

Тема 2. ТЕХНОЛОГИИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ В ГЕНОМНОЙ СЕЛЕКЦИИ

Цель занятия: ознакомиться с основными терминами и перспективами развития генной инженерии в Республике Беларусь, а также методами выделения и идентификации специфических последовательностей ДНК.

Контрольные вопросы:

1. Понятие о генной инженерии, история ее возникновения и развития.
2. Методы выделения генов (ДНК). Идентификация специфических последовательностей.
3. ПЦР - полимеразная цепная реакция. Амплификация фрагментов ДНК.
4. Рестриктазы и их значение. Векторы и их использование для переноса генетического материала.
5. Понятие о рекомбинантных молекулах ДНК.

Теоретическая часть

Термин «биотехнология» впервые был применен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология- это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты». Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения.

Термин «биотехнология» включает составляющие «биос», «техне», «логос» греческого происхождения (от греч. «биос»- жизнь, «техне»- искусство, мастерство, умение и «логос»- понятие, учение).

Биотехнология- наука, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом генной инженерии.

Объектами биотехнологии служат многочисленные представители групп живых организмов - микроорганизмы (вирусы, бактерии, дрожжи и др.), растения, животные, а также изолированные из них клетки и субклеточные структуры (органеллы).

Основные направления биотехнологии:

- 1) Генная (генетическая) инженерия.
 - 2) Клеточная инженерия.
 - 3) Эмбриогенетическая инженерия. Основные направления эмбриогенетической инженерии: а) клонирование животных; б) получение генетических химер; в) получение трансгенных животных; г) трансплантация эмбрионов.
 - 4) Традиционная биотехнология.
 - 5) Инженерная энзимология.
- Генетическая инженерия- это наука о генетическом конструировании

новых форм биологически активных ДНК и генетически новых форм клеток, выполненных с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации, гибридизации клеток).

Генная инженерия - совокупность методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами, введения их в другие организмы.

Генетическая, или генная, инженерия - это не отдельная наука, а огромная и постоянно развивающаяся научно-технологическая платформа, вобравшая в себя самое ценное из генетики, биохимии и химической инженерии, молекулярной и клеточной биологии, микробиологии и вирусологии. Благодаря этой платформе у человечества появилась возможность обсуждать такие понятия, как генетически модифицированный организм (ГМО) и генная терапия.

Генная инженерия рождалась в 1971-1973 годах сразу в нескольких американских лабораториях. Но, пожалуй, ее инкубатором можно назвать Стэнфорд - именно там знания соединились с реактивами. Генная инженерия в широком смысле - это третье поколение инструментов для изменения наследственной информации. В отличие от первых двух - селекции, применяемой тысячелетиями, и индуцированного мутагенеза, создавшего с начала 20 века более двух тысяч разновидностей растений, - новый инструмент работает точно и быстро.

В 1972-м группа стэнфордского биохимика Пола Берга впервые сшила фрагменты ДНК разного происхождения, получив так называемую рекомбинантную ДНК: в ее состав вошли участки геномов онкогенного вируса SV40 и бактериофага, несущего галактозный оперон кишечной палочки.

Возможны два основных подхода в выделении гена:

- 1) Искусственный синтез генов.
- 2) Выделение генов из геномной ДНК.

Чаще всего эти подходы используют в различных сочетаниях с учетом конкретной ситуации. Есть гены и протеины - продукты генов, которые изучены очень хорошо, а есть такие, о которых практически ничего не известно.

Прокариотические гены выделять в общем проще, чем эукариотические. В любом случае выделение генов - сложный процесс, требующий от исследователя глубоких знаний и владения широким арсеналом современных методов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков.

Другими словами, ПЦР дает возможность избирательно амплифицировать фрагменты ДНК.

Типичная реакционная смесь:

Анализируемая ДНК. Это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плазида, хромосома или геном клетки полностью. Для грубой оценки сойдет даже суспензия клеток. ДНК служит матрицей для

многократного копирования нужного участка.

Праймеры -это искусственно синтезированные короткие фрагменты нуклеотидов (15-30 штук), комплементарные выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы.

Нуклеотиды. А точнее, дезоксинуклеотидтрифосфаты - четыре вида «кирпичиков» для строительства цепей ДНК (дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ).

ДНК-полимераза. Фермент, строящий комплементарную матричной цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3D-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий. Буфер. Раствор, содержащий различные ионы для поддержания нужного рН, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и не ионный детергент Tween-20 в сочетании с BSA (бычьим сывороточным альбумином) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки.

Все компоненты смешивают в нужном объеме в специальных пробирках для ПЦР и помещают в амплификатор (или ПЦР-циклер).

Этапы реакции:

Денатурация. Чтобы полимеразы могла работать, две цепи ДНК-матрицы нужно разъединить. Для этого реакционную смесь нагревают до 94-98°C. В таких условиях разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями параллельных цепей.

Отжиг праймеров. На этом этапе праймеры специфично присоединяются к освободившимся цепям ДНК-матрицы с разных сторон копируемого участка 3-концами друг к другу. Чтобы праймеры могли комплементарно связаться (отжечься) только с нужными участками, при их конструировании необходимо учитывать такую важную характеристику, как температура плавления. Отжиг проводят при температуре в пределах 40-72°C.

Элонгация, или синтез ДНК. Этот этап чаще проводят при температуре 72°C - оптимальной для работы Taq-полимеразы. Фермент присоединяется к комплексам праймер-матрица и, выхватывая из раствора нуклеотиды, начинает по принципу комплементарности прилаживать их к 3-концу праймера. Удлинение, или элонгация, новой цепи ДНК идет с максимальной скоростью 50-60 нуклеотидов в секунду (то есть около 3000 в минуту). Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле.

Существует несколько разновидностей и вариантов проведения ПЦР:

- 1) ПЦР с обратной транскрипцией,
- 2) ПЦР в реальном времени,
- 3) ПЦР с горячим стартом,
- 4) ступенчатая ПЦР и т.д.