**Лекция 1**

**Введение. Цели и задачи генной инженерии. История развития технологий генной инженерии.**

*Цель занятия:* Ознакомление с целями и задачами генной инженерии.

*Генная инженерия.* Генетическая инжене рия (генная инженерия) — совокупность приѐмов методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК выделения генов из организма (клеток) осуществления манипуляций с генами введения их в другие организмы.

Генная инженерия решает задачу целенаправленного создания новых комбинаций генетического материала путѐм лабораторных методов in vitro которые позволяют манипулировать нуклеиновыми кислотами переносить нужные гены организма одного вида в организм другого вида. Генная инженерия служит для получения желаемых качеств изменяемого или генетически модифицированного организма. В отличие от традиционной селекции, в ходе которой генотип подвергается изменениям лишь косвенно, генная инженерия позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат, применяя технику молекулярного клонирования. Примерами применения генной инженерии являются получение новых генетически модифицированных сортов зерновых культур, производство человеческого инсулина путём использования генномодифицированных бактерий, производство эритропоэтина в культуре клеток или новых пород экспериментальных мышей для научных исследований.

Во второй половине XX века было сделано несколько важных открытий и изобретений, лежащих в основе генной инженерии. Успешно завершились многолетние попытки «прочитать» ту биологическую информацию, которая «записана» в генах. Эта работа была начата английским учёным Фредериком Сенгером и американским учёным Уолтером Гилбертом (Нобелевская премия по химии 1980 года). Как известно, в генах содержится информация-инструкция для синтеза в организме молекул РНК и белков, в том числе ферментов. Чтобы заставить клетку синтезировать новые, необычные для неё вещества, надо чтобы в ней синтезировались соответствующие наборы ферментов. А для этого необходимо или целенаправленно изменить находящиеся в ней гены, или ввести в неё новые, ранее отсутствовавшие гены. Изменения генов в живых клетках — это мутации. Они происходят под действием, например, мутагенов — химических ядов или излучений. Но такие изменения нельзя контролировать или направлять. Поэтому учёные сосредоточили усилия на попытках разработать методы введения в клетку новых, совершенно определённых генов, нужных человеку.

Все методы генетической инженерии применяются для осуществления одного из следующих этапов решения генно-инженерной задачи:

-Получение изолированного гена.

-Введение гена в вектор для переноса в организм.

-Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.

-Преобразование клеток организма.

-Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

# Контрольные вопросы:

1. Генная инженерия.
2. Цели и задачи генной инженерии.
3. История развития технологий и генной инженерии.

**Лекция 2**

**Биотехнология и некоторые области применения генной инженерии.**

*Цель занятия:* Ознакомление студентов биотехнологией и некоторыми областями применения генной инженерии.

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.

Биотехнология основана на генетике, молекулярной биологии, биохимии, эмбриологии и клеточной биологии, а также прикладных дисциплинах — химической и информационной технологиях и робототехнике. Впервые термин «биотехнология» применил венгерский инженер Карл Эреки в 1917 году.

Использование в промышленном производстве микроорганизмов или их ферментов, обеспечивающих технологический процесс, известно издревле, однако систематизированные научные исследования позволили существенно расширить арсенал методов и средств биотехнологии.

Так, в 1814 году петербургский академик К. С. Кирхгоф (биография Архивная копия от 17 октября 2019 на Wayback Machine) открыл явление биологического катализа и пытался биокаталитическим путём получить сахар из доступного отечественного сырья (до середины XIX века сахар получали только из сахарного тростника). В 1891 году в США японский биохимик Дз. Такамине получил первый патент на использование ферментных препаратов в промышленных целях: учёный предложил применить диастазу для осахаривания растительных отходов.

В начале XX века активно развивалась бродильная и микробиологическая промышленность. В эти же годы были предприняты первые попытки наладить производство антибиотиков, пищевых концентратов, полученных из дрожжей, осуществить контроль ферментации продуктов растительного и животного происхождения.

Первый антибиотик — пенициллин — удалось выделить и очистить до приемлемого уровня в 1940 году, что дало новые задачи: поиск и налаживание промышленного производства лекарственных веществ, продуцируемых микроорганизмами, работа над удешевлением и повышением уровня биобезопасности новых лекарственных препаратов.Контрольные вопросы:

# Контрольные вопросы:

1. Что изучает биотехнология?
2. Направления развития биотехнологии.
3. Роль биотехнологии в медицине, сельском хозяйстве и т.д.

**Лекция 3**

**Репликация ДНК.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с репликацией ДНК.

Реплика́ция (от лат. replicatio — возобновление) — процесс создания двух дочерних молекул ДНК на основе родительской молекулы ДНК. Репликацию ДНК осуществляет сложный комплекс, состоящий из 15—20 различных белков-ферментов, называемый реплисомой (англ.)[1]. С помощью специальных ферментов двойная спираль материнской ДНК расплетается на две нити, на каждой образовавшейся нити достраивается вторая нить, образуя две идентичных дочерних молекулы ДНК, которые затем скручиваются в отдельные спирали. В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки. Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение.

Каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм репликации называется полуконсервативным. В настоящее время этот механизм считается доказанным благодаря опытам Мэтью Мезельсона и Франклина Сталя (1958 г.)[2]. Ранее существовали и две другие модели: «консервативная» — в результате репликации образуется одна молекула ДНК, состоящая только из родительских цепей, и одна, состоящая только из дочерних цепей; «дисперсионная» — все получившиеся в результате репликации молекулы ДНК состоят из цепей, одни участки которых вновь синтезированы, а другие взяты из родительской молекулы ДНК. Молекула ДНК разрезается пополам и образуются два шаблона. Два шаблона выходят из репликационной вилки. Если представить их в выпрямленном виде, то можно видеть линейку из гребёнок, которые соединены концами, но имеют промежуток. Представим, что одна гребёнка синяя, а другая — красная. Теперь подставим нижнюю красную (она из пяти гребней, как и верхняя) пятым концом к третьему верхнему (третьей верхней иголке). Удлиним цепь и сверху, и снизу. Как бы получится: пять, три, пять и т. д.- наверху и снизу тоже. Потом к этим гребёнкам добавляются после выхода шаблонов (гребёнок) из репликационной вилки ещё два шаблона. Из одной молекулы ДНК получается две идентичные материнской (если нет мутаций) молекулы, это называется полуконсервативностью.

# Контрольные вопросы:

1.Характеристика процесса репликации

2.Молекулярный механизм репликации.

3. Репликация ДНК — ключевое событие в ходе деления клетки.

**Лекция 4**

**Методы генной инженерии.**

**Генетически модифицированный организм.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методами генной инженерии и примерами генетически модифицированных организмов.

Генети́чески модифици́рованный органи́зм (ГМО) — организм, генотип которого был искусственно изменён при помощи методов генной инженерии. Это определение может применяться для растений, животных и микроорганизмов. Всемирная организация здравоохранения даёт более узкое определение, согласно которому генетически модифицированные организмы — это организмы, чей генетический материал (ДНК) был изменен, причём такие изменения были бы невозможны в природе в результате размножения или естественной рекомбинации[1].

Генетические изменения, как правило, производятся в научных или хозяйственных целях. Генетическая модификация отличается целенаправленным изменением генотипа организма в отличие от случайного, характерного для естественного и искусственного мутационного процесса.

Основным видом генетической модификации в настоящее время является использование трансгенов для создания трансгенных организмов.

Много возражений было высказано в отношении разработки ГМО, особенно их коммерциализации. Многие из них связаны с ГМ-культурами, а также с тем, безопасны ли продукты, произведенные из них, и какое влияние их выращивание окажет на окружающую среду. Другими проблемами являются объективность и строгость регулирующих органов, загрязнение не генетически модифицированных продуктов питания, контроль над поставками продуктов питания, патентование жизни и использование прав интеллектуальной собственности. Хотя существует научный консенсус в отношении того, что имеющиеся в настоящее время продукты питания, полученные из ГМ-культур, не представляют большего риска для здоровья человека, чем обычные продукты питания, ГМ-безопасность пищевых продуктов является главной проблемой для критиков. Поток генов, воздействие на нецелевые организмы и миграция растений являются основными проблемами окружающей среды. Страны приняли меры регулирования для решения этих проблем. Существуют различия в регулировании высвобождения ГМО между странами, причем некоторые из наиболее заметных различий происходят между США и Европой. Один из ключевых вопросов, касающихся регуляторов, заключается в том, следует ли маркировать ГМ пищу и статус организмов, отредактированных генами.

# Контрольные вопросы:

1. Методы генной инженерии

2. Генетически модифицированный организм.

**Лекция 5**

**Технология рекомбинантной ДНК.**

**Создание рекомбинантной ДНК.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с технологией рекомбинантной ДНК и методами создания рекомбинантной ДНК.

Рекомбинантная структура (англ. Recombinant structure) — гибридная (англ. recombination — рекомбинация) нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) или белок, полученные в результате объединения in vitro чужеродных фрагментов и содержащие новые сочетания последовательностей нуклеотидов или аминокислот соответственно. Рекомбинация — процесс обмена генетическим материалом путем разрыва и соединения разных молекул нуклеиновых кислот, то есть перераспределение генетического материала, приводящее к созданию новых комбинаций генов. В естественных условиях рекомбинация у эукариот — обмен участками хромосом в процессе клеточного деления. У прокариот рекомбинация осуществляется при передаче ДНК путём конъюгации, трансформации или трансдукции, либо в процессе обмена участками вирусных геномов. Методы генной инженерии значительно расширили возможности рекомбинационных обменов и позволяют, в отличие от естественной рекомбинации, получать гибридные молекулы нуклеиновых кислот, содержащие практически любые чужеродные фрагменты. Суть этой технологии заключается в соединении фрагментов ДНК in vitro с последующим введением рекомбинантных генетических структур в живую клетку. Генно-инженерные манипуляции стали возможны после открытия рестриктаз (ферментов, разрезающих ДНК строго в определённых участках) и лигаз (ферментов, сшивающих двухцепочечные фрагменты ДНК). С помощью этих ферментов получают определённые фрагменты ДНК и соединяют их в единое целое. Для такого искусственного объединения безразлично происхождение ДНК, между тем как в природе объединению генетической информации чужеродных организмов препятствуют механизмы межвидовых барьеров. Первую рекомбинантную молекулу ДНК, состоящую из фрагмента ДНК вируса OB40 и бактериофага λ с галактозным опероном E. coli, в 1972 году создали Берг с сотрудниками[1].

Техника генной инженерии включает несколько последовательных процедур:

-выделение нужного (целевого) гена;

-встраивание его в генетический элемент, способный к репликации (вектор);

-введение вектора в организм-реципиент;

-идентификация (скрининг) и отбор клеток, которые приобрели желаемый ген или гены.

Схема генетической рекомбинации: рекомбинация происходит в результате физического разрыва в хромосомах (M) и (F) и их последующего соединения с образованием двух новых хромосом (C1 и C2).

Белки, полученные генно-инженерным способом, то есть транслируемые с рекомбинантных ДНК, также называются рекомбинантными. Технология рекомбинантных ДНК оказала существенное воздействие на развитие современной биологии, позволив решать многие теоретические задачи, например, определять функции белков, изучать механизмы регуляции экспрессии генов. С помощью технологии создания рекомбинантных структур были открыты и изучены: мозаичное строение генов у высших организмов, транспозоны бактерий и мобильные диспергированные элементы высших организмов, онкогены и т. д. Рекомбинантные структуры нашли широкое применение в промышленной биотехнологии, включая производство ферментов, гормонов, интерферонов, антибиотиков, витаминов и многих других продуктов для фармакологии и пищевой промышленности, на получение которых ранее затрачивалось много времени и средств. Методом рекомбинантных ДНК были получены генетически модифицированные растения и трансгенные животные, обладающие новыми полезными для человека свойствами. Рекомбинантные структуры используются в медицине в методах генной терапии, диагностике и создании рекомбинантных вакцин.Рекомендуемая литература:

1 Егорова Т.А. Основы биотехнологии. - М. : ACADEMIA 2006. - 208 с; 2 Клетки/ под ред. Б. Льюина [и др.]. - М. : Бином. Лаборатория знаний

2011. - 951 с.

# Контрольные вопросы:

1. Технология рекомбинантной ДНК.
2. Создание рекомбинантной ДНК.

**Лекция 6**

**Методы генной инженерии.**

**Селекция и генетическая инженерия растений.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методами генетической инженерией растений.

Современная генная инженерия позволяет «включать» и «выключать» отдельные гены, программируя новый генотип, в том числе, и человеческий. Это вызывает немало опасений, хотя многие открытия уже принесли человечеству пользу. Генная инженерия — это современное направление биотехнологии, объединяющее знания, приемы и методики из целого блока смежных наук — генетики, биологии, химии, вирусологии и так далее — чтобы получить новые наследственные свойства организмов.

Перестройка генотипов происходит путем внесения изменений в ДНК (макромолекулу, обеспечивающую хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов) и РНК (одну из трех основных макромолекул, содержащихся в клетках всех живых организмов).

Если внести в растение, микроорганизм, организм животного или даже человека новые гены, можно наделить его новой желательной характеристикой, которой до этого он никогда не обладал. С этой целью сегодня генная инженерия используется во многих сферах. Например, на ее основе сформировалась отдельная отрасль фармацевтической промышленности, представляющая собой одну из современных ветвей биотехнологии.

*Технологии генной инженерии.*

Генная инженерия за короткий срок оказала огромное влияние на развитие различных молекулярно-генетических методов и позволила существенно продвинуться на пути познания генетического аппарата.

Так, появилась технология CRISPR — инструмент редактирования генома. В 2014 году MIT Technology Review назвал его «самым большим биотехнологическим открытием века». Он основан на защитной системе бактерий, которые производят специальные ферменты, позволяющие им защищаться от вирусов.

«Каждый раз, когда бактерия убивает вирус, она разрезает остатки его генома, будь то ДНК или РНК, и сохраняет их внутри последовательности CRISPR, как в архив. Как только вирус атакует снова, бактерия использует информацию из «архива» и быстро производит защитные белки Cas9, в которых заключены фрагменты генома вируса. Если вдруг эти фрагменты совпадают с генетическим материалом нынешнего атакующего вируса, Cas9 как ножницами разрезает захватчика, и бактерия снова в безопасности», — поясняет Алевтина Федина, медицинский директор Checkme.

Уникальное открытие состоялось в 2011 году, когда биологи Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпантье обнаружили, что белок Cas9 можно обмануть. Если дать ему искусственную РНК, синтезированную в лаборатории, то он, найдя в «архиве» соответствие, нападет на нее. Таким образом, с помощью этого белка можно резать геном в нужном месте — и не просто резать, а еще и заменять другими генами.

Генная инженерия, также называемая генетической модификацией или генетической манипуляцией, это прямая манипуляция генами организма с помощью биотехнологии. Это набор технологий, используемых для изменения генетического материала клеток, включая перенос генов внутри и за пределы видов для создания улучшенных или новых организмов. Использование методов генной инженерии значительно расширило возможности модификации геномов и в растительном царстве, поскольку сделало возможным перенос генов между таксономически удаленными видами растений, принадлежащими, например, к классам однодольных и двудольных растений. Новую ДНК получают либо путем выделения и копирования интересующего генетического материала с использованием методов рекомбинантной ДНК, либо путем искусственного синтеза ДНК.

Обычно создается конструкция, которая используется для вставки этой ДНК в организм-хозяин.

Для этого используются следующие методы:

- выделение гена, кодирующего интересующий белок;

- клонирование (то есть перенос) этого гена в соответствующий продуцирующий хозяин;

- улучшение экспрессии генов и белков за счет использования более сильных промоторов, улучшения условий ферментации и т. д. (Gellisen, 2005).

Вместе эти методы известны как технология рекомбинантной ДНК.

***Контрольные вопросы:***

1. Методы генной инженерии.
2. Аспекты использования трансгенных растений
3. Генетически модифицированный организм.
4. Как создать генетически модифицированное растение?
5. Биотехнология генетически модифицированных растений.

**Лекция 7**

**Методы трансформации растительных протопластов, клеток и тканей.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методами трансформации растительных протопластов, клеток и тканей.

Генетическая трансформация растительных клеток наблюдается в природных условиях. Образование растительных опухолей, например корончатых галлов, индуцируется бактериями Agrobacterium tumefacienc в результате внедрения в клетку Ту-плазмиды — кольцевой ДНК с молекулярной массой порядка 1000 kDa. В плазмиде Т, идентифицирован сайттДНК, конкретно ответственный за трансформацию растительной клетки. тДНК внедряется в се хромосому и изменяет многие стороны клеточного метаболизма. Раковые клетки приобретают способность к неконтролируемому росту даже на минимальной питательной среде, лишенной фитогормонов, которые они, в отличие от интактных клеток, синтезируют в достаточном количестве. Другим примером генетической трансформации в природных условиях является заболевание растений, связанное с разрастанием корней. Причиной этого является внедрение в растительную клетку R-плазмиды из бактерий Agrobacterium rhizogenes. В этой плазмиде также имеется фрагмент ДНК, способный встраиваться в хромосому растительной клетки, подобно транспозону. Приведенные примеры инициировали многих ученых формировать сообщества всевозможных микробных и растительных клеток с целью получения новых полезных свойств у последних. Спонтанное воздействие на геном растительных клеток не увенчалось серьезными успехами (за исключением некоторых вариантов ассоциации растений с цианобактериями). Гораздо перспективнее представляется генно-инженерная трансформация клеток растений. Для этого необходимо получить жизнеспособный протопласт, из которою затем возможно было бы образование сначала трансформированной клетки, а затем и растения-регенеранта.

Для решения этой задачи следует:

- выбрать растение, протопласты клеток которого способны к регенерации. В настоящее время таких растений не так много, однако их количество из года в год увеличивается;

- сконструировать вектор для внесения чужеродного генетического материала в растительную клетку. Эта задача облегчается наличием природных Т,- и Rj-плазмид, которые спонтанно внедряются в растительную клетку. Кроме того, можно использовать растительные вирусы, а также химерные структуры, состоящие из бактериальных плазмид, соединенных с ДНК митохондрий или хлоропластов растения;

- защитить вектор от разрушающего действия эндонуклеаз растительной клетки.

Введение вектора в растительную клетку возможно при помощи липосом, причем для введения в протопласт растения наиболее эффективны липосомы, состоящие из фосфотидилсерина и холестерина.

Наиболее простым способом отбора трансформированных клеток является введение в плазмиду вместо онкогенов тДНК генов устойчивости к антибиотикам. Однако попытки введения в вектор генов устойчивости к антибиотикам оказались безуспешными, гак как они не экспрессировались в растительных клетках.

Проблема была решена, когда удалось найти промотор гена нопалин-синтазы и ввести его в Т.-плазмиду. Регуляторные системы гена — нопалин синтазы — способствовали экспрессии генов устойчивости к антибиотикам, и отбор трансформированных клеток оказался возможным на селективных средах, содержащих антибиотики.

Был рассмотрен метод трансформации растительных клеток при помощи микроорганизмов рода Agrobacterium. Существует еще ряд методов, например: свободное поглощение чужеродного генетического материала в процессе ко- культивирования с растительными клетками, инъекция ДНК в растительные клетки и целые растения и др. В результате разработанных методов генетическая инженерия получила возможность надежной трансформации ряда растений, в том числе и сельскохозяйственных культур. Так, имеются хорошие перспективы получения азотфиксируюших растений (гл. 24). Гены, устойчивые к гербицидам, выделенные из бактерий и дрожжей, переносятся в растительные клетки. Это открывает возможность использования гербицидов для уничтожения сорняков без ущерба для сельскохозяйственных культур. При помощи генной инженерии получены растения с заранее программированными свойствами. Впервые трансгенные растения были получены в 1981 г. в ФРГ. Г. Шелл и соавторы в протопласт табака ввели Т.-плазмиду с геном окто- пинсинтстазы. Из протопластов затем было получено растение-регенерант, синтезирующее несвойственную для него аминокислоту октопин. Далее в результате совершенствования техники генной инженерии был получен ряд трансгенных растений — сельскохозяйственных культур, таких, как соя, картофель, табак, ячмень и др.

***Контрольные вопросы:***

1. Трансформация растительных клеток.
2. Трансформация растительных протопластов.
3. Метод трансформации растительных клеток при помощи микроорганизмов рода Agrobacterium.

**Лекция 8**

**Трансформация растений с помощью Ti-плазмиды *A. tumefaciens.***

*Цель занятия –* ознакомление студентов с трансформацией растений с помощью Ti-плазмиды *A. tumefaciens*.

Важным преимуществом растений, по сравнению с животными, является способность их клеток развиваться в целое растение (т. е. тотипотентность), что широко используется в работах по получению трансгенных растений.

Генетическая трансформация растений с помощью методов генетической инженерии может быть осуществлена векторным способом (с использованием агробактерий и вирусов) и путем прямого переноса генов.

Наиболее изученным примером работы плазмидных векторов служит введение чужеродных генов в геном растений с помощью Ti- и Ri-плазмид почвенных бактерий рода Agrobacterium. С помощью этих плазмид бактерии могут интегрировать свой генетический материал в клетки двудольных растений.

Ti-плазмида (от англ, tumor inducing — индуцирующая опухоль) обнаружена в клетках некоторых штаммов Agrobacterium tumefaciens. Выделенная в чистой культуре, эта бактерия может приводить к образованию опухолей у двудольных растений, что, по существу, может рассматриваться как природная генно-инженерная система, индуцирующая корни) присутствует в штаммах Agrobacterium rhizogenes.

В 1970-х гг. Дж. Шелл с сотрудниками выявил, что причиной опухолеобразования являются Ti-плазмиды, обнаруженные в клетках некоторых штаммов A. tumefaciens. Ti-плазмида проникает из клетки бактерии в растение, и часть ее, называемая Т-ДНК (от англ, transferred DNA — переносимая), ковалентно встраивается в хромосомы инфицируемого растения (рис. 4.10). В природе этот фрагмент переносит гены, которые способствуют размножению агробактерий и дают им возможность паразитировать на пораженном растении.

Гены, входящие в состав Т-ДНК, функционируют лишь после их переноса в растительную клетку. Будучи интегрированной с хромосомой, Т-ДНК индуцирует в месте заражения образование опухоли (корончатых галлов, напоминающих раковые клетки животных), гиперпродукцию фитогормонов — цитокининов и ауксина, а также синтез ряда производных аминокислот, опинов — веществ, которых нет в здоровых клетках ни у одного растения.

Опухоль возникает вследствие нарушения баланса фитогормонов, т. е. как результат функционирования онкогенов, продуктами которых являются ауксины и цитокинины. Опины, выделяемые клетками опухоли, бактерия использует в качестве источников углерода и азота для своего роста и размножения. Сама бактерия в клетку не проникает, а остается в межклеточном пространстве и использует клетку со встроенной Т-ДНК как «фабрику», продуцирующую опины. Такие отношения A. tumefaciens и растения Дж. Шелл назвал генетической колонизацией, которая представляет собой эксперимент по генетической инженерии, поставленный самой природой.

Строение Ti-плазмид хорошо изучено. Они включают в себя:

— Т-ДНК — область ДНК, где содержатся гены, ответственные в итоге за морфологию опухоли и синтез фитогормонов, вызывающих неконтролируемый рост опухолевых клеток, а также гены, ответственные за синтез опинов — источников углерода и азота для питания бактерий. Именно все эти гены передаются в ядерный геном растительной клетки;

— у/г-область — содержит гены, ответственные за вырезание, перенос и интеграцию Т-ДНК в хромосомы растений. Индукция этих генов обратима, что очень важно для бактериальных клеток. Если зараженное растение уже больно и является нежизнеспособным организмом, то переноса Т-ДНК не происходит;

— ori-область — содержит гены, продукты которых обеспечивают репликацию Ti-плазмиды;

— fra-область — содержит гены, ответственные за конъюгацию бактерий.

Ti-плазмида оказалась идеальным природным вектором для введения чужеродных генов в клетки растения. Проще всего было бы заменить Т-ДНК на чужеродные (полезные) гены, ввести их в плазмиды агробактерий и заразить ими растения, так как гены, ответственные за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференциации клеток поражаемого растения, расположены близко друг от друга в Т-ДНК. В то же время гены, ответственные за перенос и интеграцию Т-ДНК в хромосомы растений, находятся в другой области Ti-плазмиды — в uir-области.

Итак, на основе Ti-плазмиды в условиях эксперимента создают искусственные векторы. Для создания трансгенных растений гены, кодирующие хозяйственно ценные признаки, встраивают в Т-ДНК. Эту же область снабжают маркерными генами (для отбора трансформированных растительных клеток), эукариотическим промотором (например, 358-промотор вируса мозаики цветной капусты — CAMV) и уникальными сайтами рестрикции.

Однако размеры Ti-плазмид слишком велики и не позволяют использовать их в качестве вектора. Для решения этой проблемы была создана специальная технология — бинарная система.

Т-ДНК вырезают из Ti-плазмиды и встраивают, например, в плазмиду pBR322, способную к саморепликации в клетках Е. coli. Таким образом осуществляют клонирование Т-ДНК (многократное увеличение числа копий) в составе pBR322. Векторную систему (Т-ДНК — pBR322) выделяют из клеток Е. coli и встраивают в Т-ДНК интересующие гены. Новую векторную систему снова размножают в клетках Е. coli, а затем вводят в клетки Agrobacterium tumefaciens, в которых находятся нормальные Ti-плазмиды. В результате гомологичной рекомбинации векторная система и Ti-плаз- мида обмениваются участками Т-ДНК. Теперь клетки Agrobacterium tumefaciens несут в составе своих плазмид чужеродные гены, которые они могут передать в ядерный геном растительных клеток, что и приводит к созданию трансгенных растений.

В последние годы для создания искусственных векторов используют Ri-плазмиду (от англ, root inducing — индуцирующая корни), присутствующую в штаммах Agrobacterium rhizogenes. Ri-плазмиды выгодно отличаются от Ti-плазмид тем, что они являются естественными безвредными векторами. После встраивания Т-ДНК в хромосомную ДНК растительных клеток в области заражения наблюдается усиленное образование корешков (<• бородатость»), из которых легче регенерировать здоровые растения, чем из недифференцированной ткани опухоли.

Для трансформации устойчивых к агробактериям однодольных растений разработаны приемы прямого физического переноса ДНК в клетку. Эти методы достаточно разнообразны: бомбардировка микрочастицами, или баллистический метод; электропорация; обработка полиэтиленгликолем; микроинъекция; перенос ДНК в составе липосом и др.

Наиболее продуктивным и чаще всего используемым является метод бомбардировки микрочастицами.

В последнее время разработан и успешно применен также комбинированный метод трансформации, названный агролистическим. При этом чужеродную ДНК вводят в ткани каким-либо физическим методом, например баллистическим. Вводимая ДНК содержит как Т-ДНК вектор с целевым и маркерным геном, так и агробактериальные гены вирулентности под контролем эукариотического промотора. Временная экспрессия генов вирулентности в растительной клетке приводит к синтезу белков, которые правильно вырезают Т-ДНК из плазмиды и встраивают ее в хозяйский геном, как и при обычной агробактериальной трансформации.

После проведения тем или иным способом трансформации растительной ткани ее помещают in vitro на специальную питательную среду с фитогормонами, способствующую размножению клеток. Среда обычно содержит селективный агент, в отношении которого трансгенные клетки приобретают устойчивость. Регенерация чаще всего проходит через стадию каллуса, после чего при правильном подборе сред начинается органогенез (побегообразование). Сформированные побеги переносят на среду укоренения, часто также содержащую селективный агент для более строгого отбора трансгенных особей. <https://studme.org/271491/tehnika/geneticheskaya_inzheneriya_rasteniy>

Введение гена в клетку

Способы прямого введения генов в клетку

Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:

Трансфекция

Микроинъекция

Электропорация

Метод «мини-клеток»

Упаковка в липосомы

Электронная пушка

При трансфекции ДНК адсорбируется на кристаллах фосфата кальция (Грэхем Ван дер Эб, 1973). Образуются частицы кальциевого преципитата. Они поглощаются клеткой путем фагоцитоза.

Для повышения эффективности трансформации к специфической ДНК, содержащей ген, по которому будет производится селекция, добавляется неспецифическая ДНК-носитель. Обычно для этой цели берут ДНК из тимуса теленка или спермы лосося. Часть ДНК связывается с мембраной и не попадает в клетки. ДНК акцептируют от 15 до 90% клеток. Через несколько суток после введения небольшая доля клеток способны экспрессировать чужеродные гены, но затем уровень экспрессии падает и более или менее стабильную трансформацию претерпевает 10-3 - 10-5 клеток.

Для трансфекции используется и ДЭАЭ-декстран, полимер, адсорбирующий ДНК. Эффект вхождения в клетки и время экспрессии высоки, но частота стабильной трансформации ниже, чем при использовании преципитата кальция. Частоту трансфекции увеличивает глицериновый шок (4 минуты в 15% растворе глицерина в НEPES-буфере).

В клетки можно вводить любой ген, если заранее лигировать его с клонированным селективным маркером. Однако дальнейшие исследования показали, что лигирование вне клетки не обязательно. Клетки, поглощающие селективный ген, вместе с ним поглощают и другую ДНК, имеющуюся в кальциевом преципитате. Таким образом, пользуясь методом котрансформации, практически любой клонированный сегмент ДНК можно ввести в культивируемые клетки эукариот, если включить эту ДНК вместе с селективным маркером в состав смеси для образования кальциевого преципитата.

Для трансфекции можно использовать хромосомы или фрагменты хромосом. Клетки-доноры блокируются на стадии митоза. Митотические хромосомы высвобождаются под воздействием осмотического шока и гомогенизации. Их очищают путем дифференциального центрифугирования. Хромосомы осаждают на поверхности клеток хлористым кальцием, а через несколько часов обрабатывают реагентом, способным перфорировать мембраны (например, глицерином).

Для обработки клеток-рецепиентов используются грубо очищенные препараты хромосом, так как хромосомы при этом разрушаются меньше всего. Количество хромосом для обработки 1 клетки ограничено. Лучше использовать не более 20 хромосом на 1 клетку-рецепиент, так как при высоких концентрациях хромосом в суспензии они агглютинируют. Рецепиентная клетка содержит фрагменты донорных хромосом, которые могут встраиваться в геном, могут реплицироваться самостоятельно. Во введенных фрагментах часто наблюдаются делеции.

Не все клетки способны к трансформации геномной ДНК с высокой частотой. Человеческие фибробласты эффективно включают плазмидную ДНК и почти не включают геномную.

Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора (рис. 45). Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы (ТК) и плазмиду рВR322, были инъецированы в ТК--клетки и было показано, что ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался. Метод введения ДНК с помощью микроинъекций был разработан в начале 70-х годов Андерсоном и Диакумакосом. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500-1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

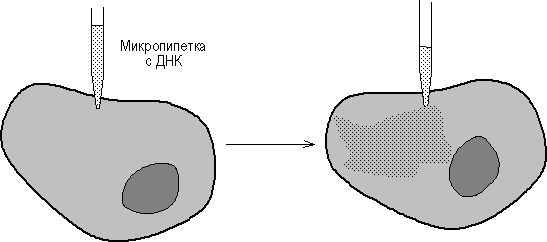


Рис. 45. Введение ДНК путем микроинъекции

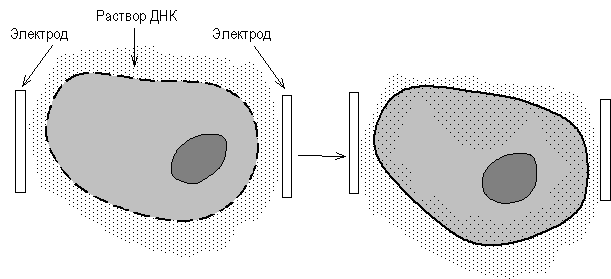
Электропорация основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки (рис. 46). Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200 - 350 В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается.

Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток.

Электропорация — физический, а не биохимический метод, и это, по-видимому, обусловливает его широкое применение. Многочисленные исследования продемонстрировали, что электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений. Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислойную липидную мембрану, по-видимому, зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому мелкие бактериальные клетки эффективно поглощают ДНК при значительно большей напряженности (10 кВ/см и более), чем крупные животные и растительные клетки, эффективно поглощающие ДНК при напряженности поля 1—2 кВ/см.

Электропорация — наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки. Однако до недавнего времени этот метод использовался в ограниченном числе лабораторий в связи с отсутствием серийных приборов — электропораторов. Появление и совершенствование таких приборов в ближайшие годы приведет к широкому применению данного подхода в генетической инженерии самых разных типов клеток.

введение ДНК в клетку путем электропорации

 Рис. 46. Метод электропорации

«Мини-клетки» получают путем блокирования донорных клеток митозе колцемидом. При продолжительной обработке клеток колцемидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану.

Полученные мини-клетки очень чувствительны к разного рода воздействиям, поэтому для слияния подбирают специальные мягкие условия. Метод трудный, капризный, эффективность низкая – 10-6 – 10-7.

Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз.

Липосомы - сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

***Контрольные вопросы:***

1. Трансформация растительного генома
2. Строение Ti-плазмид.
3. Методы трансформация растений.

**Лекция 9**

**Метод биолистической трансформации растений.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методом биолистической трансформации растений.

Метод биологической баллистики (биолистики) является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных.

Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолистической пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолистической пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.

Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации. http://www.biotechnolog.ru/ge/ge9\_4.htm

С помощью биолистической пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолистическая трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбриогенную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигаплоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаплоидных растений получены стабильные трансформанты.

***Контрольные вопросы:***

1. Метод биолистической трансформации растений.
2. Суть метода биологической баллистики.

**Лекция 10**

**Генная инженерия и клонирование животных..**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методом генной инженерий и клонирования животных.

Клонирование [от гр. klon отпрыск, ветвь] — метод генной инженерии: получение особей путем бесполого размножения из одной клетки (как правило, не половой) с применением клеточной культуры. ... Под генной инженерией понимают манипуляции с целью создания рекомбинантных молекул ДНК.

Клони́рование (англ. cloning от др.-греч. κλών — «веточка», «побег», «отпрыск») — в самом общем значении — точное воспроизведение какого-либо объекта любое требуемое количество раз. Объекты, полученные в результате клонирования (каждый по отдельности и вся их совокупность), называются клоном.

Клонирование животных

В начале пути

1826 год — открытие яйцеклетки млекопитающих русским эмбриологом Карлом Бэром.

1883 год — открытие сущности оплодотворения (слияния пронуклеусов) немецким цитологом Оскаром Гертвигом.

1943 год — сообщение в журнале «Science» об успешном оплодотворении яйцеклетки «в пробирке».

1962 год — клонирование профессором зоологии Оксфордского университета Джон Гёрдон шпорцевых лягушек[3] (более доказательные опыты — в 1970 г.).

1978 год — рождение в Англии Луизы Браун, первого ребёнка «из пробирки».

1985 год, 4 января — рождение девочки у миссис Коттон — первой в мире суррогатной матери в одной из клиник северного Лондона (девочка зачата не из яйцеклетки миссис Коттон).

1987 год — клонирование мыши из клетки эмбриона с использованием метода электростимулируемого слияния клеток в СССР в лаборатории Бориса Николаевича Вепринцева (Л. М. Чайлахян и др.)[4].

1987 год — разделение клеток человеческого зародыша и клонирование их до стадии тридцати двух клеток (бластомеров) специалистами Университета имени Дж. Вашингтона, использовавшими специальный фермент.

*Клонирование амфибий (Дж. Гёрдон)*

Первые успешные опыты по клонированию животных были проведены в 1960-е годы английским эмбриологом Дж. Гёрдоном (J. Gurdon) в экспериментах на шпорцевой лягушке. Для пересадки использовались ядра клеток кишечника головастиков. Опыты были подвергнуты критике, так как в кишечнике головастиков могли сохраниться первичные половые клетки. В 1970 году удалось провести опыты, в которых замена ядра яйцеклетки на генетически помеченное ядро из соматической клетки взрослой лягушки привела к появлению головастиков и взрослых лягушек. Это показало, что техника трансплантации ядер из соматических клеток взрослых организмов в энуклеированные (лишённые ядра) ооциты позволяет получать генетические копии организма, послужившего донором ядер дифференциированных клеток. Результат эксперимента стал основанием для вывода об обратимости эмбриональной дифференцировки генома по крайней мере у земноводных.

*Клонирование млекопитающих*

Клонирование млекопитающих возможно с помощью экспериментальных манипуляций с яйцеклетками (ооцитами) и ядрами соматических клеток животных in vitro и in vivo. Клонирование взрослых животных достигается в результате переноса ядра из дифференцированной клетки в неоплодотворённую яйцеклетку, у которой удалено собственное ядро (энуклеированная яйцеклетка) с последующей пересадкой реконструированной яйцеклетки в яйцевод приёмной матери. Однако долгое время все попытки применить описанный выше метод для клонирования млекопитающих были безуспешными. Одними из первых успешное клонирование млекопитающего (домовой мыши) осуществили советские исследователи[5] в 1987 г. Они использовали метод электропорации для слияния энуклеированной зиготы и клетки эмбриона мыши с ядром.

Значительный вклад в решение этой проблемы был сделан шотландской группой исследователей из Рослинского института и компании «PPL Therapeuticus» (Шотландия) под руководством Яна Вильмута (Wilmut). В 1996 году появились их публикации по успешному рождению ягнят в результате трансплантации ядер, полученных из фибробластов плода овцы, в энуклеированные ооциты.[6] В окончательном виде проблема клонирования животных была решена группой Вильмута в 1996 г., когда родилась овца по кличке Долли — первое млекопитающее, полученное из ядра взрослой соматической клетки: собственное ядро ооцита было заменено на ядро клетки из культуры эпителиальных клеток молочной железы взрослой лактирующей овцы[7]. В дальнейшем были проведены успешные эксперименты по клонированию различных млекопитающих с использованием ядер, взятых из взрослых соматических клеток животных (мышь, коза, свинья, корова), а также взятых у мёртвых, замороженных[8] на несколько лет, животных. Появление технологии клонирования животных вызвало не только большой научный интерес, но и привлекло внимание крупного бизнеса во многих странах. Подобные работы ведутся и в России, но целенаправленной программы исследований не существует. В целом технология клонирования животных ещё находится в стадии развития. У большого числа полученных таким образом организмов наблюдаются различные патологии, приводящие к внутриутробной гибели или гибели сразу после рождения, хотя при клонировании овец в 2007 году выжил каждый 5-й эмбрион (в случае с Долли — понадобилось 277).

В 2004 году американцы начали коммерческое клонирование кошек, а в апреле 2008 года Южнокорейские таможенники приступили к дрессировке семи щенков, клонированных из соматических клеток лучшего корейского розыскного пса породы канадский лабрадор-ретривер. По мнению южнокорейских учёных 90 % клонированных щенков будут удовлетворять требованиям для работы на таможне, тогда как лишь менее 30 % обычных щенков проходят тесты на профпригодность[9][10].

В Китае фирмой «BGI» уже производится в промышленных масштабах клонирование животных для медицинских исследований[11]. Предполагается, что подобная методика в будущем будет использована для выращивания в свиньях запасных органов для трансплантации человеку.

*Клонирование без использования пересадки ядер*

В 2009 году была опубликована работа, в которой с помощью метода тетраплоидной комплементации впервые было показано, что индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) могут давать полноценный организм, в том числе и его клетки зародышевого пути[12]. iPS, полученные из фибробластов кожи мышей с помощью трансформации с использованием ретровирусного вектора, в некотором проценте случаев дали здоровых взрослых мышей, которые были способны нормально размножаться. Таким образом, впервые были получены клонированные животные без примеси генетического материала яйцеклеток (при стандартной процедуре клонирования митохондриальная ДНК передается потомству от яйцеклетки реципиента).

*Клонирование с целью воссоздания вымерших видов*

Основная статья: Воскрешение вымерших видов

Клонирование может быть использовано для воссоздания естественных популяций вымерших животных. Несмотря на наличие определённых проблем и трудностей, первые результаты в данном направлении уже имеются.

*Клонирование испанского козерога*

В Испании в 2003 году родился клонированный детёныш вымершего подвида пиренейского горного козла букардо (Capra pyrenaica pyrenaica)[13]. Сообщение о клонировании появилось в январском номере журнала «Theriogenology».

Данный подвид пиренейских козлов полностью исчез к 2000 году (причины вымирания точно не известны[14]). Последний представитель вида, самка по имени Селия (Celia), погибла в 2000 году. Но до того (в 1999-м г.) Хосе Фольк (Jose Folch) из Исследовательского центра сельского хозяйства и технологий Арагона (CITA) взял у Селии несколько клеток кожи с целью анализа и сохранения в жидком азоте. Этот генетический материал был использован в первой попытке клонировать вымерший подвид.

Экспериментаторы переносили ДНК букардо в яйцеклетки домашней козы, лишённые собственного генетического материала. Полученные эмбрионы подсаживали суррогатным матерям — самкам других подвидов испанского козла или гибридных видов, полученных скрещиванием домашних и диких коз. Таким образом было создано 439 эмбрионов, 57 из которых были имплантированы в суррогатные матки. Всего семь операций закончилось беременностью и только одна коза, в конце концов, родила самку букардо, умершую спустя семь минут после рождения от проблем с дыхательной системой.

Несмотря на неудачное клонирование и смерть клонированного козлёнка, многие ученые полагают, что такой подход может быть единственным способом спасения видов, стоящих на грани вымирания. Это вселяет в учёных надежду на то, что подвергающиеся опасности и недавно вымершие виды можно будет воскресить с использованием замороженных тканей[15][16].

*Клонирование бантенгов*

В 2004 году на свет появилась пара бантенгов (диких быков, обитавших в Юго-Восточной Азии), клонированных из клеток животных, умерших более 20 лет назад. Два бантенга были клонированы из уникального «замороженного зоопарка» Сан-Диего, созданного ещё до того, как люди поняли, что клонирование вообще возможно. Произведшая клонирование американская компания «Advanced Cell Technology» сообщила, что в нём использовались клетки животных, которые умерли в 1980 году, не оставив потомства.

Бантенгов клонировали, перенеся их генетический материал в пустые яйцеклетки обычных домашних коров; из 16 зародышей до рождения дожили только два[17][18].

*Императорский дятел*

В последний раз императорского дятла видели в Мексике в 1958 году. С тех пор орнитологи пытаются найти следы этой популяции, но безуспешно. Около десяти лет назад появились даже слухи, что птица ещё живёт на планете, но и они не подтвердились.

Однако в музеях остались чучела птицы. Научный сотрудник Дарвиновского музея Игорь Фадеев считает, что если операцию по выделению ДНК провести со всеми чучелами, которые находятся в разных странах мира, то дятла можно будет воскресить. В разных музеях мира на сегодняшний день осталось лишь десять чучел императорского дятла.

Если проект увенчается успехом, то в недалеком будущем на нашей планете, возможно, вновь появится императорский дятел. В Государственном Дарвиновском музее уверены, что последние методы молекулярной биологии позволяют выделить и воспроизвести ДНК этих птиц[19].

*Дронт*

В июне 2006 года голландские учёные обнаружили на острове Маврикий хорошо сохранившиеся останки дронта — вымершей исторически недавно (в XVII веке) нелетающей птицы. Ранее наука не располагала останками птицы. Но теперь появилась определённая надежда на «воскрешение» этого представителя пернатых[20].

*Клонирование гигантских птиц*

Планы по клонированию исчезнувших гигантских птиц были поставлены под сомнение в результате исследований учёных Оксфордского университета. Выделив участки ДНК из останков вымерших птиц, учёные обнаружили, что их генетический материал настолько разрушен, что современная технология не позволяет провести полноценное клонирование. Цель научных работ состояла в возрождении вымерших несколько веков назад новозеландского страуса моа, а также мадагаскарского эпиорниса (птицы-слона).

Образцы ДНК были взяты из фрагментов тканей, сохранившихся в музеях. Однако учёные не смогли получить достаточную по своей длине цепочку ДНК, чтобы провести клонирование. Тем не менее, некоторые учёные считают, что в ближайшие годы будет разработана технология восстановления утраченных частей ДНК путём вшивания туда «заплат» из ДНК близкородственных видов[21].

Позже исследовательская группа Майкла Бьюнса (Michael Bunce) из университета Мердока (Австралия) разработала эффективный метод извлечения ДНК из скорлупы ископаемых яиц, показавший свою эффективность на скорлупе яиц моа и эпиорниса возрастом до 19 000 лет включительно, что делает планы по клонированию гигантских ископаемых птиц более реалистичными[22][23].

*Клонирование мамонта*

Лаборатория Джорджа Черча (George Church) из Гарвардского университета (США) в середине октября 2014 года объявила о начале проекта по «воскрешению» мамонтов. Шансы на воскрешение мамонтов появились благодаря появлению в 2012 году революционной технологии «перезаписи» генома CRISPR/CAS, которая позволяет точечным образом менять и удалять произвольные гены в ДНК млекопитающих. Используя эту методику, Черч и его коллеги смогли успешно вставить в геном клеток кожи слона гены, предположительно отвечающие за типичные признаки мамонта — маленькие уши, толстый слой подкожного жира, длинную шерсть и бурый цвет. Клетки пережили эту трансформацию и сейчас учёные думают над тем, как их можно превратить в настоящую кожную ткань[24].

В марте 2015 года было объявлено, что американские генетики впервые смогли успешно пересадить часть генов мамонта, извлечённых из фрагментов ДНК гигантов ледникового периода, в геном клетки обычного африканского слона и размножить их. Таким образом, генетики совершили первый шаг на пути к воскрешению мамонта или к созданию мамонтоподобного слона. (См. также раздел «Возможности клонирования вымерших животных» статьи «Плейстоценовый парк»).

В мае 2015 года в журнале «Current Biology» была опубликована статья о расшифровке генома двух мамонтов[25]. Возможно, новые данные найдут применение при клонировании мамонтов, но пока специалисты не смогут обойтись без яйцеклеток современных слонов[26].

*Генная инженерия на людях и клонирование*

Клонирование - это процесс, в ходе которого живое существо производится от единственной клетки, взятой от другого живого существа. Согласно опросам Time/CNN, 93% американцев выступают против клонирования людей, и 66% - против клонирования животных.

*Этика клонирования*

Человек есть тот, кто он есть, и должен приниматься только так. Он не может становиться объектом изменения ни из каких благих намерений. Иначе пропадет основное различие между людьми как субъектами и предметами для искусственного манипулирования. Это будет иметь горчайшие последствия для человеческого достоинства. Социальные последствия такого изменения глубоки. Это будет новая эра человеческой истории, в которой генетическая конституция человечества в целом станет предметом воздействия рыночных стихий. Одним из возможных последствий, судя по дороговизне технологии, будет то, что богатые смогут получить дополнительные преимущества для своих детей, ведущие к генетическому улучшению правящей элиты. Ли Сильвер, биолог из Принстонского университета, сказала, что элита может стать практически отдельным видом. Учитывая могущество технологии и недавние примеры геноцида в XX столетии, есть основания опасаться использования генной инженерии в евгенических целях.Справедливое опасение вызвало создание безголового клона лягушки в 1997 г. Этот опыт породил страх создания безголовых людей, как "фабрик органов", и "научного фашизма". Тогда станет возможным создание других существ, основным назначением которых будет обслуживание доминирующей группы. https://ru.wikipedia.org/wiki

Президент Клинтон сказал, что клонирование людей морально неприемлемо, и предложил 5-летний запрет на него. Однако его волеизъявление ограничилось просьбой к промышленности достичь добровольного соглашения об этом. Он не счел возможным ввести полный запрет на эту сферу. Конгресс отверг предложенный им законопроект. Таким образом, в этой области до сих пор царит законодательный вакуум. Тем временем управление патентов США постановило, что клиники могут патентовать их собственные линии эмбрионов, и таким образом открыло вопрос о "дизайне эмбрионов" в исследовательских целях. С другой стороны, ВОЗ и Совет Европы призвали к запрещению клонирования людей. При запрещении клонирования некоторые научные вопросы будет сложнее разрешить. Но удобство научных исследований не может оправдать унижение человеческого достоинства, подобно тому как это было в нацистских концлагерях. Сложность получения медицинской информации определенного сорта не может быть достаточным оправданием для исследований, требующих использования человека как вещи. http://www.seu.ru/cci/campaign/gen/ginlik.htm

***Контрольные вопросы:***

1. Клонирование.
2. Клонирование амфибий.
3. Клонирование млекопитающих
4. Клонирование с целью воссоздания вымерших видов.
5. Генная инженерия на людях и клонирование.
6. Этика клонирования.

**Лекция 11**

**Правовое регулирование создания и использования ГМО, идентификация генетически модифицированных источников (ГМИ) в пищевых продуктах, стандарты, методы.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с правовым регулированием создания и использования ГМО.

*Генетически модифицированная пища* — продукты питания, полученные из генетически модифицированных организмов (ГМО) — растений или животных. Продукты, которые получены при помощи генетически модифицированных организмов, включая микроорганизмы, или в состав которых входит хоть один компонент, полученный из продуктов, содержащих ГМО, также могут считаться генетически модифицированными, в зависимости от законодательства конкретной страны.

Существует научный консенсус, что имеющиеся в настоящее время продукты питания, полученные из ГМ-культур, не представляют большего риска для здоровья человека, чем обычные продукты питания[⇨].

На 2015 год генно-модифицированные растения выращивались в 28 странах, на рынок было допущено 28 генно-модифицированных сельскохозяйственных культур (включая как пищевые, так и кормовые и технические). В 2015 году впервые было разрешено к продаже в пищу генетически модифицированное животное — атлантический лосось AquAdvantage. Генетически модифицированные микроорганизмы используются при производстве значительного количества сыров, а также при производстве йогуртов.

*Способы проверки на наличие ГМО*

Как правило, проверка на наличие ГМО проводится при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Такой тест предусматривает три основных действия:

*Пробоподготовка,* состоящая в выделении ДНК из тестируемого пищевого продукта;

Постановка ПЦР с выделенной ДНК и с парой праймеров, которые комплементарны участку встроенного гена. Иногда один из праймеров может быть комплементарен пограничному участку между хромосомной ДНК «хозяина» и встроенной ДНК. В ходе ПЦР многократно амплифицируется участок ДНК, специфичный для встроенного гена или для события-вставки.

*Выявление амплифицированного ПЦР-продукта* при помощи разных устройств. Если продукт обнаруживается, это является свидетельством, что в пробе выявлена ДНК генно-модифицированного организма.

*Количественное определение на наличие ГМО*: точное количество ГМО в продукте определить невозможно. Долгое время определялось только наличие ГМО в продукте: содержит продукт ГМО или нет. Относительно недавно были разработаны способы количественного определения — ПЦР в режиме реального времени, когда амплифицированный продукт помечается флуоресцентным красителем и интенсивность излучения сравнивается с откалиброванными стандартами. Однако, даже самые лучшие устройства все ещё имеют значительную погрешность.

Количественное определение на наличие ГМО возможно только тогда, когда из продукта можно выделить достаточное количество ДНК. Если возникают трудности с выделением ДНК, которая довольно неустойчивая, разрушается и теряется в процессе обработки продукта (очищение и рафинирование масла или лецитина, термическая и химическая обработка, обработка давлением), тогда количественное определение невозможно[33]. Способы выделения ДНК в разных лабораториях могут быть разными, поэтому показатели количественного значения могут так же различаться, даже если исследуется один и тот же продукт[34].

Независимо от того, качественное или количественное определение используется для анализа пищевых продуктов на содержание ГМО, недостатком способа является большое количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Самые точные результаты можно получить при анализе необработанного растительного сырья.

Для качественного определения содержания ГМО иногда используют стандартизированные проверочные чип-системы[35]. Способы определения ДНК в разных лабораториях могут отличатся, поэтому различаться могут и показатели количественного значения, даже если анализируется один и тот же продукт[36]. В основе чип-систем лежит принцип комплементарной гибридизации ДНК с меткой, нанесённой на чип. Ограничивающим фактором этого способа является так же эффективное выделение ДНК. Однако подобные проверочные системы не охватывают всего разнообразия ГМО и сложны их определения.

*Путь к коммерциализации*

В каждой стране путь к коммерциализации ГМО разный. Допуск к продаже и культивированию предусматривает разные процедуры, однако они основаны на одинаковых принципах.

*Безопасность:* продукт должен быть безопасным и не представлять угрозы здоровью людей или животных. Также он должен быть безопасным для окружающей среды. Безопасность определяется согласно разработанным испытаниям, которые основываются на новейших научных знаниях и применяются с использованием современных технологических средств. Если продукт не подходит под вышеозначенные требования — он не получает разрешения на культивирование или распространение. Если с течением времени в продукте выявляются опасные свойства, он исключается с рынка.

*Право выбора:* даже если ГМО получает разрешение на культивирование или распространение, потребители, фермеры и предпринимательство должны иметь право выбора — использовать его или нет. Это означает, что в перспективе должна существовать возможность производить продукцию без использования генной инженерии.

Обеспечение принципа права выбора возможно при условии соблюдения двух правил:

*Маркировка:* самый важный способ для обеспечения права выбора. Где бы и каким образом ГМО не использовали, он должен быть ясно промаркирован. В таком случае потребитель имеет возможность сделать осознанный выбор.

*Отслеживание:* маркировка так же необходима, даже если ГМО нельзя отследить в остаточном продукте. Это касается производителей и поставщиков продуктов. В этом случае они обязуются информировать потребителей путём выдачи ответственной документации относительно сырья.

Допуск для одной генно-модифицированной культуры в одной стране оценивается от 6 до 15 млн долларов США, сюда включены затраты на приготовление запроса, оценка молекулярных характеристик, состава и токсичности продукта, исследования на животных, характеристика белков на аллергенность, оценка агрономических качеств, разработка способов испытания, подготовка юридических документов для организации экспорта[37]. Затраты оплачивает лицо, подающее запрос на допуск.

*Риски, связанные с ГМ продуктами питания*

Основная статья: Исследования безопасности генетически модифицированных организмов

*Риск для здоровья*

Установить 100%-ю безопасность любых пищевых продуктов научно невозможно. Однако генетически-модифицированные продукты проходят подробные исследования, которые базируются на современных научных знаниях.

Не было зарегистрировано никаких сообщений о вредных эффектах в человеческой популяции от генетически модифицированных продуктов питания[38][39][40].

Существует научный консенсус[41][42][43][44], что имеющиеся в настоящее время продукты питания, полученные из ГМ-культур, не представляют большего риска для здоровья человека, чем обычные продукты питания[45][46][38][47][48], но каждый ГМ-продукт необходимо тестировать в каждом конкретном случае до его введения[49][50][51][52].

*Пищевые аллергии, которые могут быть связаны с ГМО*

У присутствующих сегодня на рынке таких продуктов не было обнаружено аллергических эффектов[49].

Одним из возможных рисков употребления генетически модифицированной еды рассматривается её потенциальная аллергенность. Когда в геном растения встраивают новый ген, конечным результатом является синтез в растении нового белка, который может быть новым в диете. В связи с этим невозможно определить аллергенность продукта, базируясь на прошлом опыте. Теоретически каждый протеин — потенциальный триггер аллергической реакции, если на его поверхности есть специфические места связи к антителу IgE. Антитела, являющиеся специфическими для конкретного антигена, производятся в организме индивидуума, чувствительного к аллергену. Чувствительность к аллергенам часто зависит от генетической предрасположенности, поэтому расчёты аллергического потенциала невозможно сделать с 100%-й точностью. Новые потенциальные аллергены формируются так же в сортах конвенционной селекции, но отследить подобные аллергены очень сложно, кроме того процедура допуска конвенционных сортов к анализу на аллергенность не предусматривается[источник не указан 699 дней].

Каждый генно-модифицированный сорт, перед тем как попасть к потребителю, проходит процедуру оценки его аллергенного потенциала. Тесты предусматривают сравнение белковой последовательности с известными аллергенами, стабильность белка во время переваривания, тесты при помощи крови от чувствительных к аллергенам индивидуумов, тесты на животных[53].

В случае, если продукт в процессе разработки демонстрирует аллергические свойства, запрос на коммерциализацию может быть отозван. Например, в 1995 году компания Pioneer Hi-Bred разрабатывала кормовую сою с повышенным содержанием аминокислоты метионина. Для этого использовали ген бразильского ореха, который, как со временем выяснилось, демонстрировал аллергические качества[54]. Разработка продукта остановлена, поскольку есть риск, что кормовая соя может случайно или в результате недобросовестных действий поставщика попасть на стол к потребителю[источник не указан 699 дней].

Другой пример потенциально-аллергенного продукта — кормовой сорт Bt-кукурузы «StarLink», разработанный Aventis Crop Sciences. Регулирующие органы США разрешили продажу семян «StarLink» с предостережением, что культура не должна использоваться для употребления человеком. Ограничение базировалось на тестах, которые продемонстрировали плохие пищеварительные качества белка. Несмотря на ограничение, семена кукурузы «StarLink» были найдены в продуктах питания. 28 человек обратились в медицинские учреждения с подозрением на аллергическую реакцию. Однако в центре контроля за заболеваниями США изучили кровь этих людей и пришли к выводу, что нет никаких доказательств повышенной чувствительности к белку Bt-кукурузы «StarLink»[55]. С 2001 года культивирование сорта прекращено. Мониторинг продемонстрировал, что с 2004 года никаких следов культивирования сорта не наблюдается[56].

В 2005 году австралийская компания CSIRO разработала пастбищный горох путём встраивания в него гена устойчивости к насекомым-вредителям, выделенного из фасоли[57]. Экспериментальные исследования показали аллергические поражения лёгких у мышей. Дальнейшая разработка этого сорта была немедленно прекращена[58]. При этом аллергическая реакция была предположительно связана с тем, что белок, синтезировавшийся в горохе, был не идентичен белку, который синтезировала фасоль, в связи с пострансляционной модификацией. Эксперименты 2013 года, проведённые другими исследователями, показали что аллергические реакции у некоторых видов мышей вызывали как трансгенные виды бобовых, так и нетрансгенная фасоль[57].

*Токсичность, которая может быть связана с ГМО*

Отдельные продукты генов, которые переносятся в организм генно-инженерными методами, могут быть вредными. В 1999 году опубликована статья Арпада Пустай (Árpád Pusztai), касающаяся токсичности генно-модифицированного картофеля для крыс. В картофель был встроен ген лектина из подснежника Galanthus nivalis с целью повысить стойкость картофеля к нематодам. Скармливание картофеля крысам продемонстрировало токсический эффект генно-модифицированного сорта[59]. Опубликованию данных предшествовал громкий скандал, поскольку результаты были представлены до экспертной оценки другими учёными. Предложенное Пустаем объяснение, что токсический эффект, скорее всего, вызвал не лектин, а способ переноса гена, не поддерживается большинством учёных, поскольку представленных в статье данных недостаточно для формулирования именно таких выводов. Разработка трансгенного картофеля с геном лектина прекращена.

Современная методология допуска трансгенных растений к использованию предусматривает химический анализ состава в сравнении с конвенционными продуктами и исследования на подопытных животных[53]. Отдельным предметом дискуссии является дизайн экспериментов на животных. Российский исследователь Ирина Ермакова провела исследование на крысах, которое, по её мнению, демонстрирует патологическое влияние генно-модифицированной сои на репродуктивные качества животных[60]. Поскольку данные широко обсуждались в мировой прессе, не будучи опубликованными в реферированных журналах, научная общественность рассмотрела результаты более тщательно[61]. Обзор шести независимых экспертов мирового уровня привёл к следующим выводам относительно этого опыта:

Результаты Ирины Ермаковой противоречат стандартизированным результатам других исследователей, которые работали с тем же самым сортом сои и не выявили токсического влияния на организм[62].

В своей работе Ермакова отметила, что получила трансгенную сою из Нидерландов, хотя отмеченная фирма не поставляет генно-модифицированную сою.

Использованные ГМО-продукты и контрольные образцы являются смесью оригинальных сортов.

Не было приведено доказательств, что контрольные образцы не содержат материал с модифицированными генами, также не показано, что модифицированная соя на 100 % трансгенная.

Отсутствует описание диет и составляющих рациона крыс.

Отсутствуют данные относительно питания отдельных особей, продемонстрированные данные касаются только групп особей.

Смертность в контрольной группе значительно превышала нормальную смертность крыс этой лабораторной линии. Также сниженный вес в контрольной группе указывает на недостаточный досмотр или недостаточное питание крыс, которое делает выводы исследователя нерелевантными.

В 2009 году опубликованы исследования Эрика Сералини, касающиеся оценки токсического влияния трансгенных сортов кукурузы NK 603, MON 810, MON 863 на здоровье крыс[63]. Авторы пересчитали собственными статистическими методами результаты кормления крыс, полученные «Монсанто» для сортов NK 603 и MON 810 в 2000 году и Covance Laboratories Inc для сорта MON 863 в 2001 году. Выводы свидетельствуют о гепатотоксичности употребления этих генно-модифицированных сортов, и поэтому привлекли пристальное внимание контролирующих органов.

EFSA GMO Panel выдвинула ряд критических замечаний к выбранному статистическому методу вычисления и выводам, приведённых в статье[64]:

Результаты представлены исключительно в виде процента отличий для каждой переменной, а не в их фактически измеряемых единицах.

Рассчитанные значения параметров токсикологических испытаний не связаны с диапазоном нормального распределения для исследуемых видов.

Рассчитанные значения токсикологических параметров не сравнивались с нормальным распределением у подопытных животных, которые кормились разными рационами.

Статистически достоверные отличия не связаны с дозами.

Несоответствия между статистическими аргументами Сералини и результатами этих трёх исследований кормления животных, связанные с патологией органов, гистопатологией и гистохимией.

EFSA пришли к выводу, что результаты, продемонстрированные Сералини, не дают оснований для пересмотра предыдущих выводов про безопасность пищевых продуктов, полученных для трансгенных сортов кукурузы NK 603, MON 810 та MON 863.

Вышедший в 2013 году обзор 1783 исследований, сделанных в период с 2003 по 2013 год и затрагивавших разные аспекты безопасности ГМ-культур, делает вывод об отсутствии научных свидетельств токсичности ГМ-культур. <https://ru.wikipedia.org/wiki>

***Контрольные вопросы:***

1. Генетически модифицированная пища.
2. Способы проверки на наличие ГМО
3. Безопасность продуктов.
4. Риски, связанные с ГМ продуктами питания.

**Лекция 12**

**Генная терапия.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с генной терапией.

*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. Концепция генотерапии, по-видимому, появилась сразу после открытия явления трансформации у бактерий и изучения механизмов трансформации клеток животных опухолеобразующими вирусами. Такие вирусы могут осуществлять стабильное внедрение генетического материала в геном клетки хозяина, поэтому было предложено использовать их в качестве векторов для доставки желаемой генетической информации в геном клеток. Предполагалось, что такие векторы могут в случае необходимости поправлять дефекты генома.

Реальностью генная коррекция соматических клеток стала после 1980-х годов, когда были разработаны методы получения изолированных генов, созданы эукариотические экспрессирующие векторы, стали обычными переносы генов у мышей и других животных.

Исторически генная терапия нацеливалась на лечение наследственных генетических заболеваний, однако поле её применения, по крайней мере теоретически, расширилось. В настоящее время генную терапию рассматривают как потенциально универсальный подход к лечению широкого спектра заболеваний, начиная от наследственных, генетических, и заканчивая инфекционными.

*История генной терапии*

*1970-е и ранее*

В 1972 Фридман и Роблин опубликовали статью в Журнале Science под заголовком «Генная терапия для генетических болезней человека?»[4] Роджерс (1970) предложил заменять дефектный ДНК у тех, кто страдал от генетических дефектов.[5]

*1980-е*

В 1984 была разработана система ретровирусного вектора, способная эффективно вставлять инородные гены в хромосомы млекопитающих.[6]

*1990*

Первое разрешенное в истории США клиническое исследование генной терапии было проведено 14 сентября 1990 в Национальном институте здоровья (NIH) под руководством Вильяма Андерсона.[7]. Четырёхлетняя Ашанти ДеСильва получила лечение от тяжелого генетического дефекта сложного комбинированного иммунодефицита, связанного с недостатком фермента ADA. Во взятой у пациента крови дефектный ген был заменен на функциональный вариант. Это привело к частичному восстановлению иммунной системы Ашанти. Она временно стимулировала производство недостающего фермента, но не порождало новые клетки с функциональным геном. Ашанти продолжала получать инъекции скорректированных T-клеток каждые два месяца и имела возможность вести нормальную жизнь.[8]

*1993—2002*

1993 год. Генная терапия пациента, страдающего SCID[источник не указан 3269 дней] команде Френча Андерсона из Калифорнийского Университета. После проведения терапии белые кровяные клетки продолжали выполнять свои функции в течение 4 лет. Затем потребовалось повторное лечение.

«Отец генной терапии» Френч Андерсон вылечил двух девочек, 4 и 8 лет. Девочки были на грани смерти, но благодаря ему живы и здоровы по сей день.

1999 год. Каждый четвёртый ребёнок, страдающий SCID, лечится с помощью генной терапии[источник не указан 3269 дней].

*2003 год*

В 2003 команде Калифорнийского Университета удалось перенести гены в нейроны головного мозга, используя липосомы, покрытые полимером полиэтиленгликоль (англ. PEG). До этого перенос генов в нейроны головного мозга был невозможен из-за того, что вирусные векторы не могли преодолеть гематоэнцефалический барьер из-за своих больших размеров[источник не указан 3269 дней]. На основе новой технологии разрабатываются методы генной терапии болезни Паркинсона[источник не указан 3269 дней].

Разрабатываются методы лечения синдрома Хантингтона с использованием процесса РНК-интерференции[источник не указан 3269 дней].

*2006 год*

Первая демонстрация эффективной борьбы с раком с использованием генной терапии. Учёные из National Institutes of Health (Мэриленд) успешно борются с метастазирующей меланомой у двух пациентов, используя генетически изменённые Т-киллеры[источник не указан 3269 дней].

Май 2006 года. Коллектив учёных во главе с Luigi Naldini и Brian Brown из Миланского San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET) сообщил о прорыве в генотерапии: разработан способ «обмана» иммунной системы, вызывающей отторжение генно-модифицированных клеток[источник не указан 3269 дней]. Для этого специфическим образом используется микроРНК. Открытие может сыграть ключевую роль в разработке методов генной терапии гемофилии.

В марте 2006 г. международная группа учёных объявила об успешном использовании генотерапии для лечения двух взрослых пациентов от заболевания, связанного с миелоидными клетками[источник не указан 3269 дней].

*2007 год*

В мае 2007 года Moorfields Eye Hospital и University College London’s Institute of Ophthalmology объявили о первом испытании генотерапии для лечения врожденного амавроза Лебера[9]. Первая операция была выполнена на 23-летнем британце Роберте Джонсоне в начале 2007 года. Для этого использовался рекомбинантный аденоассоциированный вирус, несущий ген RPE65. Лечение привело к положительным результатам, при этом не было обнаружено никаких побочных эффектов.

*2008 год*

В декабре 2008 года успешно завершились испытания на мышах терапии серповидно-клеточной анемии[10].

*2009 год*

Генотерапия успешно применена для улучшения состояния больных ВИЧ[11] и ТКИД (тяжелый комбинированный иммунодефицит)[12]. На грызунах показана эффективность генотерапии в терапии хронической боли[13] и некоторых видов глухоты[14][15] и слепоты[16].В настоящее время разрабатывается генотерапия для редкого и тяжелого заболевания — фибродисплазии. Происходит это в Университете штата Пенсильвания, при участии генетиков всего мира[17].

*2010 год*

Статья Комароми, опубликованная в апреле 2010 года, описала технологию генной терапии для лечения форм ахроматопсии у собак. Ахроматопсия или полная цветовая слепота используется в виде идеальной модели для разработки методов генной терапии, направленных на конусные фоторецепторы. Функция конусов и дневное зрение были восстановлены, по крайней мере, в течение 33 месяцев у двух молодых собак с ахроматопсией. Тем не менее, терапия была менее эффективна для старых собак.[18]

*2011 год*

Пациент, проходивший лечение в 2007 и 2008 годах у Геро Хюттера, был излечен от ВИЧ методом повторной трансплантации гематопоэтических стволовых клеток (см. также аллогенная трансплантация стволовых клеток, аллогенная трансплантация костного мозга, аллотрансплантация) с двойной дельта-32 мутацией, которая отключает рецептор CCR5. Методы этого лечения, которые требовали полного удаления существующего костного мозга пациента, что было очень изнурительной процедурой, не были приняты медицинским сообществом вплоть до 2011 года.[19]

Группе генетиков удалось вылечить лабораторных мышей от гемофилии с помощью аденоассоциированных вирусов.[20] В течение 8 месяцев не обнаружено никаких побочных эффектов.

В 2011 в России был зарегистрирован «Неоваскулген» — первый в классе препарат генотерапии для лечения периферийной артериальной болезни, включая критическую ишемию конечности. Состав препарата — дезоксирибонуклеиновая кислота плазмидная сверхскрученная pCMV-VEGF165.

*2012 год*

Учёные из испанского Национального онкологического научного центра (исп. Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas) под руководством его директора Марии Бласко (исп. María Blasco) доказали, что продолжительность жизни мышей можно увеличить однократным введением препарата, непосредственно воздействующего на гены животного во взрослом состоянии. Они сделали это с помощью генной терапии — стратегии, ещё ни разу не использовавшейся для борьбы со старением. Применение этого метода на мышах признано безопасным и эффективным. Мыши, получавшие терапию в возрасте одного года, жили дольше в среднем на 24 %, а в возрасте двух лет — на 13 %. Кроме того, лечение привело к значительному улучшению состояния здоровья животных, задержав развитие возрастных заболеваний — таких как остеопороз и резистентность к инсулину — и улучшив такие показатели старения, как нервно-мышечная координация. Это исследование «показывает, что можно разработать антивозрастную генную терапию на основе теломеразы без увеличения заболеваемости раком», утверждают его авторы. Таким образом, генная терапия становится одним из перспективных направлений, которые рождаются в настоящее время терапевтической сферы радикального продления жизни и остановки старения.[21][22]

2 ноября Еврокомиссия впервые разрешила выпуск и продажу в ЕС лекарства нидерландской компании uniQure на основе генотерапии для лечения тяжёлого генетического заболевания — липопротеинолипазной недостаточности[23]. Стоимость лекарства составит 1,6 млн долларов США, что является рекордом за всю историю медицины.

С 2012 года продаётся на территории России препарат, лечащий атеросклероз сосудов с помощью местной генотерапии[24].

*2013 год*

На 2013 год в мире разрешено к клиническому применению всего пять генных препаратов: три для лечения злокачественных новообразований, четвёртый — глибера, для лечения редкого наследственного заболевания — дефицита липопротеинлипазы, и неоваскулген.

*2017 год*

В ноябре 2017 года в Калифорнии прошла первая в мире процедура по «редактированию» генома взрослого человека прямо внутри его тела. Пациентом стал мужчина с мукополисахаридозом II типа (синдромом Хантера)[25][26].

*2019 год*

На основе аденоассоциированного вектора AAV9 был создан препарат Zolgensma для лечения спинальной мышечной атрофии. Этот препарат считается наиболее дорогим лекарством со стоимостью курса (1 укол) более $2 млн[27]. Разрешен в ряде стран с 2019 года[28][29]. По некоторым оценкам, возможно порядка тысячи применений препарата до 2025 или 2027 года[30][31].

*Методы генотерапии*

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.

*Риски*

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].

***Контрольные вопросы:***

1. Генотерапия.
2. История генной терапии.
3. Методы генотерапии
4. Риски связанные с генотерапией.

**Лекция 13**

**Проект геном человека.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с проектом геном человека.

*Проект Человеческий Геном* (англ. The Human Genome Project, HGP) — международный научно-исследовательский проект, главной целью которого было определить последовательность нуклеотидов, которые составляют ДНК, и идентифицировать 20—25 тыс. генов в человеческом геноме[1]. Этот проект называют крупнейшим международным сотрудничеством, когда-либо проводившимся в биологии[2].

Проект начался в 1990 году, под руководством Джеймса Уотсона под эгидой Национальной организации здравоохранения США. В 2000 году был выпущен рабочий черновик структуры генома, полный геном — в 2003 году, однако и сегодня дополнительный анализ некоторых участков ещё не закончен. Частной компанией Celera Corporation был запущен аналогичный параллельный проект, завершённый несколько ранее международного. Основной объём секвенирования был выполнен в университетах и исследовательских центрах США, Канады и Великобритании. Кроме очевидной фундаментальной значимости, определение структуры человеческих генов является важным шагом для разработки новых медикаментов и развития других аспектов здравоохранения.

Хотя целью проекта по расшифровке генома человека является понимание строения генома человеческого вида, проект также фокусировался и на нескольких других организмах, среди которых бактерии, в частности, Escherichia coli, насекомые, такие как мушка дрозофила, и млекопитающие, например, мышь.

Изначально планировалось определение последовательности более трёх миллиардов нуклеотидов, содержащихся в гаплоидном человеческом геноме. Затем несколько групп объявили о попытке расширить задачу до секвенирования диплоидного генома человека, среди них международный проект HapMap (англ.), «Applied Biosystems», «Perlegen», «Illumina», «JCVI», «Personal Genome Project» и «Roche-454».

Геном любого отдельно взятого организма (исключая однояйцевых близнецов и клонированных животных) уникален, поэтому определение последовательности человеческого генома в принципе должно включать в себя и секвенирование многочисленных вариаций каждого гена. Однако, в задачи проекта «Геном человека» не входило определение последовательности всей ДНК, находящейся в человеческих клетках; а некоторые гетерохроматиновые области (в общей сложности около 8 %) остаются несеквенированными до сих пор.

Проект «Геном человека» является наиболее амбициозной биологической исследовательской программой за всю историю науки. Знание генома человека внесет неоценимый вклад в развитие медицины и биологии человека. Исследования человеческого генома так же необходимо человечеству, как когда-то было необходимо знание человеческой анатомии. Осознание этого пришло в 1980-х, и это привело к тому, что появился проект «Геном человека». В 1988-м с аналогичной идеей выступил выдающийся российский молекулярный биолог и биохимик, академик А. А. Баев (1904–1994). С 1989 г. и в США, и в СССР функционируют соответствующие научные программы; позднее возникла Международная организация по изучению генома человека (HUGO). Вклад России в международное сотрудничество признан в мире: 70 отечественных исследователей являются членами HUGO.

В 1990 г. при поддержке министерства энергетики США, а также Великобритании, Франции, Японии, Китая и Германии, был запущен этот трехмиллиардный проект. Возглавил его д-р Фрэнсис Коллинз, глава International Human Genome Sequencing Consortium.

*Целями проекта* являлись:

-идентификация 20 000–25 000 генов ДНК;

-определение последовательности 3 млрд. пар химических оснований, составляющих ДНК человека, и сохранение этой информации в базе данных;

-усовершенствование приборов для анализа данных;

-внедрение новейших технологий в область частного использования;

-исследование этических, правовых и социальных вопросов, возникающих при расшифровке генома.

В 1998 г. аналогичный проект был запущен д-ром Крейгом Вентером и его фирмой «Celera Genomics». Д-р Вентер поставил перед своей командой задачу более быстрого и дешевого секвенирования человеческого генома (в отличие от трехмиллиардного международного проекта, бюджет проекта д-ра Вентера ограничивался 300 млн долл.). Кроме того, фирма «Celera Genomics» не собиралась открывать доступ к своим результатам.

6 июня 2000 г. президент США и премьер-министр Великобритании объявили о расшифровке человеческого генетического кода, и таким образом соревнование закончилось. На самом деле, был опубликован рабочий черновик человеческого генома, и лишь к 2003 г. он был расшифрован практически полностью, хотя и сегодня все еще проводят дополнительный анализ некоторых участков генома.

Тогда умы ученых были взбудоражены необыкновенными возможностями: новые, действующие на генетическом уровне лекарства, а значит, не за горами создание «персональной медицины», настроенной точно под генетический характер каждого отдельно взятого человека. Существовали, конечно, и опасения, что может быть создано генетически зависимое общество, в котором людей буду делить на высшие и низшие классы по их ДНК и соответственно ограничивать их возможности. Но все же была надежда, что этот проект окажется столь же прибыльным, сколь и Интернет.

И вдруг все затихло... надежды не оправдались... казалось, что 3 млрд долл., вложенных в эту затею, выброшены на ветер.

Нет, не совсем так. Быть может, полученные результаты не столь грандиозны, как предполагалось во времена зарождения проекта, но они позволят достичь в будущем значительных успехов в различных областях биологии и медицины.

В результате исполнения проекта «Геном человека» был создан открытый банк генокода. Общедоступность полученной информации позволила многим исследователям ускорить свою работу. Ф. Коллинз привел в качестве иллюстрации такой пример: «Поиск гена фиброзно-кистозной дегенерации был успешно завершен в 1989 г., что стало результатом нескольких лет исследований моей лаборатории и еще нескольких других и стоило США около 50 млн долл. Сейчас это способен сделать смышленый выпускник университета за несколько дней, и все, что ему понадобится, — это Интернет, несколько недорогих реактивов, термоциклический аппарат для увеличения специфичности сегментов ДНК и доступ к ДНК-секвенатору, читающему ее по световым сигналам».

Еще один важный результат проекта — дополнение истории человека. Раньше все данные об эволюции были почерпнуты из археологических находок, а расшифровка генокода не только дала возможность подтвердить теории археологов, но в будущем позволит точнее узнать историю эволюции как человека, так и биоты в целом. Как предполагается, анализ сходства в последовательностях ДНК различных организмов сможет открыть новые пути в исследовании теории эволюции, и во многих случаях вопросы эволюции теперь можно будет ставить в терминах молекулярной биологии. Такие важнейшие вехи в истории эволюции, как появление рибосомы и органелл, развитие эмбриона, иммунной системы позвоночных, можно будет проследить на молекулярном уровне. Ожидается, что это позволит пролить свет на многие вопросы о сходстве и различиях между людьми и нашими ближайшими сородичами: приматами, неандертальцем (чей генокод недавно был реконструирован из 1,3 млрд фрагментов, подвергавшихся тысячелетнему разложению и загрязненных генетическими следами археологов, державших в руках останки этого существа), а также и всеми млекопитающими, и ответить на вопросы: какой же ген делает нас Homo sapiens, какие гены отвечают за наши поразительные таланты? Таким образом, поняв, как прочитать информацию о нас в генокоде, мы сможем узнать, как гены влияют на физические и умственные характеристики и даже на наше поведение. Возможно, в будущем, посмотрев на генетический код, можно будет не только предсказать, как будет выглядеть человек, но и, к примеру, будет ли у него актерский талант. Хотя, естественно, никогда нельзя будет это определить со 100%-ной точностью.

Кроме того, межвидовое сравнение покажет, чем отличается один вид от другого, как они разошлись на эволюционном древе. Межпопуляционное сравнение покажет, как этот вид эволюционирует. Сравнение ДНК отдельных особей внутри популяции покажет, чем объясняется различие особей одного вида, одной популяции. Наконец, сравнение ДНК различных клеток внутри одного организма поможет понять, как происходит дифференцирование тканей, как они развиваются и что идет не так в случае заболеваний, таких например, как рак.

Вскоре после расшифровки большей части генокода в 2003 г., ученые обнаружили, что существует гораздо меньше генов, чем они ожидали, но впоследствии убедились в противоположном. Традиционно ген определяли как участок ДНК, который кодирует белок. Однако, расшифровывая генокод, ученые выяснили, что 98,5% участков ДНК не кодируют белки, и назвали эту часть ДНК «бесполезной». И выяснилось, что эти 98,5% участков ДНК имеют едва ли не большее значение: именно эта часть ДНК отвечает за ее функционирование. Например, определенные участки ДНК содержат инструкции для получения похожих на ДНК, но небелковых молекул, так называемых двухцепочечных РНК. Эти молекулы являются частью молекулярно-генетического механизма, контролирующего активность гена (РНК-интерференция). Некоторые двухцепочечные РНК могут подавлять гены, препятствуя синтезу их белковых продуктов. Таким образом, если данные участки ДНК также считать генами, то их количество удвоится. В итоге исследования изменилось само представление о генах, и сейчас ученые считают, что ген — это единица наследственности, которую нельзя понимать как просто участок ДНК, кодирующий белки.

Можно сказать, что химический состав клетки — ее «хард», а информация, закодированная в ДНК, — предварительно загруженный «софт». Никто раньше и не предполагал, что клетка является чем-то большим, чем просто совокупностью составных частей, и что для ее построения недостаточно закодированной в ДНК информации, что столь же важным является процесс саморегулирования генома — и путем сообщения между соседними генами, и путем воздействия других молекул клетки.

Открытый доступ к информации позволит объединить опыт врачей, информацию о патологических случаях, результаты многолетнего изучения отдельных особей, и потому станет возможным соотнести генетическую информацию с данными анатомии, физиологии, поведения человека. И уже это сможет привести к лучшей медицинской диагностике и прогрессу в лечении.

Например, исследователь, изучающий определенную форму рака, сможет сузить круг поиска до одного гена. Сверив свои данные с данными открытой базы генома человека, он сможет проверить, что другие написали об этом гене, включая (потенциально) трехмерную структуру его производного белка, его функции, его эволюционную связь с другими генами человека или с генами мышей, дрожжей или дрозофилы, возможные пагубные мутации, взаимосвязь с другими генами, тканями тела, в которых ген активируется, заболеваниями, связанными с этим геном, или другие данные.

Более того, понимание хода заболевания на уровне молекулярной биологии позволит создать новые терапевтические методы. Учитывая, что ДНК играет огромную роль в молекулярной биологии, а также ее центральное значение в функционировании и принципах работы живых клеток, углубление знаний в этой области откроет путь для новых методов лечения и открытий в различных областях медицины.

Наконец, и «персональная медицина» теперь кажется уже более реальной задачей. Д-р Уиллс выразил надежду, что лечение заболеваний путем замены поврежденного участка ДНК нормальным станет возможным уже в следующее десятилетие. Сейчас проблемой, препятствующей развитию такого метода лечения, является то, что ученые не умеют доставлять ген в клетку. Пока единственный известный способ доставки — заражение животного вирусом с необходимыми генами, но это опасный вариант. Однако д-р Уиллс предполагает, что в скором времени в этом направлении будет совершен прорыв.

Сегодня уже существуют простые способы проведения генетических тестов, которые могут показать предрасположенность к различным заболеваниям, включая рак молочной железы, нарушение свертываемости крови, кистозный фиброз, заболевания печени и др. Такие заболевания, как рак, болезнь Альцгеймера, диабет, как было выяснено, связаны не с общими для всех, а с огромным количеством редких, практически индивидуальных мутаций (причем не в одном гене, а в нескольких; например, мышечную дистрофию Шарко-Мари-Тут может вызвать мутация 39 генов), в результате чего эти болезни трудно поддаются диагностике и воздействию медицинских препаратов. Именно это открытие является одним из камней преткновения «персональной медицины», поскольку, прочитав генокод человека, пока невозможно точно определить состояние его здоровья. Исследуя генокоды разных людей, ученые были разочарованы результатом. Около 2000 участков ДНК человека статистически относилось к «болезненным», которые при этом не всегда относились к работающим генам, т. е. не представляли угрозы. Похоже, что эволюция избавляется от мутаций, вызывающих болезнь, до того, как они станут общими.

Проводя исследования, группа ученых в Сиэтле обнаружила, что из всего человеческого генокода лишь 60 генов претерпевают спонтанную мутацию каждое поколение. При этом мутировавшие гены могут вызвать различные заболевания. Так, если у каждого из родителей было по одному «испорченному» и одному «неиспорченному» гену, то у детей болезнь может и не проявиться или проявится в очень слабой форме, если они получат один «испорченный» и один «неиспорченный» ген, но если ребенок унаследует оба «испорченных» гена, то это может привести к болезни. К тому же, поняв, что общечеловеческие болезни вызываются индивидуальным мутациями, ученые пришли к выводу, что необходимо исследовать полностью весь генокод человека, а не его отдельные участки.

Несмотря на все затруднения, уже созданы первые генетические лекарства против рака, которые блокируют эффекты генетических отклонений, приводящих к росту опухолей. Также недавно было одобрено лекарство компании «Amgen» от остеопороза, которое основывается на том, что болезнь вызывается гиперактивностью определенного гена. Последнее достижение — проведение анализа биологических жидкостей на присутствие мутации определенного гена для диагностики рака толстой кишки. Такой тест позволит избавить людей от неприятной процедуры колоноскопии.

Итак, привычная биология ушла в прошлое, наступил час новой эры науки: постгеномной биологии. Она полностью развенчала идею витализма, и хотя в него уже больше столетия не верил ни один биолог, новая биология не оставила места и для призраков.

Не только интеллектуальные озарения играют важную роль в науке. Такие технические прорывы, как телескоп в астрономии, микроскоп в биологии, спектроскоп в химии, приводят к неожиданным и замечательным открытиям. Похожую революцию в геномике производят сейчас мощные компьютеры и информация, содержащаяся в ДНК.

Закон Мура говорит о том, что компьютеры увеличивают свою мощность вдвое примерно каждые два года. Таким образом, за последнее десятилетие их мощность возросла более чем в 30 раз при постоянно снижающейся цене. В геномике пока нет имени для аналогичного закона, но его следовало бы назвать законом Эрика Лэндера — по имени главы Broad Institute (Cambridge, Massachusetts, крупнейший американский центр, занимающийся расшифровкой ДНК). Он подсчитал, что по сравнению с прошлым десятилетием цена расшифровки ДНК снизилась на сотни тысяч долларов. При расшифровке последовательности геномов в International Human Genome Sequencing Consortium использовали метод, разработанный еще в 1975 г. Ф. Сенджером, что заняло 13 лет и стоило 3 млрд долл. А значит, расшифровка генетического кода была под силу только мощным компаниям или центрам по исследованию генетической последовательности. Сейчас, используя последние устройства для расшифровки от фирмы «Illumina» (San Diego, California), человеческий геном может быть прочитан за 8 дней, и стоить это будет около 10 тыс. долл. Но и это не предел. Другая калифорнийская фирма, «Pacific Biosciences» из Менло Парка, разработала способы, позволяющие прочитать геном всего с одной молекулы ДНК. Вполне возможно, что скоро расшифровка генома будет занимать минут 15 и стоить менее 1000 долл. Аналогичные разработки существуют и в «Oxford Nanopore Technologies» (Великобритания). Раньше фирмы использовали решетки проб ДНК (ДНК-чипы) и искали определенные генетические символы — SNP.\* Сейчас известно несколько десятков таких символов, но есть основания предполагать, что среди трех миллиардов «букв» генетического кода их гораздо больше.

До недавнего времени полностью было расшифровано всего несколько генокодов (в проекте «Геном человека» были использованы кусочки генокода множества людей, а затем собраны в единое целое). Среди них генокоды К. Вентера, Дж. Уотсона, д-ра Ст. Куэйка, двух корейцев, китайца, африканца, а также больного лейкемией, национальность которого ныне уже трудно установить. Теперь, с постепенным усовершенствованием техники чтения последовательностей генов, станет возможным расшифровка генокода все большего и большего числа людей. В будущем свой генокод сможет прочитать любой человек.

Кроме стоимости расшифровки, важным показателем является его точность. Считается, что приемлемым уровнем является не более одной ошибки в 10 000–100 000 символов. Сейчас уровень точности находится на уровне 1 ошибки в 20 000 символов.

На настоящий момент в США ведутся споры по поводу патентования «расшифрованных» генов. Однако многие исследователи считают, что патентование генов станет препятствием для развития науки. Главная стратегическая задача будущего сформулирована следующим образом: изучить однонуклеотидные вариации ДНК в разных органах и клетках отдельных индивидуумов и выявить различия между индивидуумами. Анализ таких вариаций даст возможность не только подойти к созданию индивидуальных генных «портретов» людей, что, в частности, позволит лучше лечить болезни, но и определить различия между популяциями, выявлять географические районы повышенного «генетического» риска, что поможет давать четкие рекомендации о необходимости очистки территорий от загрязнения и выявлять производства, на которых есть большая опасность поражения геномов персонала.

\* SNP — одиночный генетический символ, который меняется от человека к человеку. Его открыли специалисты «International HapMap Project», изучая такую мутацию генокода, как однонуклеотидный полиморфизм. Целью проекта по картированию участков ДНК, различных для разных этнических групп, был поиск уязвимости этих групп к отдельным заболеваниям и возможностей их преодоления. Эти исследования могут также подсказать, как человеческие популяции адаптировались к различным заболеваниям.

https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya\_biblioteka/431280/Proekt\_Genom\_cheloveka\_desyat\_let\_spustya

*Перспективы*

Работа над интерпретацией данных генома находится всё ещё в своей начальной стадии. Ожидается, что детальное знание человеческого генома откроет новые пути к успехам в медицине и биотехнологии. Ясные практические результаты проекта появились ещё до завершения работы. Несколько компаний, например «Myriad Genetics», начали предлагать простые способы проведения генетических тестов, которые могут показать предрасположенность к различным заболеваниям, включая рак молочной железы, нарушения свёртываемости крови, кистозный фиброз, заболевания печени и многим другим. Также ожидается, что информация о геноме человека поможет поиску причин возникновения рака, болезни Альцгеймера и другим областям клинического значения и, вероятно, в будущем может привести к значительным успехам в их лечении.

Также ожидается множество полезных для биологов результатов. Например, исследователь, изучающий определённую форму рака может сузить свой поиск до одного гена. Посетив базу данных человеческого генома в сети, этот исследователь может проверить что другие учёные написали об этом гене включая (потенциально) трёхмерную структуру его производного белка, его функции, его эволюционную связь с другими человеческими генами или с генами в мышах или дрожжах или дрозофиле, возможные пагубные мутации, взаимосвязь с другими генами, тканями тела в которых ген активируется, заболеваниями, связанными с этим геном или другие данные. https://ru.wikipedia.org/wiki

***Контрольные вопросы:***

1. Проект «Геном человека».
2. Цели проекта «Геном человека».
3. Результаты проекта «Геном человека».
4. Перспективы Проекта «Геном человека».

**Лекция 14**

**ПЦР, принцип работы.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методом ПЦР и принципом работы.

*Полимера́зная цепна́я реа́кция (ПЦР)* — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале (пробе).

Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

*История*

В начале 1970-х годов норвежский учёный Хьелль Клеппе[en] из лаборатории нобелевского лауреата Хара Гобинды Кораны предложил способ амплификации ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК — синтетических праймеров[1]. Однако в то время эта идея осталась нереализованной. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была изобретена в 1983 году американским биохимиком Кэри Муллисом[2][3]. Его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Первая публикация по методу ПЦР появилась в ноябре 1985 года в журнале Science[4]. Метод революционизировал молекулярную биологию и медицину. В 1993 году Кэри Муллис получил за это Нобелевскую премию по химии[5].

В начале использования метода после каждого цикла нагревания-охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура проведения реакции была сравнительно неэффективной, требовала много времени и фермента. В 1986 году метод полимеразной цепной реакции был существенно улучшен. Было предложено использовать ДНК-полимеразы из термофильных бактерий[6]. Эти ферменты оказались термостабильными и были способны выдерживать множество циклов реакции. Их использование позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий Thermus aquaticus и названа Taq-полимеразой. Недостаток этой полимеразы заключается в довольно высокой вероятности внесения ошибочного нуклеотида, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5'-экзонуклеазная активность). Полимеразы Pfu[en] и Pwo, выделенные из архей, таким механизмом обладают; их использование значительно уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость их работы (процессивность) ниже, чем у Taq. Сейчас применяют смеси Taq и Pfu, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования.

В момент изобретения метода Кэри Муллис работал химиком-синтетиком (он синтезировал олигонуклеотиды, которые применялись тогда для выявления точечных мутаций методом гибридизации с геномной ДНК) в компании Цетус Корпорейшн[en], которая и запатентовала метод ПЦР. В 1992 году Цетус продала права на метод и патент на использование Taq-полимеразы компании Хофман-Ла Рош за 300 млн долларов. Однако оказалось, что Taq-полимераза была охарактеризована советскими биохимиками А. Калединым, А. Слюсаренко и С. Городецким в 1980 году[7], а также за 4 года до этой советской публикации, то есть в 1976 году, американскими биохимиками Alice Chien, David B. Edgar и John M. Trela[8]. В связи с этим компания Promega[en] пыталась в судебном порядке заставить Рош отказаться от исключительных прав на этот фермент[9]. Американский патент на метод ПЦР истёк в марте 2005 года.

*Проведение ПЦР*

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований (3 kbp[10]). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований[11].

*Компоненты реакции*

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — Thermus aquaticus (Taq-полимераза), Pyrococcus furiosus[en] (Pfu-полимераза), Pyrococcus woesei (Pwo-полимераза), Thermus thermophilus (Tth-полимераза) и другие.

Дезоксирибо[fr]нуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Ионы Mg2+, необходимые для работы полимеразы.

Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР[12].

*Праймеры*

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

После гибридизации матрицы с праймером (отжиг[13]), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы (см. ниже).

Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (Tm) комплекса праймер-матрица.

Tm — температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером. Усредненная формула подсчета Tm для короткого олигонуклеотида (и для длинных фрагментов ДНК), с учётом концентрации ионов K+ и DMSO:

{\displaystyle T\_{m}=77,1+11,7\lg[K^{+}]+{\frac {41(G+C)-528}{L}}-0,75[\%DMSO]}{\displaystyle T\_{m}=77,1+11,7\lg[K^{+}]+{\frac {41(G+C)-528}{L}}-0,75[\%DMSO]},[14]

где L — количество нуклеотидов в праймере, K+ — молярная концентрация ионов калия, G+C — сумма всех гуанинов и цитозинов.

В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 °C.

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

GC-состав ~ 40—60 %;

близкие Tm праймеров (отличия не более, чем на 5 °C);

отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек[15] и димеров[16];

желательно, чтобы на 3’-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

Амплификатор компании Eppendorf для проведения ПЦР

*Амплификатор*

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °C. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР (см. ниже) и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °C. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

*Ход реакции*

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий.[≡]

*Денатурация*

Двуцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °C (или до 98 °C, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется плавлением (денатурацией[fr]), так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

*Отжиг*

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 5 градусов меньше, чем температура плавления праймеров. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре). Время стадии отжига — 30 секунд, одновременно, за это время полимераза уже успевает синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °C и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60—72 °C.

*Элонгация*

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепь в направлении от 5'- к 3'-концу. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7—10 минут.

Количество специфического продукта реакции (ограниченного праймерами) теоретически возрастает пропорционально 2n — 2n, где n — число циклов реакции[17]. На самом деле эффективность каждого цикла может быть меньше 100 %, поэтому в действительности P ~ (1+E)n, где P — количество продукта, Е — средняя эффективность цикла.

Число «длинных» копий ДНК тоже растет, но линейно, поэтому в продуктах реакции доминирует специфический фрагмент.

Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато».

***Контрольные вопросы:***

1. Полимера́зная цепна́я реа́кция (ПЦР)
2. История открытия ПЦР метода.
3. Проведение ПЦР.
4. Компоненты ПЦР реакции.
5. Ход ПЦР реакции.

**Лекция 15**

**Метод гель -электрофореза.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методом гель -электрофореза.

*Электрофорез в агарозном геле.*

*Электрофорез* (от электро- и др.-греч. φορέω — «переношу») —метод разделения макромолекул, различающихся по размеру, молекулярной массе, пространственной конфигурацией, вторичной структурой или электрическому заряду. Впервые было открыто профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году.

*Принцип метода.*

Молекулы в буферном растворе обладают электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от pH среды. При пропускании электрического тока через раствор в нем формируется направленное электрическое поле, напряженность которого измеряется разностью потенциалов по концам емкости, в которой производится электрофорез. Под действием поля молекулы начинают движение в направлении катода или анода. Скорость движения зависит от величины заряда, размеров и трения окружающей среды. С течением времени смесь разделяется на фракции, состоящие из молекул, движущихся с одинаковой скоростью. В современных экспериментах рабочий канал приборов для электрофореза заполняют гелем, имеющим структуру сетки. В этом случае основное влияние на подвижность молекул и их степень разделения оказывают их линейные размеры. В некоторых случаях может возникнуть ситуация, при которой особо крупные молекулы не проходят через поры геля.

*Методика электрофореза в агарозном геле.*

*Агароза.* Электрофорез в агарозном геле в различных модификациях широко применяется для разделения молекул нуклеиновых кислот, белков и других макромолекул в биологии и медицине. На водяной бане или в лабораторной печи плавят смесь агарозы, буфера и воды. Затем ее охлаждают до 50-60 °C и заливают в форму. Лунки для нанесения делаются при помощи гребенки. Исследуемый образец наносят в лунку при помощи дозатора. Когда краситель, помещаемый в лунки в начале эксперимента, достигает конца геля, электрофорез останавливают. Затем гель окрашивают красителем, который связывается с исследуемыми молекулами. Интенсивность окраски полос красителя дает представление о концентрации молекул в образце. Кроме концентрации, метод электрофореза позволяет определить относительную молекулярную массу исследуемых молекул, для этого в крайнюю лунку помещают набор маркеров молекулярной массы, который должен полностью покрывать диапазон молекулярных масс исследуемой системы.

*Выбор карсителя и буфера*

Бромфеноловый синий и ксиленцианол - могут заметно мешать наблюдению фрагментов под UV. Краситель Cresol red совместим с ферментативными реакциями, практически не мешает наблюдению под UV. OrangeG наиболее подвижный краситель, практически всегда находится вне "рабочей зоны". Заметен под UV. Краситель в буфере нужен лишь для того, чтобы образец был легко заметен в лунке и в геле.

Самое широкое применение агарозные гели имеют в исследованиях, связанные с разделением нуклиновых кислот. Последние имеют довольно значительные отрицательный заряд, величина которого слабо зависиот от pH раствора, вследствие чего разделение на фракции происходит в основном за счет различия в линейных размеров молекул. В таких экспериментах используют 0.089М Трис-боратный, 0.05 Трсфосфатный и Трис-ацетатный буфер. Стоит отметить, что при обычном электрофорезе в геле можно разделять фрагменты нуклеиновых кислот, размер которых менее 50 тыс п.н. Также часто из эксперимента нужно получить оценку размеров молекул. Для этого используются наборы молекул известной длины. Например, для регистрации продуктов амплификации ДНК применяется электрофорез в агарозном геле в присутствии бромистого этидия, который образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением длиной волны 290-330 нм.

***Контрольные вопросы:***

1. Электрофорез.
2. Принцип метода.
3. Методика электрофореза в агарозном геле.
4. Выбор карсителя и буфера.