

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ



ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ - это область молекулярной и клеточной генетики, связанная с целенаправленным созданием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке-хозяине и синтезировать конечные продукты обмена. *или* генная инженерия - конструирование функционально активных генетических структур в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. В настоящее время под генной инженерией подразумевают технологию рекомбинантных ДНК - совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой.

- 1960г. С. Очоа и А. Корнберг выделили белки, которые могут «сшивать» или «склеивать» нуклеотиды в полимерные цепочки, синтезируя тем самым макромолекулы ДНК. Один из таких ферментов был выделен из кишечной палочки и назван ДНК-полимеразой.
- 1962г. Х. Корана синтезировал химическим способом функциональный ген;
- 1969г. синтезирован фермент эндонуклеаза
- 1972 г. В СССР в промышленном масштабе получена обратная транскриптаза (ревертаза)
- 1973г. Бойер и Коэн разработали технологию рекомбинантной ДНК. (в 1973 г. ввели термин «трансгеноз» – перенос выделенного чужеродного генетического материала из одного организма в геном другого неродственного организма);

1974г. в Кембриджском университете (СШАа) Рудольф Яниш путем микроинъекции ввел обезьяний ДНК вирус SV 40 в эмбрион мыши.

1978г. фирма Genen-tech производила в больших масштабах инсулин посредством E.coli.

1980г. Американский ученый Жорж Гордон получил с помощью метода генной инженерии трансгенных мышей (путем микроинъекционного введения ДНК в пронуклеус зиготы).

1981г. В Институте биоорганической химии имени М.М.Шемякина, под руководством академика Ю.А.Овчинникова с помощью генмодифицированных бактерий получен гормон роста человека соматотропин.

1982 - поступил в продажу человеческий инсулин, продуцируемый клетками кишечной палочки; разрешена к применению в Европейских странах вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК; разработаны фактор некротизации опухоли, интерлейкин-2, соматотропный гормон человека и др;

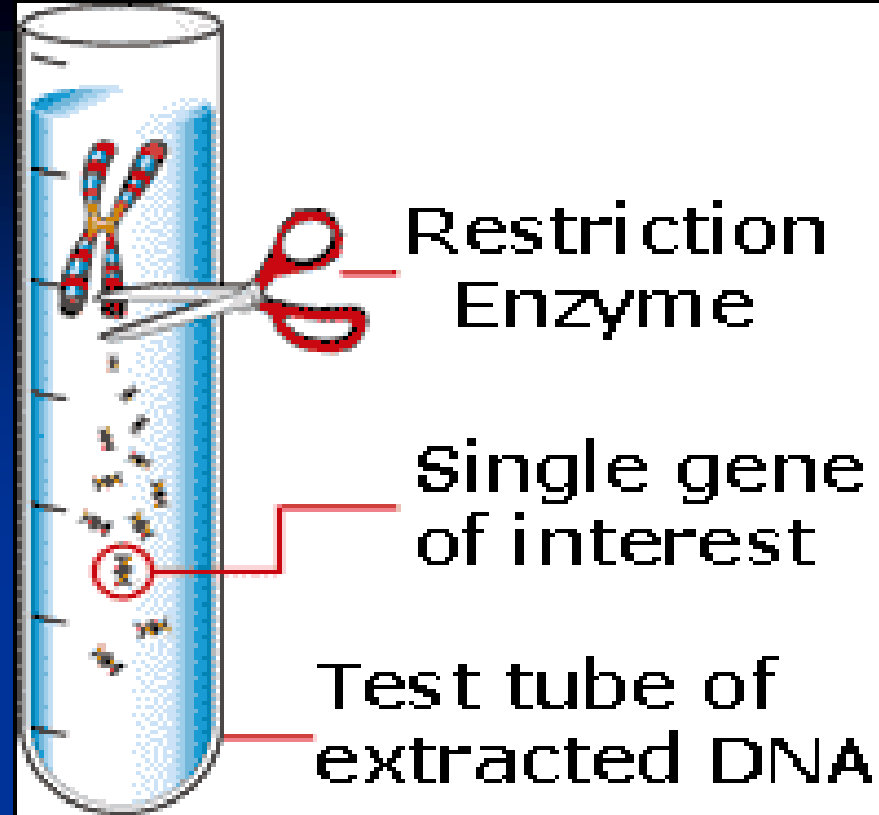
1983г. Получение трансгенных растений с помощью гибридных Ti-плазмид.

1986г. С использованием генной инженерии созданы вакцина против гепатита В и лекарственный препарат против вирусных инфекций - интерферон.

1986-К. Мюллис разработал метод полимеразной цепной реакции (ПЦР);

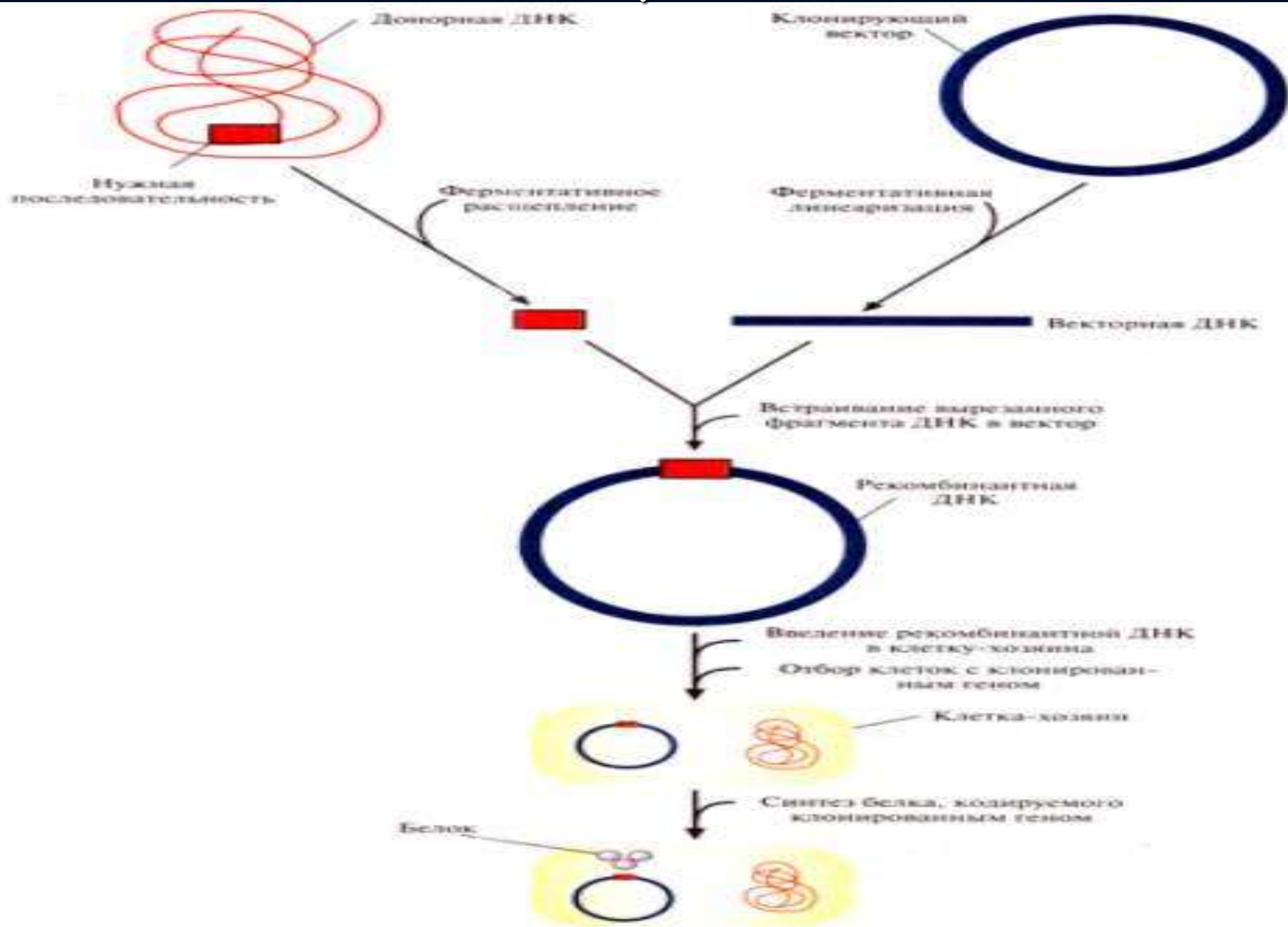
С помощью рестриктаз, которые рассекают молекулу ДНК по строго определенным местам (там где есть специфические нуклеотидные последовательности в ДНК) можно вырезать отдельные гены из одного организма, посредством вектора и с помощью ДНК-лигаз полученные фрагменты ДНК (рестриктазные фрагменты ДНК) несущие нужный ген и, имеющие комплементарные (липкие) концы, сшить в единое целое и перенести в другой организм и т.о. получается генетически активная рекомбинантная молекула ДНК, которая затем трансформируется в любой другой организм, где экспрессируется и клетка начинает синтезировать продукт (соответственно появляется новый признак), кодируемый введенным геном.

Организм, несущий новый признак, благодаря введению (трансформированию) в него новой генетической информации в виде рекомбинантной (гибридной) молекулы ДНК называется ТРАНСГЕННЫМ ОРГАНИЗМОМ (трансформированным).



ЭТАПЫ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

1. Из организма – донора нужных генов – экстрагируют нативную ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (разрезают рестриктазами) и соединяют (лигируют лигазами) с другой ДНК (вектор для клонирования) с образованием новой рекомбинантной молекулы (конструкция «клонлирующий вектор-встроенная ДНК»).
2. Эту конструкцию вводят в клетку реципиента, где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией.
3. Идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки)
4. Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками –хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

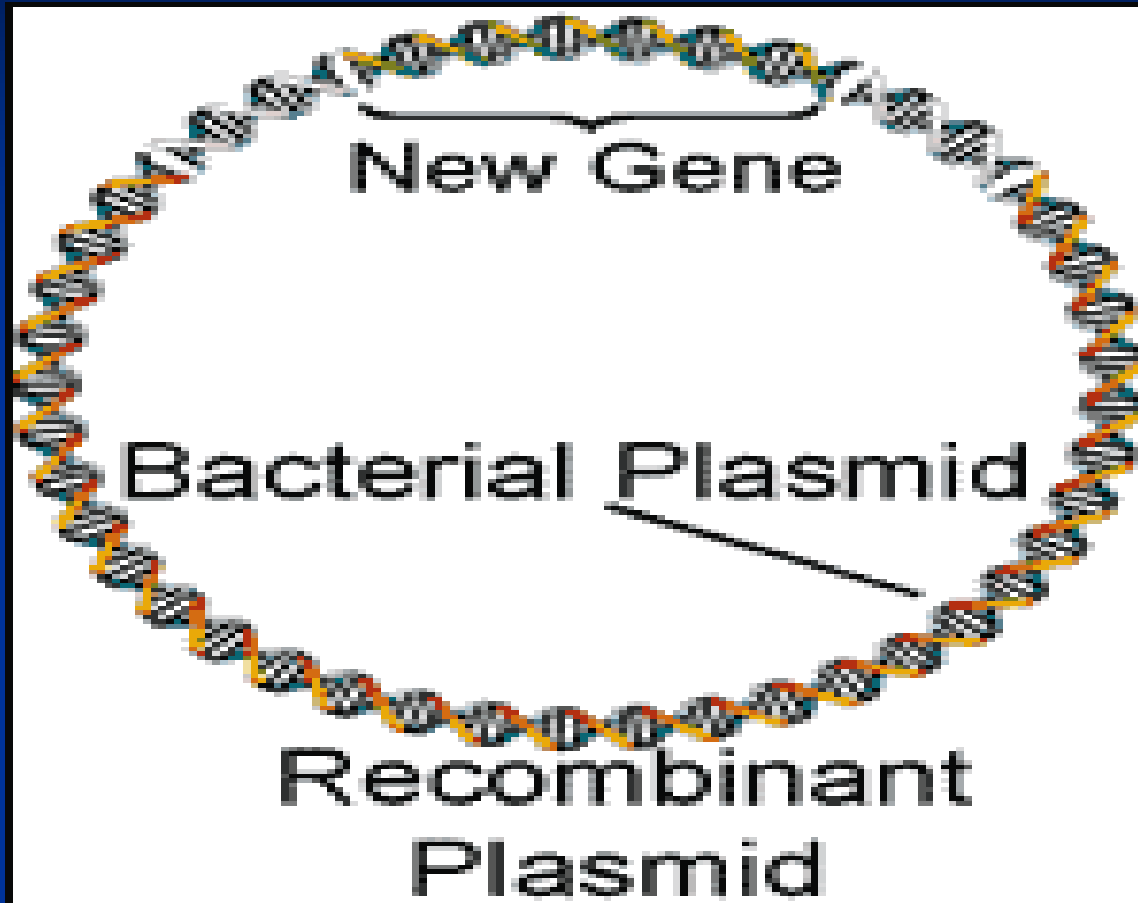


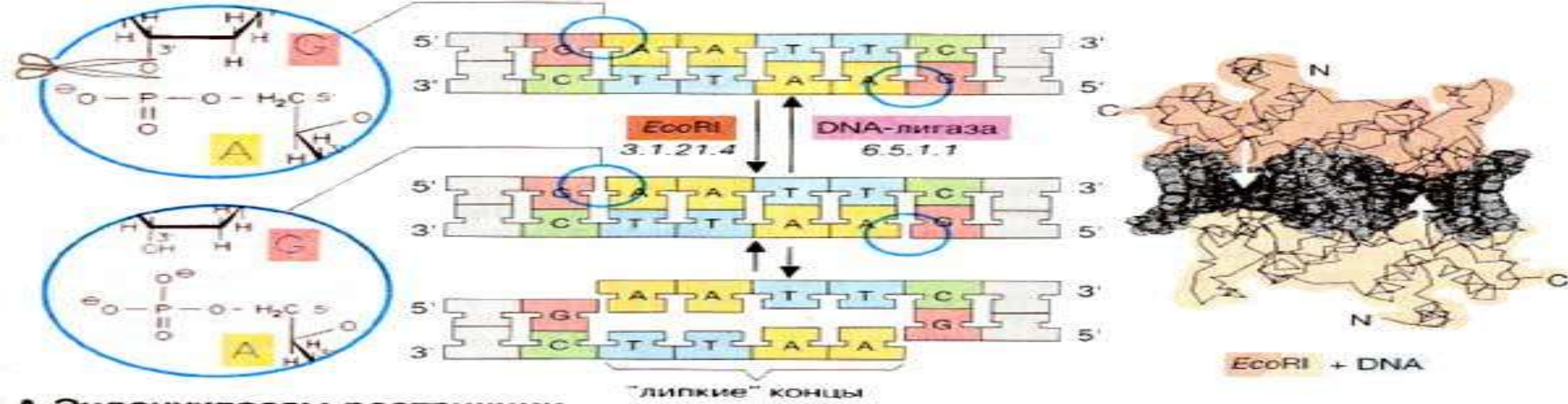
молекула ДНК, опосредованно переносимая введенным

ген в геном реципиента называется ВЕКТОРОМ.

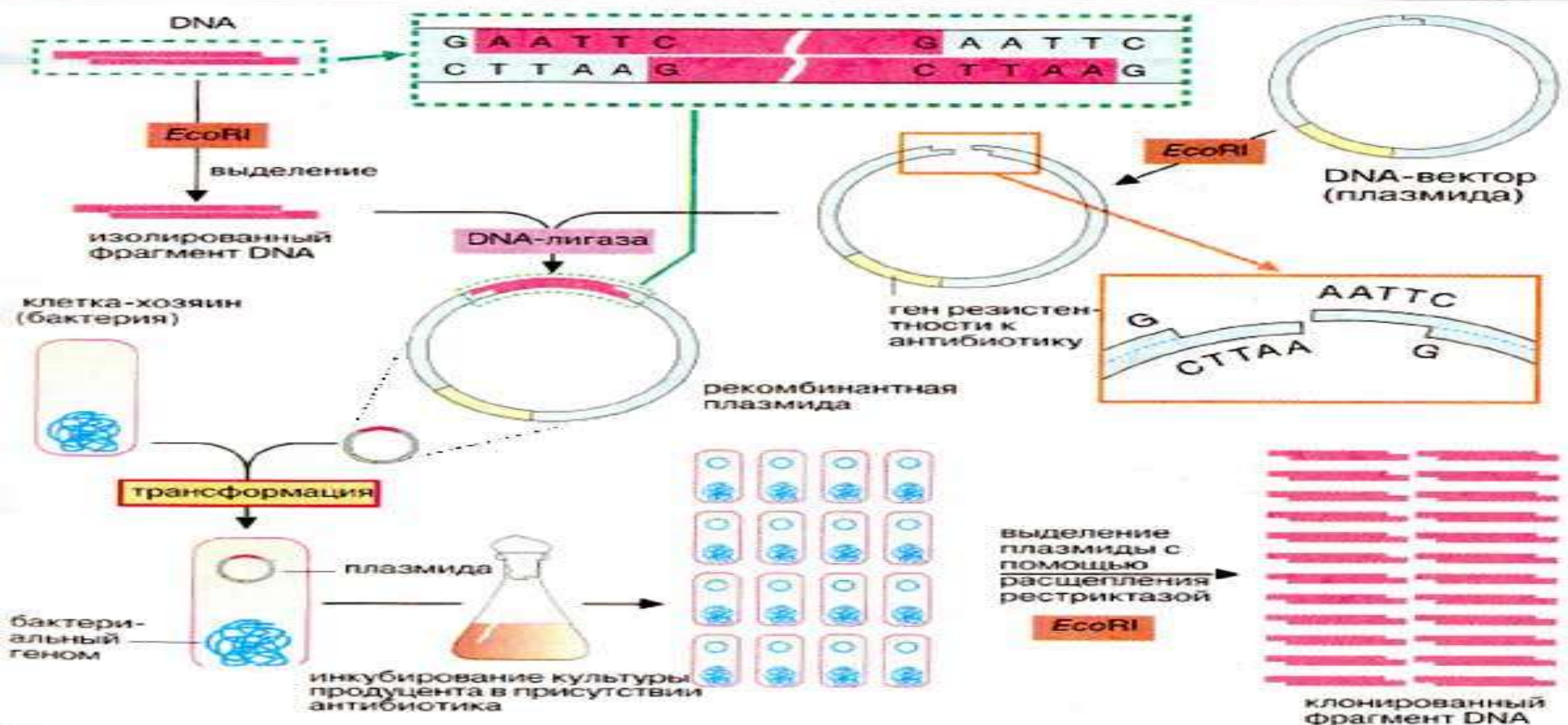
Векторы должны отвечать следующим требованиям:

- самореплицироваться, передавать наследственную информацию и, в дальнейшем, не терять способности к репликации
- векторы должны содержать маркерные гены (например гены устойчивости к антибиотикам), благодаря которым в дальнейшем возможно селектирование трансформированных клеток
- векторы должны содержать сайты рестрикции, «распознаваемые» рестриктазами
- введенный в вектор чужеродный ген не должен искажать и изменять функции вектора, в свою очередь введенный в вектор ген не должен изменять своей функциональности.
- размер и объем вектора не должен быть большим

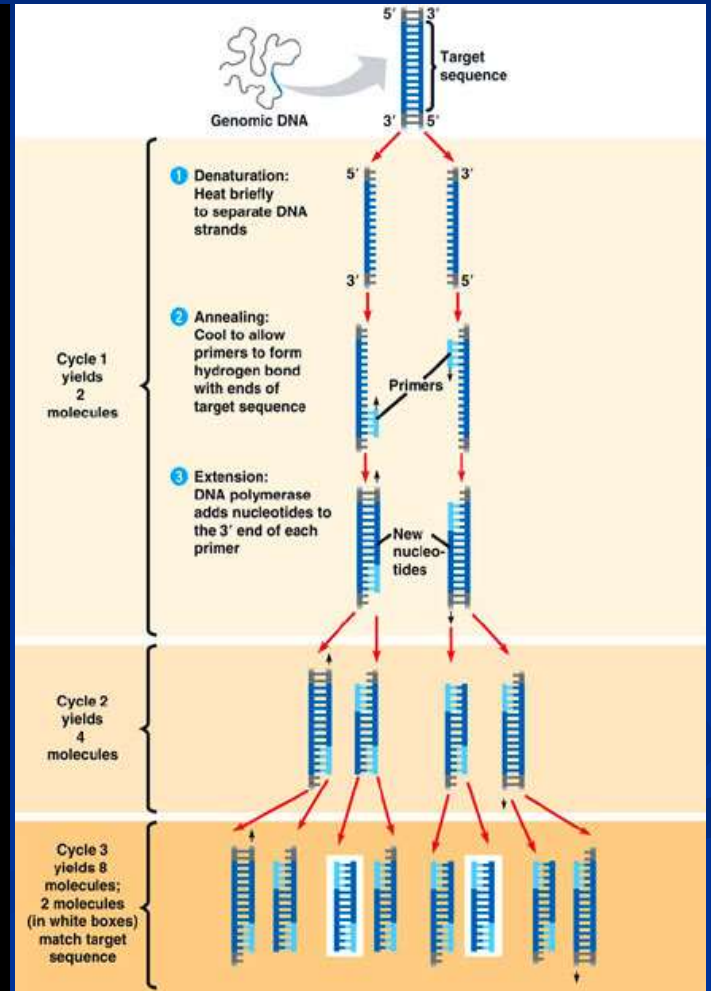
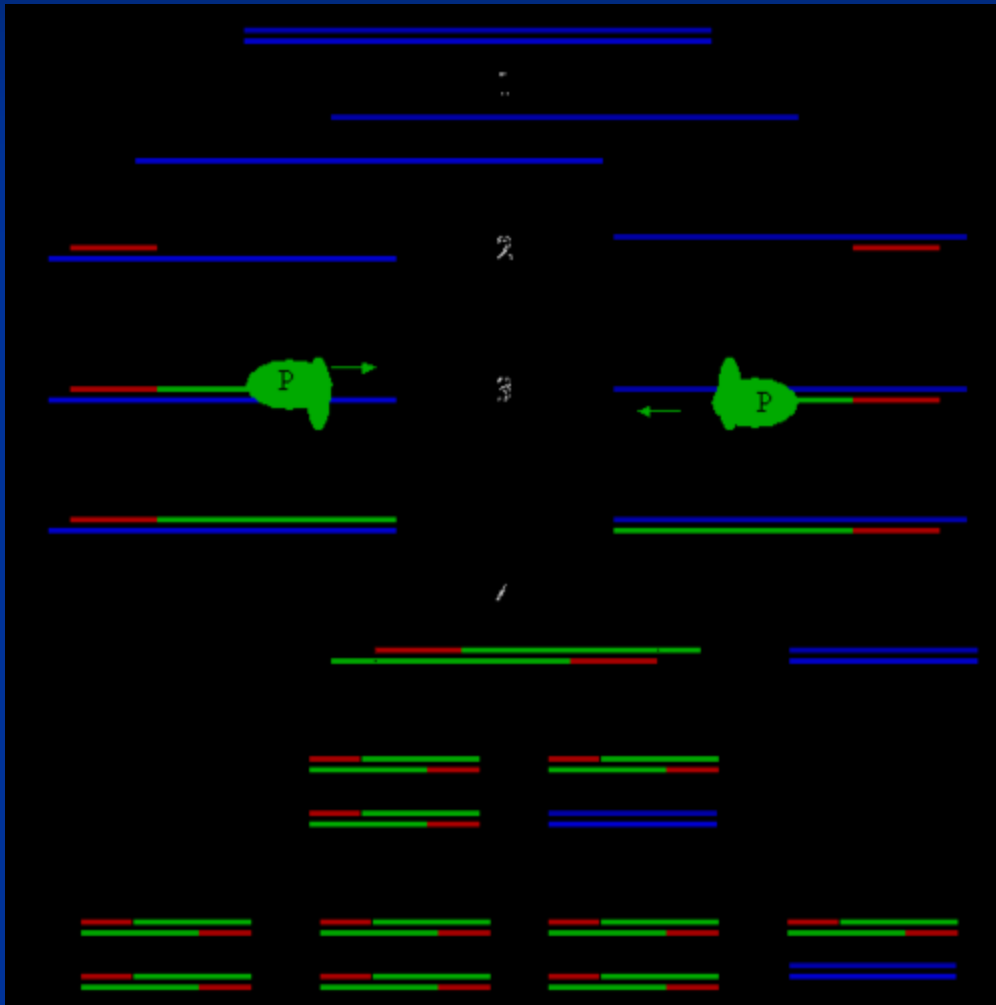




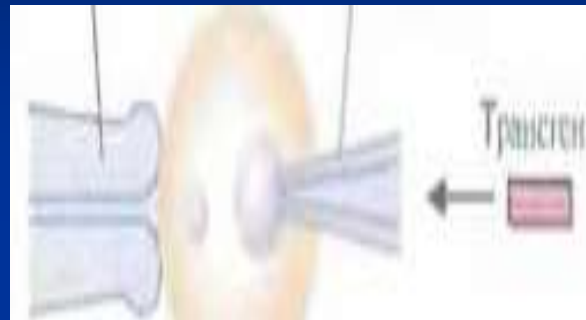
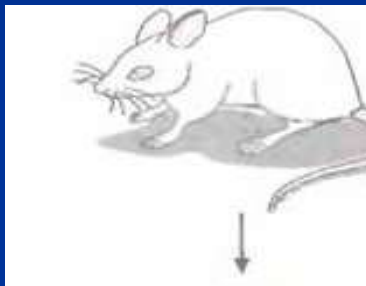
А. Эндонуклеазы рестрикции



Б. Клонирование ДНК

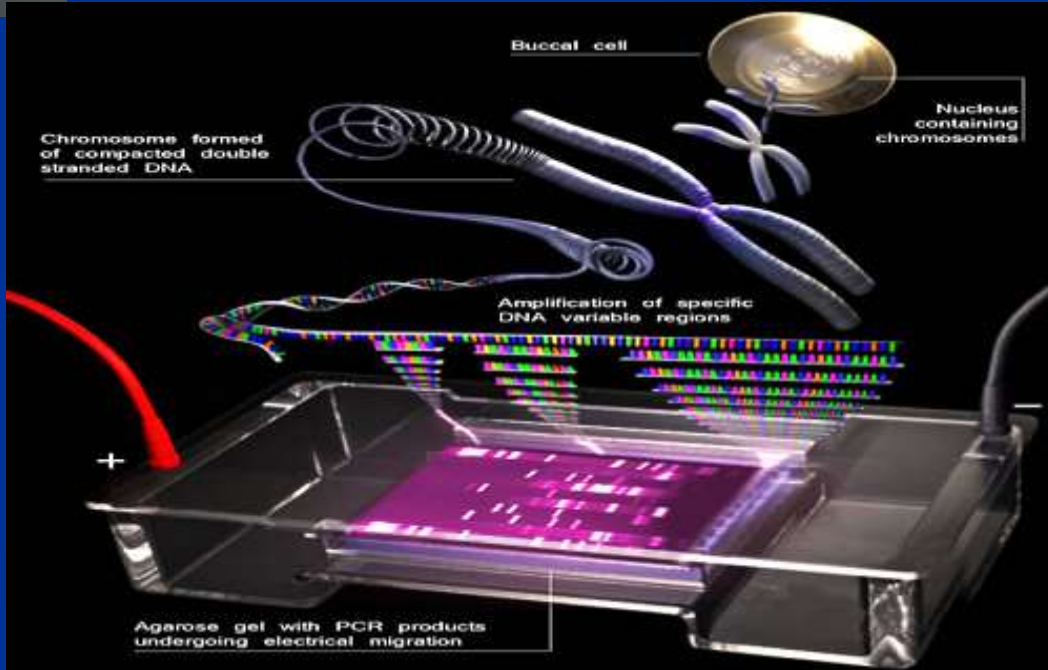
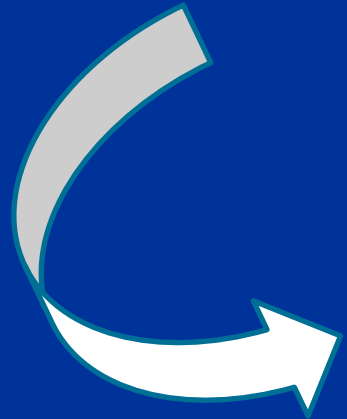


Метод прямой трансформации (микроинъекции)





Амплификатор



- ***Ген-инженерным методом были получены:***
- Инсулин (гормон, регулирующий уровень сахара в крови, синтезируется клетками поджелудочной железы). Из 1 л суспензии культивируемых клеток *E.coli*, содержащих ген инсулина, выделенного из клеток поджелудочной железы человека можно получить 200 мг инсулина, что соответствует количеству инсулина выделенного из поджелудочной железы 8-10 коров.
- Соматотропин – гормон роста, образующийся в клетках гипофиза. 1 л суспензии культивируемой рекомбинантной *E.coli* (с введенным геном соматотропина человека) продуцирует 100 мг гормона.
- Интерферон, интерлейкин и др. Вещества, активирующие иммунную систему и применяемые для лечения рака и вирусных заболеваний (продуценты данных продуктов – рекомбинантные *E.coli*, *Pseudomonas*).