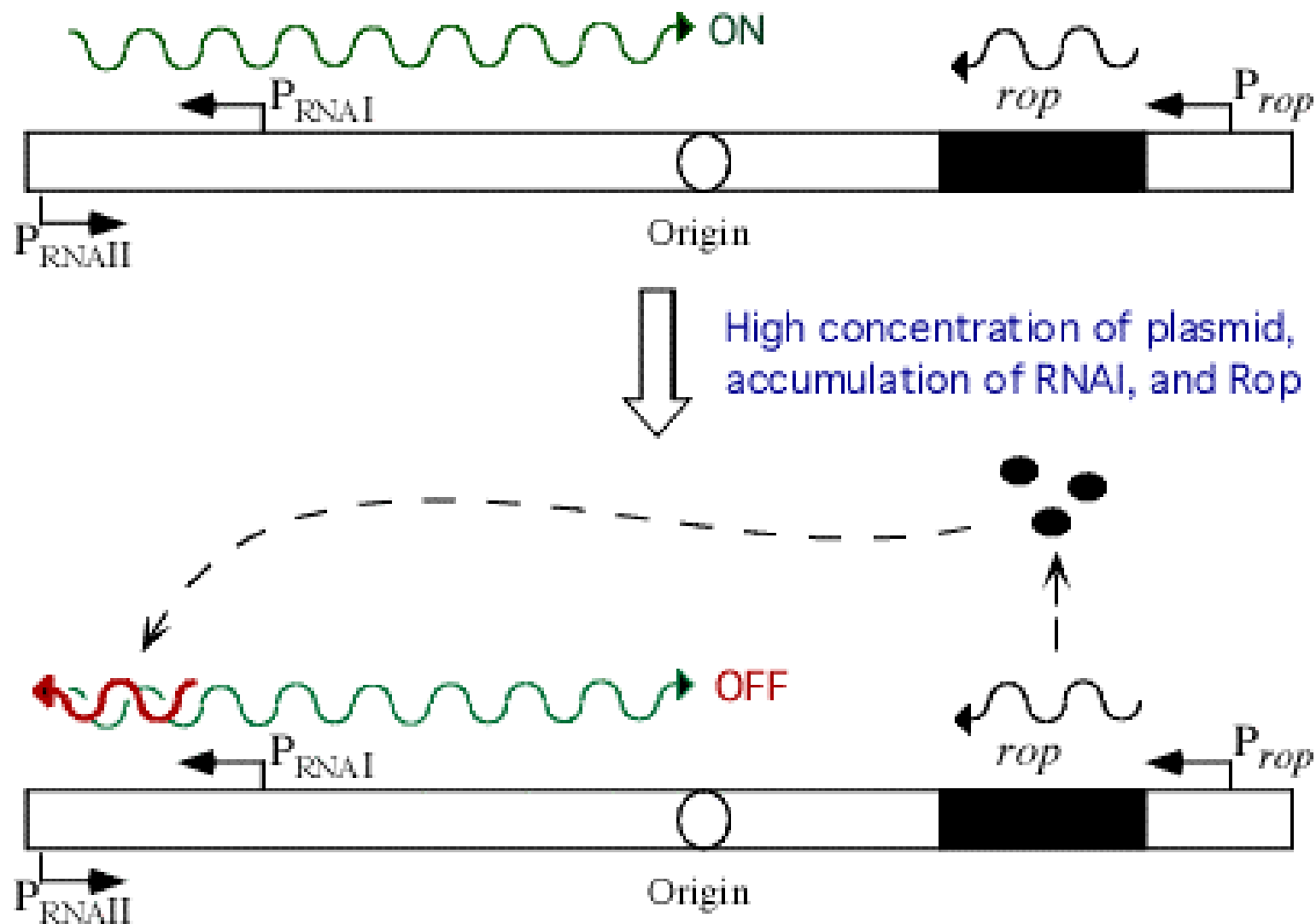
Способность к автономной репликации;
(ориджин репликации, *ori*)

Емкость вектора;
(до размеров самой плазмиды, но обычно до 70%, сайты рестрикции)

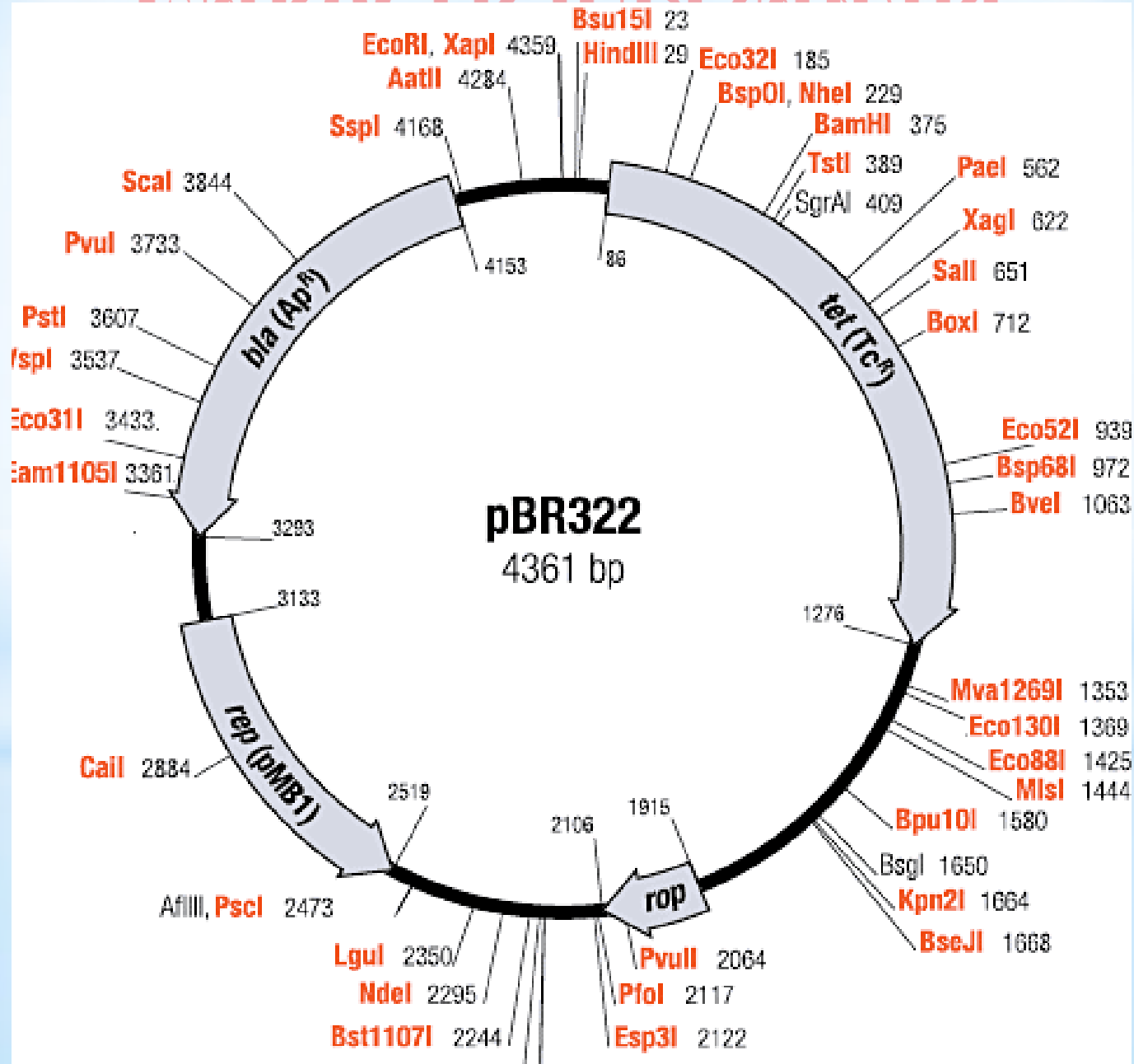
1. Наличие маркерного гена.
(R-плазмиды)



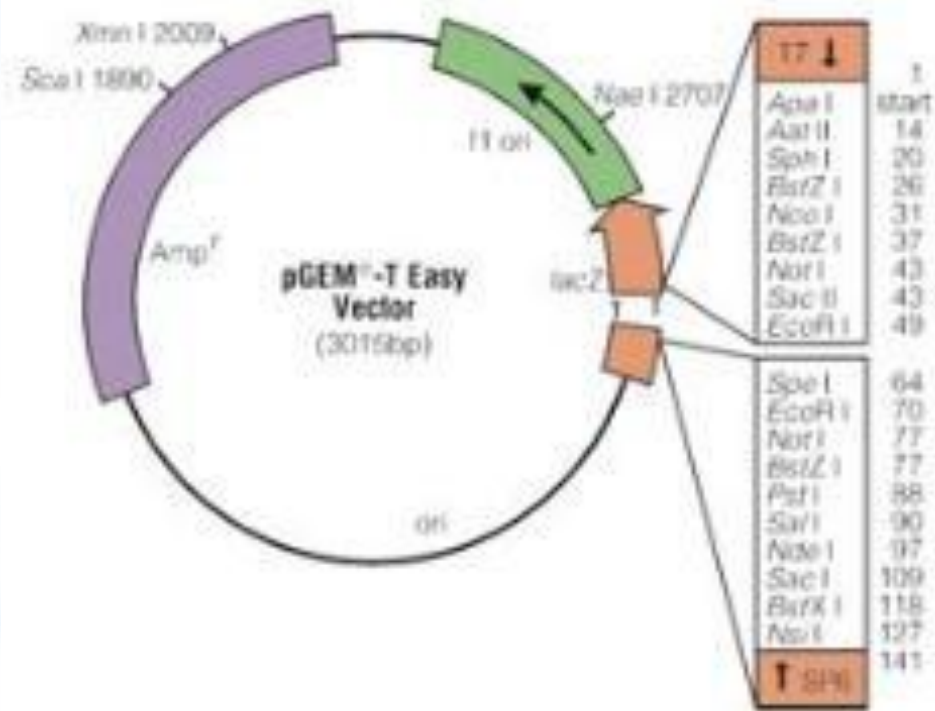
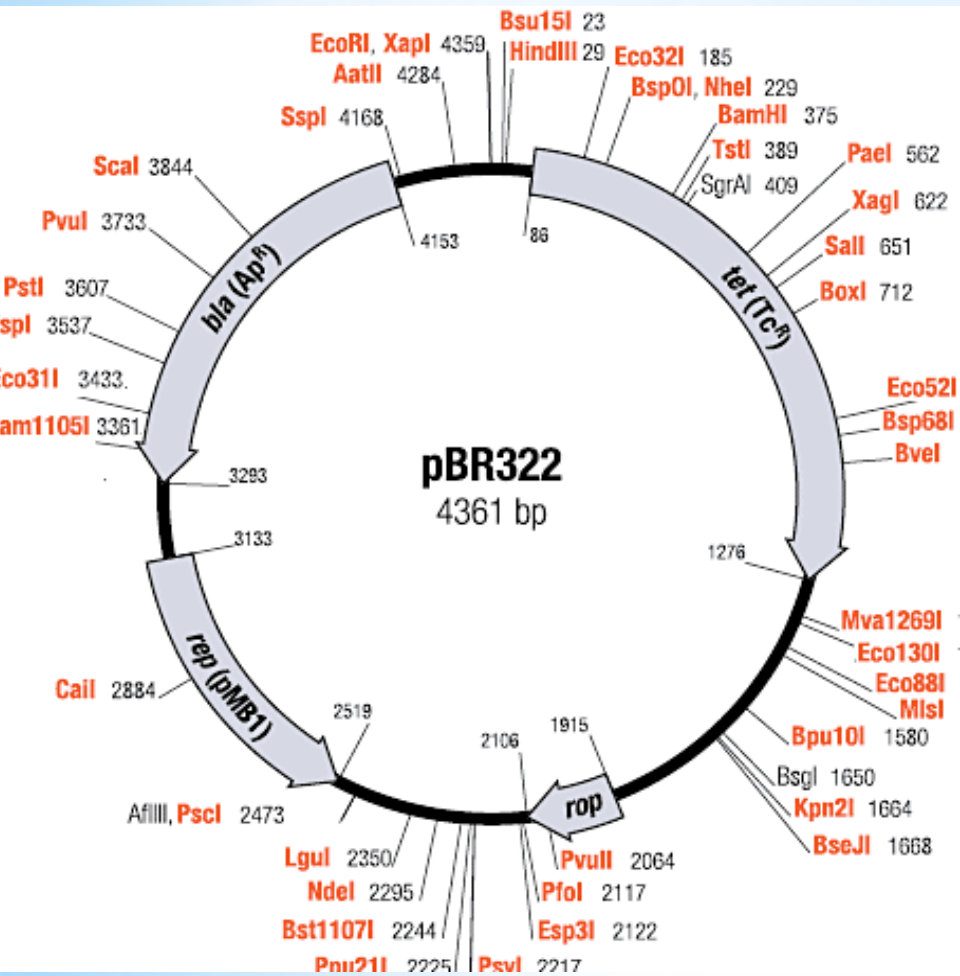
Локусы контроля репликации плазмидной ДНК



Емкость плазмиды

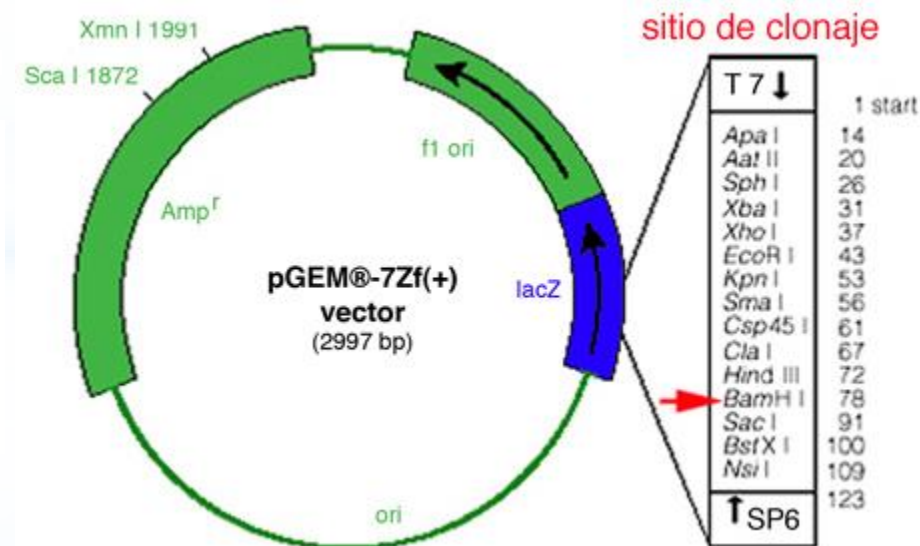
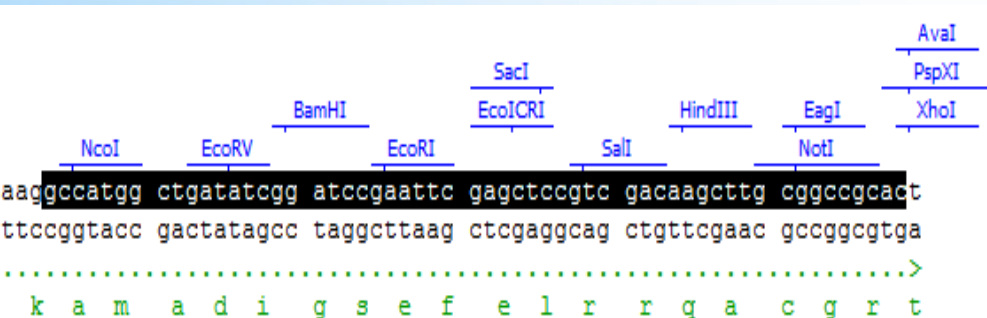


Отличие векторов и плазмид

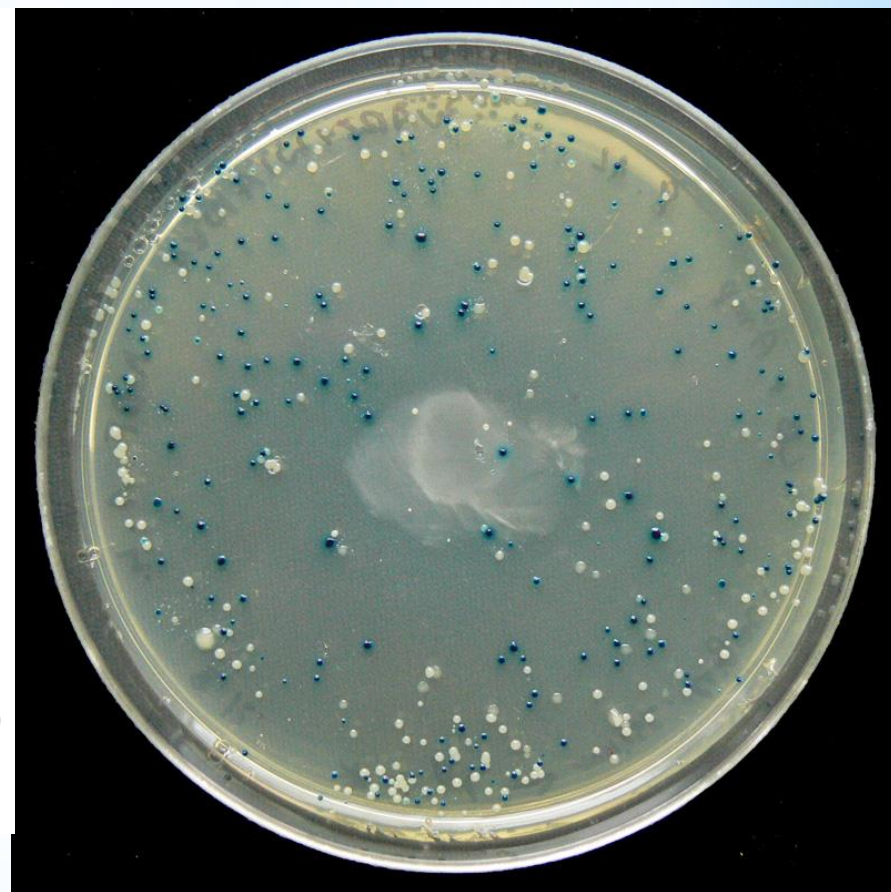
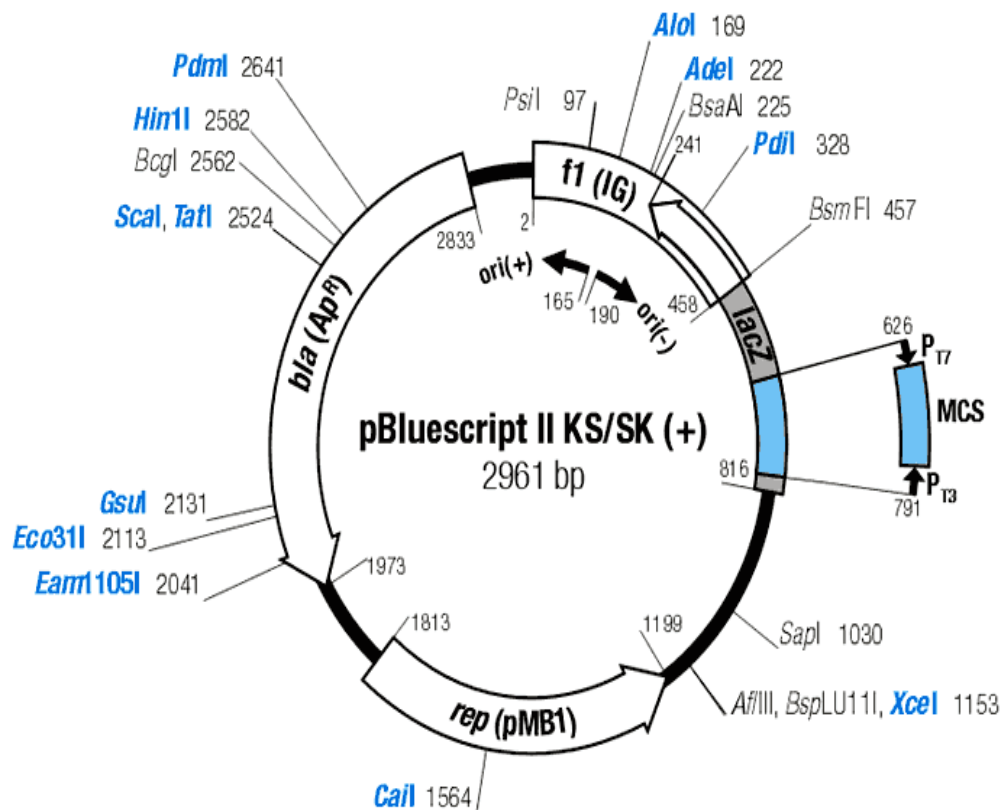
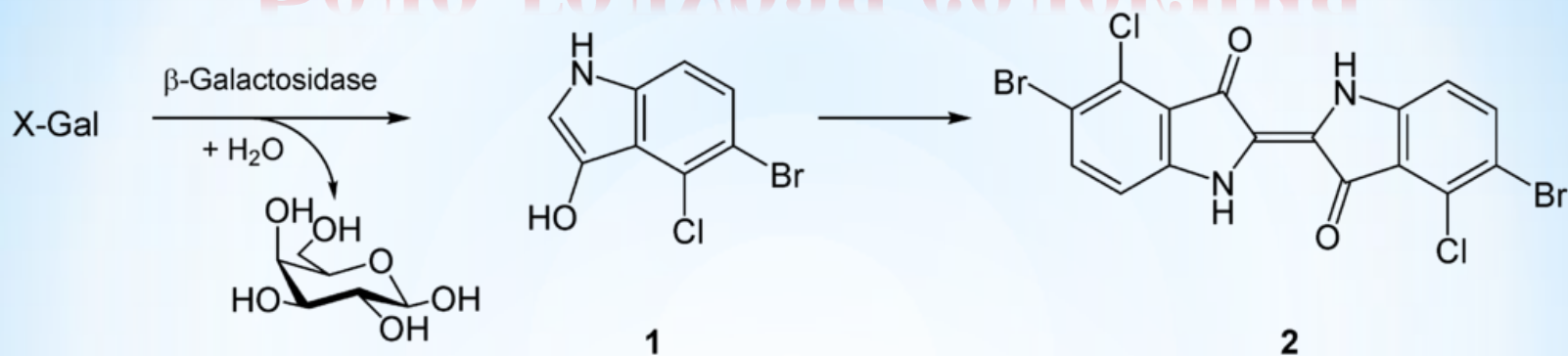


Полилинкер (MCS)

небольшой, искусственно синтезированный фрагмент ДНК, который представляет собой последовательность, содержащую сайты рестрикции для наиболее используемых ферментов

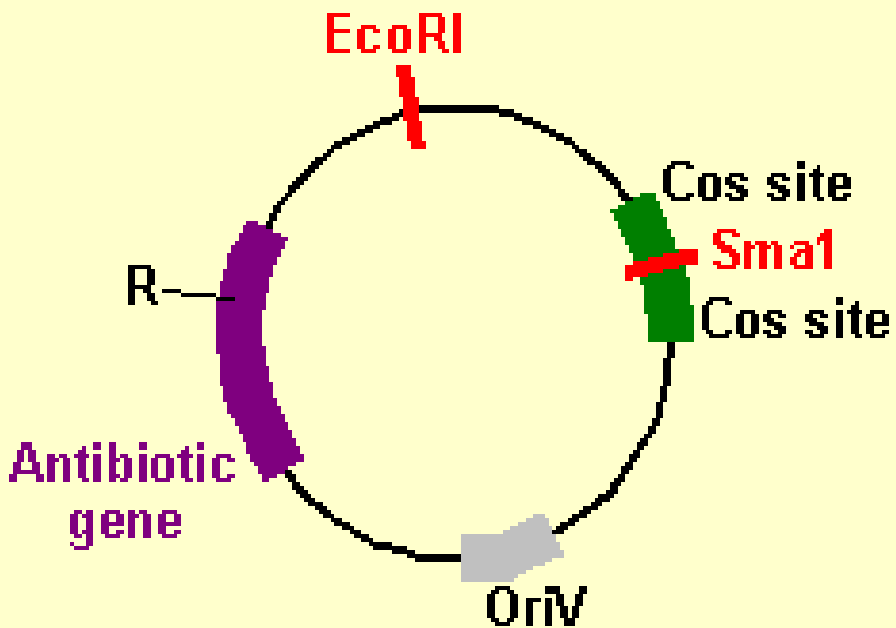


Бело-голубая селекция



Космиды

Это гибридный тип векторов, совмещающий в себе свойства плазмиды и фага λ . Они конструируются на основе репликона плазмиды и содержат *cot*-сайты. Предназначены для больших фрагментов ДНК (35 – 45 kb).



KEY

oriV - origin of replication.

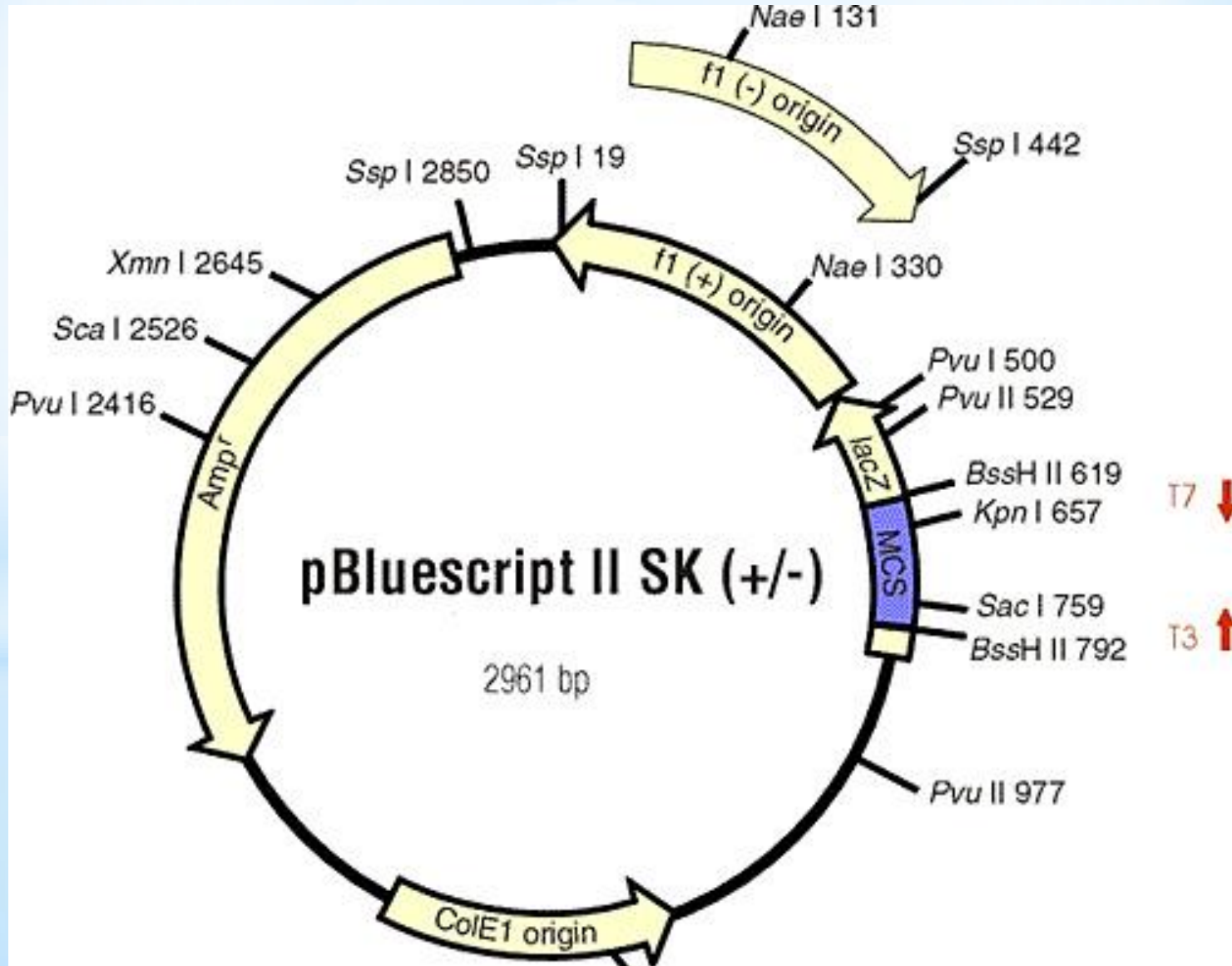
Cos sites - provide blunt ends.

R - recombinant site

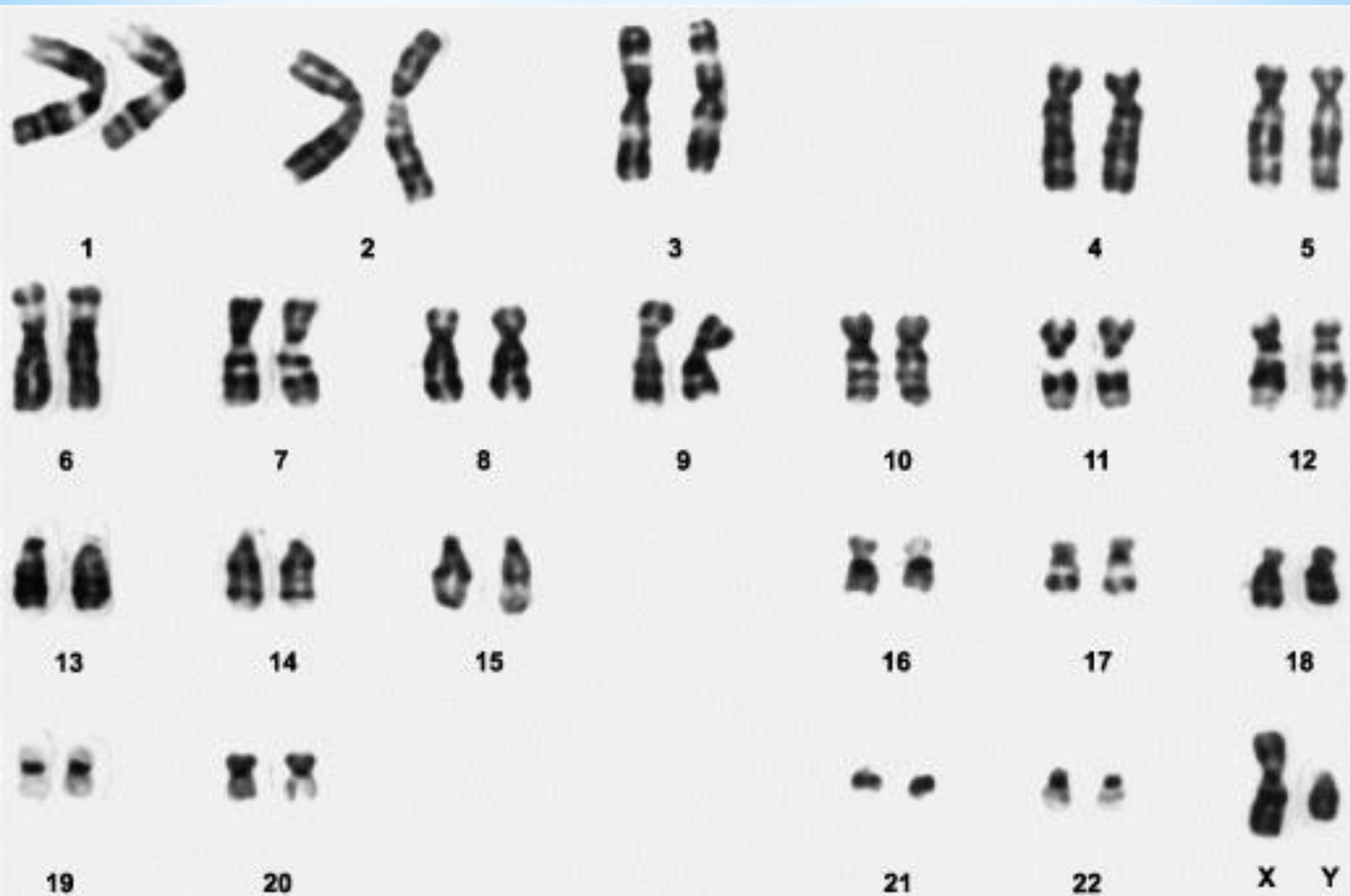
EcoRI } - Restriction endonuclease
SmaI } recognition sequence.

Фазмиды (фасмиды, фагмиды)

Это гибридный тип векторов, совмещающий в себе свойства плазмиды и нитчатых фагов (f1, M13)



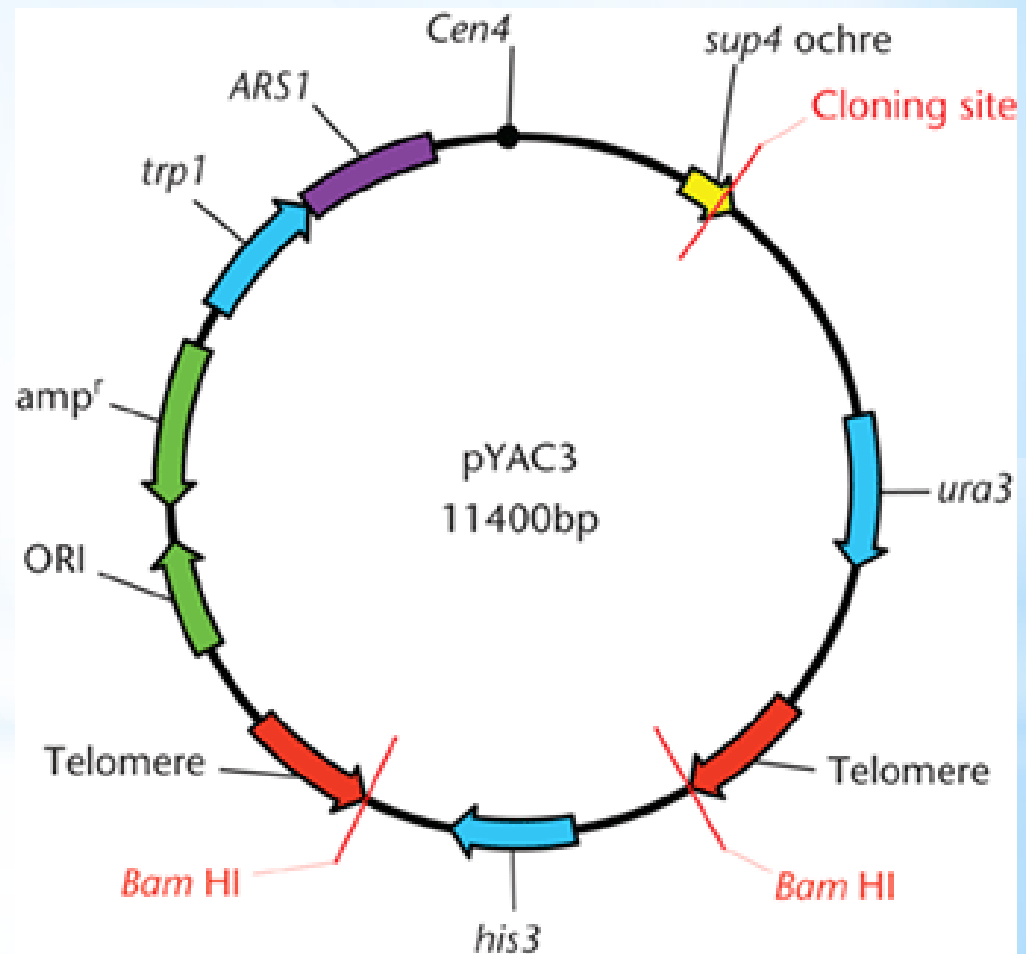
Искусственные хромосомы



Искусственные хромосомы дрожжей (yeast artificial chromosomes, YACs)

Cen4 – центромера дрожжей;
ORI – ориджин бактерий;
Telomere – теломерные последовательности;
ARS1 – автономная реплицирующаяся последовательность
Cloning site – полилинкер
AmpR, trp1, ura3, his3 – селективные маркеры
Sup4 – красно-белая селекция

Применение:
Клонирование больших фрагментов генома: 100 – 2000 kbp (1000 kbp)



Создание геномных библиотек



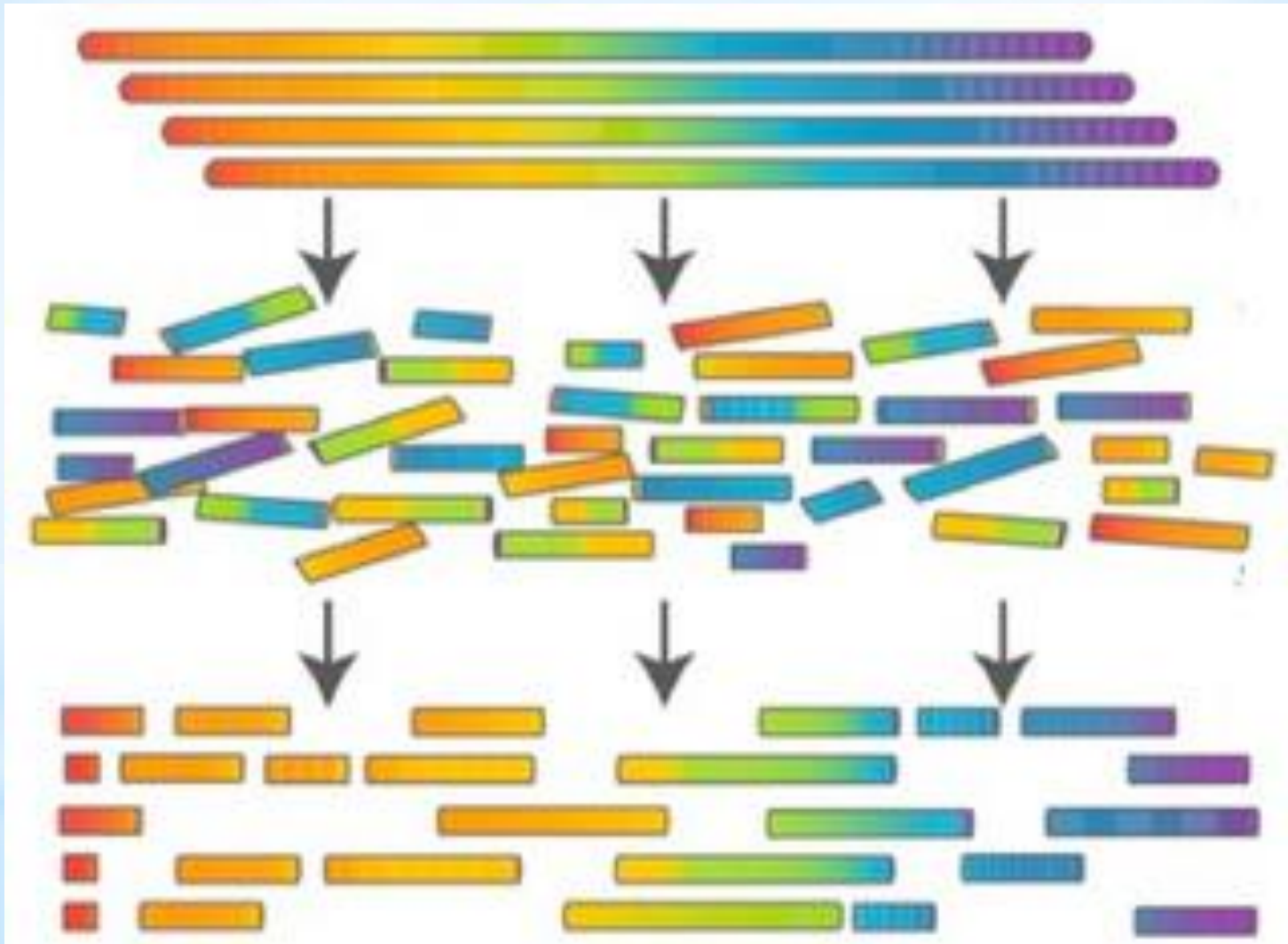
Геномные библиотеки (банки генов)

Геномная библиотека – фрагменты генома, клонированные в фаге λ (фаговые библиотеки) или в ВАС/РАС/УАС векторах (ВАС/РАС/УАС библиотеки)

Геномная библиотека – совокупность фрагментов, составляющих целый геном.

Геномная библиотека позволяет работать не с целым геномом, а его конкретными участками.

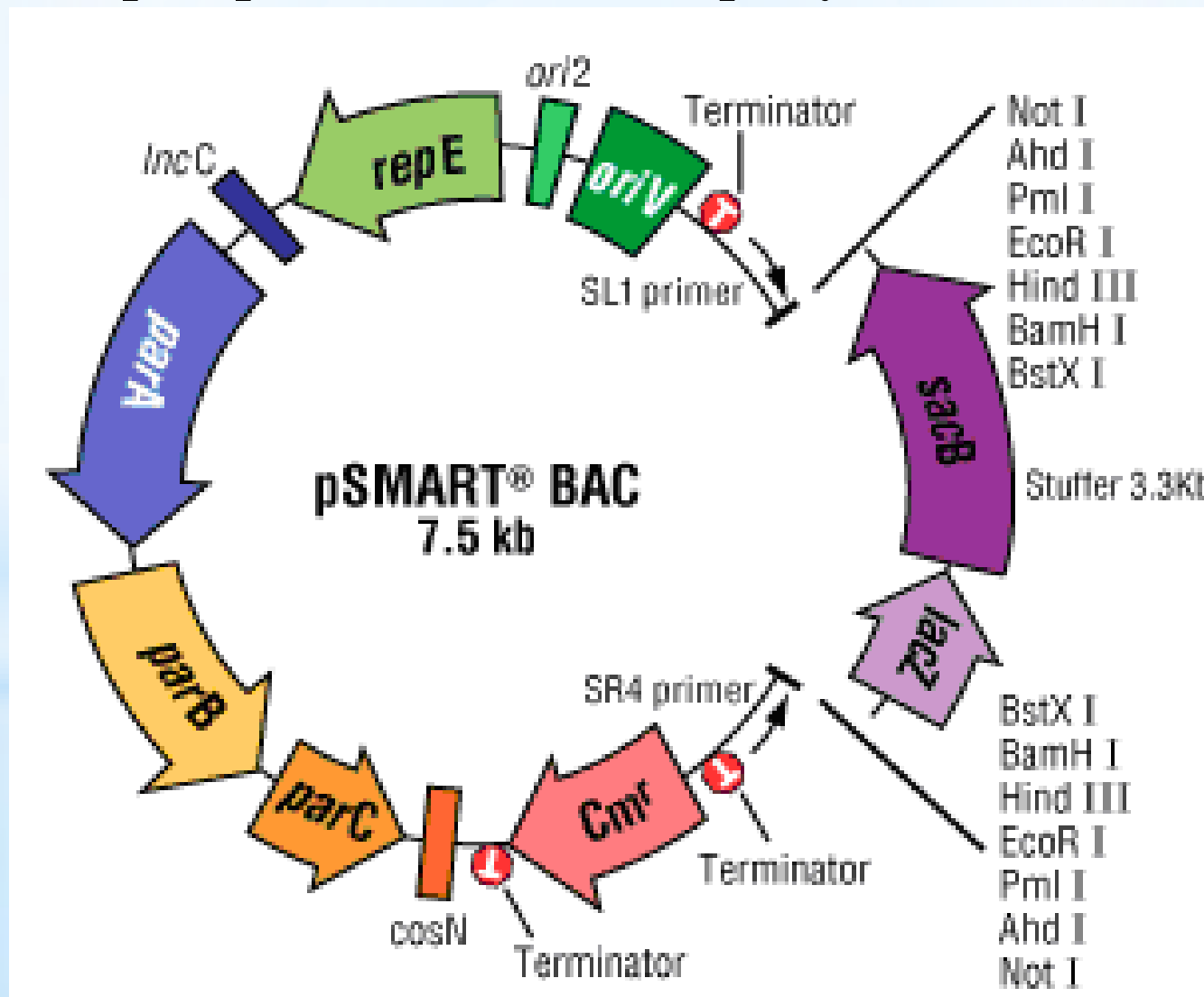
Перекрывающиеся последовательности



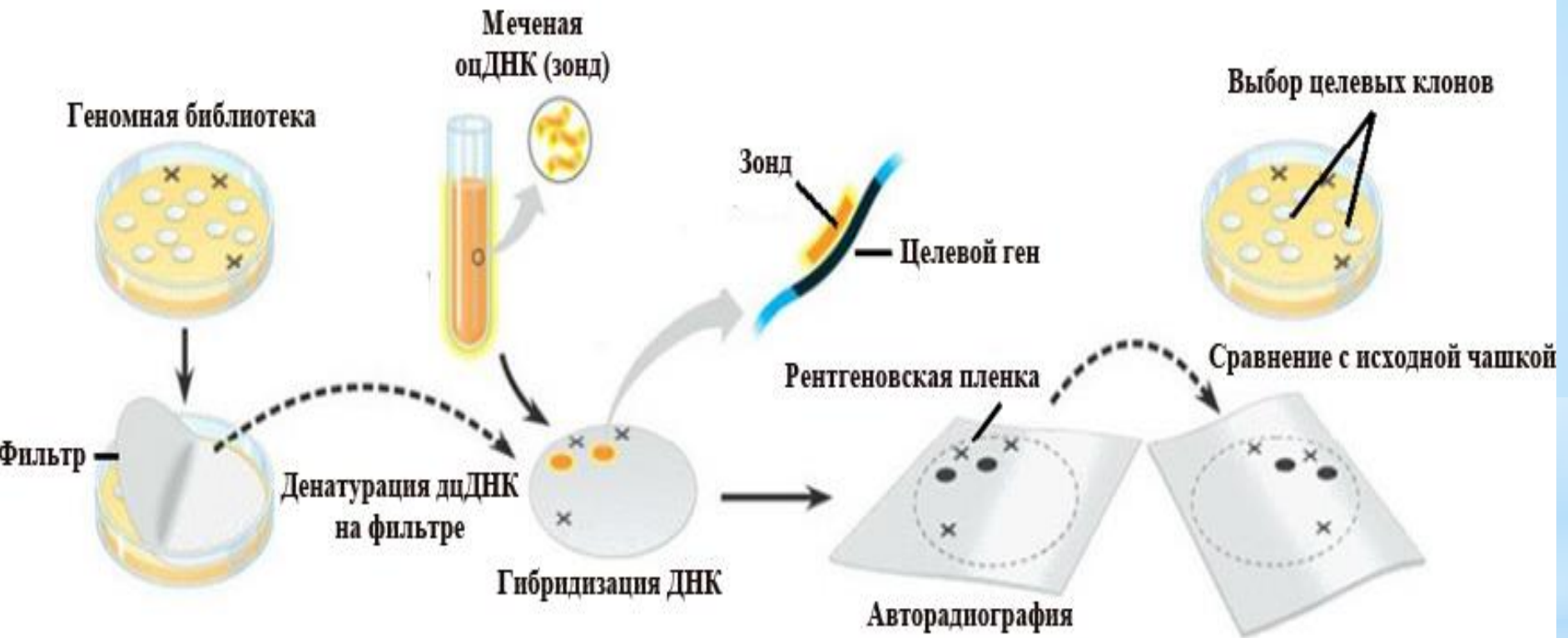
Перекрытие – в скольких фрагментах у вас будет 1 участок ДНК

ВАС, РАС библиотеки

Сложно выделять ДНК (фрагментация редкощепящими рестриктазами или не режут вообще)



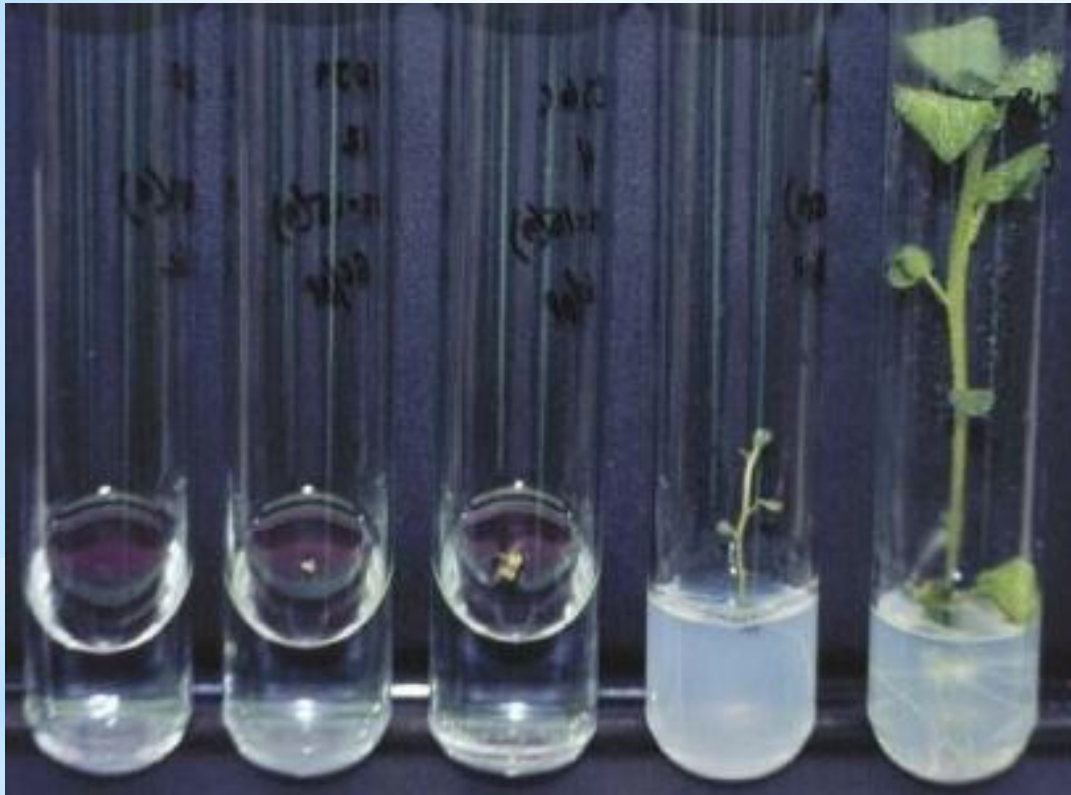
Принцип проведения скрининга



ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ



50-е годы XX века



Получение культур *in vitro*
- растений «в пробирке»

1983 год, первое трансгенное растение



**Растение табака, устойчивое к
канамицину**

**1990 год, первое трансгенное растение,
пошедшее «в поля»**



**Растения хлопка, устойчивые к
насекомым**

1994 год, томаты «flavr savr»



**Устойчивость к
бактериальным гнилям**

1995 год, Monsanto



MONSANTO



Соя, устойчивая к гербицидам

MONSANTO



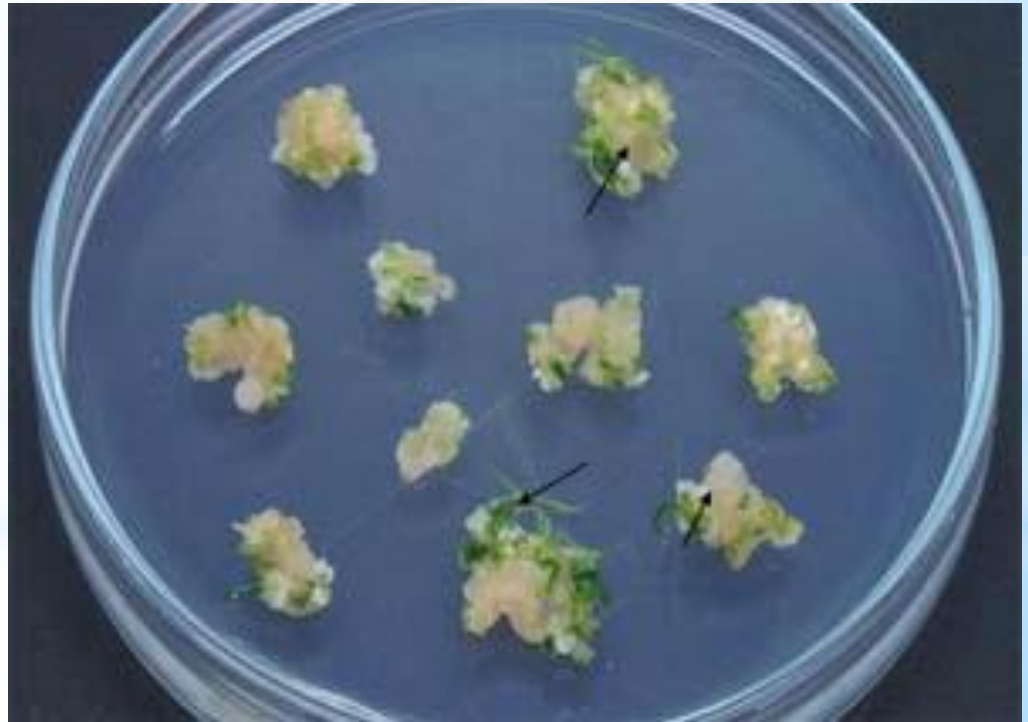
- Картофель, устойчивый к колородскому жуку**
- Кукуруза, устойчивая к кукурузной огневке, гербицидам**
- Папайя, устойчивая к вирусу кольцевой пятнистости**

Suntory – голубая трансгенная роза (дигидрокверцетин 5'-гидролаза)



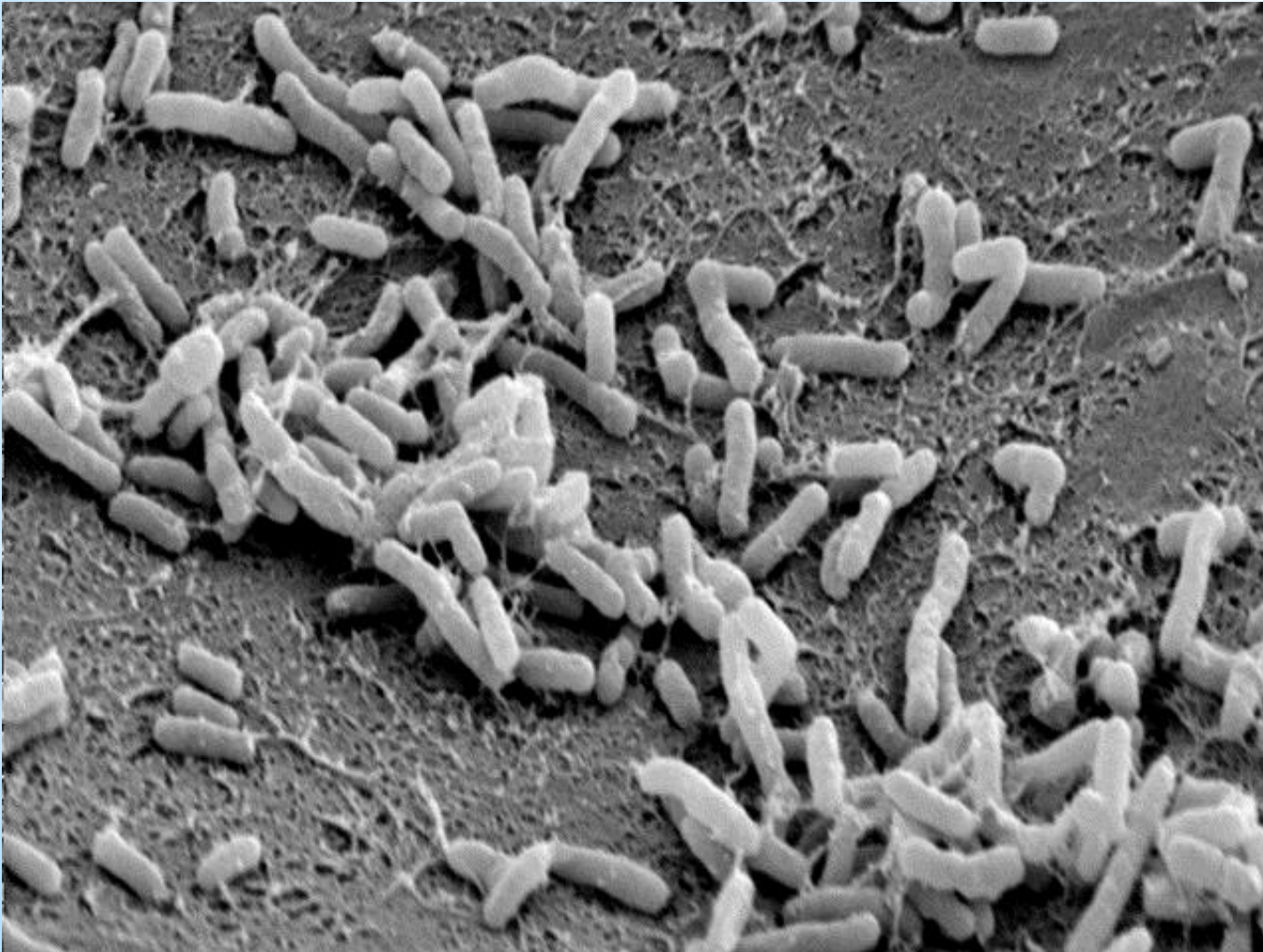
Как получают трансгенные растения?

- Получение культур и регенерация культур *in vitro*



- трансформация клеток

Агробактериальная трансформация



Agrobacterium tumefaciens
(*A. tumefaciens*)

A. tumefaciens вызывает болезнь корончатых галлов

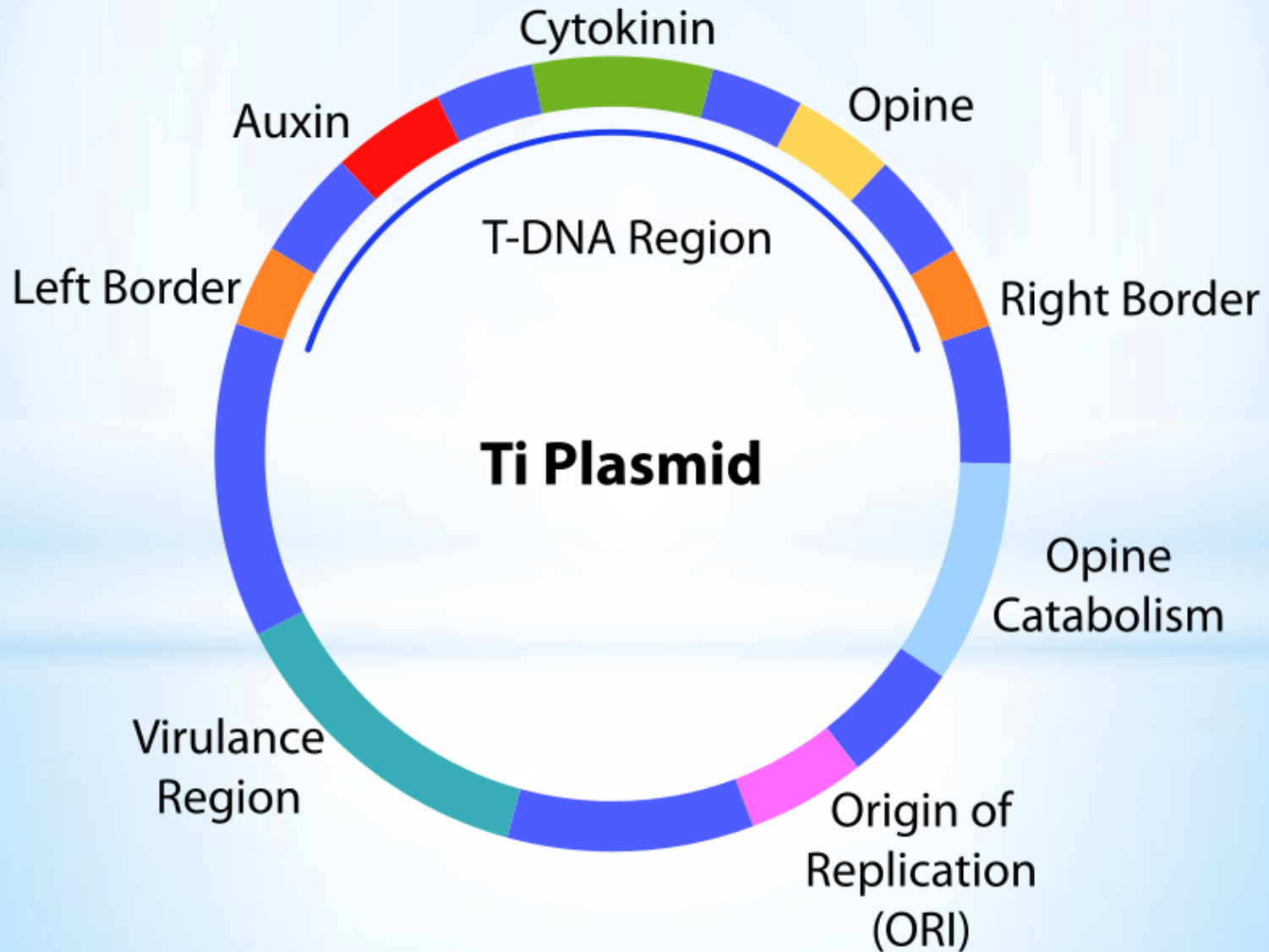


Корончатые галлы состоят из

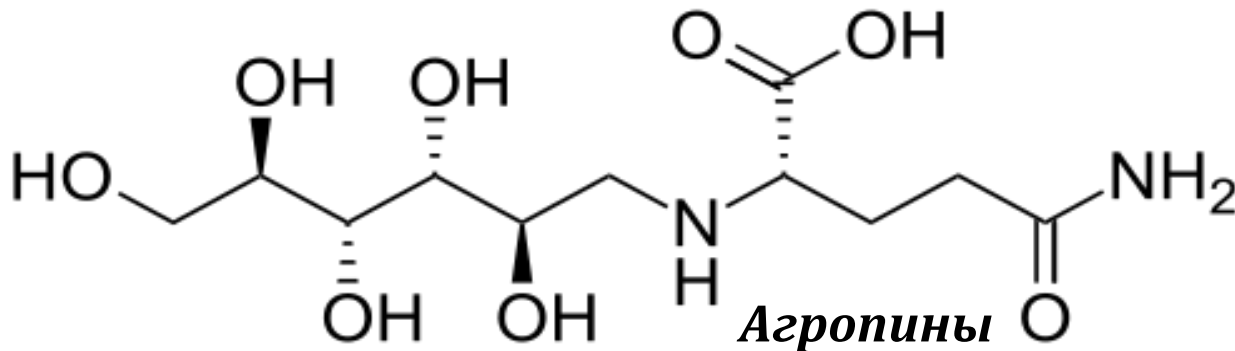
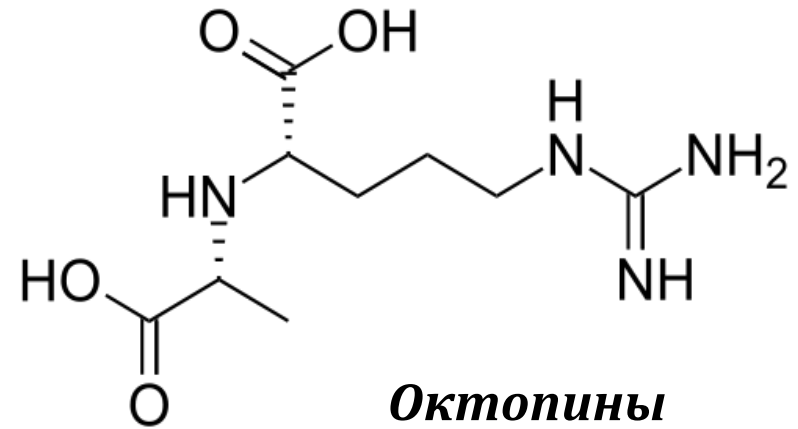
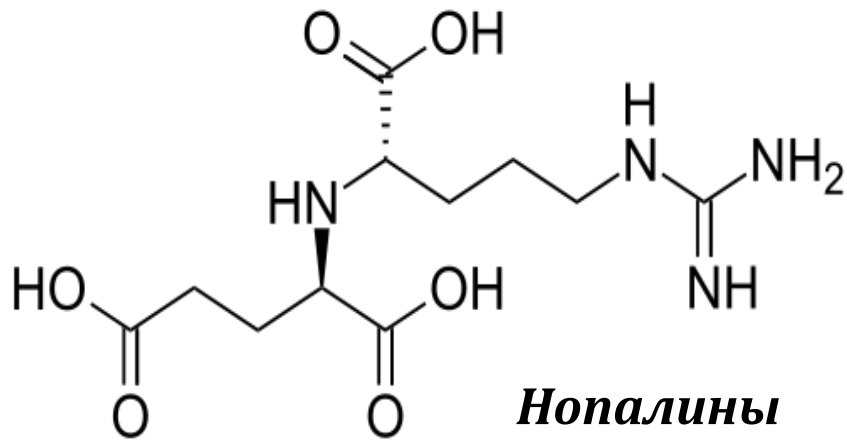


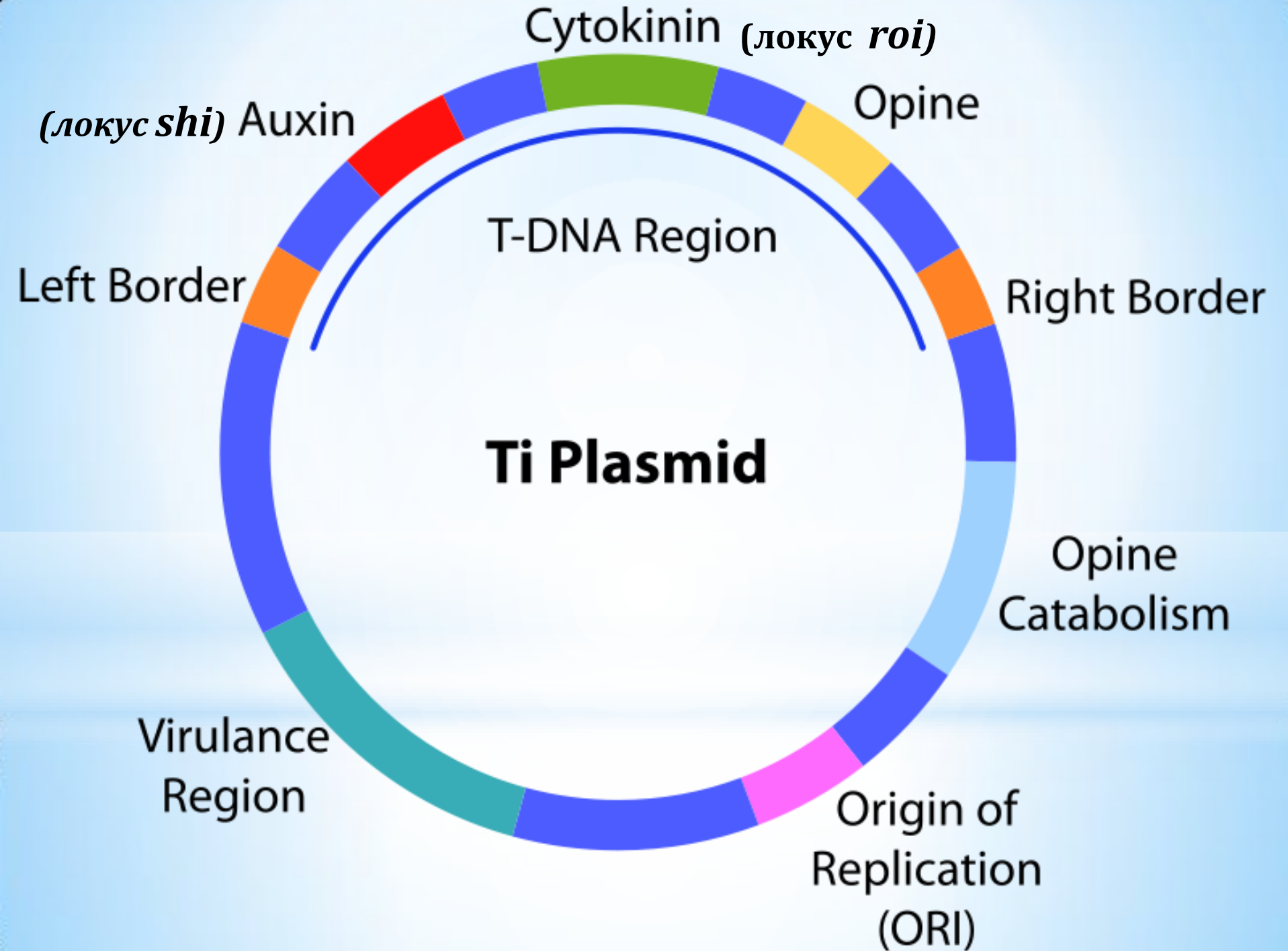
дифференцированных клеток

A. tumefaciens – плазмидосодержащая бактерия

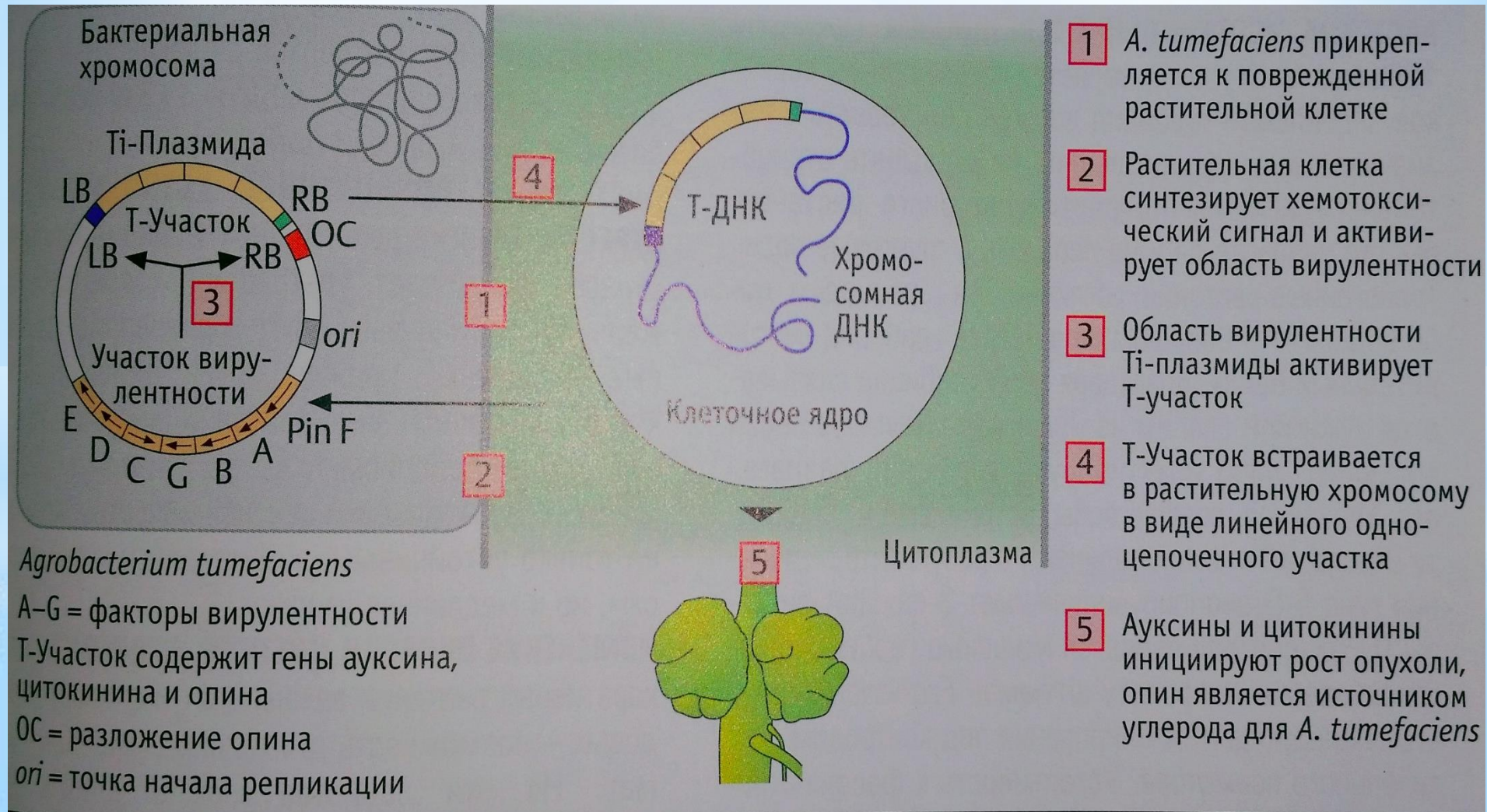


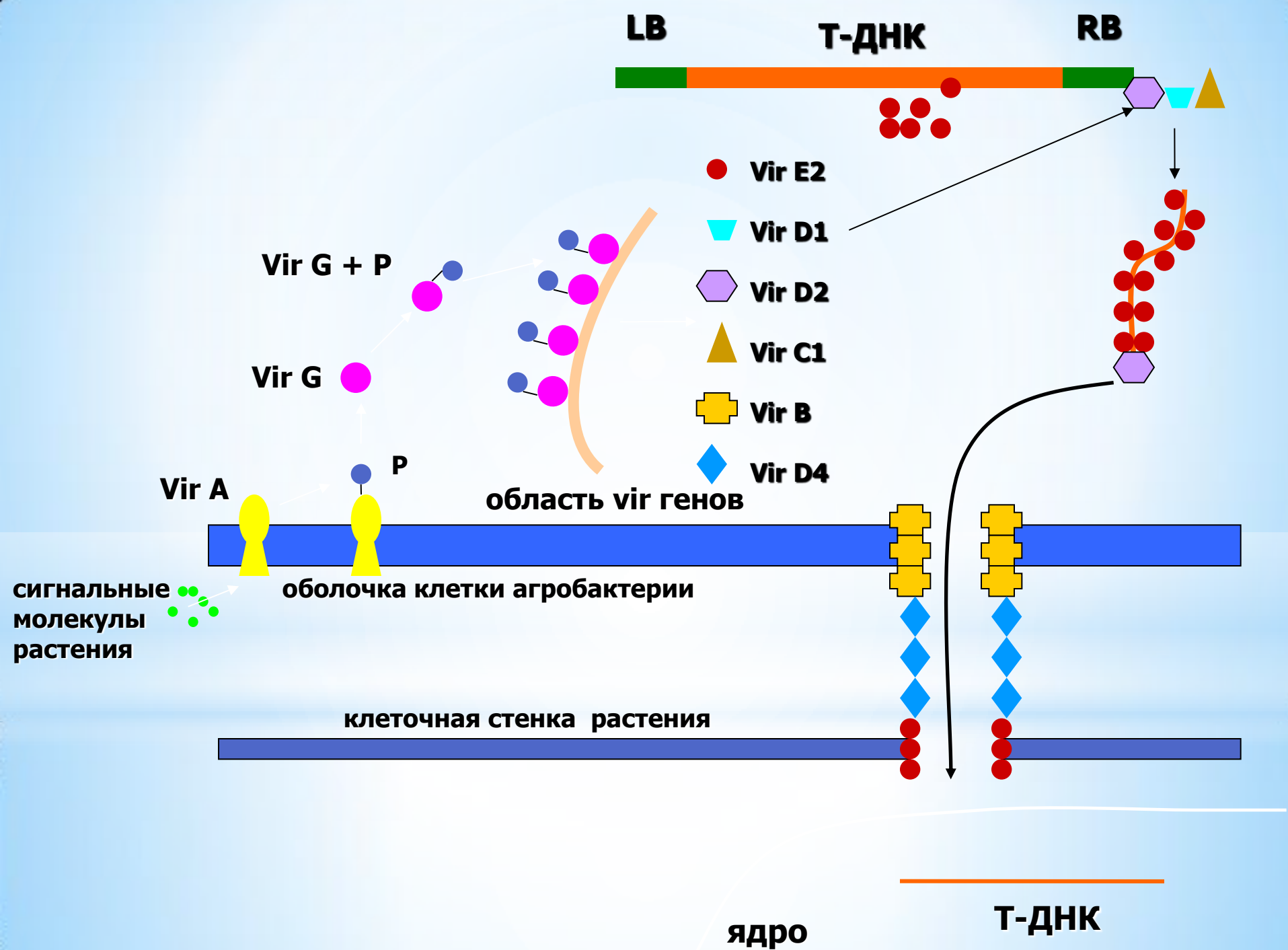
Опины – источники азота и энергии агробактерии



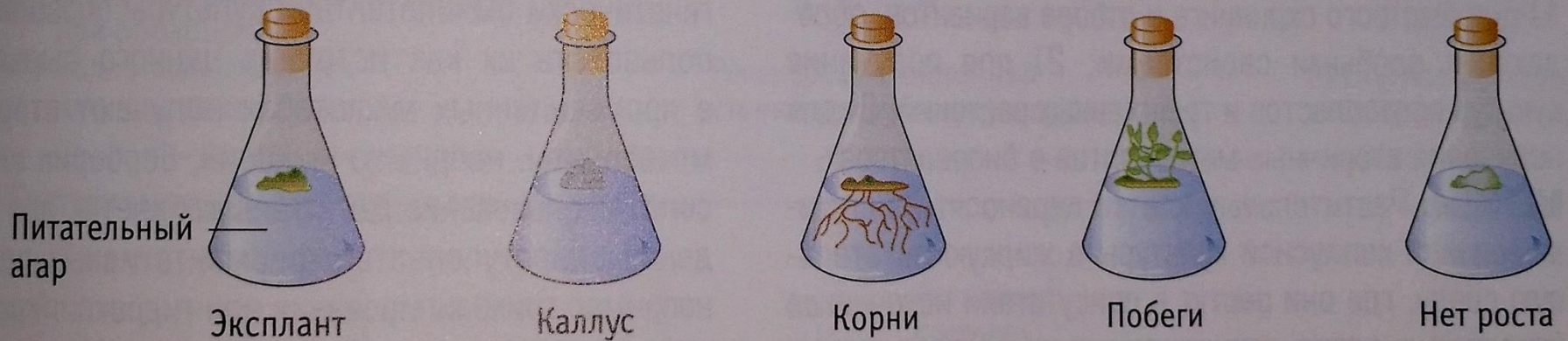


Агробактериальная трансформация





Влияние растительных гормонов на клетку



Ауксин	—	3,00 мг/л	3,00 мг/л	0,03 мг/л	—
Цитокинин	—	0,2 мг/л	0,02 мг/л	1,00 мг/л	0,2 мг/л

Составу

Ауксин 3-Индолилуксусная кислота,
(2,4-дихлорфенокси)уксусная кислота
(синтетический ауксин) и другие

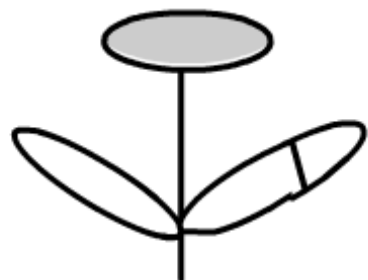
Цитокинины Кинетин, 6-бензаминопурин
Абсцизовая кислота
Гибберелин и другие

Функция*

Индуктирует рост в длину, в больших концентрациях ингибирует образование корней и деление клеток

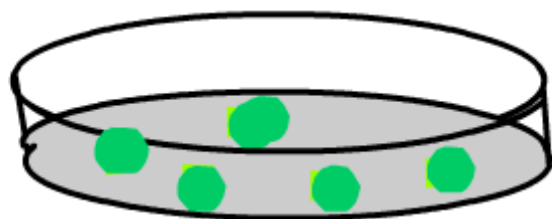
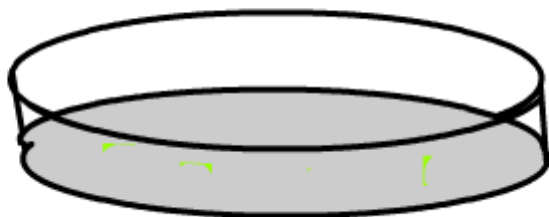
Стимулирует образование каллуса
Стимулирует дифференцировку
Стимулирует деление клеток и рост в длину

Исходное растение



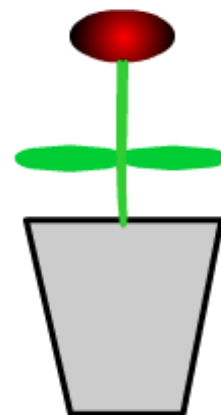
**Культура
агробактерий**

Совместная
инкубация
эксплантов
с агробактериями



Регенерация на селективной среде

Пересадка в
теплицу



**Трансгенное
растение
с новыми
свойствами**

Оценка устойчивости трансгенных линий сахарной свеклы к действию гербицида «Баста»

ТРАНСГЕННЫЕ ЛИНИИ



ТРАНСГЕННЫЕ ЛИНИИ



КОНТРОЛЬ



**ТРАНСГЕННЫЕ
ЛИНИИ**

**ТРАНСГЕННЫЕ
ЛИНИИ**

КОНТРОЛЬ

Получение трансгенного картофеля



**ГМ сорт
Невский**

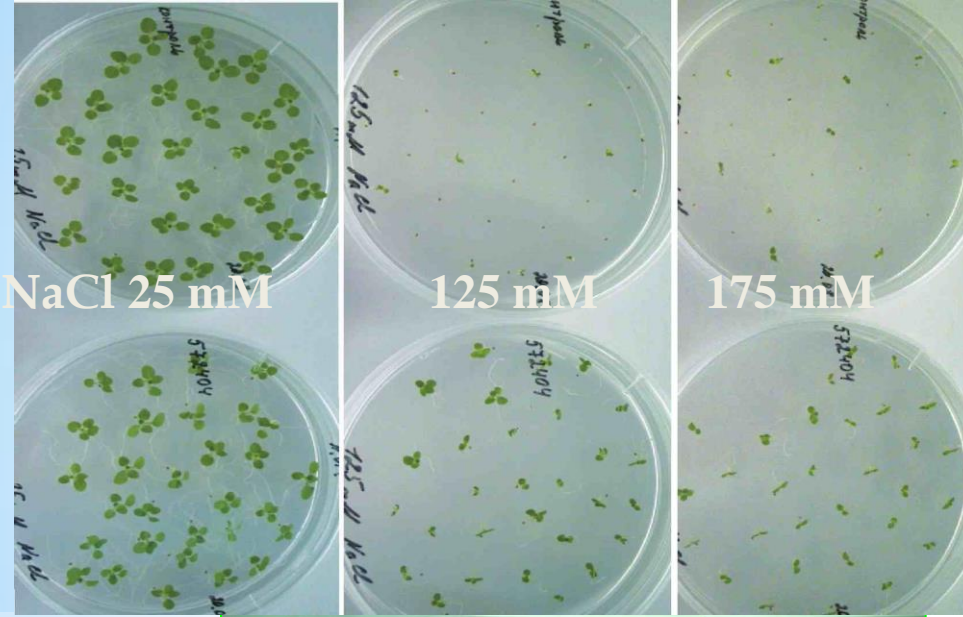


**ГМ сорт
Луговской**

Контрольные растения

Участок, зарегистрированный МВК ГИД, Краснодар, ВНИИБЗР

Растения табака, несущие ген *RPP* H⁺ пиррофосфатазы *Rhodospirillum rubrum*, обуславливающий устойчивость к засолению



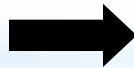
Контрольные
растения

Прорастание семян
при различной
концентрации NaCl
в среде



Трансгенные
растения

Рост контрольных и
трансгенных растений на
различных концентрациях
NaCl в среде



Контрольные растения,
150 mM NaCl

Трансгенные растения,
150 mM NaCl



“Золотой” рис с повышенным содержанием β -каротина



Получение лекарственных препаратов в растениях



Трансгенные животные – биореакторы

Белки, синтезируемые с генов человека в бактериях, не всегда идентичны белкам из клеток человека. Так как ряд механизмов обеспечивающих посттрансляционные модификации у бактерий отсутствуют.

Выделение и очистка белков, синтезированных в бактериальной клетке, представляет собой трудоемкую процедуру.

Выделение чужеродных белков с молоком животных позволит значительно упростить их получение.

Для обеспечения экспрессии трансгена в молочной железе и выделение белка с молоком перед трансгеном следует поместить промотор гена одного из белков, секретируемых с молоком (например, промотор гена казеина).

Белки человека, полученные от трансгенных животных

- **Антитрипсин**
- **Интерферон**
- **Фактор
свертываемости крови
IX**
- **Сывороточный
альбумин**
- **Трофобластин**
- **Интерлейкин-2**
- **Некоторые
иммуноглобулины**
- **Тканевой активатор
плазминогена**
- **Урокиназа**

**Для получения трансгенной
коровы требуется 5-6 лет**



Мировая потребность в факторе свертываемости крови VIII в год составляет около 7 кг.

Такую потребность может удовлетворить 1-2 трансгенные коровы

Мировая потребность в факторе свертываемости крови IX в год составляет около 85 кг.

Такую потребность может удовлетворить 15-20 трансгенных коров

Мировая потребность в фибриногене в год составляет около 3 т.

Такую потребность может обеспечить 500 трансгенных коров

- Созданы трансгенные коровы, в молоке которых образуется человеческий белок лактоферрин.
- Лактоферрин обладает антивирусной, антибактериальной, антипаразитарной, различными каталитическими активностями, радиопротективными свойствами и противораковым, антиаллергическим, иммуномоделирующим действиями.
- Перспективно использование лактоферрина для профилактики заболеваний у людей.
- С помощью трансгенных коров можно получать человеческий альбумин, используемый в медицине для поддержания осмотического давления крови.

- Непереносимость молока связана с нарушением синтеза фермента лактазы.
- Поступающая с молоком лактоза не расщепляется, поскольку отсутствует гидролизующий ее фермент лактаза.
- В связи с этим микроорганизмы кишечника начинают бурно расти, что сопровождается соответствующими симптомами.
- Если в геном коровы ввести ген лактазы и заставить его экспрессироваться в молочной железе, то лактоза будет расщеплена до глюкозы и галактозы.

Могут быть созданы два типа модельных животных:

- Животные с функционирующим «больным» трансгеном (животным вводится человеческий ген, ответственный за заболевание)
- Животные у которых выключен ген, аналогичный тому, который вызывает данное заболевание у человека.
- Возможна разработка методов генетической терапии на основе изучения трансгенных ЖИВОТНЫХ

Генные инженеры смоделировали синдром Дауна у мышей.

Выведена линия трансхромосомных мышей путем пересадки 21-ой человеческой хромосомы



Создание трансгенных животных, источников органов для пересадки человека

В мире существует дефицит органов для пересадки человека.

Решением этой проблемы может быть пересадка органов человеку от животных.

Органы свиньи подходят человеку по размеру, строению, биохимическим показателям.

Необходимо сконструировать трансгенную свинью, органы которой не отторгались бы иммунной системой человека.



Семейство СВИНЬИ (Suidae). Конечности четырехпалые. Клыки большие. Желудок простой, с дополнительным мешком. Всеядны. 9 современных видов объединены в 5 родов

Получение модифицированного молока

Перспективно создание коров, продуцирующих молоко, по своему составу приближенное к молоку человека. С этой целью необходимо исключить несколько генов коровы и внести несколько генов человека.

Трансгенные козы повышают иммунитет грудным молоком

- Человеческое грудное молоко содержит ценные антибактериальные ферменты, которых в молоке животных значительно меньше.
- В человеческом грудном молоке содержание лизоцима приблизительно в 3 тысячи раз больше, чем в молоке козы.
- Внедрив животным человеческий ген, отвечающий за синтез лизоцима, исследователи создали трансгенных коз, которые производят молоко, содержащее лишь на 24% меньше лизоцима, чем женское грудное молоко
- Недостаток аминокислот цистеина и метионина в организме овцы задерживает рост шерсти.
- Введение в геном овцы дополнительных генов ферментов, ответственных за синтез указанных аминокислот, возможно, повысит качество шерсти.

➤ Американские ученые вывели трансгенную линию комаров, которые невосприимчивы к возбудителю малярии и более жизнеспособны, чем обычные насекомые.

➤ Трансгенные комары помогут в борьбе с малярией.

➤ Комарам введен ген, который дает зеленый блеск в глазах.



Ученые вырастили зубастого петуха



- Ученые сумели разбудить ген, спавший у птиц на протяжении как минимум 70 млн лет.
- Эксперимент дает основания предположить, что когда-нибудь удастся включить аналогичные человеческие гены, управляющие ростом зубов и волос.

ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ СВЕТАТСЯ В ТЕМНОТЕ

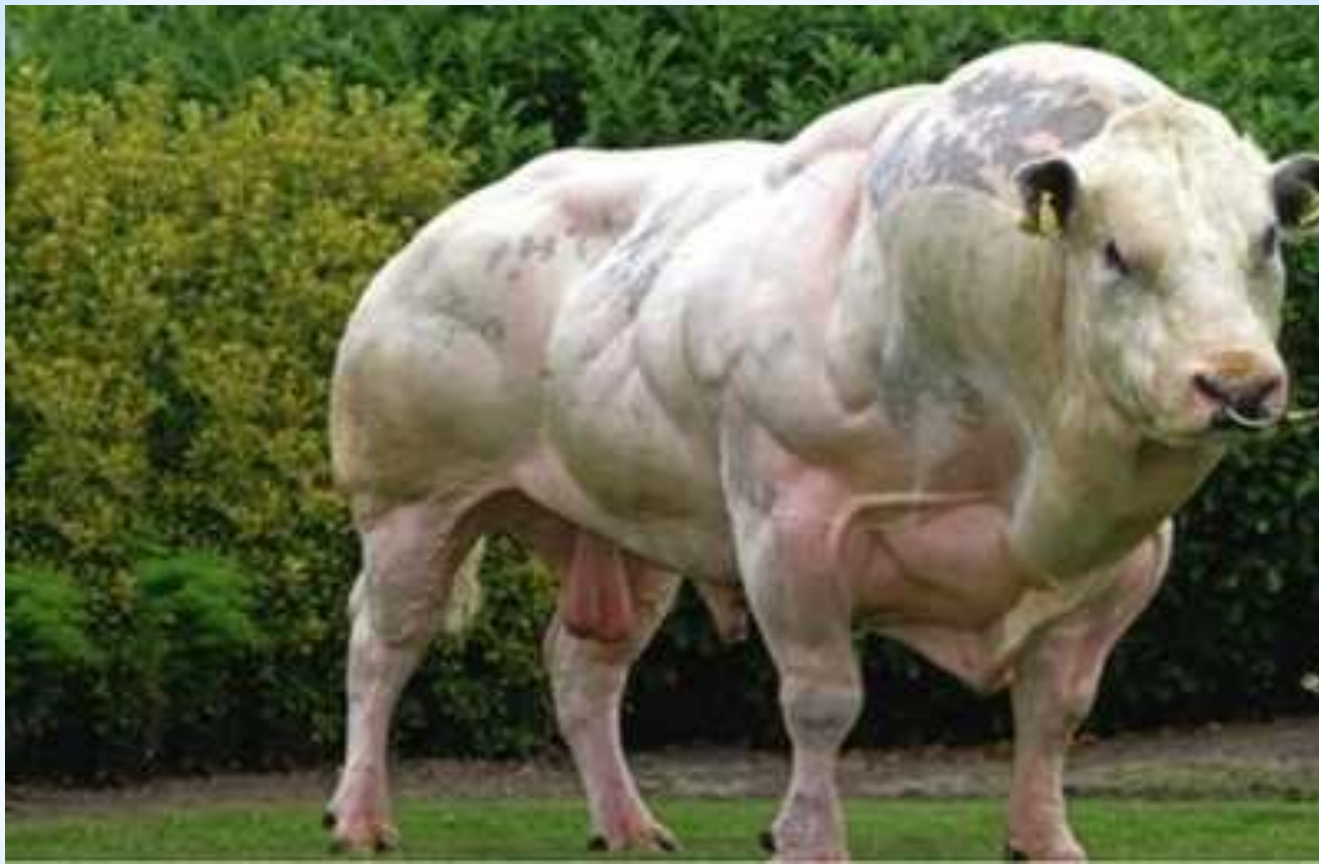
Свиньям и цыплятам введен ген медузы, заставивший их светиться в темноте.



- Лактоферрин содержится в женском грудном молоке.
- Он и обеспечивает противомикробную и противовирусную защиту.
- Препараты на его основе дороги.
- Ученые доказали идентичность полученного из козьего молока человеческому и возможность промышленного производства рекомбинантного лактоферрина.

Трансгенный козел





Мускулы бельгийских голубых коров как минимум в два раза более развиты, чем у их собратьев.

Ученые генетики смогли добиться такого эффекта, блокировав ген, регулирующий секрецию миостатина — белка, подавляющего рост мышечных тканей, когда те достигнут определенного предела

<http://kovzunova.by/>

Раздел

«Микробиология с основами биотехнологии»

ИЛИ

