

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК НАУКА ЕЕ ОСНОВЫ И МЕТОДЫ. ФЕРМЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ. ПОСТРОЕНИЕ КАРТ

4.1. Генетическая инженерия как наука. Связь генной инженерии с другими науками

Генетическая инженерия (или **генная инженерия**) – совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных **РНК** и **ДНК**, выделения **генов** из **организма** (клеток), осуществления манипуляций с **генами**, введения их в другие организмы и выращивания искусственных организмов после удаления выбранных генов из ДНК. Генетическая инженерия не является **наукой** в широком смысле, но является инструментом **биотехнологии**, используя методы таких биологических наук, как **молекулярная** и **клеточная биология**, **генетика**, **микробиология**, **вирусология**. Генетическая инженерия растений – это область биотехнологии, которая занимается изменением генетического материала растений для улучшения их свойств. Это достигается путем введения новых генов или модификации существующих генов, что позволяет создавать растения с улучшенной устойчивостью к болезням, вредителям, засухе, а также повышать урожайность и питательную ценность.

Генетическая инженерия тесно связана с такими науками как биотехнология, молекулярная и клеточная биология, цитология, генетика, микробиология, вирусология, биохимия, эмбриология, так как использует методы этих наук.

4.2. История становления генной инженерии.

Проблемы и направления генной инженерии. Меры безопасности при работе с различными биологическими объектами.

1865 г. – Грегор Мендель, скрещивая горох, описал законы наследственности.

1869 г. – Иоганн Фридрих Мишер выделил из лейкоцитов вещество нуклеин, содержащее ДНК.

1888–1909 гг. – начала формироваться генетическая терминология: появились понятия «ген», «генотип», «фенотип», «хромосома», «мутация».

1892 г. – Д. И. Ивановский впервые описал передачу болезнетворного начала посредством агентов, проходящих через бактериальные фильтры и позже названных вирусами.

1901 г. – Альбрехт Коссель обнаружил в составе небелкового компонента нуклеина – нуклеиновых кислот – азотистые основания: аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил.

1903 г. – Уолтер Саттон и Теодор Бовери предположили, что физическим субстратом менделевского наследования служат хромосомы.

1910 г. и позже – Морган, Бриджес, Стёртевант и Мёллер показали, как гены расположены на хромосомах, и развили хромосомную теорию наследственности Саттона и Бовери.

1915–1917 гг. – Фредерик Туорт и Феликс д-Эррель обнаружили вирусы бактерий – бактериофаги.

1928 г. – Фредерик Гриффит впервые наблюдал бактериальную трансформацию – горизонтальную передачу наследственной информации между бактериями.

1941 г. – Джордж Бидл и Эдвард Тейтем сформулировали гипотезу «один ген – один фермент».

1944 г. – Эвери, Маклауд и Маккарти показали, что трансформирующий фактор Гриффита представляет собой ДНК.

1952 г. – Альфред Херши и Марта Чейз подтвердили, что субстрат наследственности – ДНК.

1940–1950-е гг. – описаны конъюгация и трансдукция – процессы переноса генетического материала между бактериальными клетками с помощью плазмид и фагов.

1948 г. – Барбара Макклиток обнаружила в ДНК кукурузы транспозоны.

1953 г. – С помощью рентгеновской кристаллографии установлена структура ДНК.

1955 г. – Северо Очоа и Марианна Грюнберг-Манаго выделили [полинуклеотидфосфорилазу](#) и синтезировали с ее помощью цепь РНК.

1956 г. – Артур Корнберг выделил ДНК-полимеразу I, первый из ферментов, способных копировать ДНК, и синтезировал с ее помощью цепь ДНК.

1960 г. – Франсуа Жакоб и Жак Моно описали функциональную единицу прокариотического генома – оперон, – показав, что экспрессия генов регулируется на уровне транскрипции.

1960-е гг. – изучены структура и функции мРНК и тРНК, расшифрован генетический код.

1967 г. – Бернард Вайсс и Чарльз Ричардсон впервые показали Т4-лигазу в действии.

1969 г. – Говард Темин зафиксировал у ретровирусов обратную транскрипцию – синтез ДНК по матрице РНК.

1969 г. – изобретена ДНК-ДНК- и РНК-ДНК-гибридизация.

1970 г. – Гамильтон Смит выделил первую эндонуклеазу рестрикции II типа.

1970 г. – Мортон Мандель и Акико Хига нашли способ делать клетки бактерий компетентными – способными лучше принимать ДНК из внешней среды.

1972 г. – Кес Ай и Пит Борст применили электрофорез ДНК в агарозном геле с этидиум бромидом в качестве визуализирующего вещества.

1970-е гг. – разработаны способы введения генов в растительные клетки с помощью T1-плазмид и микроинъекций.

1972 г. – Пол Берг получил первую рекомбинантную ДНК.

1972 г. – Ананда Чакрабартти получил генетически модифицированные псевдомонады, в которых уживались несколько разных плазмид биодеградации.

1973 г. – Герберт Бойер и Стэнли Норман Коэн получили первый организм, содержащий рекомбинантную ДНК, а в **1974 г.** – первую бактерию, несущую эукариотический ген – ген рибосомной РНК лягушки.

1974 г. – Рудольф Йениш создал первое трансгенное млекопитающее (мышь).

1975 г. – созвана Асиломарская конференция, регламентировавшая работу с рекомбинантными ДНК.

1977 г. – созданы достаточно производительные методы секвенирования ДНК.

1977 г. – Филлип Шарп и Ричард Робертс обнаружили в ДНК эукариот интроны.

1978–1979 гг. – Genentech произвела первые рекомбинантные белки – соматотропин и инсулин.

1980-е гг. – разработаны способы введения генов в клетки с помощью электропорации и обстрела из генной пушки.

1982 г. – Томас Чех и Сидни Альтман открыли рибозимы.

1983 г. – Кэри Мюллис разработал метод ПЦР.

1983 г. – появилось первое трансгенное растение.

1990 г. – обнаружена РНК-интерференция, механизм которой в 1998 описали Крейг Мелло и Эндрю Файер.

1995–1996 гг. – секвенированы первые про- и эукариотические геномы.

1996 г. – сконструированы сайт-специфические нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN).

2000 г. – создан «золотой рис» – первое инженерное растение с повышенной пищевой ценностью.

2003 г. – почти полностью прочитан геном человека.

2010 г. – группа Крейга Вентера и Гамильтона Смита создала Синтию – первый организм с полностью синтетической хромосомой.

2011 г. – сконструированы сайт-специфические нуклеазы TALEN.

2011 г. – зарегистрирован первый российский генно-терапевтический препарат, «Неоваскулген» (стимулирует рост новых кровеносных сосудов).

2012 г. – в Европе одобрено первое генно-терапевтическое лекарство, Glybera (для лечения панкреатита).

2012 г. – разработана технология геномного редактирования CRISPR-Cas9.

2014 г. – получена бактерия с расширенным генетическим кодом.

2014–2017 гг. – первые попытки клинического редактирования ДНК человека инженерными нуклеазами.

2017 г. – в США одобрено первое генно-терапевтическое лекарство, Kymriah (лечение некоторых видов рака).

2020 г. – создание вакцины от ковида, получившую название «Спутник V».

Основные этапы развития, задачи генетической инженерии:

I этап связан с доказательством возможности получения рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Эти работы касаются получения гибридов между различными плазмидами. Доказана возможность создания рекомбинантных молекул с использованием исходных ДНК из различных видов и штаммов бактерий, их жизнеспособность, стабильность и функционирование.

II этап связан с началом работ по получению рекомбинантных молекул ДНК между хромосомными генами прокариот и различными плазмидами, доказательством их стабильности и жизнеспособности.

III этап – начало работ по включению в векторные молекулы ДНК (ДНК, используемые для переноса генов и способные встраиваться в генетический аппарат клетки-реципиента) генов эукариот, главным образом, животных.

Современная стратегия направлена на конструирование молекулярных генетических систем вне организма с последующим введением их живой организм, при этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические и физиологические свойства, которые при внедрении рекомбинантных ДНК в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека.

Получение растений с высокой урожайностью:

–Повышение устойчивости растений к стрессам (заморозки, засуха и др.);

–создание растений, устойчивых к гербицидам –создание культур, устойчивых к насекомым вредителям;

– получение вирусоустойчивых растений.

– Биофарминг – создание растений, способных синтезировать лекарственные белки;

– Модельные растения для изучения действия целевых генов.

Основные направления генной инженерии:

• **Медицина:**

Разработка методов генной терапии для лечения наследственных и приобретенных заболеваний, создание новых вакцин, производство белков-лекарств.

• **Сельское хозяйство:**

Создание генетически модифицированных (ГМ) растений и животных, устойчивых к вредителям, болезням и неблагоприятным условиям, повышение питательной ценности продуктов.

• **Промышленность:**

Разработка микроорганизмов для производства биологически активных веществ, ферментов, биотоплива и других продуктов.

• **Экология:**

Создание технологий для очистки окружающей среды от загрязнений, разработка биоразлагаемых материалов.

Основные проблемы генной инженерии:

• **Этические и социальные вопросы:**

Споры о безопасности ГМО, правомерности вмешательства в геном человека, возможности использования генетической информации для дискриминации.

- **Риски для здоровья:**

Возможность возникновения побочных эффектов при генной терапии, развитие устойчивости к антибиотикам у бактерий, непредсказуемые последствия для организма при введении новых генов.

- **Экологические риски:**

Потенциальная опасность для биоразнообразия при попадании ГМО в дикую природу, возможность неконтролируемого распространения генетически модифицированных организмов.

- **Экономические аспекты:**

Высокая стоимость исследований и разработки, доступность генной терапии только для обеспеченных слоев населения.

Генная инженерия является мощным инструментом, способным принести огромную пользу человечеству. Однако, необходимо тщательно взвешивать все риски и учитывать возможные негативные последствия, чтобы обеспечить ее безопасное и ответственное использование.

4.3. Ферменты генетической инженерии их классификация и функции (нуклеазы, лигазы, полимеразы, рестриктазы).

Типы нуклеаз по способу их действия

Суть генной инженерии сводится к следующему: биологи, зная, какой ген за что отвечает, выделяют его из ДНК одного организма и встраивают в ДНК другого. В результате можно заставить клетку синтезировать новые белки, что придает организму новые свойства. Мы знаем, что обмен генетической информацией происходит и в природе, но только между особями одного вида. Случаи же скрещивания особей разных видов (например, собаки и волка, пшеницы и ячменя и т. д.) являются исключением. Перенос генов от родителей к потомкам внутри одного вида называется вертикальным. Так как возникающие при этом особи, как правило, очень похожи на родителей, в природе генетический аппарат обладает высокой точностью и обеспечивает постоянство каждого вида. Всё это стало возможно благодаря ферментам – образованиям на основе белка, отвечающим за организацию работы клетки. Рассмотрим следующие виды ферментов.

Нуклеазы – это большая группа ферментов, которые катализируют гидролиз (расщепление) фосфодиэфирных связей в нуклеиновых кислотах (ДНК и РНК), превращая их в моно- и олигонуклеотиды. Различают два типа нуклеаз:

- экзонуклеазы удаляют моносахариды с конца полинуклеотидной цепи;
- эндонуклеазы разрывают внутренние связи в молекуле (эндонуклеазы рестрикции).

Основные функции нуклеаз в генной инженерии:

- **Направленное разрезание ДНК:**

Нуклеазы, такие как рестриктазы, TALENs и CRISPR-Cas9, могут быть нацелены на определенные последовательности ДНК, разрезая её в этих местах.

- **Геномное редактирование:**

Внесение двуцепочечных разрывов в ДНК инициирует клеточные механизмы репарации. Неправильное восстановление может привести к вставкам или делециям, что позволяет «выключить» ген, или же используется гомологичная рекомбинация для вставки новых участков ДНК, что и является основой геномного редактирования.

- **Получение фрагментов ДНК:**

Естественные или искусственные рестриктазы используются для разрезания ДНК на мелкие фрагменты, которые затем могут быть собраны в рекомбинантные молекулы ДНК.

- **Использование в процессах репарации:**

Нуклеазы также используются в сочетании с другими ферментами (например, ДНК-полимеразами) для внесения радиоактивных меток или для других манипуляций с ДНК.

Лигазы – ферменты (катализаторы), которые соединяют две молекулы, образуя новую химическую связь и обычно расщепляя небольшую химическую группу из одной из молекул для получения энергии, необходимой для реакции.

Функцией лигаз в клетке является репарация однонитевых разрывов, возникающих в ДНК в процессе репликации. Эти ферменты также могут соединять между собой различные фрагменты ДНК.

Применение лигаз в генетической инженерии:

- **Рекомбинантное клонирование.** Лигазы соединяют фрагменты ДНК (например, вставку и плазмиду) для создания рекомбинантных ДНК-молекул.

- **Ремонт ДНК:** Лигазы участвуют в естественных процессах репарации (восстановления) и репликации (удвоения) ДНК, исправляя разрывы в цепях.

- **Создание адаптеров и линкеров.** Лигазы могут использоваться для присоединения синтетических олигонуклеотидов (адаптеров или линкеров) к концам ДНК-фрагментов, что позволяет соединять молекулы с несовместимыми концами.

Полимеразы – фермент, катализирующий синтез полимеров нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) по матрице, то есть копирующий существующую цепь нуклеиновой кислоты для создания новой.

Виды полимераз:

- **ДНК-полимеразы** синтезируют ДНК, копируя одну из цепей родительской ДНК.
- **РНК-зависимые ДНК-полимеразы (обратные транскриптазы):** способны считывать информацию с РНК-шаблона, что позволяет создавать ДНК на основе РНК-матрицы.

- **РНК-полимеразы** синтезируют РНК, используя в качестве шаблона ДНК. Они формируют различные типы РНК, включая матричную РНК (мРНК), которая служит шаблоном для синтеза белков.

Основные функции в генетической инженерии:

- **Аmplификация ДНК:** в технологии **полимеразной цепной реакции** (ПЦР) ДНК-полимеразы используются для многократного увеличения количества определённых фрагментов ДНК из образца.

- **Клонирование генов:** полимеразы играют роль в создании точных копий определённых генов для их дальнейшего изучения и использования.

- **Внесение мутаций:** с помощью полимераз можно целенаправленно изменять последовательность нуклеотидов в ДНК, создавая мутации.

- **Сращивание фрагментов ДНК:** полимеразы участвуют в соединении различных фрагментов ДНК для создания новых молекул или рекомбинантов.

- **Диагностика:** используются для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний путем анализа ДНК.

Рестриктазы – фермент, который разрезает молекулу ДНК в строго определенных местах, называемых сайтами рестрикции.

1. **Специфическое расщепление ДНК.** Рестриктазы способны распознавать и разрезать ДНК только по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым сайтами рестрикции. Это позволяет получать фрагменты ДНК заданной длины и с определенными концами.

2. **Создание «липких» и «тупых» концов.** В зависимости от типа рестриктазы, расщепление может приводить к образованию либо «липких» концов (одноцепочечных выступов), либо «тупых» концов (ровных разрывов).

- **«Липкие» концы.** Комплементарные одноцепочечные участки могут быть легко сшиты другими молекулами ДНК, что очень важно для клонирования.

- **«Тупые» концы** подходят для соединения с любыми фрагментами ДНК, поскольку не имеют комплементарных выступов.

3. Вырезание и встраивание фрагментов ДНК. Благодаря способности разрезать ДНК в нужных местах, рестриктазы позволяют извлекать нужные гены или другие участки ДНК из общей молекулы. Эти фрагменты затем могут быть введены в векторы для дальнейшего клонирования или модификации.

4. Создание рекомбинантных ДНК. В сочетании с ДНК-лигазами, рестриктазы являются ключевыми инструментами для создания рекомбинантных ДНК – молекул, состоящих из фрагментов ДНК из разных источников.

Пример использования: Фермент EcoRI, выделенный из бактерии *E. coli*, узнает последовательность 5'-GAATTC-3' и расщепляет обе цепи ДНК между G и A, формируя «липкие» концы. Эти выступы затем могут соединиться с комплементарными выступами других ДНК-фрагментов, что делает рестриктазы незаменимыми в таких процессах, как создание генно-инженерных конструкций.

4.4. Построение генетических карт

Построение карт в генетической инженерии – это процесс генетического картирования, который включает создание схемы взаимного расположения генов, регуляторных элементов и генетических маркеров на хромосоме или группе сцепления. Эти карты позволяют определить относительные расстояния между участками ДНК и используются для определения ассоциаций «маркер-признак» при практическом использовании генетических исследований.

Этапы построения генетических карт.

1. Анализ частоты кроссинговера:

Основой для построения генетических карт служат наблюдения за частотой кроссинговера (обмена участками хромосом) между различными генами. Чем чаще происходит обмен, тем большее расстояние между генами на хромосоме.

2. Определение групп сцепления.

Генетические исследования позволяют установить группы сцепления – наборы генов, которые наследуются вместе.

3. Идентификация маркеров.

Использование генетических маркеров помогает определить точное расположение генов и других элементов на карте.

4. Создание схемы.

На основе полученных данных создается графическая схема, отображающая последовательность и относительные расстояния между генами и маркерами.

Значение построения генетических карт.

Генетические карты имеют большое значение для практического использования установленных связей между определенными генами и признаками организма.

1. Управление генами. Знание расположения генов на хромосоме помогает в дальнейшем манипулировании генами в генетической инженерии, например, при переносе генов в другие организмы.

2. Понимание наследственности. Картирование помогает лучше понять закономерности наследования признаков и структуру хромосом.