**Семинарское занятие 1**

**Генная инженерия. Строение нуклеиновых кислот.**

*Цель занятия:* Ознакомление с дисциплиной генная инженерия и строением нуклеиновых кислот.

*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. Нуклеиновые кислоты (НК) – это высокомолекулярные линейные полярные биополимеры, полинуклеотиды, которые построены из нуклеотидных остатков. Нуклеотидные остатки состоят из азотистого основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил), сахара (рибозы или дезоксирибозы) и остатков фосфорной кислоты (от 1го до 3х). НК могут быть двух типов: дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК). В ДНК входит 4 азотистых основания (А, Г, Ц, Т) и сахар дезоксирибоза, и состоит ДНК из 2х комплементарных цепей, которые образуются благода парным взаимодействиям а.о., а именно: А=Т, Г≡Ц. В РНК, которая состоит из одной цепи, также входит 4 азотистых основания, но вместо а.о. тимина а.о. урацил, и сахар рибоза.

С помощью программы ChemSketch, программы для моделирования и редактирования различных химических структур, можно графически представить структурные формулы нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Для понимания некоторых возможностей и свойств программы были построены следующие структуры нуклеотидов (рис.1):

# 2'-дезоксигуанозиндифосфат;

# 2'-дезокситимидинмонофосфат;

# уридин;

# псевдоуридин.

# На данном рисунке красным цветом указаны атомы азота, принадлежащие азотистому основанию, и атомы углерода С1', входящие в состав сахара. Между этими атомами образуется N-гликозидная связь. Как мы можем заметить, в псевдоуридине нет подобной связи, в нем, так называемая С-гликозидная связь, которая образуется между атомами С5 и С1'.

# Контрольные вопросы:

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

**Семинарское занятие 2**

**Гены и наследственность.**

*Цель занятия:* Ознакомление студентов с единицами наследственнности. .

# Ген (др.-греч. γένος — род) — в классической генетике — наследственный фактор, который несёт информацию об определённом признаке или функции организма, и который является структурной и функциональной единицей наследственности. В таком качестве термин «ген» был введён в 1909 году датским ботаником, физиологом растений и генетиком Вильгельмом Йоханнсеном[1].

# После открытия нуклеиновых кислот в качестве носителя наследственной информации определение гена изменилось, и ген стали определять как участок ДНК (у некоторых вирусов — участок РНК), задающий последовательность полипептида либо функциональной РНК[2].

# По мере накопления сведений о строении и работе генов определение понятия «ген» продолжало изменяться, однако в настоящее время не существует универсального определения гена, которое удовлетворило бы всех исследователей[3][4][4][5]. Одно из современных определений гена звучит следующим образом: ген представляет собой последовательность ДНК, составляющие сегменты которой не обязательно должны быть физически смежными. Эта последовательность ДНК содержит информацию об одном или нескольких продуктах в виде белка или РНК. Продукты гена функционируют в составе генетических регуляторных сетей, результат работы которых реализуется на уровне фенотипа[6].

# Совокупность генов организма составляют генотип. Генотип наряду с факторами окружающей среды и развитием определяют, каким будет фенотип. Передача генов потомству является основой наследования фенотипических признаков. Большинство биологических признаков являются полигенными, то есть находятся под влиянием многих генов. Гены могут изменяться в результате мутаций, изменяющих последовательность ДНК. Вследствие мутаций в популяции гены существуют в различных вариантах, называемых аллелями. Разные аллели гена могут кодировать различающиеся версии белка, что может проявляться фенотипически. Гены наряду с участками ДНК, не содержащими генов, входят в состав генома, представляющего собой весь наследственный материал организма.

# Контрольные вопросы:

1. Что такое гены?
2. Геном.
3. Роль наследственности.

**Семинарское занятие 3**

**ДНК-полимераза.**

**Транскрипция. РНК-полимераза.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с ДНК-полимеразой, транскрипцией и РНК-полимеразой.

ДНК-полимераза — фермент, участвующий в репликации ДНК. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с шаблоном, с которого ведётся считывание. Собираемая молекула комплементарна шаблонной моноспирали и идентична второму компоненту двойной спирали.[1]

Выделяют ДНК-зависимую ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7), использующую в качестве матрицы одну из цепей ДНК, и РНК-зависимую ДНК-полимеразу (другое название обратная транскриптаза, КФ 2.7.7.49), способную также к считыванию информации с РНК (обратная транскрипция)[2].

ДНК-полимеразу считают холоферментом, поскольку для нормального функционирования она требует присутствия ионов магния в качестве кофактора. В отсутствие ионов магния о ней можно говорить как об апоферментe.

ДНК-полимераза начинает репликацию ДНК, связываясь с отрезком цепи нуклеотидов. Среднее количество нуклеотидов, присоединяемое ферментом ДНК-полимеразой за один акт связывания/диссоциации с матрицей, называют процессивностью.

РНК-полимераза — фермент, осуществляющий синтез молекул РНК. В узком смысле, РНК-полимеразой обычно называют ДНК-зависимые РНК-полимеразы, осуществляющие синтез молекул РНК на матрице ДНК, то есть осуществляющие транскрипцию. Ферменты класса РНК-полимераз очень важны для функционирования клетки, поэтому они имеются во всех организмах и во многих вирусах. Химически РНК-полимеразы являются нуклеотидил-трансферазами, полимеризующими рибонуклеотиды на 3'-конце цепи РНК.

# Контрольные вопросы:

1. ДНК-полимераза.

2.Транскрипция.

3. РНК-полимераза..

**Семинарское занятие 4**

**Плазмиды, векторы.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с плазмидами и векторами, используемыми в генной инженерии.

Плазми́ды (англ. plasmids) — небольшие молекулы ДНК, физически обособленные от хромосом и способные к автономной репликации. Главным образом плазмиды встречаются у бактерий, а также у некоторых архей и эукариот (грибов и высших растений). Чаще всего плазмиды представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы. Несмотря на способность к размножению, плазмиды, как и вирусы, не рассматриваются в качестве живых организмов[1].

Размеры плазмид варьируют от менее чем 1 тысячи до 400—600 тысяч пар оснований (п. о.)[2]. Некоторые плазмиды содержатся в клетке в количестве одной-двух копий, другие — в количестве нескольких десятков. Плазмиды разных классов могут сосуществовать в клетке.

В природе плазмиды обычно содержат гены, повышающие приспособленность бактерий к окружающей среде (например, обеспечивают устойчивость к антибиотикам). Нередко они могут передаваться от одной бактерии к другой того же вида, рода, семейства и даже между клетками бактерий и растений, являясь таким образом средством горизонтального переноса генов. Перенос плазмиды в клетку может осуществляться двумя путями: либо при непосредственном контакте клетки-хозяина с другой клеткой в процессе конъюгации, либо путём трансформации, то есть захвата экзогенной ДНК из внешней среды.

Искусственные плазмиды используются как векторы в клонировании ДНК, причём благодаря их способности к репликации обеспечивается возможность репликации рекомбинантной ДНК[en] в клетке-хозяине.

Вектор (в генетике и молекулярной биологии) — молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала внутрь клетки, в том числе в клетку живого многоклеточного организма in vivo[1].

Существующие векторы:

-плазмиды

-фазмиды

-векторы на основе вируса SV40

-векторы на основе аденовирусов

-векторы на основе герпесвирусов

-векторы на основе ретровирусов

-векторы на основе аденоассоциированного вируса

# Контрольные вопросы:

1. Плазмиды.
2. Векторы.

**Семинарское занятие 5**

**Методы клонирования генов.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методами клонирования генов.

Клонирование ДНК (клонирование генов) — процесс выделения заданной последовательности ДНК и получения многих её копий *in vitro*. Клонирование ДНК часто применяют для амплификации фрагментов, содержащих гены, а также любые другие последовательности — например, промоторы, некодирующие последовательности, химически синтезированные олигонуклеотиды и случайные участки ДНК.

*Рестрикция — лигирование*

В классических методиках рестрикции и лигирования, клонирование фрагмента ДНК включает четыре стадии: разрезание ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование ДНК с вектором, трансфекция и последующий скрининг (отбор).

*Выделение вставки*

Первоначально необходимо выделить участок ДНК для клонирования. Часто препарат ДНК для клонирования получают при помощи полимеразной цепной реакции, а также разрезания ДНК рестриктазами, обработкой ДНК ультразвуком, фракционированием при помощи агарозного электрофореза ДНК. Выделение вставки может быть сделано технологией клонирования шотган, комплементарной ДНК, искусственным химическим синтезом.

*Трансформация*

После лигирования плазмидой трансформируют бактерии для наращивания. Бактерии далее выращивают на селективной среде для отбора колоний, содержащих встройку. Индивидуальные колонии отбирают и изучают на наличие встройки.

*Трансфекция*

После лигирования реакционную смесь со встроенным в требуемой ориентации вектором помещают в клетки. В зависимости от типа клеток используют химическую сенситизацию клеток, электропорацию или генные пушки. Для химической сенситизации не требуется специальное оборудование. Электропорацию используют в случае необходимости высокой эффективности трансфекции. Генные пушки применяют в случае растительных клеток и тканей, так как клеточная стенка растений не дает чужеродной ДНК проникать в цитоплазму и ядро.

*Отбор*

Получают культуры трансфицированных клеток. Так как описанные выше процедуры часто имеют низкую эффективность, требуются способы выявления клеток, содержащих требуемую вставку в правильной ориентации и отделение таких клеток от не содержащих вставки. Современные векторы для клонирования содержат селективные маркеры (как правило, гены устойчивости к антибиотикам) которые дают возможность расти только клеткам с правильной вставкой расти на селективной среде (с антибиотиком). Векторы для клонирования также часто содержат маркеры, обуславливающие окраску колоний, например при выращивании на среде, содержащей X-gal. Для точного подтверждения успешного клонирования, требуется проверка при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) или секвенирования ДНК.

*Генная терапия*

Генная терапия подразумевает введение работающего гена в клетки, в которых он отсутствует, что приводит к излечению болезни, связанной с отсутствием или неправильным функционированием гена. Генную терапию классифицируют на две категории. В первом случае мутации содержатся в стволовых или половых клетках, тогда весь организм и все потомки имеют дефект. Во втором случае мутация возникает в соматических клетках, возможна пересадка модифицированных клеток или тканей. Клинические испытания генной терапии соматическими клетками начались в конце 1990-х, для лечения рака крови, печени и легких.

**Контрольные вопросы:**

1. Методы клонирования генов.
2. Рестрикция — лигирование
3. Выделение вставки, выделить участок ДНК для клонирования..
4. Трансформация.

**Семинарское занятие 6**

**Генная инженерия растений.**

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

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.

*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.

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.

**Семинарское занятие 7**

**Различные методы генетической трансформации,**

**недостатки и преимущества.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с различными методами генетической трансформации, недостатками и преимуществами ГИ.

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.

***Контрольные вопросы:***

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

**Семинарское занятие 8**

**Строение и механизм внедрения Ti-плазмиды A. tumefaciens. Характеристика Ti-плазмид.**

**Интеграция Т-ДНК с хромосомой растений.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов со строением и механизмом внедрения Ti-плазмиды A. tumefaciens.

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.

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.

*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.

***Контрольные вопросы:***

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

**Семинарское занятие 9**

**Принцип биолистической трансформации растений.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с принципом работы на биолистическом аппарате для трансформации растений.

Метод биологической баллистики (биолистики) 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

***Контрольные вопросы:***

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

**Семинарское занятие 10**

**Искусственное клонирование организмов.**

**Клонированные виды животных.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с методом искусственного клонирования животных.

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 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).

*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

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.

**Семинарское занятие 11**

**Маркировка продуктов, содержащих ГМО.**

**Перспективы ГМО технологий.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов маркировкой продуктов, содержащих ГМО и перспективами ГМО технологий..

*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.

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.

*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].

***Контрольные вопросы:***

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

**Семинарское занятие 12**

**Рекомбинантная ДНК и наследственные болезни. Персонализированная медицина.**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с рекомбинантной ДНК и наследственными болезнями. Персонализированная медицина.

Повышение качества и продолжительности жизни человека — ключевые приоритеты развитых экономик мира. Для более эффективной профилактики, диагностики и лечения социально значимых заболеваний, а также реабилитации пациентов необходимы технологические прорывы в области биомедицины. Они прежде всего связаны с созданием принципиально новых лекарств, продуктов для клеточной и генной терапии, инструментов высокоспецифичной молекулярной диагностики. Технологии генетической инженерии — конструирование функционально активных генетических структур, введение их в организм человека, интеграция в геном — позволяют выработать новые, в некоторых случаях уникальные генетические, биохимические и физиологические свойства. Создание новых биофармпрепаратов, культур клеток-продуцентов биологически активных молекул в перспективе обеспечит отечественный рынок доступными инновационными лекарствами и средствами диагностики.

*Генно-инженерное конструирование лекарств.*

Для эффективного лечения многих болезней, в первую очередь иммунной природы, требуются точечные воздействия, иногда на уровне отдельных клеток. Создание мишень-ориентированных препаратов, в том числе конъюгированных и ДНК-вакцин, повысит эффективность лечения онкологических, ревматических, инфекционных заболеваний, а также болезней нервной системы.

Первое направление развития тренда связано с применением рекомбинантной ДНК для получения биологических продуктов с заданными терапевтическими свойствами и высокими показателями биодоступности и специфичности действия. В результате появятся новые лекарства, эффективные при заболеваниях, вызванных нарушениями иммунной системы.

Создание диагностических биосенсоров — другое направление использования терапевтических клеточных продуктов и специфических молекулярных фрагментов, получаемых на основе технологий генетической инженерии. Эти решения могут повысить диагностическую ценность портативных тестов, выводимых на рынок медицинских изделий для «домашней медицины».

*Перепрограммирование клеток человека*

Технологии направленного перепрограммирования стволовых и модификации дифференцированных клеток дают возможность исследовать их свойства, получать клетки с новыми функциональными характеристиками. На этой основе разрабатываются технологии регенеративной медицины, нацеленные на восстановление травмированных или пораженных болезнью тканей и утраченных физиологических функций.

В русле этого тренда активнее всего развиваются следующие технологии: манипуляции геномом клеток разного уровня дифференцировки и использование негеномных средств их перепрограммирования, включая рентгеновское облучение, моделирование процессов регенерации, стресс-индуцированную трансформацию и др.

Эти технологии составляют основу для разработки биомедицинских клеточных продуктов (минимально манипулированные клетки, препараты на базе нуклеиновых кислот и стромально-клеточной фракции), а также продуктов культивирования модифицированных клеток.

*Технологии терапевтического применения РНК-интерференции*

Многие неизлечимые заболевания возникают в силу патологических изменений генома клеток. Традиционные лекарства недостаточно эффективны при их лечении — из-за низкой специфичности и, в ряде случаев, значительного токсического воздействия на организм. Но главное — они не действуют на саму причину подобного рода заболеваний — соматические мутации генома. Ожидается, что точечно воздействовать на экспрессию генов, прерывая последовательность патологических изменений в клетке, управлять ключевыми механизмами развития, например, онкологических заболеваний станет возможным с помощью технологий терапевтического применения РНК-интерференции.

РНК-интерференция — один из основных методов исследования функций генов в культурах клеток и живых организмах — имеет большой терапевтический потенциал. Посредством посттранскрипционного подавления экспрессии генов (когда двухцепочечная РНК индуцирует деградацию гомологичной мРНК) можно воздействовать на уровне синтеза кодируемых ими белков, модулируя таким образом активность генома клеток на любом этапе развития заболеваний, связанных с нарушениями нуклеотидной последовательности. Характерное преимущество технологии — возможность точной локализации терапевтического действия, например, в очаге опухоли.

*Персонализированная медицина* (англ. personalized medicine) — также называемая персонифицированная медицина, прецизионная медицина, индивидуализированная медицина, — представляет собой совокупность методов профилактики патологического состояния, диагностики и лечения в случае его возникновения, основанных на индивидуальных особенностях пациента. К подобным индивидуальным особенностям относят генетические[1], эпигенетические[2], транскриптомные[3], протеомные[4], метаболомные[5] и метагеномные[6] маркеры, а также совокупность вариативных фенотипических признаков[7] — как всего организма пациента, так и его отдельных тканей или клеток.

***Контрольные вопросы:***

1. Генно-инженерное конструирование лекарств.
2. Перепрограммирование клеток человека
3. Технологии терапевтического применения РНК-интерференции
4. Персонализированная медицина

**Семинарское занятие 13**

**Применение генно-инженерных методов.**

**Перспективы проекта Геном человека**

*Цель занятия –* ознакомление студентов с применением генно-инженерных методов и перспективами проекта Геном человека.

*Проект Человеческий Геном* (англ. The Human Genome Project, HGP) — международный научно-исследовательский 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.

*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.

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».

***Контрольные вопросы:***

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

**Семинарское занятие 14**

**Этапы реакции и реагенты ПЦР.**

*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).

*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.

*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.

**Семинарское занятие 15**

**Электрофорез.Агарозный гель электрофорез.**

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

*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.

***Контрольные вопросы:***

1. Электрофорез.
2. Принцип метода.
3. Методика электрофореза в агарозном геле.