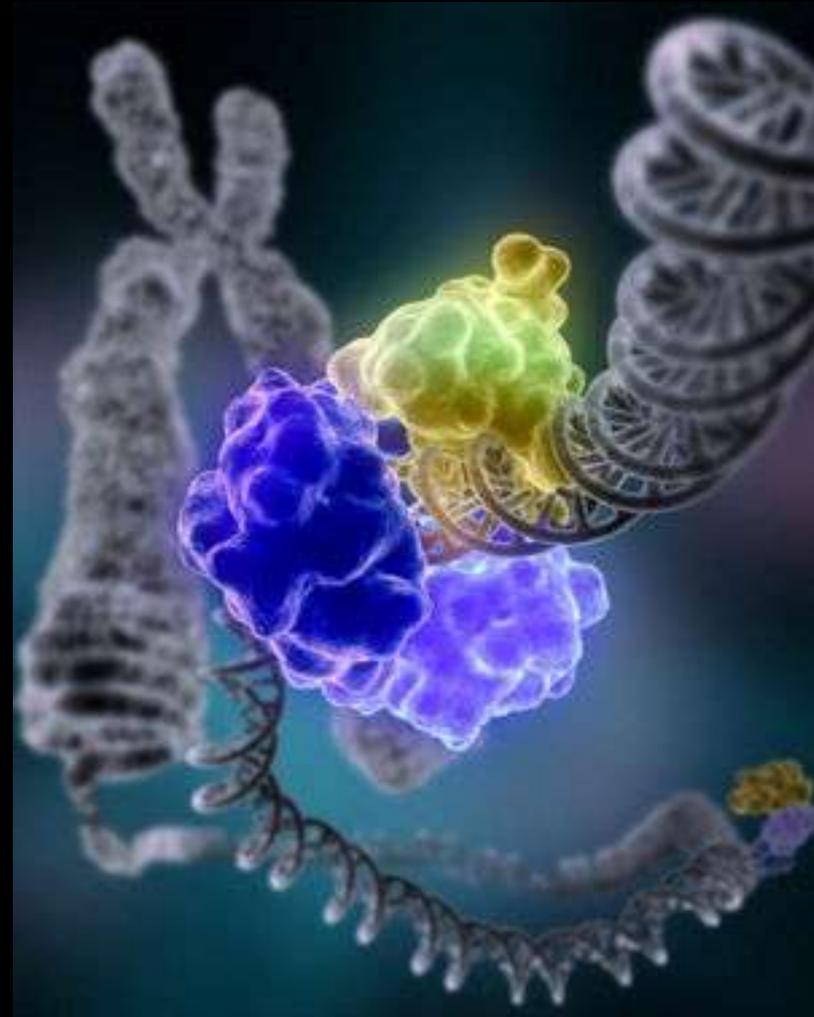


Медицинская биология и общая генетика

Лекция №5

Лектор:

кандидат биологических наук, доцент
Давыдов Владимир Витольдович



ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

- 1 Развитие генно-инженерных методов
- 2 Методы получения генетического материала
- 3 Конструирование векторной молекулы
- 4 Введение рекомбинантных ДНК в клетку-реципиент
- 5 Селекция клонов клеток, содержащих молекулы гибридной ДНК
- 6 Использование методов генной инженерии в медицине



В.А. Энгельгардт

Не нужно быть беспочвенным оптимистом, чтобы верить, что через пятьдесят лет "биологический код" - химическая зашифровка наследственных свойств - будет расшифрован и прочитан. С этого момента человек станет полным властелином живой материи...

"Комсомольская правда" 9 июня 1957 года

1970 г. – Келли и Смит выделили рестриктазу

1972 г. – П. Берг получил in vitro рекомбинантную ДНК

1978 г. – создан генно-инженерный инсулин и гормон роста человека

1986 г. – вакцина против гепатита В и интерферон

1987 г. – первые полевые испытания генетически модифицированных с/х растений (томат, устойчивый к вирусным заболеваниям)

1990 г. – начало международного проекта «Геном человека»

1990 – впервые успешно проведена генная терапия четырехлетней девочке с нарушением иммунитета

1993 г. – начата продажa продуктов питания, содержащих генетически модифицированные организмы

1997 г. – Я. Уилмут и К. Кэмпбелл - «овечка Долли»

1997 г. – клонированы овцы, которые несли человеческий ген «антигемофильного фактора IX»

1998 г. – выращиваются эмбриональные стволовые клетки;

1998 г. – впервые создана полная генетическая карта животного (*Caenorhabditis elegans*)

2001 г. – создана первая полная генетическая карта риса

2003 г. – завершение проекта «Геном человека»

2003г. – проект «Encode»

2007г. – завершение первого этапа проекта «Encode»

Генная инженерия (ГИ) –

отрасль молекулярной биологии и генетики, целью которой является создание организмов с новой генетической программой, полезной для человека

В основе ГИ лежит целенаправленное манипулирование с фрагментами нуклеиновых кислот

ГИ успешно развивается с 1970-х гг

Этапы методов генной инженерии:

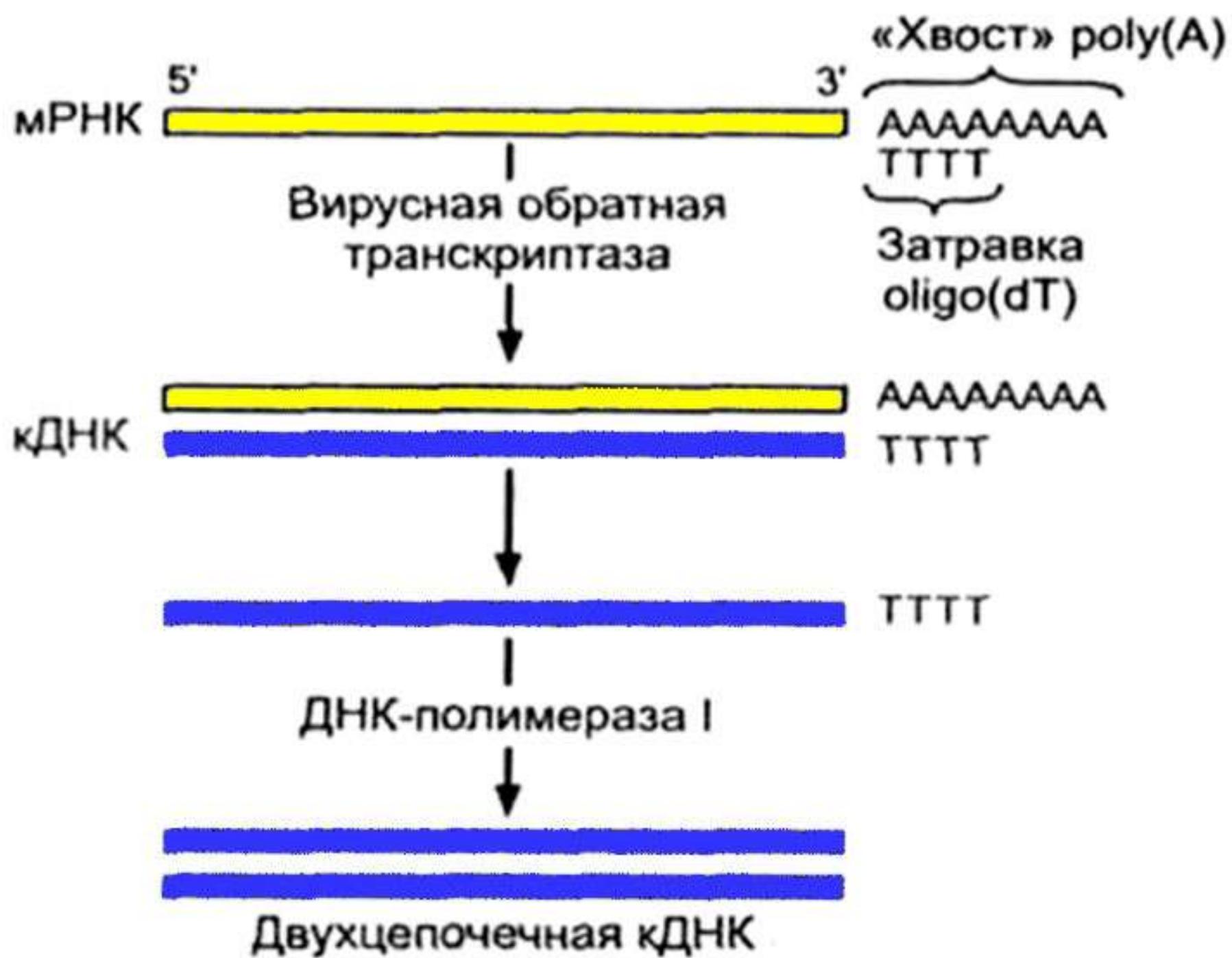
- 1. Получение генетического материала**
- 2. Анализ фрагментов ДНК**
- 3. Конструирование векторной молекулы ДНК *in vitro*, способной реплицироваться автономно *in vivo***
- 4. Введение рекомбинантных ДНК в клетку-реципиент**
- 5. Селекция клонов клеток, содержащих молекулы гибридной ДНК**

Способы получения генов:

1. Матричный синтез

(биоферментативный) - обратная транскрипция генов с помощью ревертазы:

- и-РНК используется как матрица для синтеза цепи ДНК
- цепь ДНК реплицируют при помощи ДНК-полимеразы I



Способы получения генов:

2. Химико-ферментативный синтез *in vitro*:

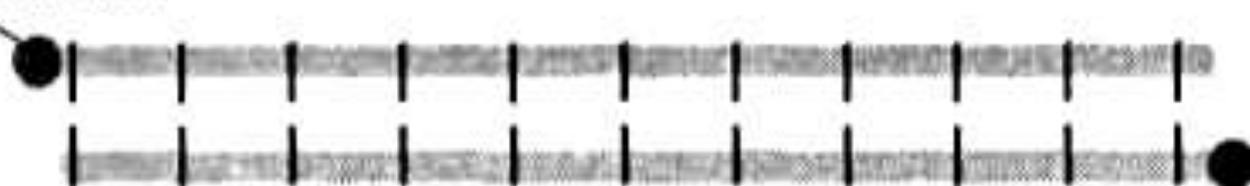
- можно синтезировать короткие гены с известной последовательностью (сиквенированные)
- для сиквенирования генов используют методы:
 - Максама-Гилберта (1977)
 - Сэнгера (1975)

Метод Максама-Гилберта

основан на химической деградации ДНК

- Один из концов сиквенируемого фрагмента ДНК помечают ^{32}P или флюорисцирующей меткой
- Препарат меченой ДНК делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентами, специфически разрушающими одно из четырех оснований ДНК: А, Г, Т, Ц

Радиоактивная
метка

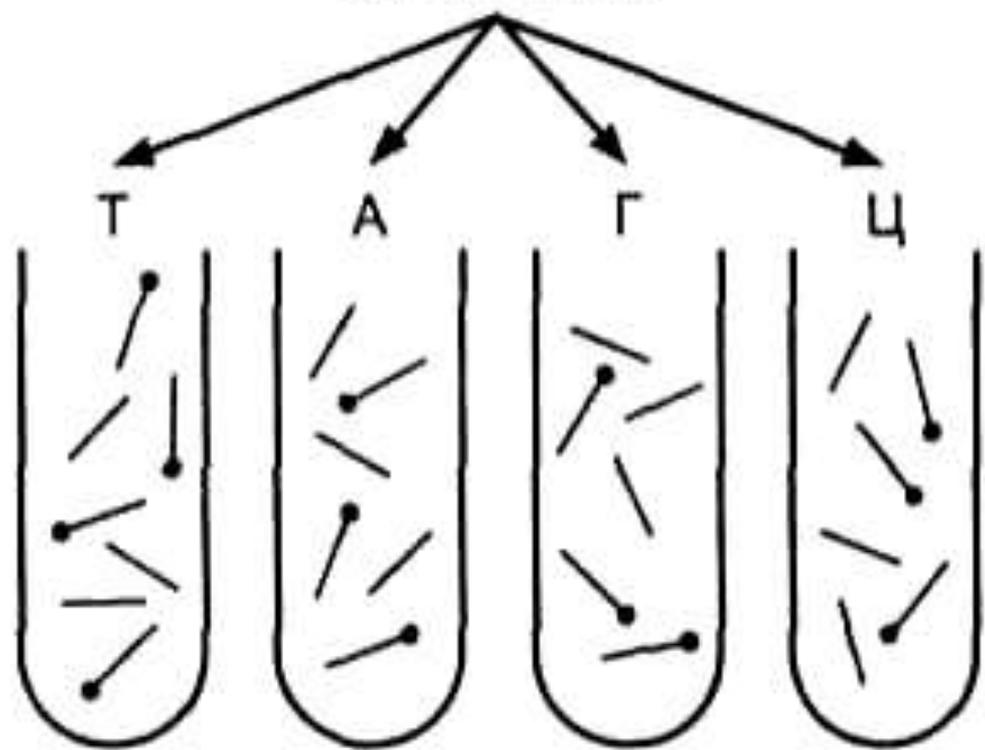


Двухцепочечная
ДНК



Одноцепочечная
ДНК

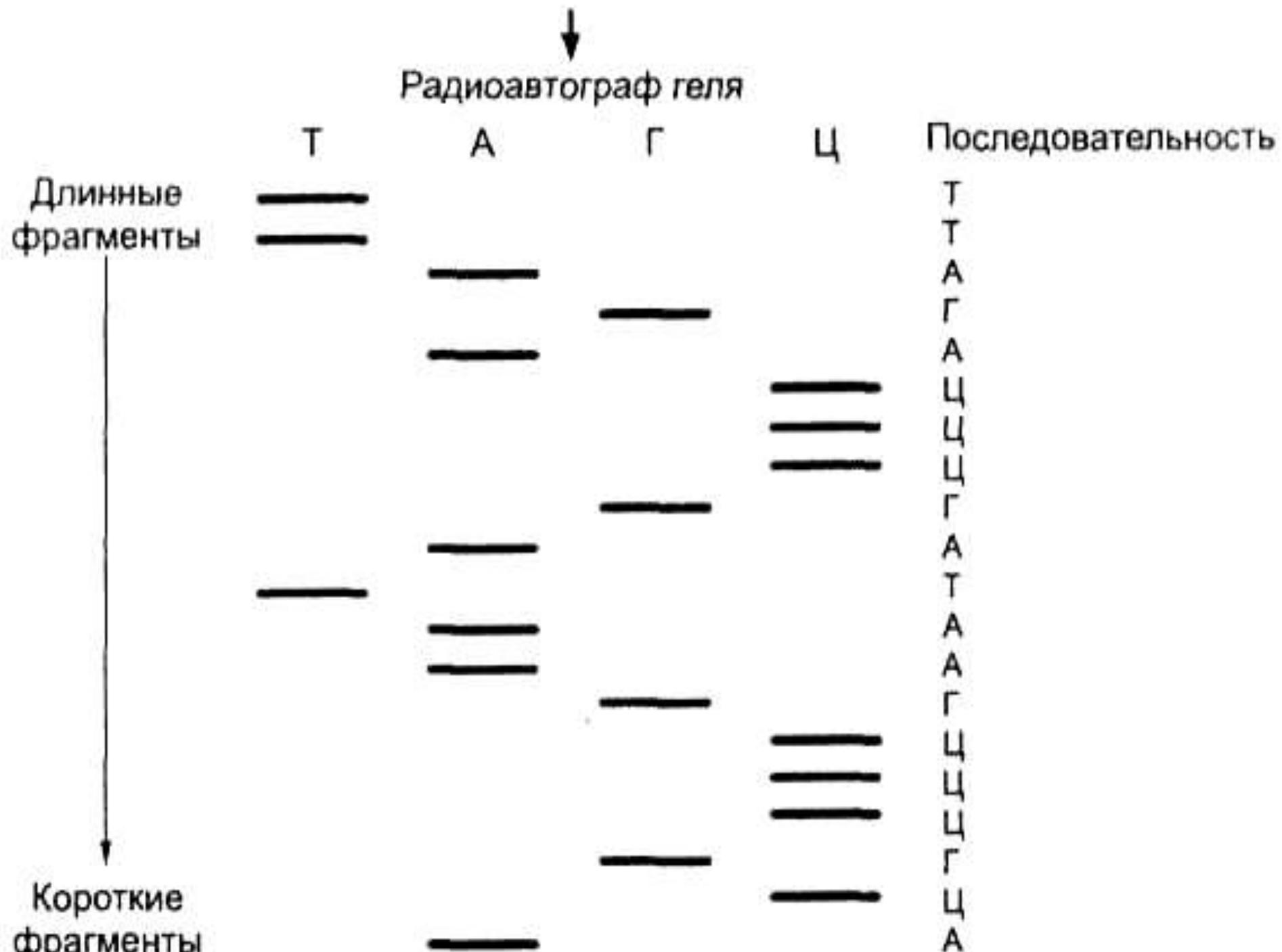
Цепи разделяют и получают препарат
одной из них



- Смеси фрагментов подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле
- Фрагменты ДНК разделяются на фракции в соответствии с размерами
- Радиоавтография геля
- Набор полос, регистрируемых на рентгеновской пленке, «читают»

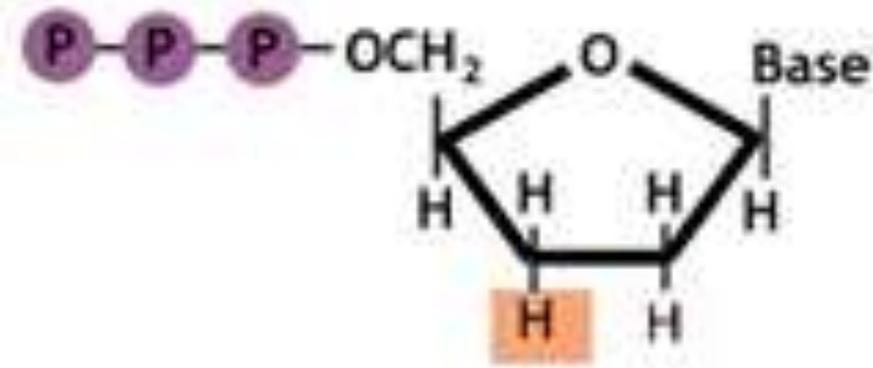
- При обработке поврежденных цепей пиперидином, образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание

- Получается набор меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца цепи

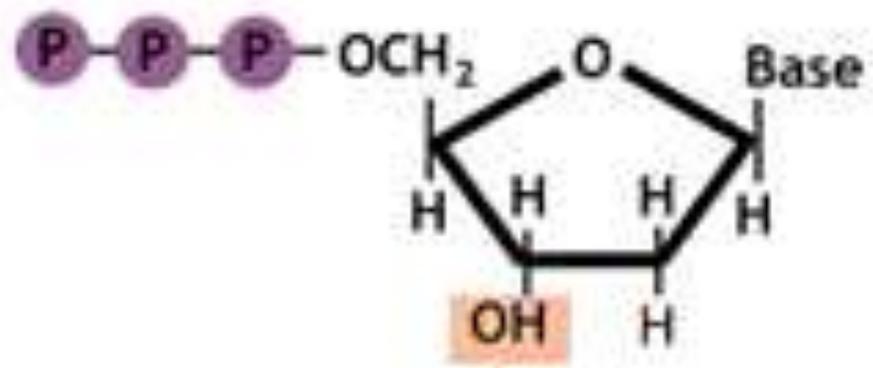


Метод Сэнгера

ОСНОВАН НА ВКЛЮЧЕНИИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ В
СИНТЕЗИРУЮЩУЮСЯ ЦЕПЬ ДНК,
ЯВЛЯЮЩИХСЯ ТЕРМИНАТОРАМИ
ЭЛОНГАЦИИ



dideoxynucleotide (ddNTP)

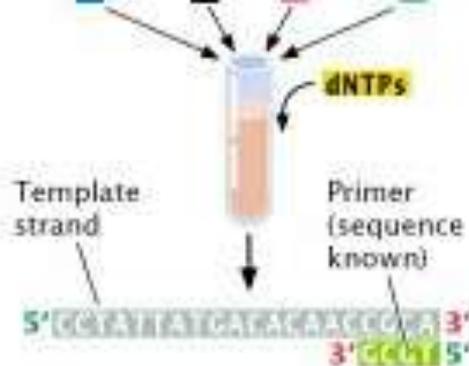


deoxynucleotide (dNTP)

5' CCTATTATGACAAACCGCA 3'

ddCTP ddGTP ddTTP ddATP

C G T A



5' CCTATTATGACAAACCGCA 3'

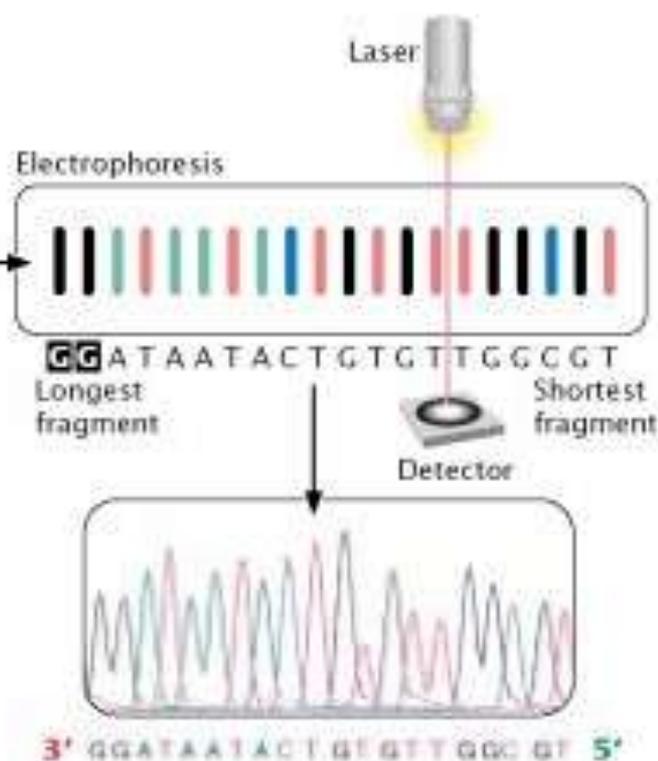
3' GGATAA TACTGTGTTGGCGT 5'

5' CCTATTATGACAAACCGCA 3'

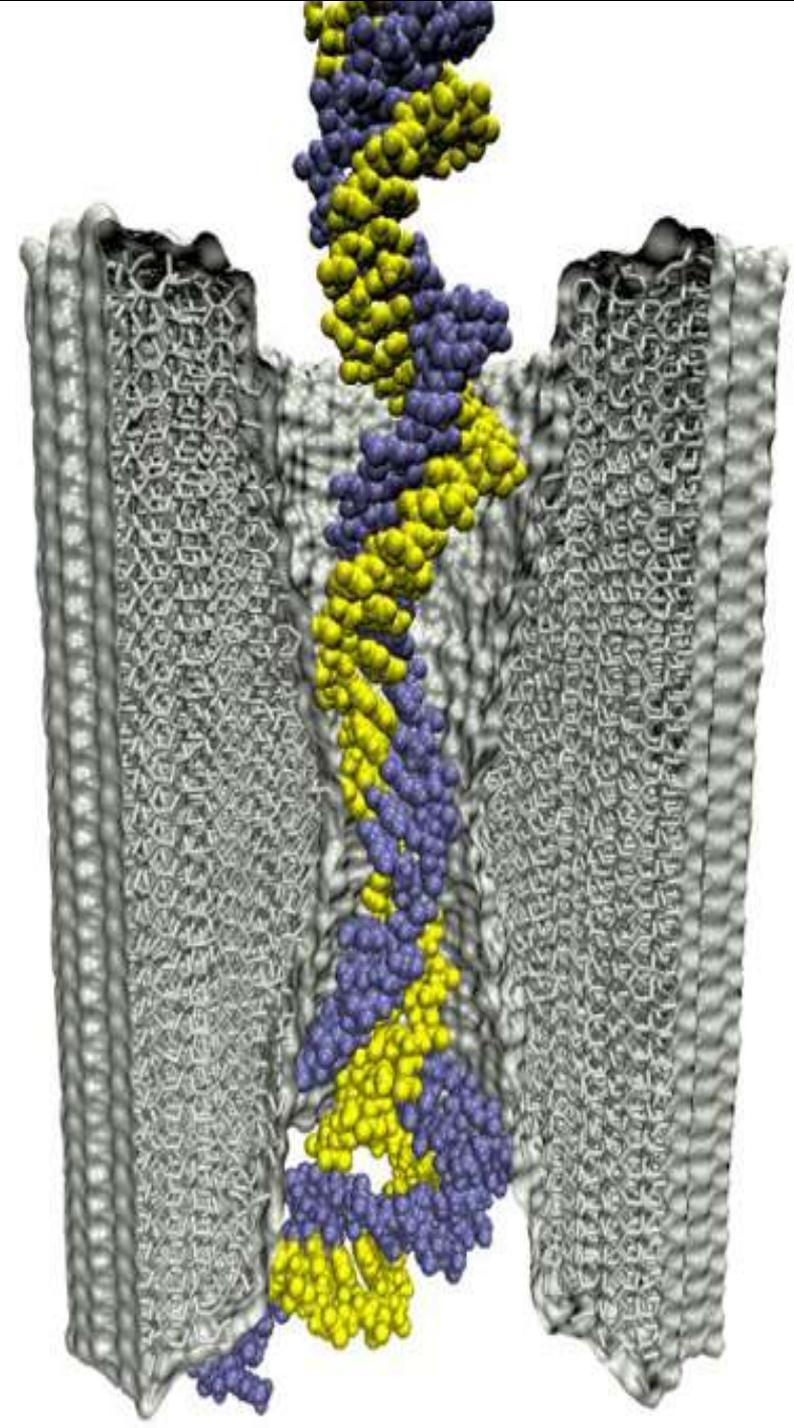
3' GGATAA TACTGTGTTGGCGT 5'

**Терминированные
фрагменты ДНК
фракционируются
электрофоретически**

**Автоматизация
секвенирования: каждый
из четырех ddNTP имеет
флюоресцентную метку
своего цвета**



**Фрагмент каждого размера имеет цвет
соответствующий одному из четырех
ddNTP**



Новый подход к секвенированию ДНК заключается в протягивании молекулы ДНК через тонкие нанопоры в специальном кремниевом микрочипе. Молекула движется в электрическом поле, это позволяет изучать механические свойства ДНК, осуществлять быстрое и точное секвенирование геномов

Способы получения генов:

3. Получение генов с помощью рестриктаз

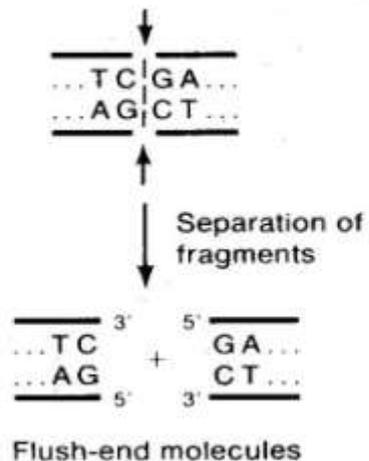
Рестриктазы - это ферменты, узнающие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции) и разрезающие молекулу в этих точках

Сайты рестрикции – палиндромные последовательности , специфичные для каждого вида рестриктазы

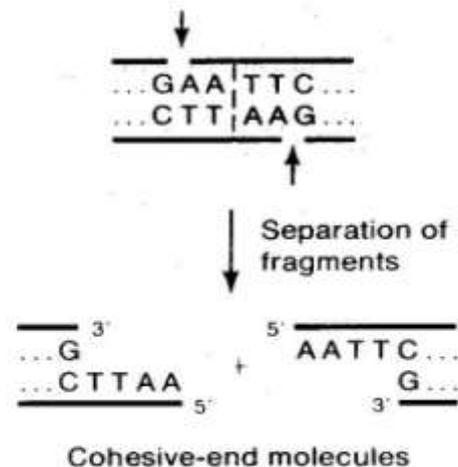
Разрезание приводит к появлению **липких** или **тупых** концевых фрагментов ДНК

Microorganism	Name of enzyme	Target sequence and cleavage sites
Generates cohesive ends		
<i>Escherichia coli</i> RY13	EcoRI	$\begin{array}{c} G \downarrow A A T T C \\ C T T A A \uparrow G \end{array}$
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	BamHI	$\begin{array}{c} G \downarrow G A T C C \\ C C T A G \uparrow G \end{array}$
<i>Bacillus globigii</i>	BglIII	$\begin{array}{c} A \downarrow G A T C T \\ T C T A G \uparrow A \end{array}$
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeII	$\begin{array}{c} Pu \ G \ C G \ C \ Py \\ Py \uparrow C \ G C \ G \ Pu \end{array}$
<i>Haemophilus influenza</i> R _d	HindIII	$\begin{array}{c} A \downarrow A G C T T \\ T T C G A \uparrow A \end{array}$
<i>Providencia stuartii</i>	PstI	$\begin{array}{c} C T G C A \downarrow G \\ G \uparrow A C G T C \end{array}$
<i>Streptomyces albus</i> G	SalI	$\begin{array}{c} G \downarrow T C G A C \\ C A G C T \uparrow G \end{array}$
<i>Xanthomonas badrii</i>	XbaI	$\begin{array}{c} T \downarrow C T A G A \\ A G A T C \uparrow T \end{array}$
<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI	$\begin{array}{c} T \downarrow C G A \\ A G C \uparrow T \end{array}$
Generates flush ends		
<i>Brevibacterium albidum</i>	BalI	$\begin{array}{c} T \ G \ G \downarrow C \ C \ A \\ A \ C \ C \uparrow G \ G \ T \end{array}$
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeI	$\begin{array}{c} (A) \ G \ G \downarrow C \ C \ (T) \\ (T) \ C \ C \uparrow G \ G \ (A) \end{array}$
<i>Serratia marcescens</i>	SmaI	$\begin{array}{c} C \ C \ C \downarrow G \ G \ G \\ G \ G \ G \uparrow C \ C \ C \end{array}$

(a) Cuts on line of symmetry



(b) Cuts symmetrically placed around line of symmetry



Two types of cuts made by restriction enzymes. The arrows indicate the cleavage sites. The dashed line is the center of symmetry of the sequence.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) К. Мюллис, 1980

Метод используется для увеличения числа выделенных или синтезированных генов: это быстрая репликация фрагментов ДНК (амплификация) *in vitro*.

Для реакции необходимо:

- Таг-ДНК-полимераза
- среда со свободными нуклеотидами (А, Т, Г, Ц)
- праймеры ДНК
- амплификатор

Стадии ПЦР:

1. Денатурация - +90°C, 15 с

образуются одноцепочечные фрагменты
инкубируемой ДНК

2. Гибридизация - +50°C, 30 с

гибридизация цепей ДНК с праймерами

3. Полимеризация - +70°C, 90 с

Таг-ДНК-полимераза удлиняет праймеры до
размеров матричных ДНК

Использование полученных генов

1. Промышленное производство БАВ
2. Создание и производство ГИ вакцин
3. Генодиагностика
4. Генотерапия

1. Получение БАВ:

- Создание рекомбинантной ДНК (вектора)
- Введение векторной молекулы в клетку
- Отбор трансформированных клеток с работающим геном
- Производство БАВ

Вектор – небольшая автономно реплицирующаяся молекула ДНК, обеспечивающая функционирование встроенного в нее гена

Требования к векторам:

- автономная репликация в клетке
- стабильное наследование клеткой-ХОЗЯИНОМ
- наличие большого числа копий в клетке
- достаточная емкость
- наличие «удобных» сайтов рестрикции
- наличие селективных маркеров

Виды векторов:

Плазмиды – небольшие кольцевые ДНК бактерий; используются для переноса генов до 10 кб: pBR 322

Фаговые векторы – ДНК-содержащие бактериофаги: фаг λ , фаг M 13.
Емкость 15-25 кб

Космиды – плазмидные вектора, в которые встроен участок генома фага λ , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу
Переносят гены до 33 – 39 кб

Фазмиды - являются гибридами между фагом и плазмидой

После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды

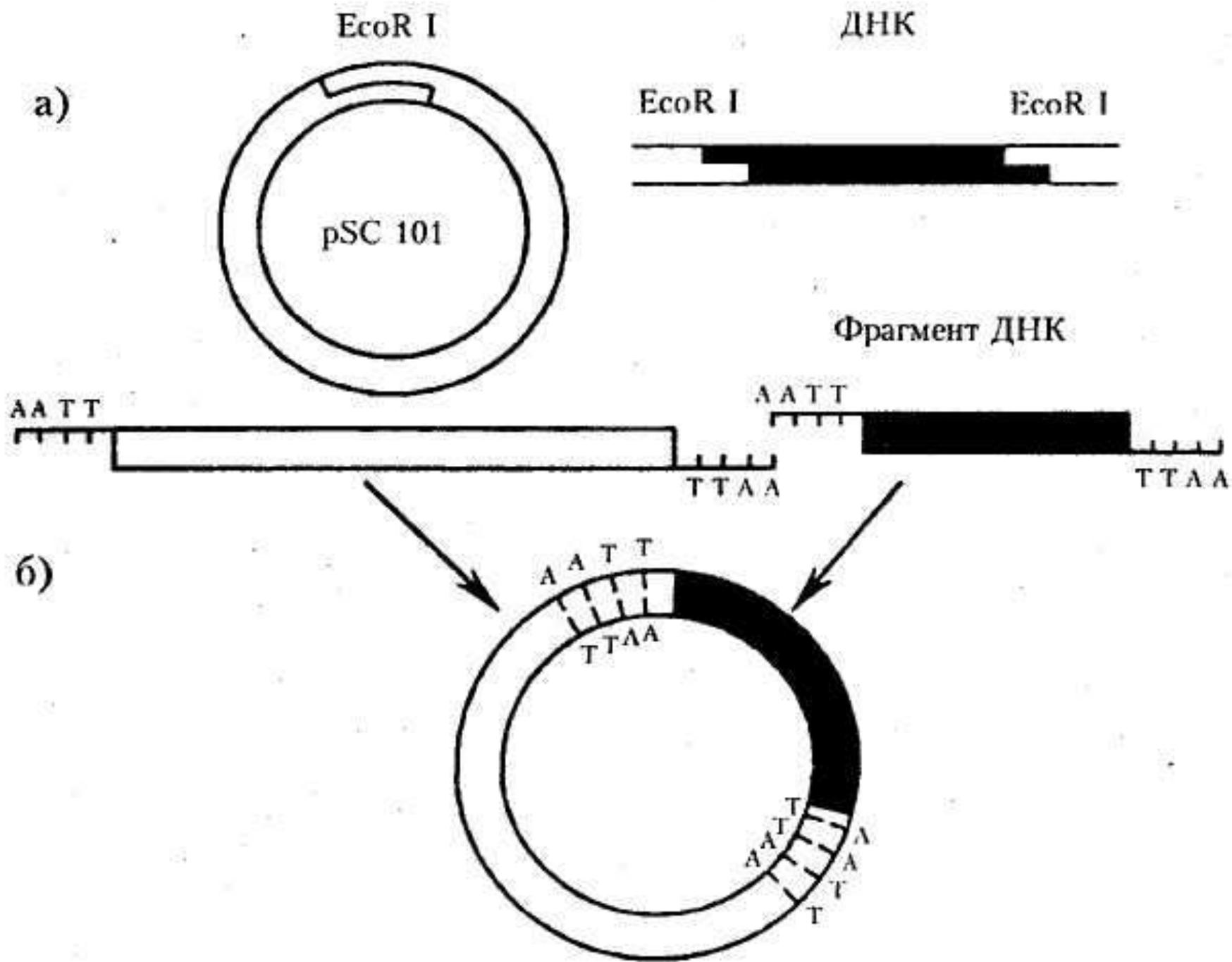
Емкость как у фаговых векторов

Челночные векторы – способны к репликации в разных клетках-хозяевах: растений и животных прокариот и эукариот

Одни и те же гены получают возможность реплицироваться и экспрессироваться в разных организмах

Основной вектор для клонирования генов животных – геном вируса **SV40**

Основные векторы для клонирования растений – геномы вирусов растений и **плазмида pTi** агробактерий



Способы введения векторов в клетку:

конъюгация – у бактерий переход векторной ДНК при межклеточном контакте через плазмиду

трансдукция – передача ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту при участии бактериофагов

трансформация – передача генов при помощи свободной растворимой ДНК (плазмидами), выделенной из клеток-доноров

Способы введения векторов в клетку:

компетентность – активное поглощение бактериальными клетками рекомбинантных ДНК из окружающей среды

трансфекция – введение в клетки человека и животных (бактерий) нуклеиновой кислоты невирусным методом (**микроинъекция, применение липосом, электропорация, электронная (генная) пушка и др.**)

Отбор трансформированных клеток

Используют маркерные гены:

1. Селективные гены, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (тетрациклину и др.), гербицидам (у растений).

Трансформированные клетки способны расти на селективной питательной среде

2. Репортерные гены, кодирующие белки, наличие которых в тканях может быть легко определено.

Чаще всего используется ген зеленого флюоресцентного белка (GFP).

Достижения ГИ в области производства БАВ

Более 350 препаратов и вакцин, разработанных с помощью биотехнологий, широко используются в медицине:

антикоагулянты – участвуют в рассасывании тромбов; эффективны при лечении инфаркта миокарда

VIII фактор крови – ускоряет образование тромбов, эффективен для лечения гемофилии А

эритропоэтин – стимулирует образование эритроцитов. Применяют для лечения анемии

ростовые факторы – стимулируют дифференциацию и рост различных типов клеток

соматотропин – гормон роста, применяют при лечении карликовости

Достижения ГИ в области производства БАВ

инсулин – гормон поджелудочной железы, используется для лечения сахарного диабета

интерферон – противовирусный препарат, используется для лечения некоторых форм раковых заболеваний

лейксинны – активируют лейкоциты, применяются для лечения ран, СПИДа, раковых заболеваний

моноклональные антитела – используются в диагностике, для адресной доставки лекарств, токсинов, радиоактивных и изотопных соединений к раковым клеткам

энкефалины и эндорфины – используются для лечения психических заболеваний, улучшают настроение, память

Использование методов ГИ в медицине:

1. Генодиагностика - это комплекс методов, позволяющих обнаруживать последовательности нуклеиновой кислоты, специфичные для патологического гена, определенного вида возбудителя заболевания и др.

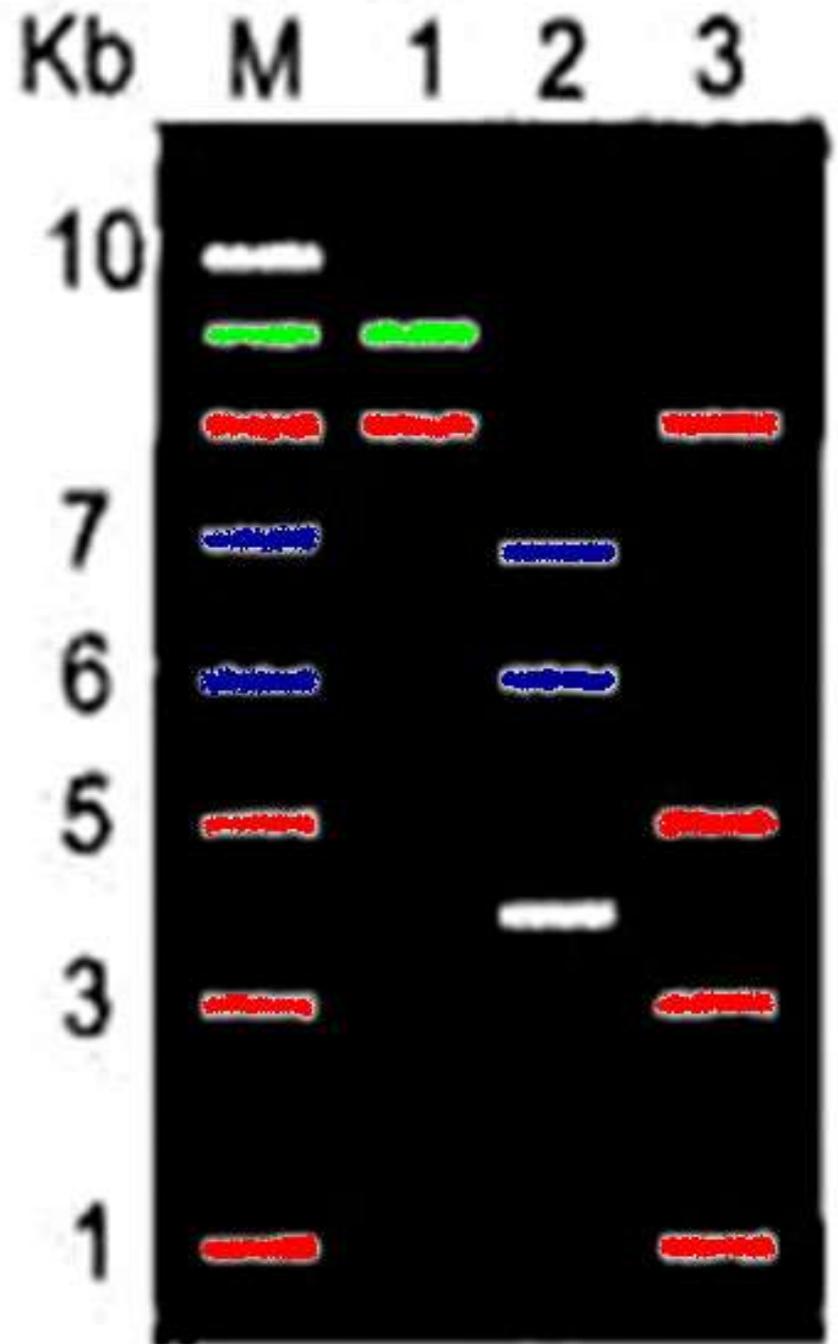
Саузерн-блот гибридизация позволяет идентифицировать рестрикционные фрагменты ДНК

Используется:

- при анализе фрагментов рестрикции
- для диагностики генных мутаций (наследственных заболеваний обмена веществ)

Фингерпринт ДНК (генная дактилоскопия)

- Выделение ДНК
- Рестрикция ДНК
- Саузерн-блот
анализ рестриктов
- Выявление
фракций
минисателлитной ДНК



Диагностические системы на технологии ДНК-микрочипов

- **ДНК-микрочипы** – небольшие пластины с нанесенными на них пробами одноцепочечных молекул ДНК или РНК с известными последовательностями (20 пн), характерными для патологических генов.
- на чип наносятся образцы ДНК пациента
- гомологичные последовательности гибридизуются с пробами на чипе
- результат фиксируется на авторадиограмме или флюорограмме

Генотерапия:

1. Введение **антисмысловых олигонуклеотидов** для связывания с мишенью (промотор гена или и-РНК) и блокирования синтеза патологического белка

2. Введение **рибозимов** – полирибонуклеотидов, обладающих ферментативной активностью к определенным и-РНК (вирусов) и разрушающих их

3. **Введение** новых генов в ядерную ДНК соматических клеток для лечения заболеваний (больным вводят их же опухолевые клетки с генами фактора некроза опухолей или с генами интерлейкинов, активирующих лимфоциты и макрофаги)

- 1. Взятие фибробластов и культивирование их на питательной среде**
- 2. Ретровирус с геном IL-12, ответственным за синтез интерлейкина-12 добавляют в питательную среду с фибробластами**
- 3. Ген IL-12 переносится в геном фибробластов**
- 4. Отбор фибробластов, продуцирующих интерлейкин-12 и образование культуры клеток**
- 5. Под действием излучения выделяют генетически измененные фибробласты**
- 6. Из этих фибробластов формируют вакцину.**
- 7. Введение вакцины в опухоль еженедельно в течение 4 недель**

Интерлейкин-12 генная терапия

