**Казахский национальный университет им. аль-Фараби**

**Факультет биологии и биотехнологии**

**Кафедра молекулярной биологии и генетики**

**Образовательная программа по специальности «6B05105 - Генетика»**

**Лабораторные занятия по дисциплине**

**GOB 4307 - ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**для студентов 3 курса**

**Алматы**

**Лабораторное занятие 1**

**Техника безопасной работы в лаборатории.**

**Цель занятия:** ознакомление с техникой безопасной работы в лаборатории.

***Цель дисциплины:*** ознакомить студента с техникой безопасной работы в лаборатории.

- познакомить студентов с методами клеточной и генной инженерии (культивированием клеток in vitro и гибридизацией соматических клеток; выделением генов и конструированием рекомбинантных ДНК, введением генов в бактериальные клетки);

- дать теоретические знания об использовании модифицированных клеток для

получения биологически активных веществ и различных продуктов, иммунологических материалов;

- обеспечить приобретение студентами практических навыков применения в

животноводстве биотехнологических способов селекции.

- Техника безопасной работы в лаборатории.

**Лабораторное занятие 2**

**Типы питательных сред.**

Биотехноло́гия (от гр. βίος — «жизнь», τέχνη — «искусство, мастерство, способность», λόγος — «слово, смысл, мысль, понятие») — дисциплина, 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.

Биотехнологией часто называют применение генной инженерии в XX—XXI веках, но термин относится и к более широкому комплексу процессов модификации биологических организмов для обеспечения потребностей человека, начиная с модификации растений и животных путём искусственного отбора и гибридизации. С помощью современных методов традиционные биотехнологические производства получили возможность улучшить качество пищевых продуктов и увеличить продуктивность живых организмов.

До 1971 года термин «биотехнология» использовался, большей частью, в пищевой промышленности и сельском хозяйстве. С 1970 года учёные используют термин в применении к лабораторным методам, таким, как использование рекомбинантной ДНК и культур клеток, выращиваемых in vitro.Основные направления биотехнологии:

1) Генная инженерия. Это область молекулярной генетики, которая разрабатывает методы конструирования новых генетических программ.

2) Клеточная инженерия. Получение клеток нового типа, гибридомная технология, конструирование генетически новых объектов путем клеточной гибридизации и введения чужеродного генетического материала.

3) Эмбриогенетическая инженерия. Это активная перестройка генома животных путем вмешательства в их развитие на ранних этапах онтогенеза. Перестройка генома – это реконструкция эмбрионов путем клонирования, слияния или инъекции в их ядра чужеродной ДНК.

4) Традиционная биотехнология. Использование анаэробных процессов для

производства вина, силоса, квашения, получение молочнокислых продуктов, спирта и т.д.

5) Инженерная энзимология. Применение микробиологических, физикохимических методов для производства ферментов – специфических катализаторов белковой природы.

**Лабораторное занятие 3**

**Способ приготовления питательной среды Мурасиге и Скуга.**

Биотехнологические подходы, базирующиеся на возможностях культивирования растительных клеток в условиях in vitro, предлагают новый инструмент расширения генетической вариабельности, что позволяет сочетать классические и инновационные методы в селекции растений (Rai et al., 2011). С разработкой техники регенерации растений из каллусной ткани появилась возможность получать новые формы, отличающиеся по различным признакам от исходных сортов (Скапцов и др., 2015). Такое разнообразие среди клеточных линий и растений-регенерантов получило название «сомаклоны», а само явление «сомаклональная изменчивость» (Larkin, Scowcroft, 1981). К настоящему моменту доказано, что сомаклональные варианты могут существовать как генетически стабильные формы и передавать по наследству определенные признаки (Hussain et al., 2001). Высокая степень изменчивости растений-регенерантов, имеющая важное селекционное значение, установлена у пшеницы (Никитина и др., 2013а, б; 2014), кукурузы (Долгих, 2005), проса (Баер и др., 2007) и др. культур. Сомаклональная изменчивость выявлена и у генетически модифицированных (трансгенных) растений. В ряде случаев такие растения обнаруживают изменения в фенотипе, не свя занные с экспрессией перенесенных генов. Причинами дополнительной изменчивости могут быть стрессы, связанные с методикой проведения трансформации, встраивание переносимых генов, а также других

нецелевых последовательностей ДНК (вставочный мутагенез) (Labra et al., 2001). Для использования сомаклонов в создании сортов необходима информация о спектре и размахе вариабельности измененных хозяйственно-ценных признаков.

**Лабораторное занятие 4**

**Правильное использование дозаторов.**

Получение гаплоидных растений из изолированных пыльников может идти по двум направлениям: прямая регенерация соматических зародышей и косвенная - через каллусогенез. В первом случае внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен формируются проэмбриональные структуры, которые при определенных условиях культивирования развиваются в эмбриоиды, дающие начало гаплоидным растениям. Эмбриоиды - зародышеподобные структуры. Во втором - пыльца делится, но клетки, возникшие в результате делений, быстро увеличиваются в размерах и, разрывая оболочку пыльцевого зерна, образуют каллус. В результате дальнейшего морфогенеза из этих каллусных клеток регенерируют растения. При этом растения могут иметь разную степень плоидности - ди-, поли-, анеуплоидные. Последние часто стерильны, но после обработки растений колхицином происходит удвоение числа хромосом, в результате чего можно получить фертильные гомозиготы.

Культура пыльцы представляет собой культивирование микроспор, освобожденных от соматических тканей пыльника, в жидкой среде. Пыльцу от соматической ткани пыльника отделяют несколькими способами:

Спонтанное высвобождение (пассивный способ) - пыльники определенным образом обрабатываются, инкубируются на жидкой среде, где лопаются, а пыльца высвобождается и всплывает наверх.

Гомогенизация и фильтрация. Пыльники, культивируемые в жидкой среде, разрушают, надрезая скальпелем и осторожно надавливая, затем фильтруют (поры фильтра 50 -100 мкм) и центрифугируют. Осадок промывают и суспендируют в жидкой среде.

Разрезание - разрезают стенку пыльника. Этот метод применяется редко, так как трудоемок и длителен.

Пыльцевой эмбриогенез обусловлен функциональной и структурной детерминацией пыльцевого ядра и клеток гаметофита, поэтому в развитии могут принимать участие: - лишь вегетативные клетки, - лишь генеративные клетки, - оба типа клеток, если вегетативные и генеративные клетки сольются, при этом образуется диплоидный эмбриоид. Для пасленовых характерен только эмбриогенез, для злаковых - образование как каллусов, так и эмбриоидов. Среди гаплоидов много альбиносов (особенно у злаков). Наибольший выход регенерантов-альбиносов в культуре пыльцы, что вызвано, по-видимому, нарушениями развития пыльцы. Причина не установлена, возможно, это результат мутаций в микроспорах при культивировании.

**Лабораторное занятие 5**

**Культура тканей растений in vitro.**

Клональным микроразмножением называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения идентичные исходному. В основе получения таких растений лежит способность соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития, т.е. свойство тотипотентности. Метод клонального микроразмножения получает все более широкое распространение во всем мире. В большинстве стран эта технология приобрела коммерческий характер.***Этапы и методы клонального микроразмножения***

Саженцы бананов переносятся в субстат с вермикомпостом из питательной среды. Этот процесс сделан для акклиматизации саженцев к почве, поскольку они были ранее выращены в стерильной питательной среде при высокой влажности. После выращивания в течение нескольких дней саженцы переносят на поле.

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа:

- выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;

- собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов;

- укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°, +10 °C);

- выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

**Лабораторное занятие 6**

**Сохранение ценных видов сельскохозяйственных растений в криобанках.**

Технологически процесс криоконсервации многоэтапен. Первый этап — стадия культивирования перед криоконсервированием. От состава среды культивирования в ряде случаев зависит криоустойчивость организмов. Изменение соотношения углерода и азота в среде, введение в среду культивирования жирных кислот, солей кальция либо других компонентов меняет криочувствительность организмов, выращенных в этих условиях. В связи с этим было предложено предварительное культивирование клеток растений в определенных условиях.

Отмечено, положительное влияние на криоустойчивость как краткой инкубации клеток при пониженной температуре, так и закаливания — естественной подготовки морозоустойчивых клеток. Закаливание суспензий клеток проводят, постепенно снижая температуру культивирования и одновременно увеличивая концентрацию сахарозы в среде, затем добавляют и разные криопротекторы. Однако способность к закаливанию генетически детерминирована.

Другой физиологический подход подготовки к криосохранению основан на снижении водного потенциала среды за счет добавления в нее осмотически активных веществ — криопротекторов. Среди всех известных криопротекторов выделяются такие легко проникающие в клетки вещества, как диметилсульфоксид (ДМСО, 5—10%), глицерин (10—20%), а также непроникающие высокомолекулярные — поливинил пиролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Криопротекторами могут также служить сахароза, трегалоза и смеси этих растворов. Кроме того, предварительное культивирование с маннитом и сорбитом (в концентрации 2—6%) способствовало уменьшению растяжения клеток. Положительный эффект данной подготовки к криосохранению связан со снижением оводненности клеток.

Следующий способ подготовки связан с физиологической ролью некоторых эндогенных аминокислот при различных стрессах, обусловленных водным дефицитом. В первую очередь, это пролин, чье значение для связывания воды в клетках растений широко известно. Для этих целей применяют также аланин, аспарагин, серин, глицин, а также у-аминомасляную кислоту.

Как известно, образование стрессовых белков, обуславливающих устойчивость к низким температурам, регулируется фитогормоном АБК. В результате воздействия экзогенной АБК возможно увеличение морозоустойчивости и формирование защитных механизмов у растительных объектов, что является существенным для целей криоконсервирования.

При наблюдении за клетками под криомикроскопом четко видно образование внутриклеточного льда, находящееся в прямой зависимости от степени переохлаждения, от скорости замораживания, от наличия или отсутствия центров инициации кристаллизации раствора, окружающего клетки.

Большое значение при криосохранении имеет правильно подобранный режим замораживания. Так при криосохранении клеток, тканей растений и микроорганизмов целесообразно применять программное замораживание с инициацией кристаллизации и скоростью охлаждения на первом этапе замораживания 0,25—1,0°С/мин (до -40°С). На втором этапе увеличивать скорость до 9—10°С/мин и около -60°С быстро погружать в жидкий азот.

Эту работу проводят на специальном оборудовании, обеспечивающем программное замораживание. Такие приборы выпускает специальное конструкторское технологическое бюро с опытным производством при Институте проблем криобиологии и криомедицины (г. Харьков).

Этап удаления криопротекторов и рекультивирование требует особых предосторожностей, так как выжившие клетки перенесли сильнейший стресс и частично повреждены. Для сохранения таких клеток необходимо свести к минимуму все воздействия, которые могут дополнительно повредить клетки и плазмалемму. Однако криопротекторы должны быть удалены. Был предложен физиологичный, щадящий способ для интенсификации процесса рекультивирования. Этот способ основан на диффузии криопротекторов из клеток в жидкую среду после высева суспензии клеток на фильтры, расположенные на поверхности раствора. Такая система позволяет менять раствор, не тревожа клетки, чтобы избежать дополнительного стресса, и интенсифицировать рекультивирование.

Для определения жизнеспособности клеток после оттаивания применяют наиболее простой, быстрый и вполне удовлетворительный способ — окраска витальным красителем (0,1% феносафранином или 0,25% раствором синьки Эванса), в результате которой мертвые клетки окрашиваются, а живые нет. Окончательным критерием жизнеспособности клеток, безусловно, служит четкое возобновление роста и деления клеток при рекультивации на искусственных питательных средах после оттаивания.

Таким образом, если к моменту глубокого замораживания клеточные штаммы сохраняли способность к регенерации, то и после криосохранения также имеется возможность регенерировать эти растения независимо от сроков хранения в жидком азоте, т.к. восстанавливать рост клеточных культур можно спустя годы, а эмбриогенные и морфогенетические потенции в результате криосохранения не изменяются. Конечно, если режим хранения не был нарушен, т.е. температура никогда не превышала -140°С, а все этапы криоконсервирования были достаточно оптимизированы. Следовательно, криосохранение является фактически консервацией в состоянии анабиоза (криобиоза), когда все процессы жизнедеятельности прекращены, но при правильном оттаивании и рекультивировании их можно возобновить и «оживить» биологические объекты.

**Лабораторное занятие 7**

**Ферменты рестрикции и лигазы.**

1 Принцип действия и функция рестриктаз.

2 Виды рестриктаз.

3 ДНК-лигазы.

**1 Принцип действия и функция рестриктаз.**

Для того, чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него хотя бы один чужеродный ген. причем, необходимо приготовить
(сконструировать) фрагмент чужеродной ДНК, содержащий этот нужный ген. осуществляется эта процедура с помощью двух операций: "разрезания" и"сшивания".

Роль портняжных инструментов играют
**Ферменты рестриктазы** и **лигазы**.

**Рестриктазы** (своеобразные молекулярные ножницы), действуя
на двухцепочечную ДНК, "узнают" в ней определенную
последовательность нуклеотидов. Причем, каждая рестриктаза узнает
только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, какую ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были распознаваемые участки. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (слепить) друг с другом.

Лигаза (лат. ligāre — сшивать, соединять) — фермент, катализирующий соединение двух молекул с образованием новой химической связи — лигирование. При этом обычно происходит отщепление (гидролиз) небольшой химической группы от одной из молекул.

Лигазы относятся к классу ферментов EC 6.

В молекулярной биологии лигазы подкласса 6.5 классифицируют на РНК-лигазы и ДНК-лигазы. ДНК-лигазы — ферменты (EC 6.5.1.1), катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации. Они образуют фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксинуклеотидов в местах разрыва ДНК или между двумя молекулами ДНК. Для образования этих мостиков лигазы используют энергию гидролиза пирофосфорильной связи АТФ. Один из самых распространённых коммерчески доступных ферментов — ДНК-лигаза бактериофага Т4.

У млекопитающих классифицируют три основных типа ДНК-лигаз.

-ДНК-лигаза I лигирует фрагменты Оказаки в ходе репликации отстающей цепи ДНК и участвует в эксцизионной репарации[1].

-ДНК-лигаза III в комплексе с белком XRCC1 участвует в эксцизионной репарации и в рекомбинации.

-ДНК-лигаза IV в комплексе с XRCC4 катализирует окончательный этап негомологичного соединения (non-homologous end joining - NHEJ) двунитевых разрывов ДНК. Также требуется для V(D)J рекомбинации генов иммуноглобулинов.

Ранее выделяли ещё один тип лигаз - ДНК-лигазу II, которая позднее была признана артефактом выделения белков, а именно продуктом протеолиза ДНК-лигазы III[

**Лабораторное занятие 8**

**Методы создания рекомбинантных мо**

**лекул ДНК. Решение задач.**

1 Векторы и их применение.

2 Простейшие плазмидные векторы pSC101 и pBR322.

3 Плазмидные векторы усложненной конструкции.

1 Векторы и их применение. С помощью ферментов рестриктаз и лигаз исследователи научились конструировать разнообразные по своим составным частям гибридные (рекомбинантные) ДНК, путём сшивки фрагментов разных видов in vitro.

Но как полученным гибридным генам попасть в клетку и начать там “работать” – производить белки?

Для доставки чужеродных генов в различные организмы учёные стали применять специальные устройства, так называемые векторы.

Вектор – это молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. В английской литературе вектор часто обозначается словом vehicle – повозка.

Идеальными векторными молекулами, созданными самой природой, оказались плазмиды, представляющие собой небольшие кольцевые молекулы ДНК, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают генами устойчивости к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках, плазмиды могут внедряться в хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (сайты рестрикции) для действия ряда рестриктаз. Это означает, что каждая такая рестриктаза может разрезать кольцо плазмидной ДНК и переводить её в линейное состояние. После чего линейную плазмиду можно легко соединить с фрагментом ДНК другого вида с подходящими липкими концами.

По мере развития методов генной инженерии совершенствовались и плазмидные векторы. Широко распространение получила плазмида pBR322. У нее больше участков, разрезаемых различными рестриктазами, следовательно, с ней можно «сшивать» самые разные фрагменты ДНК. Более того, у pBR322 не один, а два маркера для селекции на бактериальных средах: помимо тетрациклина эта плазмида кодирует еще устойчивость к ампициллину. Если один из этих генов (например, ген устойчивости к тетрациклину) разрезать определенной рестриктазой, то при встраивании в это место фрагмента чужеродной ДНК целостность гена нарушается и определяемый им признак исчезает. Это позволяет легко отбирать гибридные плазмиды, специальным образом введённые в бактериальные клетки кишечной палочки E. coli при помещении их на твёрдую питательную среду с антибиотиками ампицилином и тетрациклином и на среду только с ампициллином.

**Лабораторное занятие 9**

**Молекулярные маркеры.**

1 Минисателлитная ДНК.

2 Генная дактилоскопия.

1 Минисателлитная ДНК.

В геноме каждого человека имеется так называемая минисателлитная ДНК. В основе её строения лежит повторяющаяся последовательность, состоящая из 14 – 100 нуклеотидов. Цепочка одной минисателлитной ДНК может насчитывать таких повторяющихся последовательностей от одной до нескольких тысяч. У людей имеется два и более десятков минисателлитных цепочек, расположенных на разных хромосомах.

В совокупности они образуют набор минисателлитных ДНК, различающихся по длине. Было обнаружено, что для каждого человека характерен свой, присущий только ему вариант набора таких тандемно повторяющихся последовательностей, отличающихся по длине, то есть по числу отдельных звеньев.

Иными словами, ситуация оказалась сходной с отпечатками пальцев человека. У каждого имеется собственная минисателлитная ДНК.

Поэтому и метод анализа фрагментов минисателлитной ДНК получил название генной дактилоскопии (фингерпринт ДНК).

2 Генная дактилоскопия.

Технология генной дактилоскопии включает ряд хорошо разработанных и уже рассмотренных нами методов. Сначала из каких либо клеток выделяют ДНК и с помощью рестриктаз разрезают её на фрагменты разной длины. Среди фрагментов естественно будут те, которые содержат вариабельные минисателлиты. Далее проводится стандартный Саузерн-блот анализ. Все полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в геле и фракции, содержащие минисателлитную ДНК выявляются с помощью специального меченого зонда, комплементарного повторяющемуся фрагменту нуклеотидов. Так как зонд радиоактивен, то он засвечивает ренгеновскую плёнку только в определённых местах, давая картину из нескольких десятков чередующихся темных фракций, соответствующих отдельным минисателлитам.

Следует добавить, что метод фингерпринта минисателлитной ДНК обладает высокой чувствительностью и анализ можно проводить на одной капле крови или нескольких волосяных луковиц.

**Лабораторное занятие 10**

**Компоненты и режим ПЦР.**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три
стадии.
1. Денатурация. Инкубационную смесь, в которой содержится
образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90 °С. При этом, в
течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей
между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы образуется
две одноцепочечные.
2. Гибридизация праймеров. Температуру снижают до 50 °С.
При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта
стадия обычно протекает 30 секунд.
3. Полимеризация. Инкубационную смесь нагревают до
температуры 70°С. При этой температуре Tag-полимераза удлиняет
оба праймера с их 3’-концов. Праймеры дорастают до размеров
матрицы. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате
количество ДНК удваивается.

ПЦР технологии позволили ученым без огромных временных и
материальных затрат получать точные данные по структуре генов и
фрагментов ДНК при наличии самого минимального количества
биологического материала.

Одним из важнейших применений ПЦР
стала диагностика наследственных заболеваний человека,
особенно на пренатальных стадиях развития при наличии малого
количества ДНК из фетальных клеток.

Вторым, не менее важным
применением ПЦР технологий стала дактилоскопия иидентификация индивидуумов, используя материал ДНК,
полученный из нескольких сперматозоидов, или одного волоса и, в
некоторых случаях, даже из одного бластомера, выделенного из
зародыша (пре-эмбриона) на стадии восьми зародышевых клеток.

**Лабораторное занятие 11**

**Гель электрофорез.**

Производство гормонов человека генно-инженерными методами.

Инсулин — гормон поджелудочной железы, регулирующий углеводный обмен и поддерживающий нормальный уровень сахара в крови. Недостаток этого гормона в организме приводит к одному из тяжелейших заболеваний — сахарному диабету, который как причина смерти стоит на третьем месте после сердечнососудистых заболеваний и рака. Инсулин — небольшой глобулярный белок, содержащий 51 аминокислотный остаток и состоящий из двух полипептидных цепей, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками. Синтезируется он в виде одноцепочечного предшественника — препроинсулина, содержащего концевой сигнальный пептид (23 аминокислотных остатка) и 35-звенный соединительный пептид (С-пептид). При удалении сигнального пептида в клетке образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков, в котором А и В-цепи инсулина соединены С-пептидом, обеспечивающим им необходимую ориентацию при замыкании дисульфидных связей. После протеолитического отщепления Спептида образуется инсулин.

Известно несколько форм сахарного диабета. Самая тяжелая форма, для лечения которой больному необходим инсулин (инсулинзависимая форма заболевания), вызвана избирательной гибелью клеток, синтезирующих этот гормон (клетки островков Лангерганса в поджелудочной железе). Форма сахарного диабета, для лечения которой инсулин не требуется, распространена чаще, с ней удается справляться с помощью соответствующих диет и режима.

Работы по генно-инженерному получению инсулина начались более 20 лет назад. В 1978г. появилось сообщение о получении штамма кишечной палочки, продуцирующего крысиный проинсулин (США). В этом же году были синтезированы отдельные цепи человеческого инсулина посредством экспрессии их синтетических генов в клетках Е. coli. Каждый из полученных синтетических генов подстраивался к 3'-концу гена фермента β- галактозидазы и вводился в векторную плазмиду (pBR322). Клетки Е. coli, трансформированные такими рекомбинантными плазмидами, производили гибридные (химерные) белки, состоящие из фрагмента β-галактозидазы и А или В пептида инсулина, присоединенного к ней через остаток метионина. При обработке химерного белкабромц ианом пептид освобождается. Однако замыканиедисульфидных мостиков между образованными цепями инсулина происходило с трудом. В 1981г. синтезирован ген-аналог проинсулина — мини-С-проинсулин, в котором 35-звенный С-пептид был заменен на сегмент из шести аминокислот: арг-арг-гли-сер-лиз-арг и показана его экспрессия в Е. coli.

В 1980 г. У.Гилберт с сотрудниками выделили мРНК инсулина из опухоли β-клеток поджелудочной железы крысы и с помощью обратной транскриптазы получили с нее кДНК. Полученную кДНК встроили в плазмиду pBR322 Е. coli, в среднюю часть гена пенициллиназы.

Рекомбинантная плазмида содержала информацию о структуре проинсулина. В результате трансляции мРНК в клетках синтезировался гибридный белок, содержащий последовательности пенициллиназы и проинсулина, который выщепляли из такого белка трипсином.

**Лабораторное занятие 12**

**Репортерные и селективные гены.**

*Агробактериальная трансформация растений: Ti-плазмиды*

В A. tumefaciens помимо хромосомы содержится Ti-плазмида. Плазмида содержит Т-ДНК (transferred DNA), которая составляет 12-22 тыс. пар оснований и встраивается в ДНК растительной хромосомы. Она кодирует ферменты синтеза фитогормонов и опинов - производных аминокислот, которые используются бактерией как источник углерода, азота и энергии.

Кроме Т-ДНК в Ti-плазмиде содержатся vir-область, отвечающая за перенос Т-ДНК в растение, гены утилизации опинов, а также локусы, контролирующие размножение плазмиды в бактериальной клетке и ее перенос при бактериальной конъюгации [2]. Доказательства того, что именно Ti-плазмиды, а не хромосомные гены бактерий ответственны за поддержание трансформированного состояния клеток корончатых галлов, были получены при изучении штаммов Agrobacterium, содержащих мутантные Ti-плазмиды. Агробактерии, лишенные Ti-плазмид, не индуцируют в зараженном растении ни образования корончатых галлов, ни синтеза опинов. Все полученные мутации Ti-плазмид разделяют на три основных класса. Мутанты первого класса не индуцируют синтез опинов, но вызывают образование корончатых галлов. Мутанты второго класса утрачивают способность индуцировать развитие опухолей. Мутанты третьего класса стимулируют аномальную дифференцировку нормальных клеток, например избыточный рост корней или побегов. Эти генетические исследования показали, что ДНК Ti-плазмид содержит гены, которые контролируют развитие опухолей, синтез опинов [1-4]. Поскольку у растений с мутантными Ti-плазмидами второго и третьего классов с помощью фитогормонов можно стимулировать опухолеобразование, было предположено, что полученные мутации затрагивают гормональный метаболизм [2, 4, 5].

*Молекулярно-генетические механизмы агробактериальной трансформации*

Процесс трансформации можно разделить на четыре этапа: прикрепление бактерии к стенке растительной клетки, проникновение Т-ДНК внутрь клетки растения, интеграция Т-ДНК в геном растения и экспрессия Т-ДНК.

Традиционный способ трансформации растительных клеток с помощью Т-ДНК заключается в нанесении агробактерий, содержащих Ti-плазмиду, на специально поврежденный побег. Сейчас используют широкий арсенал методов для получения трансгенных растений. Создан даже специальный прибор - "Shotgun", который стреляет мельчайшими вольфрамовыми пульками, одетыми в молекулы ДНК, осуществляя таким образом трансформацию растительных клеток.

**Лабораторное занятие 13**

**Горизонтальный электрофорез.**

Генная терапия — это лечение наследственных, мультифакториальных и ненаследственных (инфекционных, злокачественных и др.) заболеваний путем введения генов в соматические клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых свойств.

Генотерапия — совокупность генноинженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток[1] человека в целях лечения заболеваний[2]. Это новая и бурно развивающаяся область, ориентированная на исправление дефектов, вызванных мутациями (изменениями) в структуре ДНК, поражением ДНК человека вирусами[3] или придания клеткам новых функций. Новые подходы к генной терапии соматических клеток можно поделить на две большие категории: генная терапия ex vivo и in vivo. Разрабатываются специфические лекарственные препараты на основе нуклеиновых кислот: РНК-ферменты, модифицированные методами генной инженерии олигонуклеотиды, корректирующие генные мутации in vivo и т. д.

Использование при имплантации ген-активированных материалов, модифицированных геннотерапевтическими препаратами, позволяет обеспечить отложенное и продолжительное высвобождение препарата in situ[32][33].

Разработка таких мощных инструментов для генной модификации как CRISPR/Cas9[34][35] предоставили человечеству возможность в ближайшем будущем с помощью генной модификации успешно устранять причины наследственных заболеваний[36][37] и повысить устойчивость организма к старческим заболеваниям[38].

Существует несколько способов введения новой генетической информации в клетки млекопитающих. Это позволяет разрабатывать прямые методы лечения наследственных болезней — методы генотерапии.

Используют два основных подхода, различающихся природой клеток-мишеней:

-фетальная генотерапия, при которой чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития; при этом ожидается, что введённый материал попадёт во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению);

-соматическая генотерапия, при которой генетический материал вводят только в соматические клетки, и он не передаётся половым клеткам.

Генотерапия может как обеспечить клиническую пользу, так и привести к расширению и злокачественной трансформации гемопоэтических клонов с переносными векторными вставками вблизи онкогенов, при использовании лентивирусных векторов, что увеличит риск лейкемии [39].

**Лабораторное занятие 14**

**Вертикальный гель электрофорез.**

Одна из важнейших задач сельскохозяйственной биотехнологии — выведение трансгенных животных с улучшенной продуктивностью и более высоким качеством продукции, резистентностью к болезням, а также создание так называемых животных-биореакторов — продуцентов ценных биологически активных веществ. С генетической точки зрения особый интерес представляют гены, кодирующие белки каскада гормона роста: непосредственно гормон роста (ГР), рилизинг-фактор гормона роста (РФ) и инсулинподобный фактор ГР (ИФГР).

В конце 70-х годов XX в. ген гормона роста крупного рогатого скота был интегрирован в геном E. сoli. Было показано, что ГР, выделенный из E. сoli, оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животных, как и гипофизарный ГР. Гормон роста, полученный с помощью методов генетической инженерии, при крупномасштабном применении вызывал увеличение удоев на 23-31% при дозе 13 мг в день. Разработаны формы препарата пролонгированного действия, позволяющие использовать его один раз в две недели и даже в месяц. При ежедневной инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец удалось увеличить суточные привесы на 20-30% при значительном сокращении расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней с ускорением роста увеличивалось содержание белка и уменьшалось содержание жира в тканях, что повышало качество мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши со встроенным геном ГР были получены в 1982 г. У них отмечалось повышение скорости роста и увеличение конечной живой массы.

Получены также впечатляющие результаты на европейском лососе. Особи лосося (Salmo salmo) со встроенным геном ГР достигают товарного веса в 2 раза быстрее, чем обычные.

Рассматривается возможность уменьшения лактозы в молоке путем создания животных, у которых присутствует специфический промотор, соединенный с геном фермента β-галактозидазы, катализирующего распад лактозы. Молоко таких животных, не содержащее лактозы, могут использовать люди, у которых не синтезируется β-галактозидаза.

**Лабораторное занятие 15**

**Картахенский протокол по биобезогасности. Этапы оценки риска возможных неблагоприятных последствий использования ГИО**

Основные направления государственного регулирования биобезопасности в системе международных отношений: - работы по созданию, испытанию и использованию генно-инженерных организмов в закрытых (изолированных) системах; - высвобождение ГИО в окружающую среду с целью испытания; - экспорт и импорт ГИО; - использование ГИО в хозяйственной деятельности. Биобезопасность в системе международных отношений В 2000 г. странами - Сторонами Конвенции о биологическом разнообразии (в т.ч. и Беларусь) принят Картахенский протокол по биобезогасности. Основная цель Картахенского протокола - содействие обеспечению надлежащего уровня защиты в области безопасной передачи, обращения и использования живых измененных организмов, являющихся результатом современной биотехнологии, способных оказывать неблагоприятное воздействие на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом также рисков для здоровья человека и с уделением особого внимания трансграничному перемещению» (Картахенский протокол, Статья 1). Основное положение Протокола состоит в требовании использовать процедуру заблаговременного обоснованного согласия до первого преднамеренного трансграничного перемещения ГИО, предназначенных для преднамеренного высвобождения в окружающую среду Стороны импорта. Присоединение к Картахенскому протоколу какой-либо страны не только обеспечивает возможность урегулирования вопросов, связанных с экспортом и импортом ГИО, но и создает предпосылки для создания национальной системы биобезопасности, которая является важнейшим атрибутом эффективного и безопасного использования достижений современных биотехнологий, развития генетической инженерии как одного из наиболее перспективных научных направлений.

Этапы оценки риска возможных неблагоприятных последствий использования ГИО: 1) выявление любых новых генотипических и фенотипических практик, связанных с присутствием трансгенов, которые могут оказать неблагоприятное воздействие ГИО на здоровье человека и окружающую среду; 2) оценка вероятности возникновения неблагоприятных последствий, исходя из интенсивности и характера воздействия ГИО на потенциальную принимающую среду; 3) оценка последствий в том случае, если такое неблагоприятное воздействие действительно будет иметь место; 4) оценка совокупного риска, вызываемого ГИО, на основе оценки вероятности возникновения и последствий выявленных неблагоприятных последствий; 5) вынесение рекомендации относительного того, являются ли риски приемлемыми или регулируемыми, включая, если это необходимо, определение стратегий для регулирования таких рисков. Для оценки потенциальной токсичности/аллергенности продуктов трансгенов используют: - изучение происхождения трансгена (что известно о безопасности организма-донора ДНК); - анализ структуры трансгенов и их продуктов, оценка гомологии с известными токсинами, аллергенами (по базам данных); - анализ регуляторных элементов и характера экспрессии трансгенов (время и тканеспецифичность, концентрация продуктов трансгенов); - анализ физико-химических и каталитических особенностей продуктов трансгенов (молекулярная масса, термостабильность, оптимум рН и т.п.); - определение времени переваривания продуктов трансгенов в пищеварительном соке желудка и тонкого кишечника; - острый (до 15 дней, ежедневная доза до 5000 мг/кг веса) и хронический (до одного года) эксперименты на лабораторных и/или сельскохозяйственных животных для оценки неблагоприятных эффектов продуктов трансгенов; - иммунологические тесты для оценки аллергенности продуктов трансгенов.