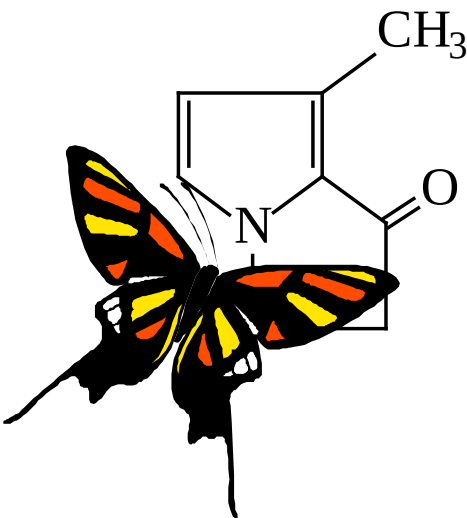




**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования**

**«Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет»**

***Факультет естественных наук***

**Соловьев В.И.**

# **Основы генетической инженерии. Биотехнология растений.**

Электронное учебно-методическое пособие  
по биологии в рамках экспериментальной площадки НГУ  
в Биотехнологическом лицее-интернате № 21 р.п. Кольцово.

# План занятия

- 1. Глобальные проблемы человечества и роль биотехнологий в их решении.
- 2. Основы генетической инженерии: инструменты для манипуляций с генами, векторы, объекты генной инженерии.
- 3. Биотехнология растений: основные подходы к трансгенезу, генетические конструкции ,
- 4. Трансгенез животных, подходы и основные направления трансгенеза животных.
- 5. Приложения генетической инженерии к практической деятельности.
- 6. Трансгенез и мифология. Проблемы биобезопасности.

**Томас Роберт Мальтус**  
(1766 - 1834, Англия)

**• В 1798 году опубликовал книгу  
«Опыт о законе  
народонаселения»**

**• В этой книге Мальтус приходит к  
выводу, что народонаселение  
растет в геометрической  
прогрессии, а средства  
существования — в  
арифметической.**

**• Голод, войны за истощающиеся  
ресурсы – неизбежны, считает  
Мальтус**



По данным Всемирной Организации Здравоохранения, **ежедневно 24 тыс. человек умирают от голода** или болезней, непосредственно связанных с голодом. ВОЗ считает голод главной угрозой здоровью людей: **голод** является причиной **трети детских смертей и 10%** всех заболеваний.



# Глобальные проблемы человечества и биотехнология.

**Недостаточное производство продуктов питания.**



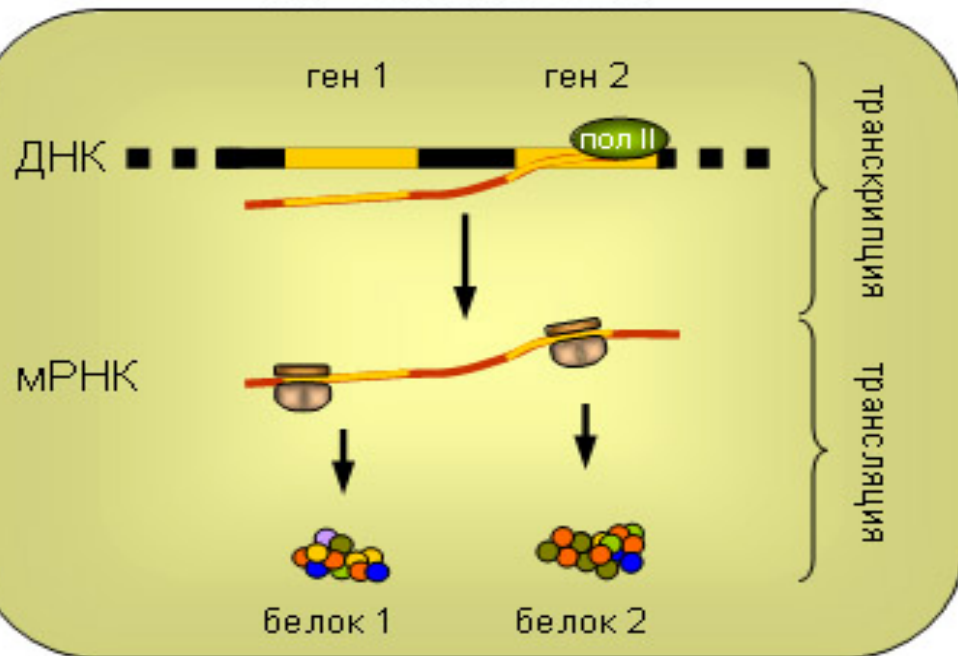
**Истощение традиционных источников энергии и сырьевых ресурсов**



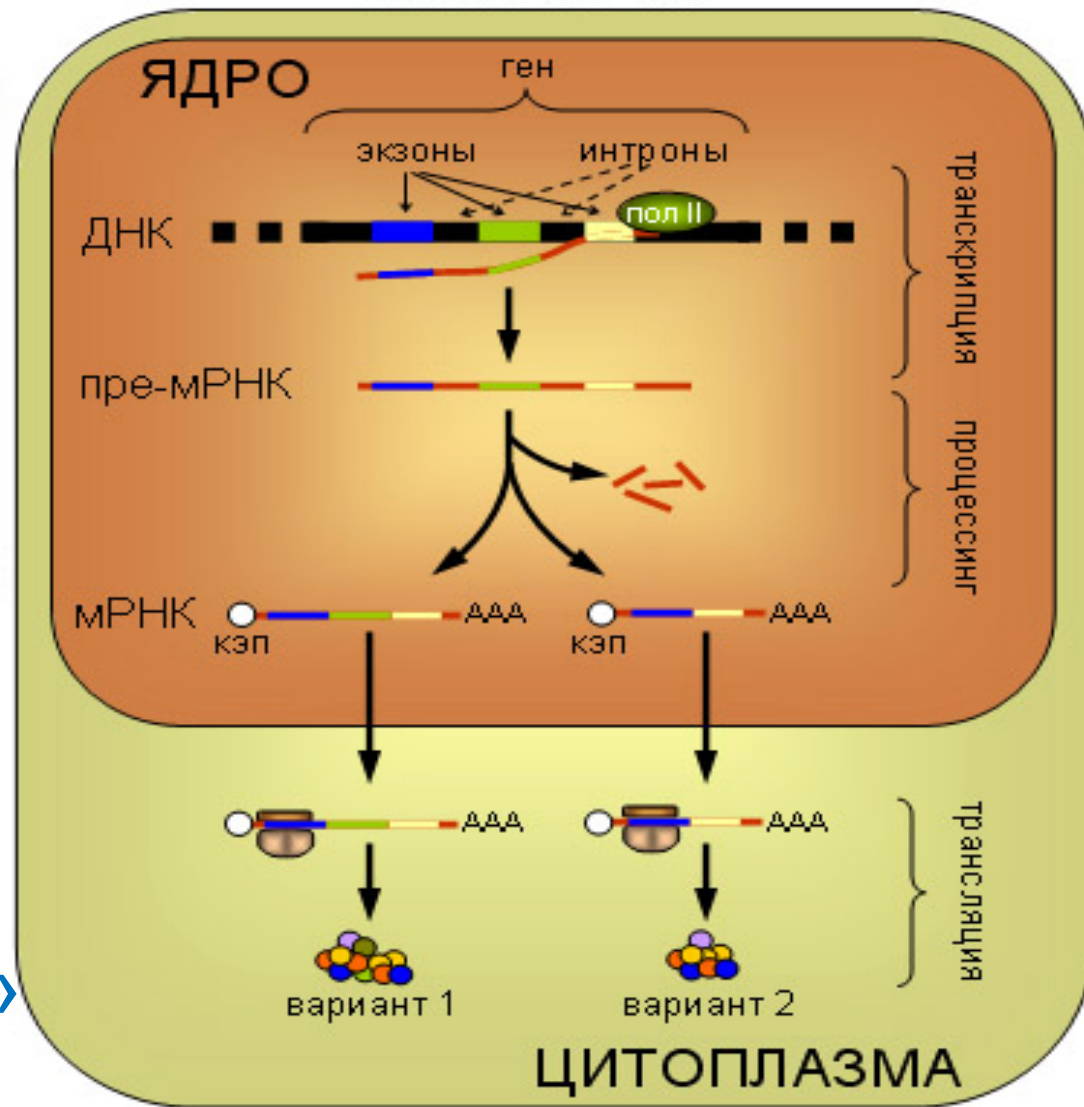
**Болезни, появление новых заболеваний**



## ПРОКАРИОТЫ



## ЭУКАРИОТЫ



# «Центральная догма молекулярной биологии»

ДНК → РНК → белок

Хранение наследственной информации

Реализация наследственной информации

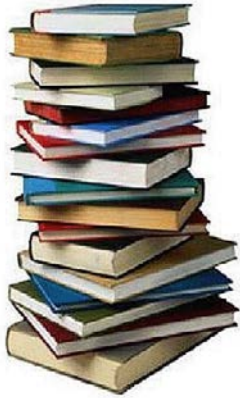
Взаимодействие с внешней средой.

Катализ биохимических реакций

Структурная роль



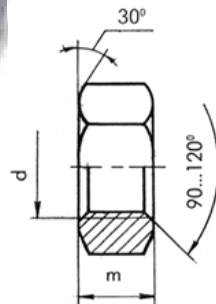
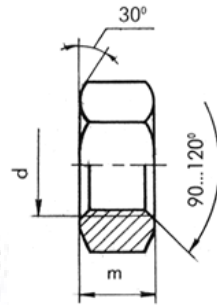
# Основные молекулярно-генетические процессы.



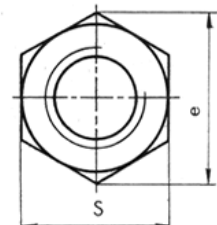
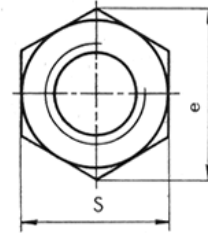
ДНК



РНК-полимераза



РНК



Рибосома



Белок



ДНК → РНК → белок

# Белки – основные действующие лица в клетке.

Программа  
(РНК)





# Регуляторные области генов.

- Использование разных генов равносильно использованию разных программ для рибосомы, будут получаться разные белки



Энхансер  
Сайленсер  
Сайт посадки  
рецептора  
гормонов

Промотор  
Посадка РНК -  
полимеразы

Терминатор  
Уход РНК -  
полимеразы

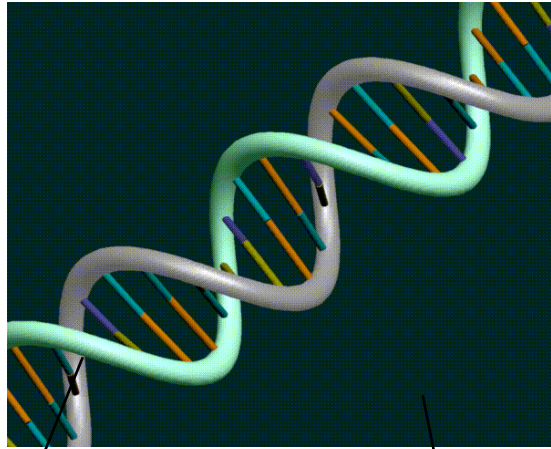


Локализация

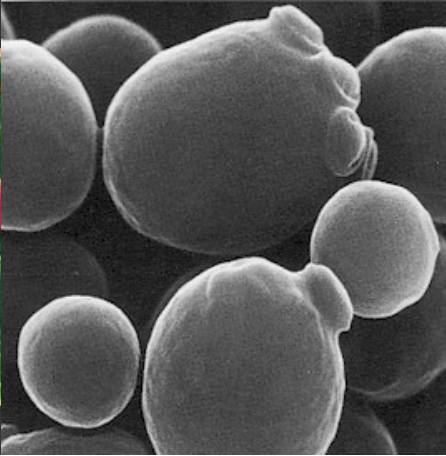
Активный  
центр и сайты  
связывания

Регуляторный  
домен

# Генетический код универсален для всех организмов.

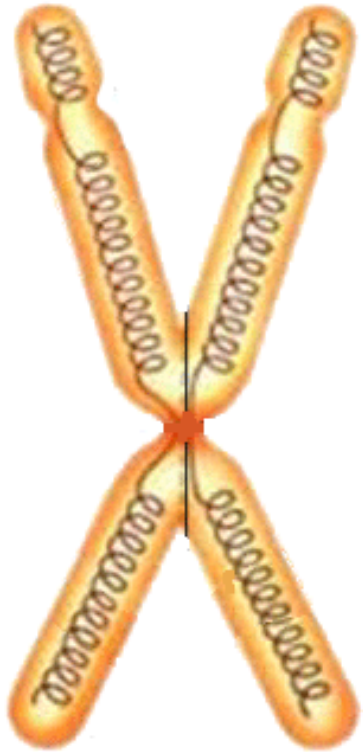


**Программа записанная в ДНК будет работать у всех организмов.**



# Как устроен ген?

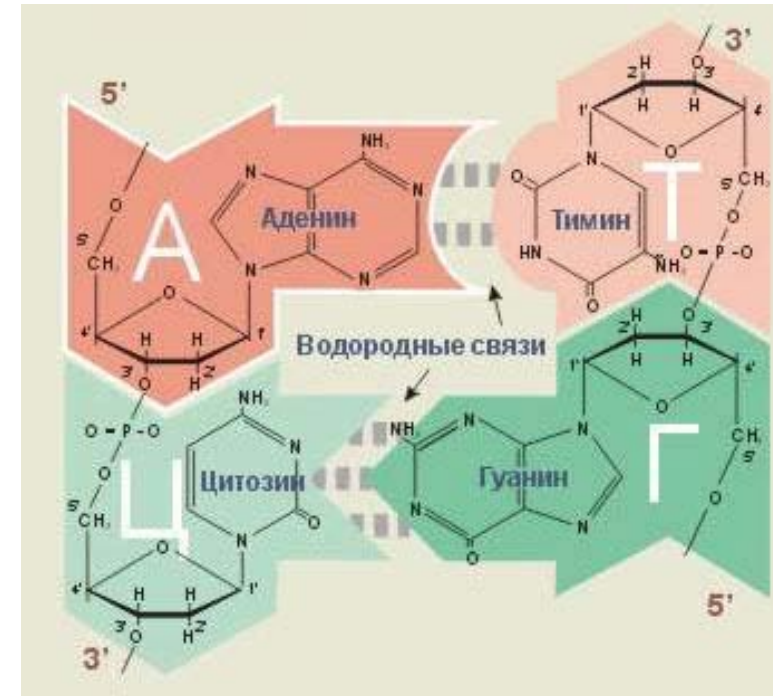
Физически:



www.mylearn.ru



www.biotechnologyonline.gov.au



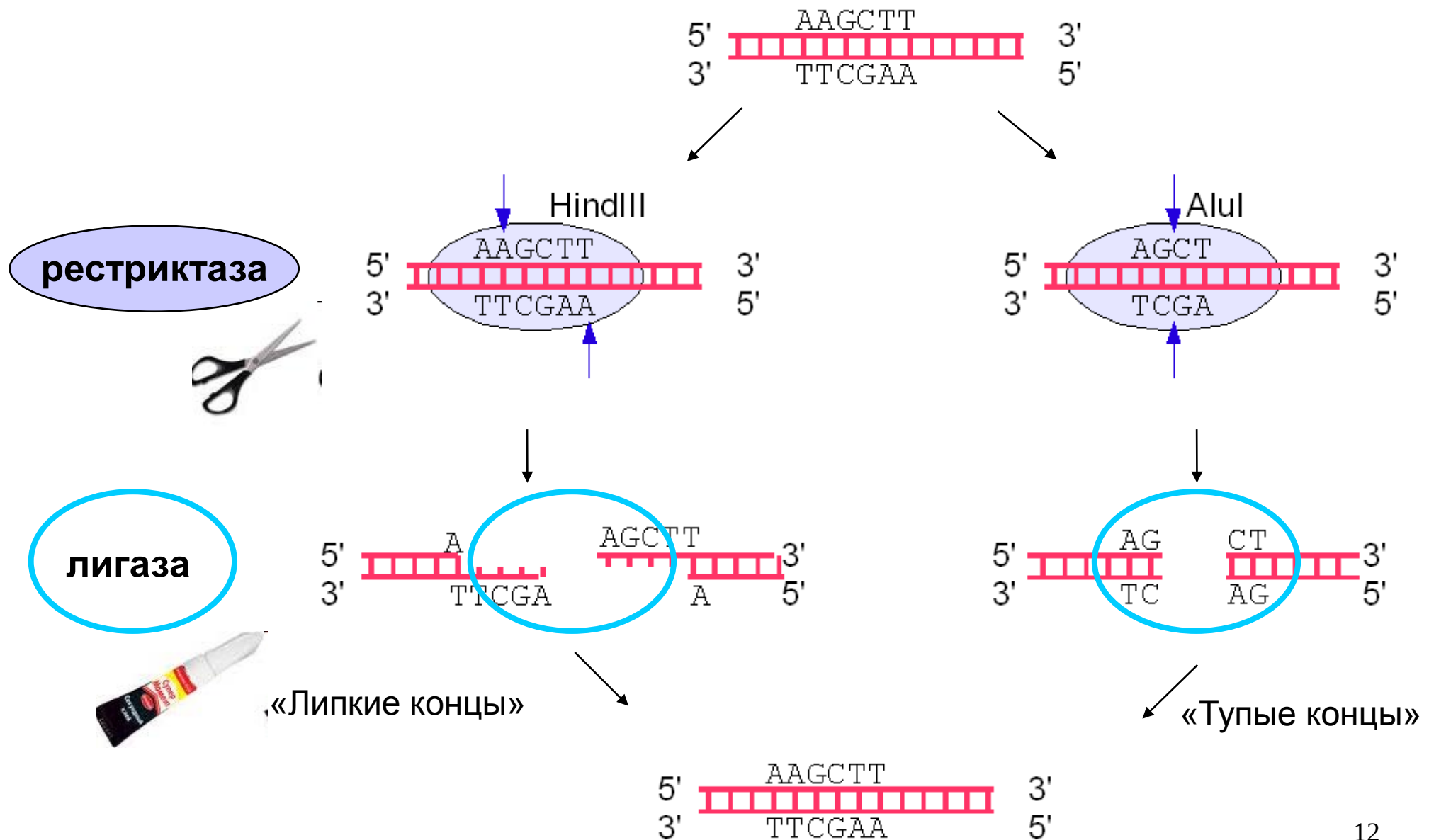
www.primer.ru

Информационно:

ААУУААГЦГАУГЦАУАГУААГ

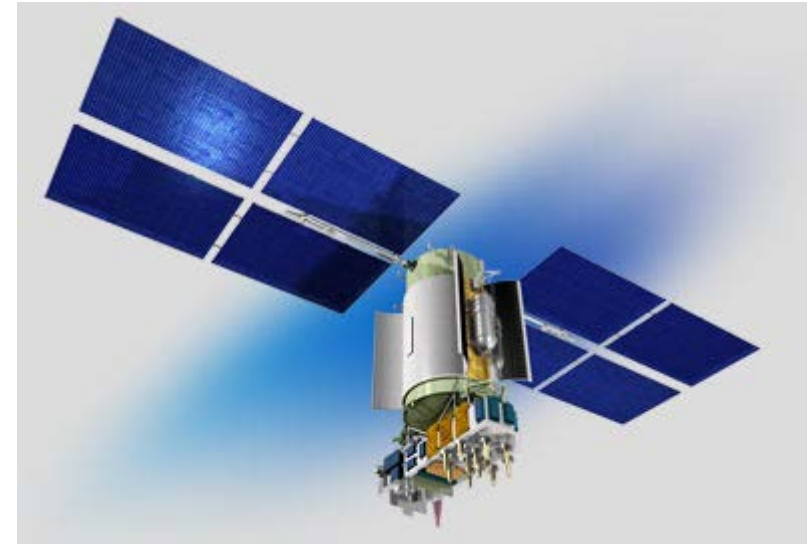
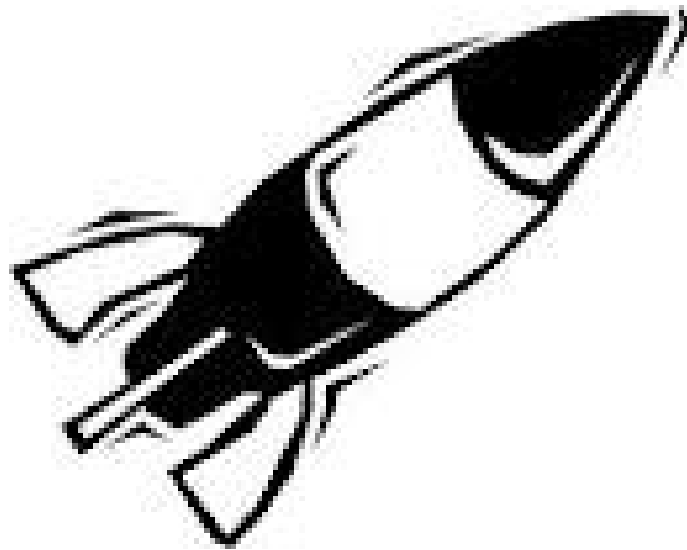
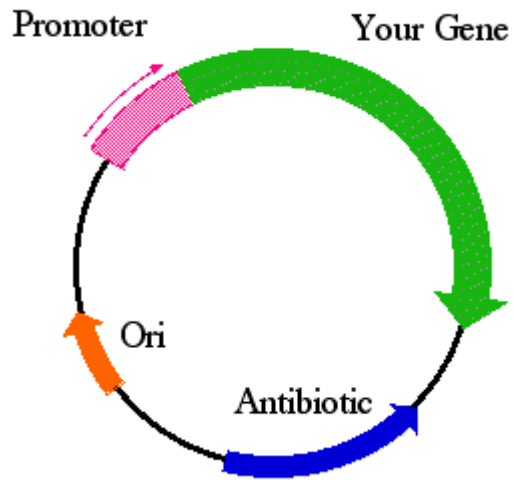
| Нуклеотид |                                                                    |                                          |                                                                                   |                                                               |                  |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------|
| 1-й       | 2-й                                                                |                                          |                                                                                   |                                                               | 3-й              |
|           | У                                                                  | Ц                                        | А                                                                                 | Г                                                             |                  |
| У         | УУУ } Фенилаланин<br>УУЦ }<br>УУА } Лейцин<br>УУГ }                | УЦУ }<br>УЦЦ } Серин<br>УЦА }<br>УЦГ }   | УАУ } Тирозин<br>УАЦ }<br>УАА } стоп-кодона<br>УАГ }                              | УГУ } Цистеин<br>УГЦ }<br>УГА } стоп-кодон<br>УГГ } Триптофан | У<br>Ц<br>А<br>Г |
| Ц         | ЦУУ }<br>ЦУЦ } Лейцин<br>ЦУА }<br>ЦУГ }                            | ЦЦУ }<br>ЦЦЦ } Пролин<br>ЦЦА }<br>ЦЦГ }  | ЦАУ } Гистидин<br>ЦАЦ }<br>ЦАА } Глутамин<br>ЦАГ }                                | ЦГУ }<br>ЦГЦ } Аргинин<br>ЦГА }<br>ЦГГ }                      | У<br>Ц<br>А<br>Г |
| А         | АУУ }<br>АУЦ } Изолейцин<br>АУА }<br>АУГ } Метионин<br>старт-кодон | АЦУ }<br>АЦЦ } Треонин<br>АЦА }<br>АЦГ } | ААУ }<br>ААЦ } Аспарагин<br>ААА } Лизин<br>ААГ }                                  | АГУ }<br>АГЦ } Серин<br>АГА } Аргинин<br>АГГ }                | У<br>Ц<br>А<br>Г |
| Г         | ГУУ }<br>ГУЦ } Валин<br>ГУА }<br>ГУГ }                             | ГЦУ }<br>ГЦЦ } Аланин<br>ГЦА }<br>ГЦГ }  | ГАУ } Аспарагиновая<br>кислота<br>ГАЦ } Глутаминовая<br>кислота<br>ГАА }<br>ГАГ } | ГГУ }<br>ГГЦ } Глицин<br>ГГА }<br>ГГГ }                       | У<br>Ц<br>А<br>Г |

# Инструментарий биоинженера: манипуляции с ДНК.



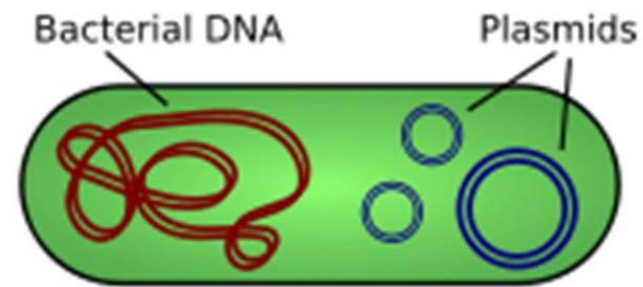


# Средства доставки генетической конструкции.

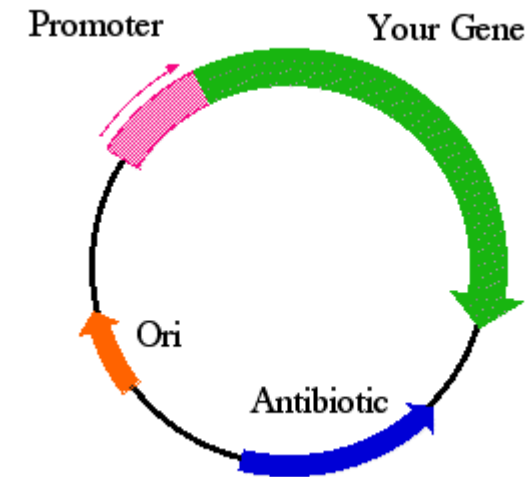


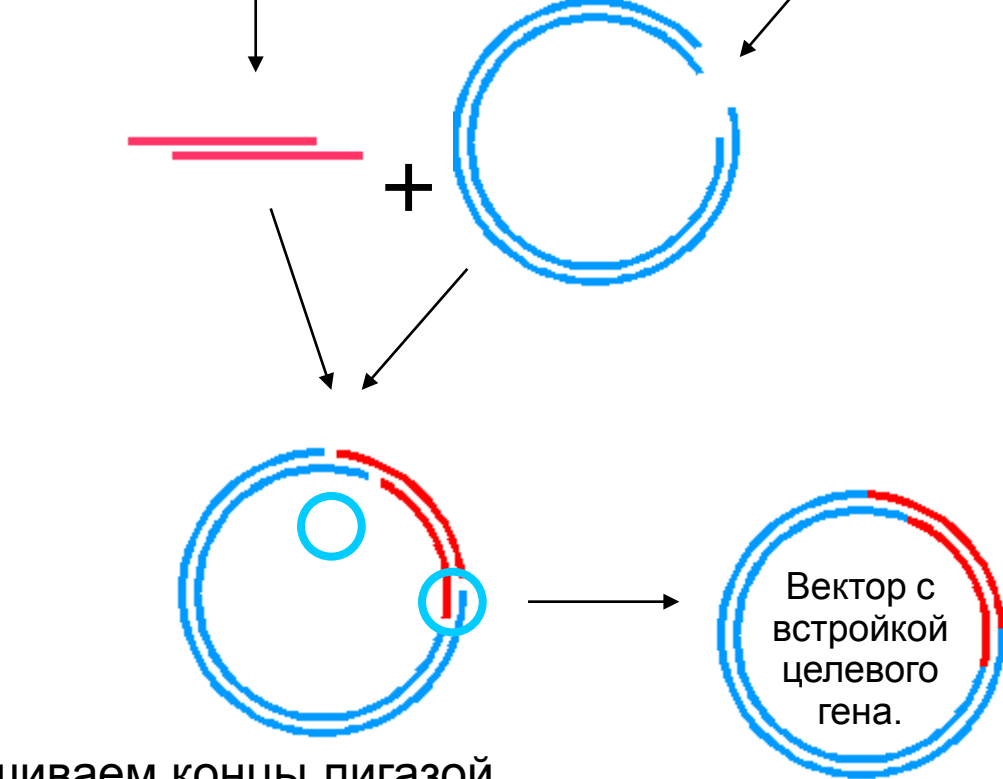
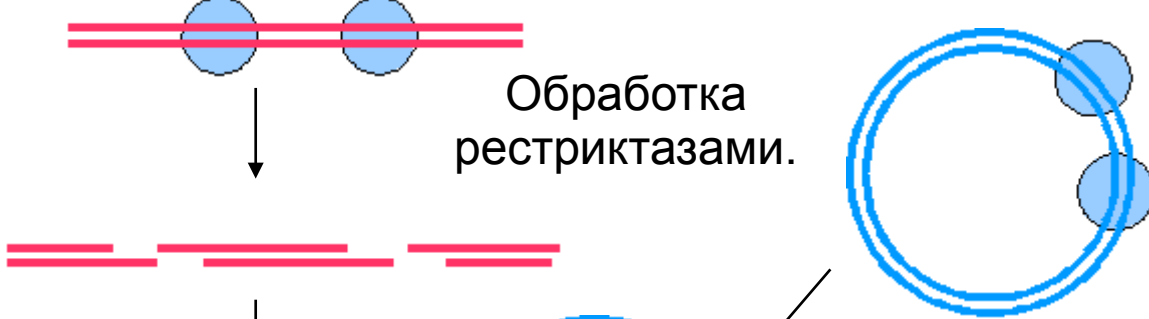
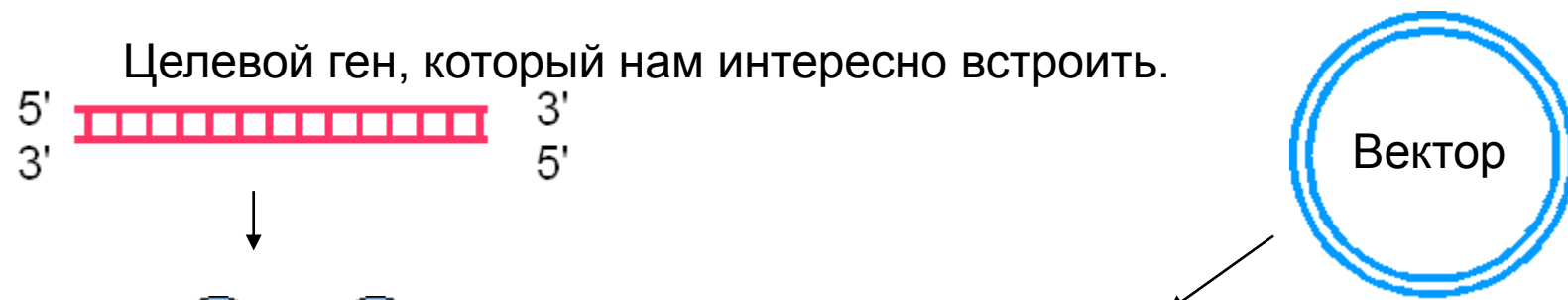


# E. coli. Кишечная палочка

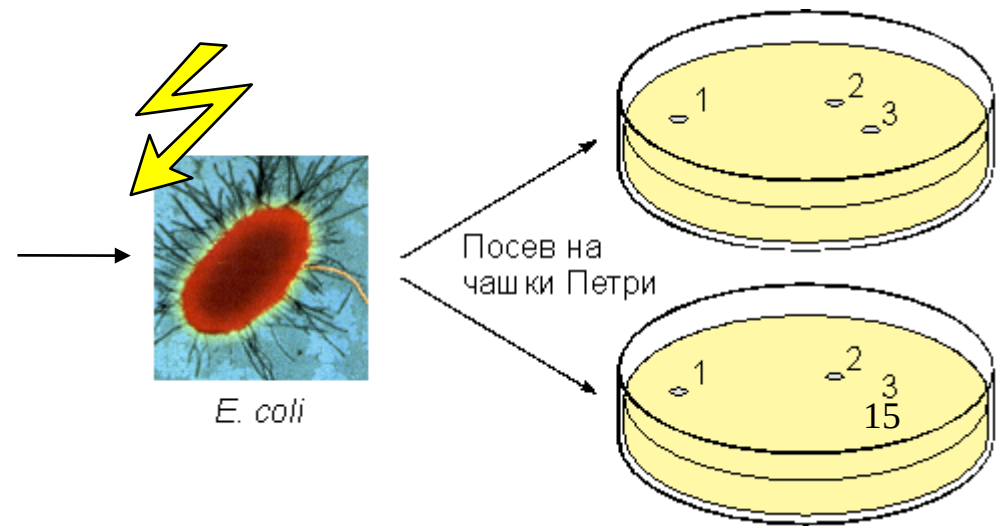


## Плазмиды

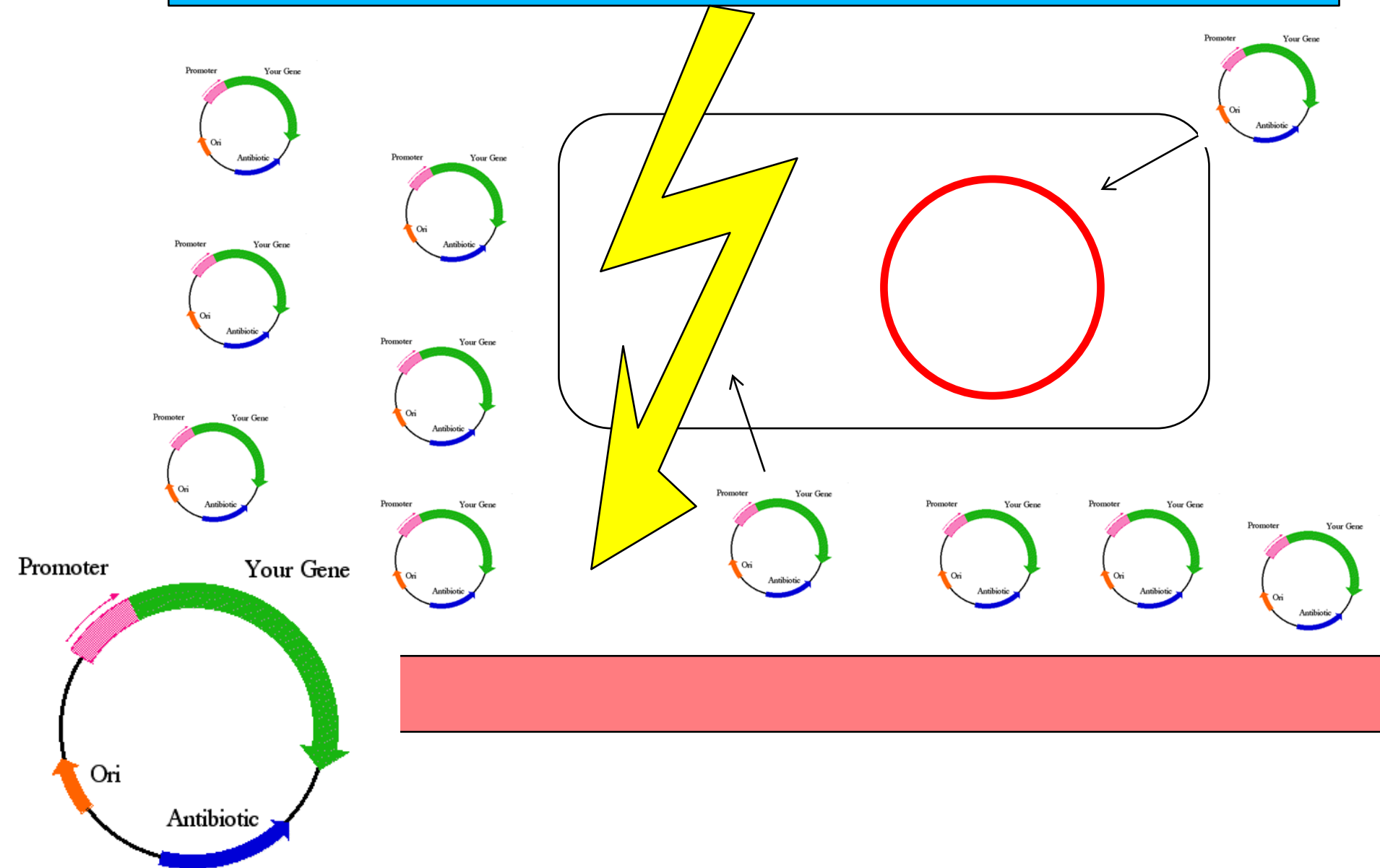




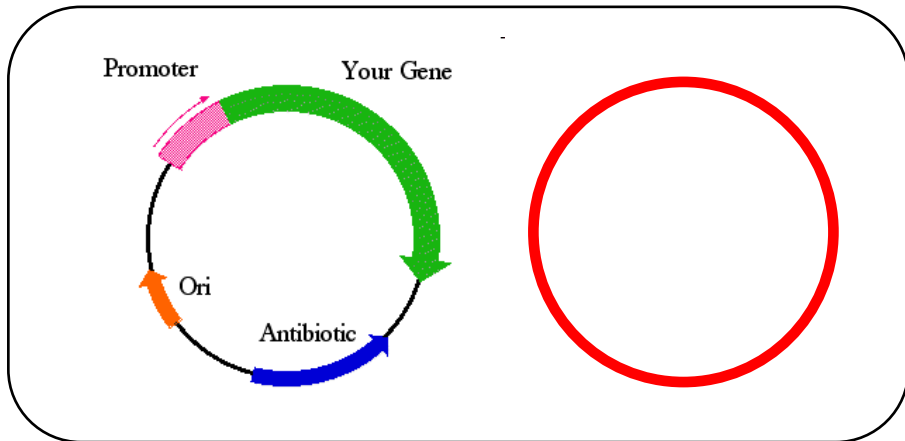
# Трансформация бактерий.



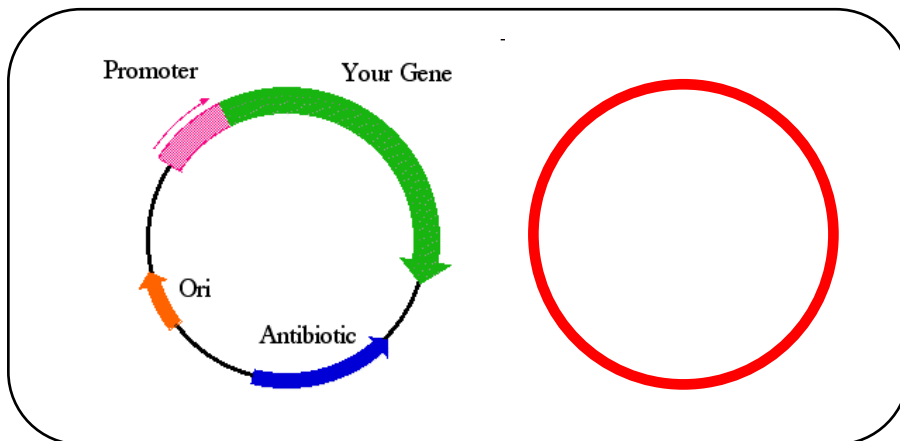
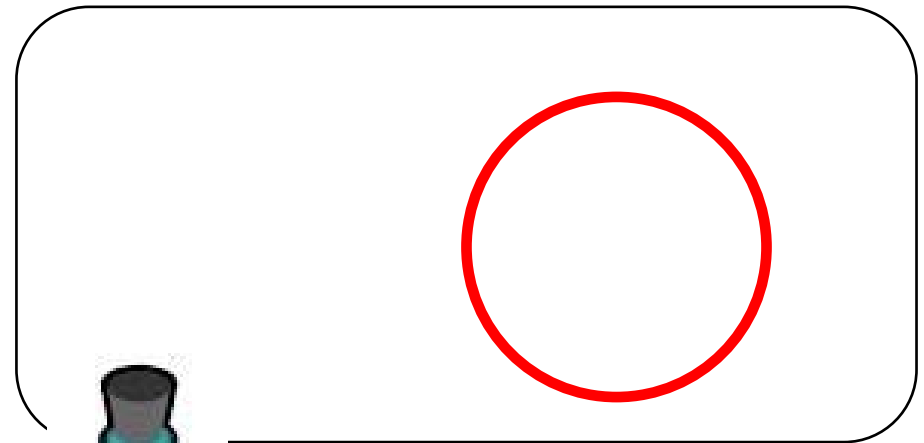
# Трансгенез с помощью электропорации.



# Селективные среды.

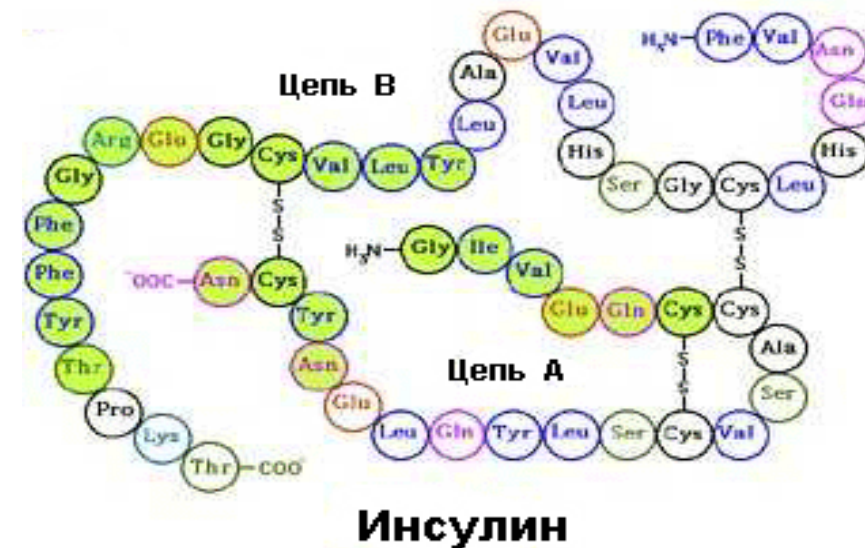


+ АНТИБИОТИК



# Биотехнологическое производство инсулина.

Инсулин ранее получали из клеток поджелудочной железы животных, для получения 100 г кристаллического инсулина требовалось 800-1000 кг поджелудочной железы, а одна железа коровы весит 200 - 250 грамм.



**В 1978** году исследователи из компании "Генентек" впервые получили **инсулин** в специально сконструированном штамме кишечной палочки.

**Из 1000** литров культуральной жидкости можно получать до **200** граммов гормона, что эквивалентно количеству инсулина, выделяемого из **1600** кг поджелудочной железы свиньи или коровы.



# Производство соматотропина.

**Соматотропин** - гормон роста человека, секретируемый гипофизом.

**Недостаток** этого гормона у детей приводит к гипофизарной **карликовости**.

Ранее соматотропин получали из **трупного материала**, из одного трупа добывали около 4 - 6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат.

**В итоге:**

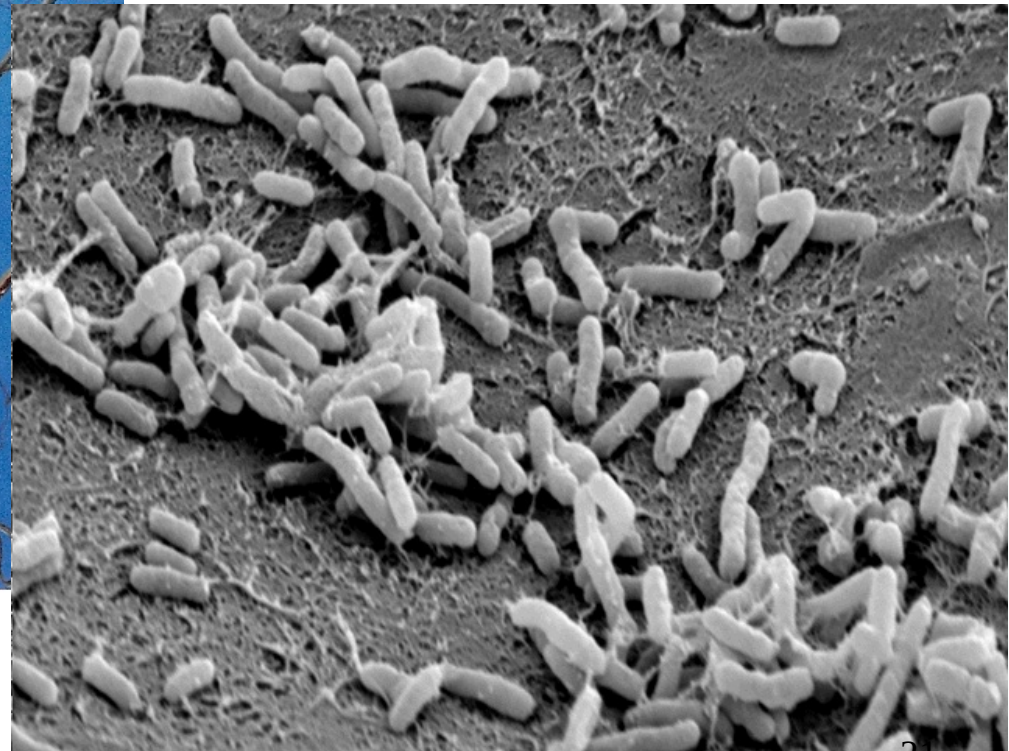
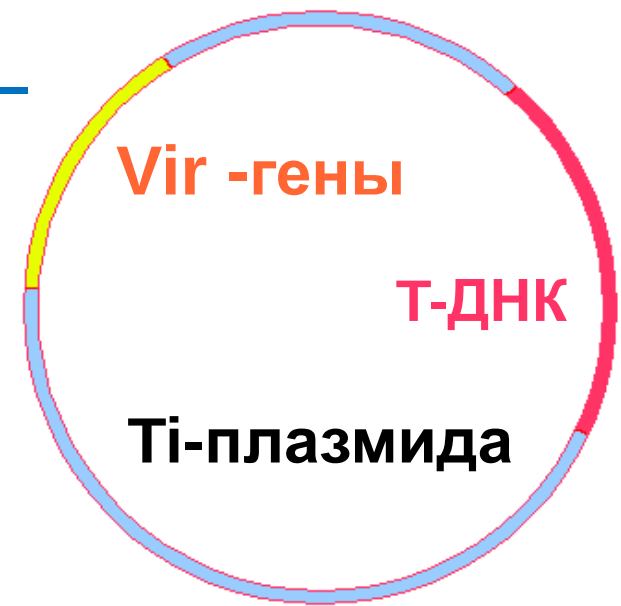
- препарата **не хватало на всех** пациентов.
  - препарат был **неоднороден**
  - препарат мог содержать **вирусы**.
- Биотехнологическое производство решает все эти проблемы**





# ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

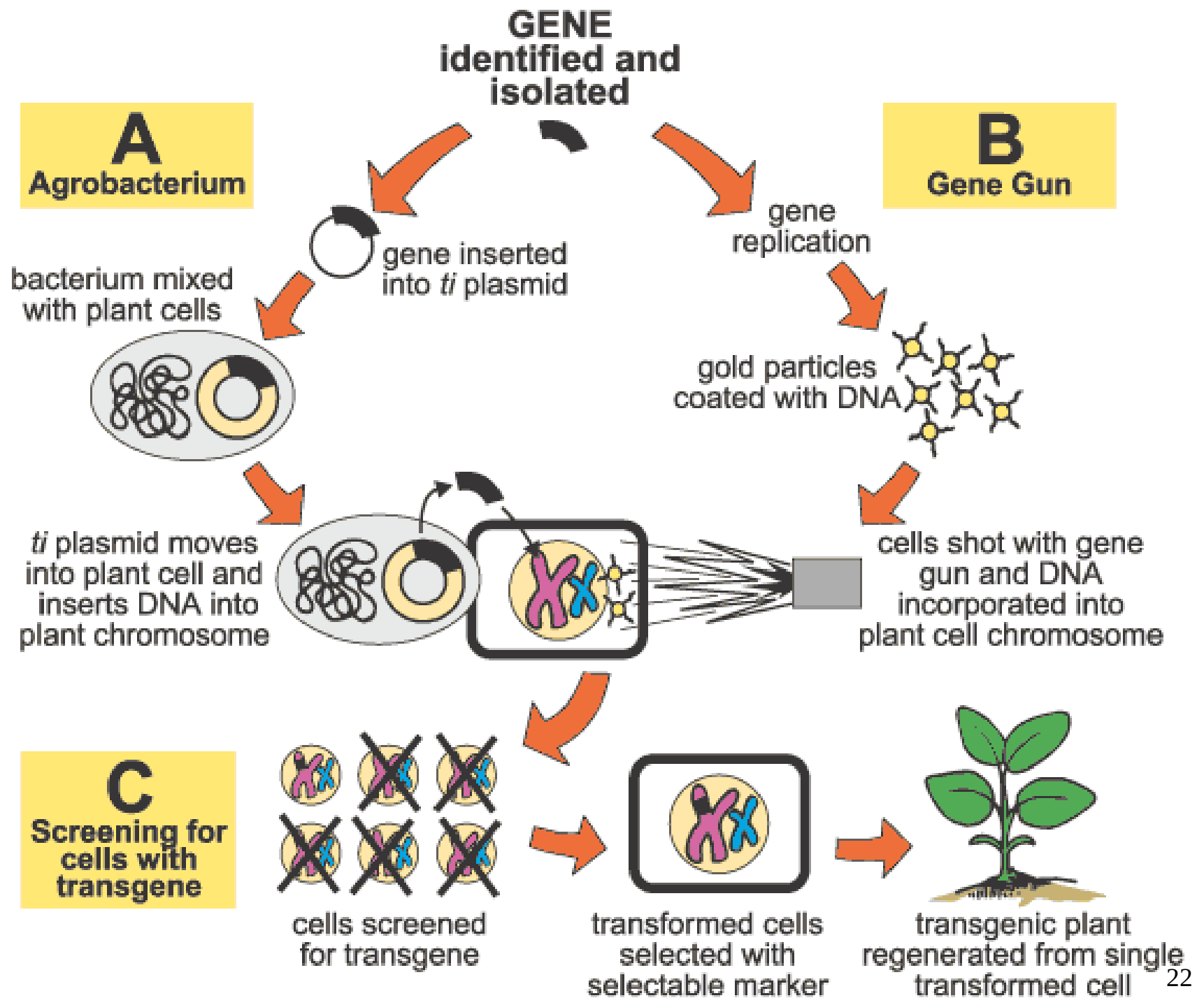
# Agrobacterium tumefaciens — природный био инженер.



<http://northernwoodlands.org/images/uploads/>

<http://www.bio.davidson.edu/people/kabernd/seminar/2002/method/dsmeth/ds.htm>





# GenGun или генная пушка.

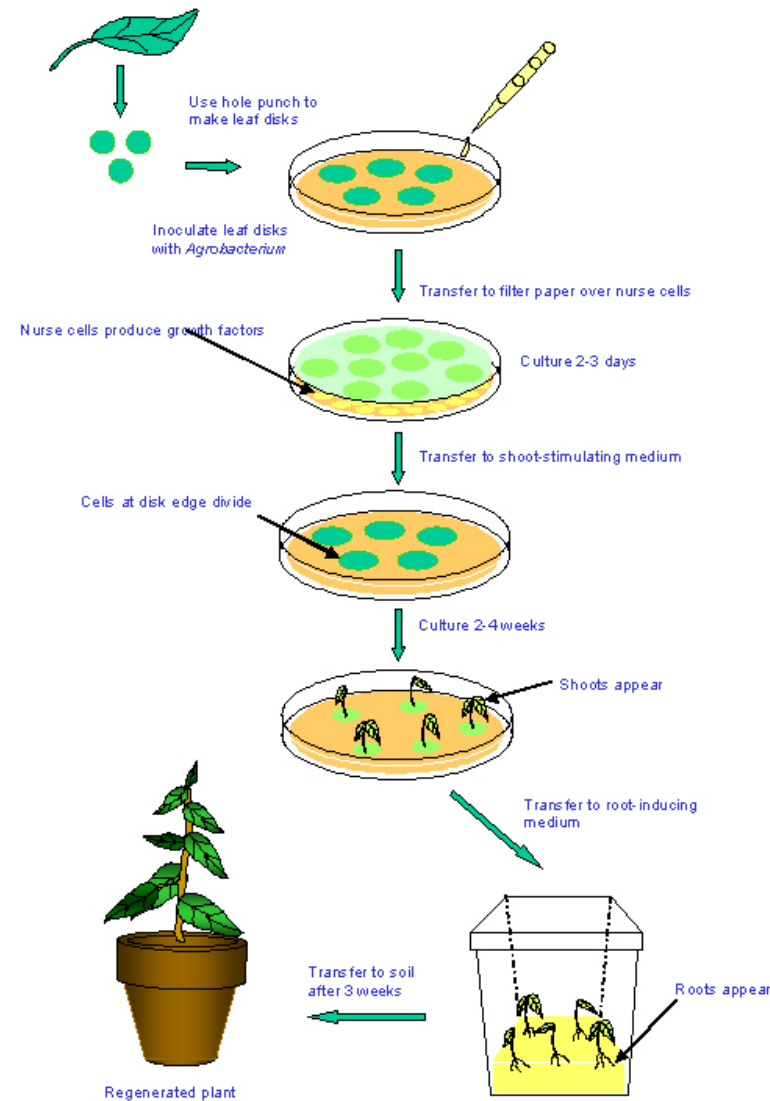




# GenGun в действии.



# Клеточные технологии при трансгенезе растений.



# Основные направления создания трансгенных растений.

- Повышение устойчивости к гербицидам
- Повышение устойчивости к энтомофауне, бактериальным, вирусным и грибковым инфекциям.
- Повышение устойчивости к неблагоприятным условиям среды (температура, засоленность, недостаток влаги )
- Повышение качества запасных белков, жиров и углеводов.
- Биофабрики белка.
- Съедобные вакцины.

# «Золотой» рис.

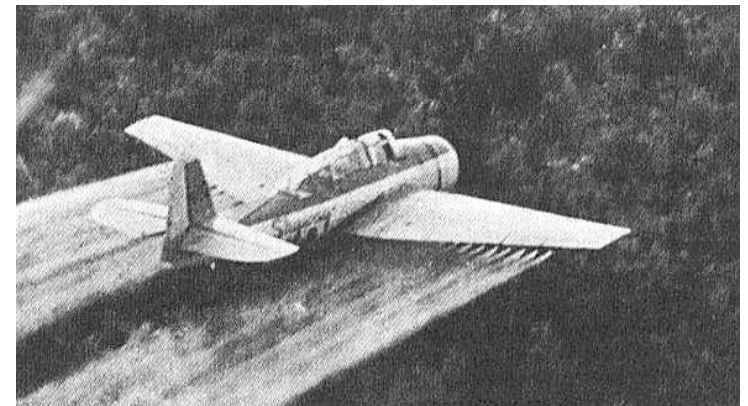
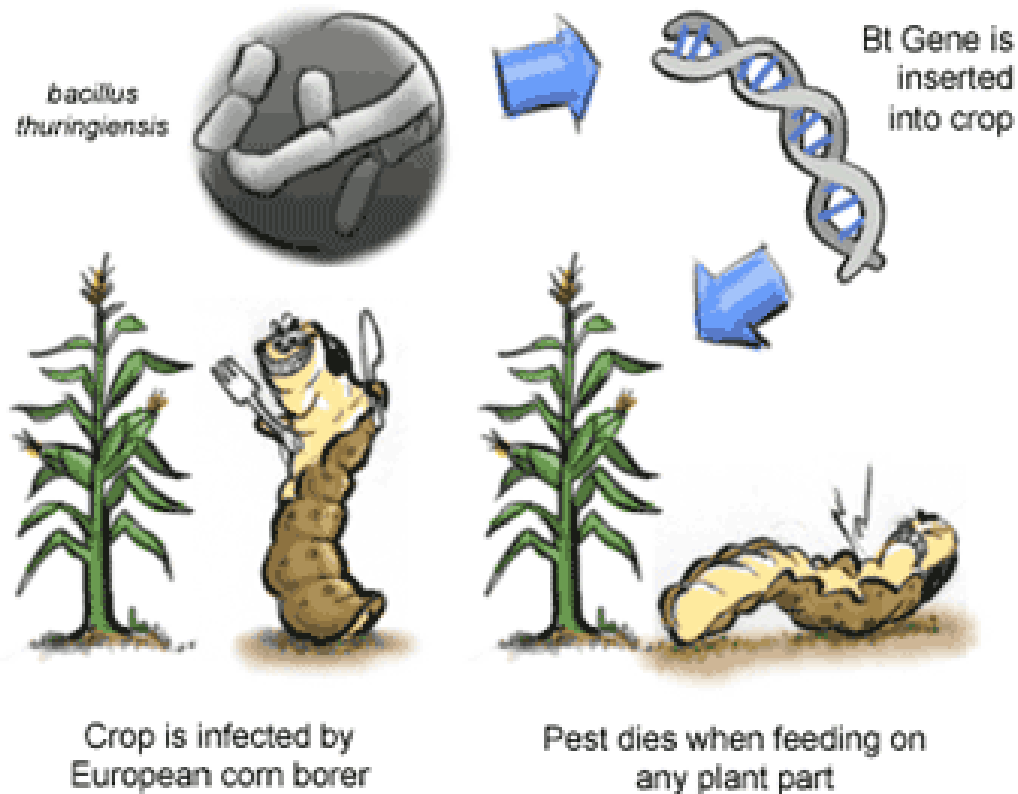


**Недостаток витамина А ведет к ухудшению зрения, поскольку основной компонент родопсина - светочувствительного белка сетчатки составляет его кофактор: ретиналь-образующийся из витамина А.**

**В странах Юго-Восточной Азии пищевой рацион в основном состоит из риса, жители этих стран часто страдают от недостатка витамина А. В рис была внедрена генетическая конструкция, несущая гены позволяющие вырабатывать каротиноиды, являющиеся прямыми предшественниками витамина А.**



# Использование дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* для борьбы с вредителями.



<http://scq.ubc.ca/quarterly023/>

В природе найдено большое количество штаммов *B. thuringiensis*, чьи токсины действуют только на определенные виды насекомых. Препараты *B. thuringiensis* в течение десятилетий использовали для контроля насекомых на полях. Безопасность токсина и его составных белков для человека и других млекопитающих полностью доказана.



# Морозоустойчивость растения и *Pseudomonas syringae*.

- Формирование льда в воде зависит от веществ, могущих служить **центрами кристаллизации льда.**
- **Белок**, который выделяет наружу *Pseudomonas syringae*, **вызывает формирование кристаллов льда в различных частях растения**, что является одним из главных факторов, ответственных за повреждение тканей растений, чувствительных к ранним заморозкам.
- Растения, развивающиеся **в стерильной среде** выдерживают до **-6-8° С**, а у растений, имеющих соответствующую **микрофлору**, повреждения возникают при температурах **-1,5-2° С.**
- **Мутанты этих бактерий**, потерявшие способность синтезировать белок, вызывающий формирование кристаллов льда, не повышали температуру образования льда, и **растения с такой микрофлорой были устойчивы к заморозкам.**

# Съедобные вакцины и растения-биофабрики белка.

## Томаты с комбинированной вакциной против ВИЧ и гепатита В.

В томаты сорта «Вентура» были встроены поверхностные белки вирусов гепатита В человека и ВИЧ-1: HBsAg и белок p24.

## Морковь с интерлейкинами.



# Основные направления биоинженерии у животных.

- Исследовательские цели (например, изучение регуляторных элементов генома)
- Биофабрики белка.
- Генная терапия (например, для лечения ТКИД, вызванного мутацией фермента адениндезаминазы была успешно применена трансформация лейкоцитов с помощью ретровирусного вектора, содержащего нормальный вариант этого гена ).

# Системы молочной экспрессии.



Молочные железы очень удобны для организации в них экспрессии целевого белка:

- Не требуется манипуляций с кровью.
- Простота очистки.
- Молочные железы изолированы от кровеносной системы. Трансген активен только в молочной железе поскольку находится под тканеспецифичным промотором.
- Трансген отсутствует в молоке, присутствует лишь его продукт – целевой белок.



# Молочные животные - продуценты.



Американская компания PharmAthene, недавно получивла трансгенных коз, молоко которых содержит **бутирилхолинэстеразу**, являющуюся антидотом боевых отравляющих веществ из группы фосфорорганических соединений, в том числе зарина и VX-газов.

Один литр молока содержит 2—3 грамма такого вещества.

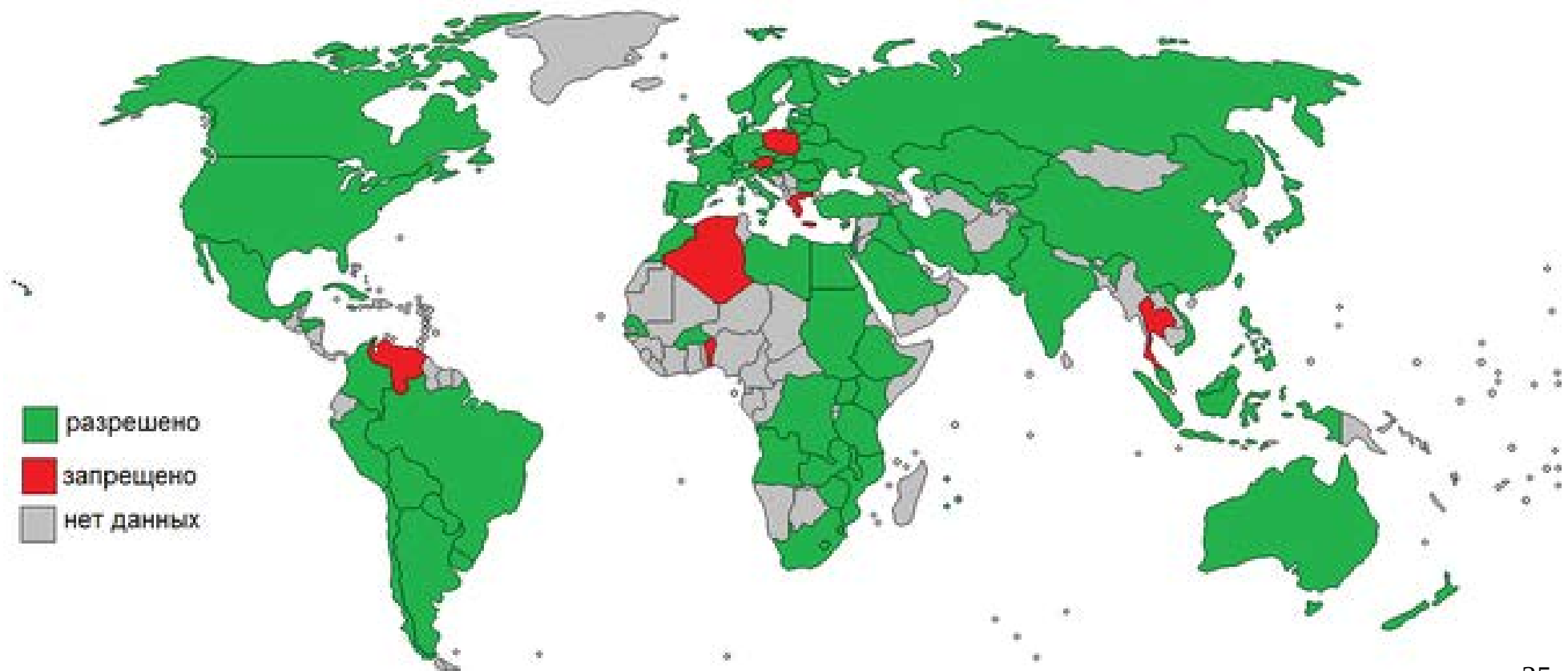
# МИФОЛОГИЯ о ГМО...

## МИФ №1

Трансгены способны встроиться в хромосомы человека.  
Продукты, содержащие ГМО,  
превратят вас и ваших детей в мутантов.



# Распространение гмо в мире.



# Обработка пищи ферментами в организме человека.



## **Слюнные железы:**

Липаза: жиры->глицерин+жирные кислоты

Амилаза: крахмал->мальтоза

## **Желудок:**

Пепсин: белки->аминокислоты

HCl, pH

## **Поджелудочная железа + железы тонкого кишечника:**

Трипсин, химотрипсин: белки->аминокислоты

Липаза: жиры->глицерин+жирные кислоты

Нуклеазы: НК->нуклеотиды

Амилаза: крахмал->мальтоза

Мальтаза: мальтоза->глюкоза

## **Печень**

Желчь: эмульгирует липиды.

## Миф №2. Британские ученые доказали, что ГМО вредно...

Статьи о вреде ГМО в научных журналах можно сосчитать по пальцам. Самую цитируемую из них по недосмотру напечатал журнал «Ланцет» (и в следующем номере опубликовал ее резкую критику).

Автор статьи, венгр Арпад Пуштаи, работавший в Великобритании, вставил в картошку заведомо ядовитый лектин из подснежника, две недели кормил этой картошкой зерноядных крыс (в обычный рацион которых картошка не входит!), а затем сделал вывод не о вреде картошки для крыс и этого конкретного лектина – для млекопитающих, а о вреде ГМО вообще.



# МИФ №3. Противники ГМО борются за здоровье человека и сохранение биосферы.

ГМО угрожают не биосфере и здоровью потребителей, а доходам производителей ядохимикатов. Для руководства «экологических» организаций кампания против ГМО – прежде всего лозунг в политической борьбе.

**МНОГИЕ ЛЕКАРСТВА ПОЛУЧЕНЫ ГМО ПУТЕМ.**

# Проблемы биобезопасности. Современный миф или реальность?



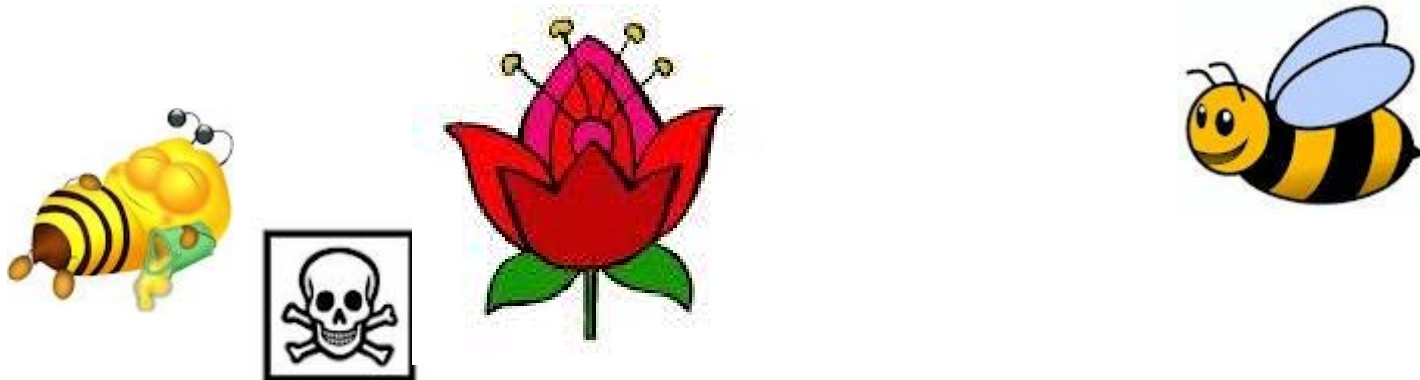
- **СУПЕР БАКТЕРИИ**
- Скептик: гены устойчивости к антибиотикам, которые содержат трансгенные растения могут попасть в бактериальные клетки, что приведет к появлению супербактерий.
- Реалист: Это маловероятно.
- Гены устойчивости к антибиотикам отличаются у прокариот и эукариот.
- Перенос НК как правило затруднен нестабильностью внеклеточных НК.
- Гораздо больше вероятность занесения генов устойчивости из природных микроорганизмов.

# Биобезопасность. Суперсорняки и супервредители.

- **СУПЕРСОРНЯКИ.**

- Скептик: Трансгенные растения устойчивые к гербицидам, теоретически могут переопылиться с близкородственными сорняками, в результате могут возникнуть суперсорняки, устойчивые к гербицидам.
- Гербициды – широко использовались, однако не имели подобного эффекта.
- **Выход:** использование в трансгенных растениях генов нескольких разных гербицидов, биогенный путь борьбы с сорняками.

# Токсичность пыльцы для полезных насекомых.



- Трансгенные растения с инсектицидными генами могут убить и полезных насекомых, поскольку токсины будут содержаться например в пыльце, которой многие насекомые питаются.
- Выход: использование тканеспецифичных промоторов, при которых гены не будут вырабатывать белок в тычинках.

# Вместо заключения

Трансгенная голубая роза.