

Генная инженерия сегодня



Л.И. Патрушев

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*

План лекции

Часть первая:

- Введение
- Полимеразная цепная реакция
- Новые методы секвенирования ДНК – геном человека

Часть вторая

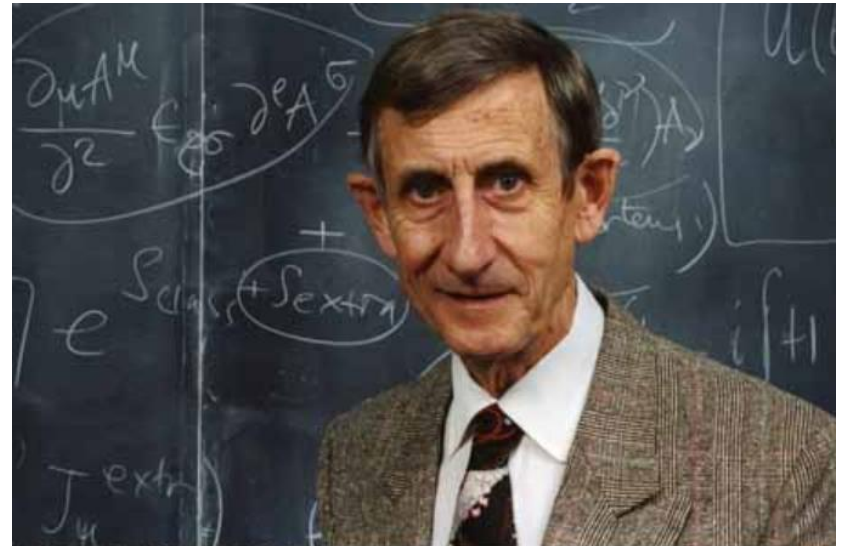
- Анализ геномов и экспрессии генов на уровне транскрипции
- Олигонуклеотидные аптамеры, рибозимы и ДНКзимы. ДНК в наноконструкторе
- Трансгенные животные, животные-клоны

«Новые направления в науке гораздо чаще создаются с помощью новых методов, а не новых концепций.

Новые концепции объясняют известные явления по-новому.

Новые методы открывают новые явления, которые необходимо объяснить.»

Freeman J. Dyson



Что такое «генная инженерия»?

Раздел молекулярной генетики, занимающийся разработкой искусственных генетических систем с использованием манипуляций генами *на молекулярном уровне* путем конструирования *рекомбинантных ДНК* или РНК

Программа-максимум генной инженерии – создание жизнеспособного организма *de novo* по чертежам, разработанным в лаборатории - «*синтетическая биология*»

Генная инженерия облегчает обмен генами между природными генетическими системами

- ❖ В классической генетике и селекции – отбор среди потомства по определенным признакам ограничен репродуктивной изоляцией
- ❖ В генной инженерии при получении трансгенных организмов такие ограничения действуют слабее

Клонированная самка муфлона, родившаяся у овцы, использованной в качестве приемной матери



Перенос ядра соматической клетки погибшего муфлона в энуклеированную яйцеклетку овцы

Нормальные роды после 155 дней беременности



Самец муфлона

Что такое «клонирование»?

В генной инженерии: получение «клона»:
препарата идентичных молекул ДНК

или

«идентичных» живых организмов

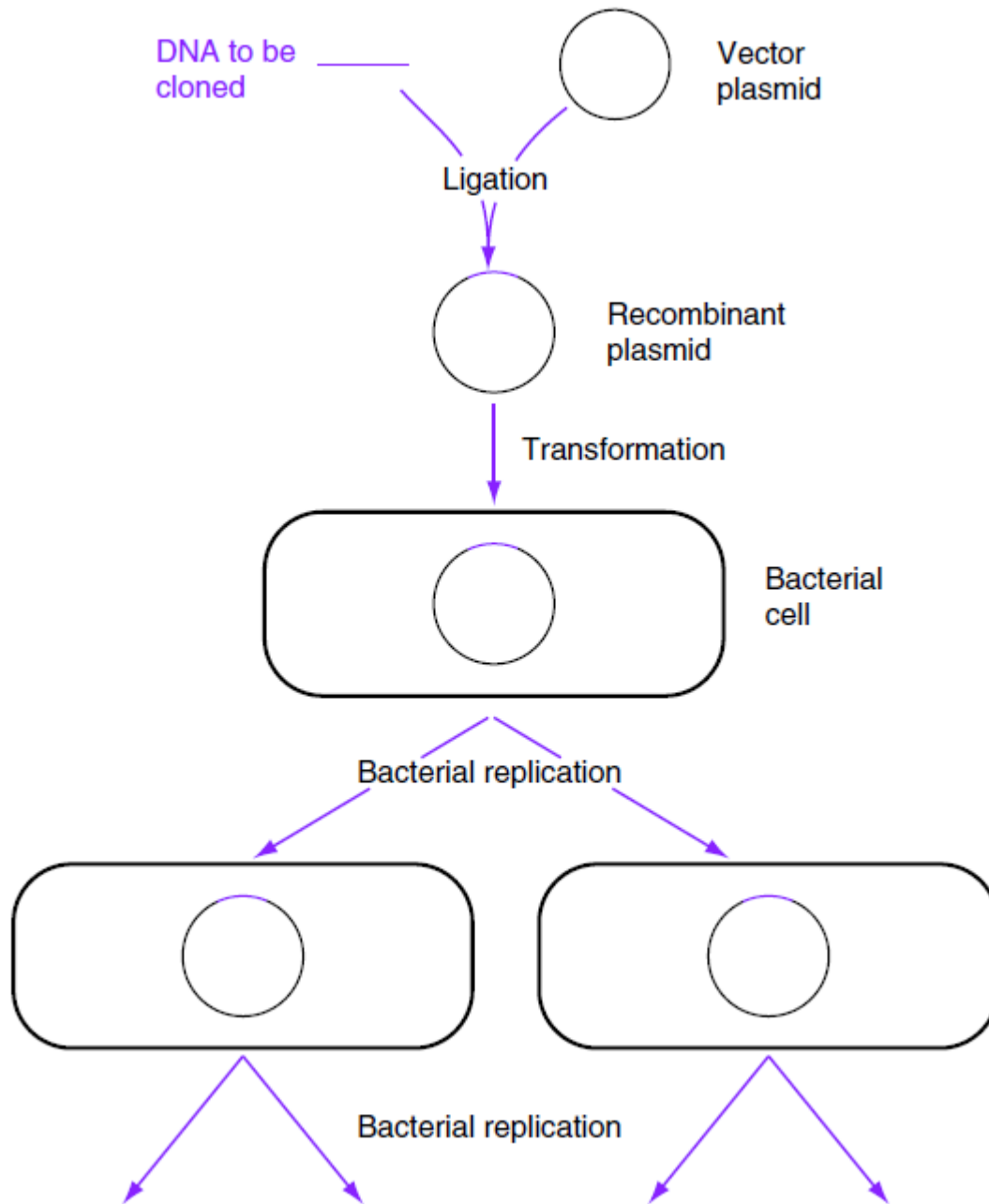
В случае ДНК два пути решения задачи:

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
2. Рекомбинантные молекулы ДНК

Для чего нужны клоны ДНК?

Для удобства проведения исследований

Работать с индивидуальными молекулами ДНК трудно, но возможно



Клонирование ДНК

Цель – получение клона идентичных последовательностей

1 – Объединение вектора со вставкой чужеродной ДНК

2 – Введение рекомбинантного вектора в клетки

3 – Размножение клеток (получение клона клеток)

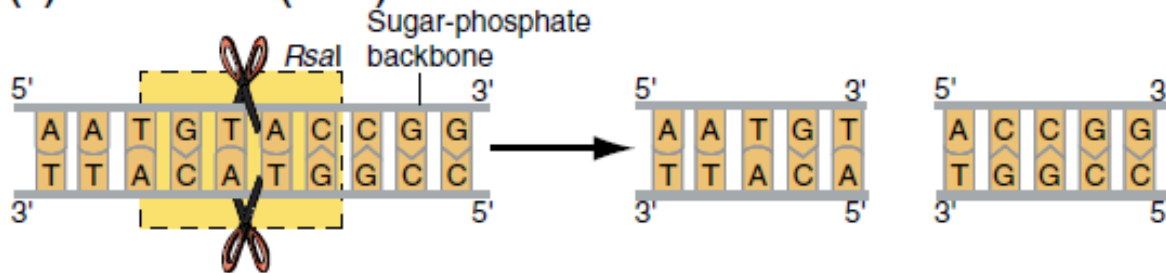
или амплификация молекул нуклеиновых кислот - ПЦР

Эндонуклеазы рестрикции класса II (рестриктазы) – основной инструмент генной инженерии

- ❖ Узнают специфические последовательности – сайты рестрикции
- ❖ Активны в виде димеров в присутствии ионов Mg^{2+}

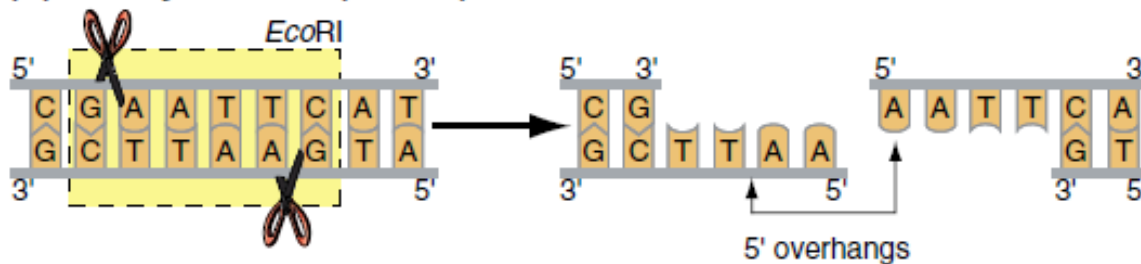
Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

(a) Blunt ends (*RsaI*)



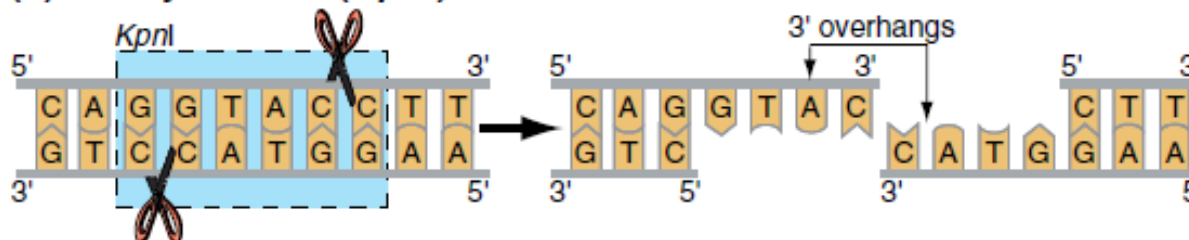
«Тупые» концы

(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



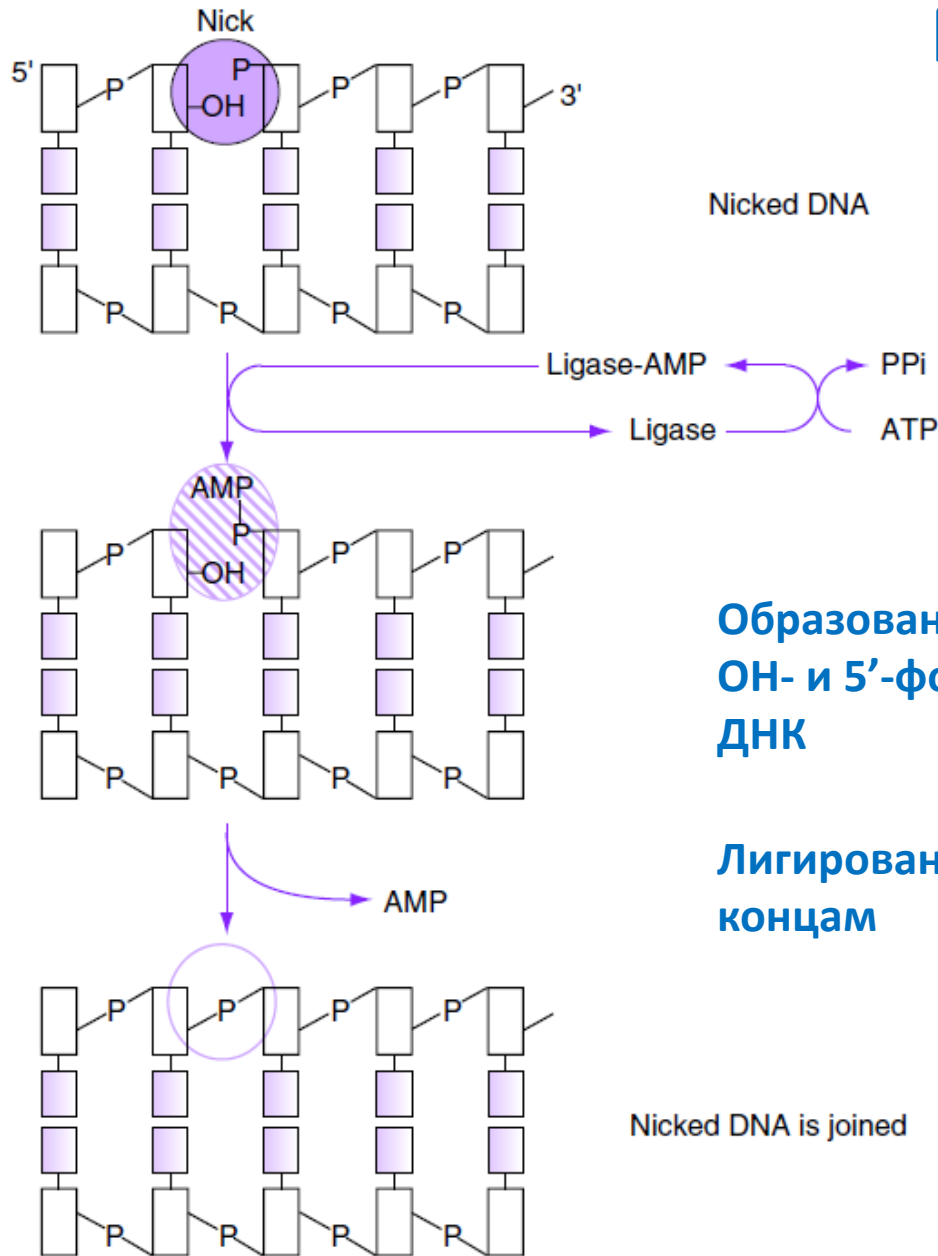
5'-выступающие

(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)



3'-выступающие

Механизм действия Т4-ДНК-лигазы



Образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН- и 5'-фосфатной группами одноцепочечных ДНК

Лигирование фрагментов ДНК по «тупым» концам

Векторы

Молекулярно-генетические конструкции, предназначенные для переноса генетического материала в клетки живых организмов

- ❖ Клонировующие векторы (Cloning vectors)
- ❖ Экспрессирующие векторы (Expression vectors)
- ❖ Векторы для слияния генов (Gene fusion vectors)
- ❖ Бинарные (челночные) векторы (Shuttle vectors)

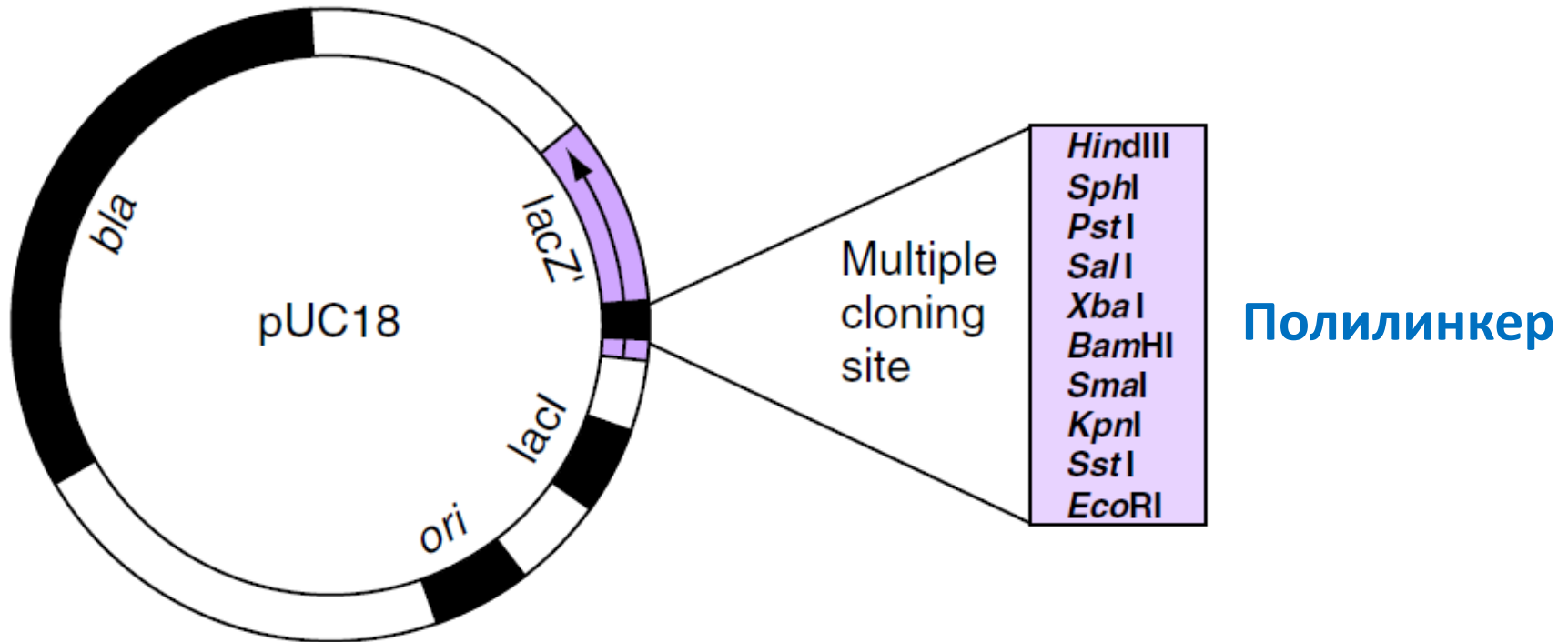
Свойства, которыми должен обладать любой вектор

- ❖ Способность к длительному существованию в клетках-хозяевах (репликация автономная или в составе хромосом)
- ❖ Наличие биохимических или генетических маркеров, которые позволяют обнаруживать его присутствие в клетках
- ❖ Должны допускать встраивание чужеродной ДНК без нарушения своей функциональной целостности

A microscopic image showing numerous small, circular, and irregularly shaped structures, likely plasmids, against a dark background. The structures are stained and appear as bright, thin lines or loops. A semi-transparent blue rectangular box is centered over the image, containing the title text in white.

Плазмидные векторы

Плазмидный вектор pUC18



bla – Ген β -лактамазы, **селектируемый маркер** (устойчивость ампициллину)

ori – Точка начала репликации (origin)

lacZ' – N-концевая часть гена β -галактозидазы (кодирует 146 из 1021 АК-остатков), **селектируемый маркер** (хромогенный субстрат X-Gal)

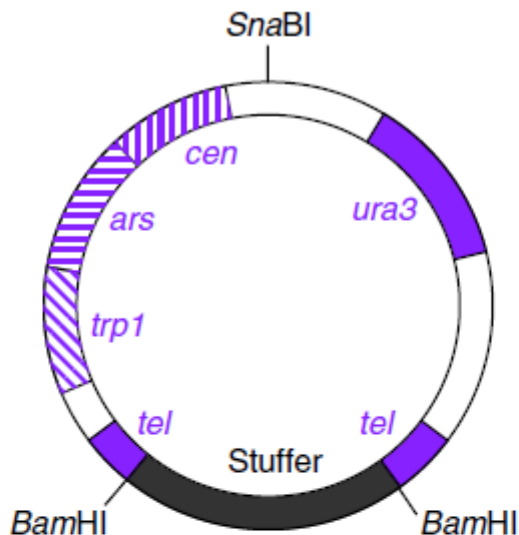
lacI – Ген Lac-репрессора (Индуктор – IPTG)

Искусственные хромосомы



Искусственная хромосома дрожжей YAC (Yeast Artificial Chromosome)

cen – центромера
tel – теломеры
ars – область начала
репликации



ura3 – ген оротидин-
5'-фосфатдекарбоксилазы
жизненноважный:

позитивный отбор

5-фтороротовая кислота
(нетоксична)

5-фторурацил (токсичен)

негативный отбор

Cut with *SnaBI* and *BamHI*
Discard stuffer



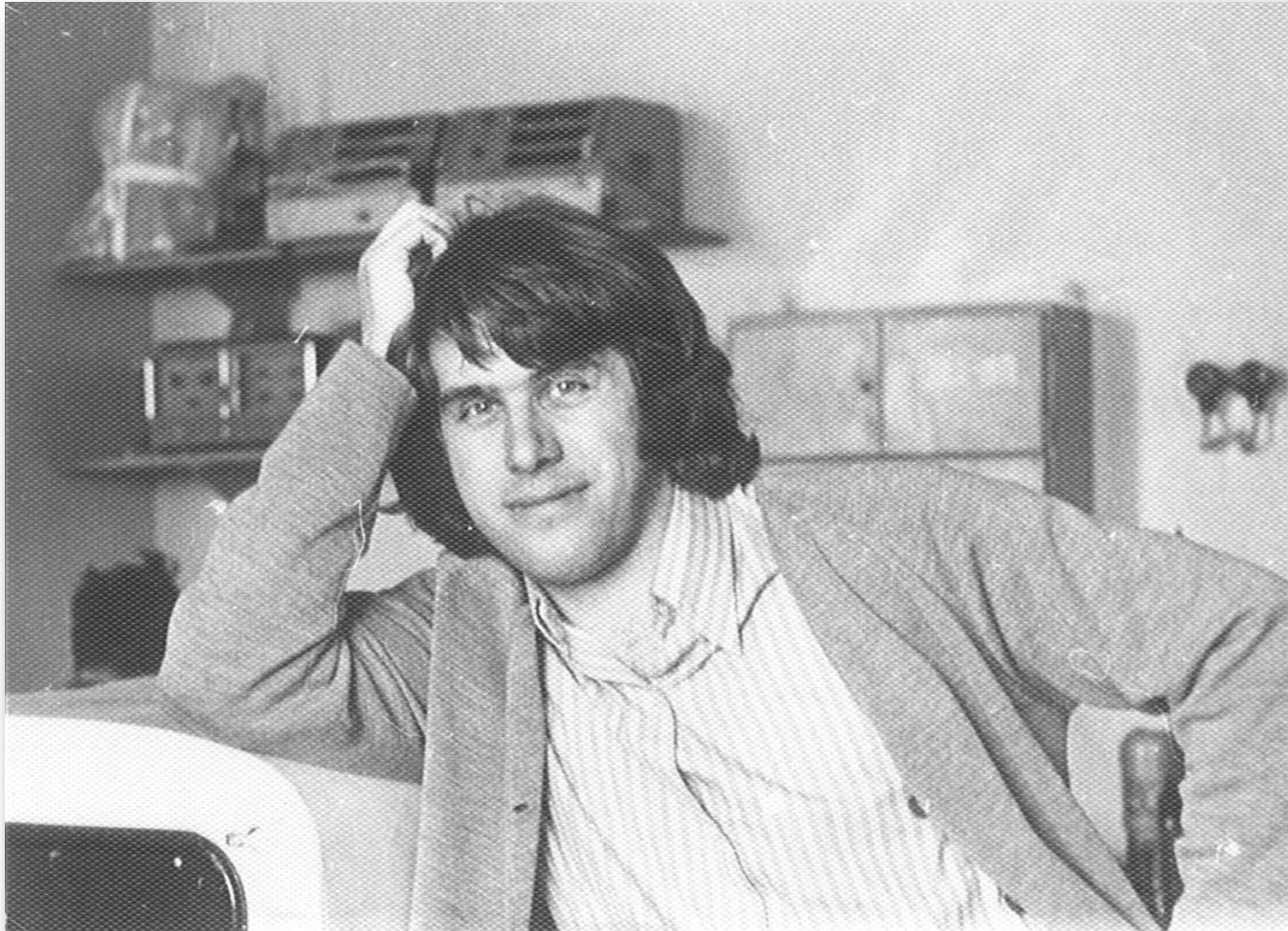
Ligate with insert DNA



Insert DNA

>2000 т.п.н.

Евгений Витальевич Ананьев, 1970-е



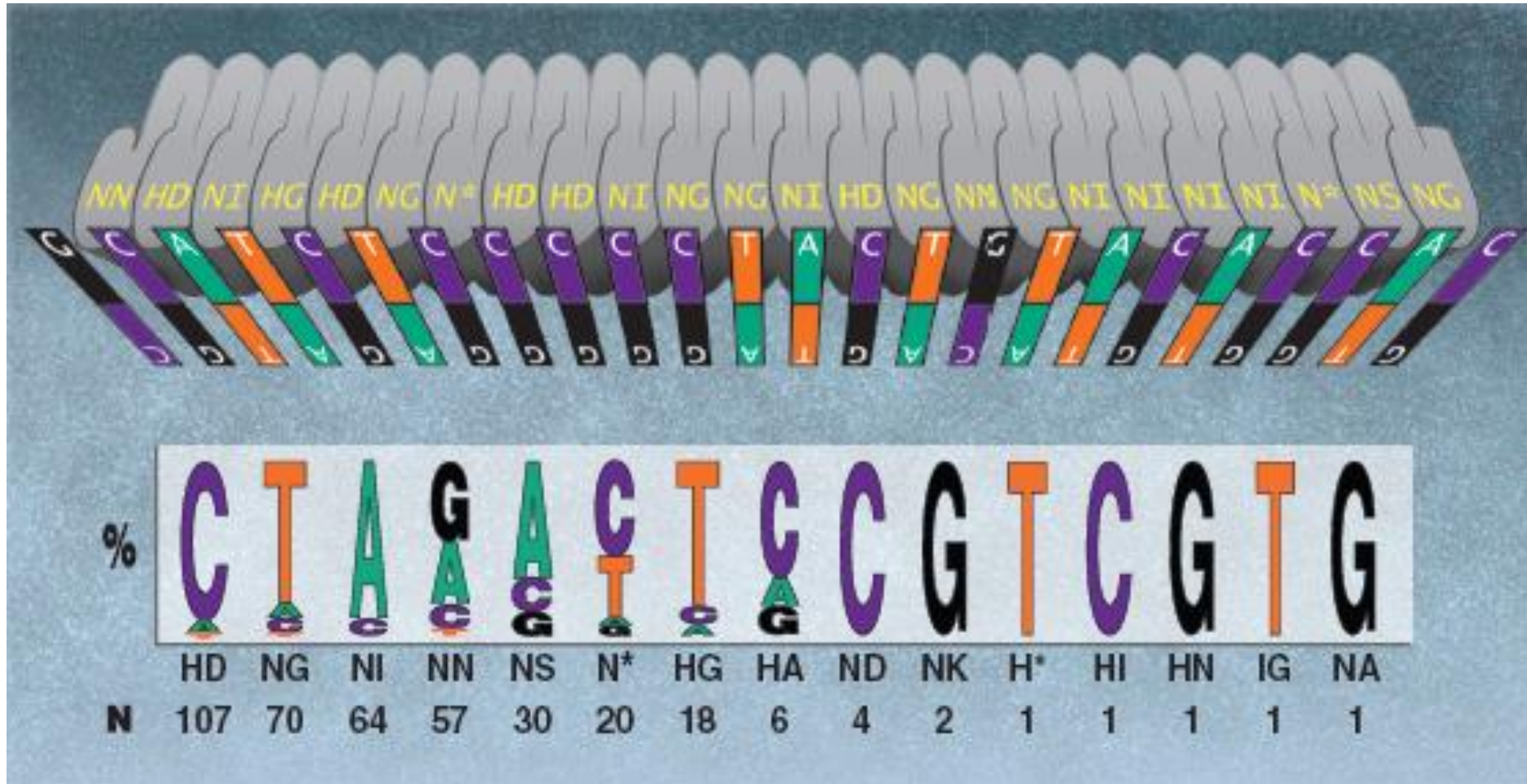
Искусственные
хромосомы
кукурузы

Первооткрыватель
мобильных
генетических
элементов у
дрозофилы

Емкости векторов разных классов

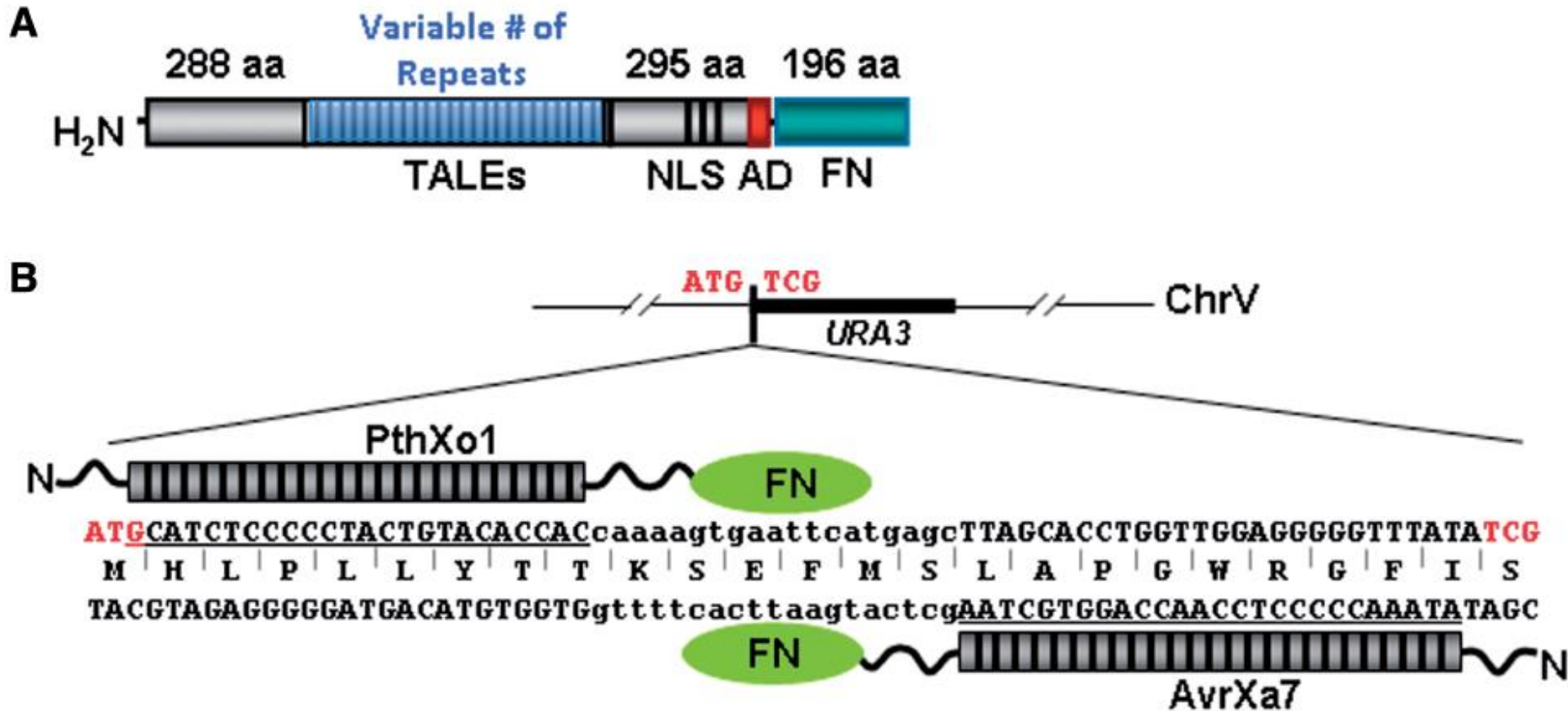
Вектор	Емкость (т.п.н.)	Применение
Плазмиды	15	Библиотеки кДНК
Бактериофаг лямбда	25	Геномные библиотеки Библиотеки кДНК
Космиды	30-45	Геномные библиотеки
РАС	70-90	То же
ВАС	100-500	То же
УАС	250-2000	То же
МАС	>2000	Генотерапия

ДНК-узнающий домен TAL-эффектора построен из повторяющихся пептидных модулей



TAL - Transcription activator-like (effectors) у бактерий рода *Xanthomonas*, паразитирующих на растениях. Длина повторяющегося модуля – 33-35 а.о.

Рекомбинантный химерный белок TALEN для адресной доставки нуклеазы к ДНК дрожжей



Cytoplasm

Engineered TAL effector protein



NUCLEUS

Targeted
DNA cleavage



FokI

FokI

Gene activation

AD



Gene repression ?

RD

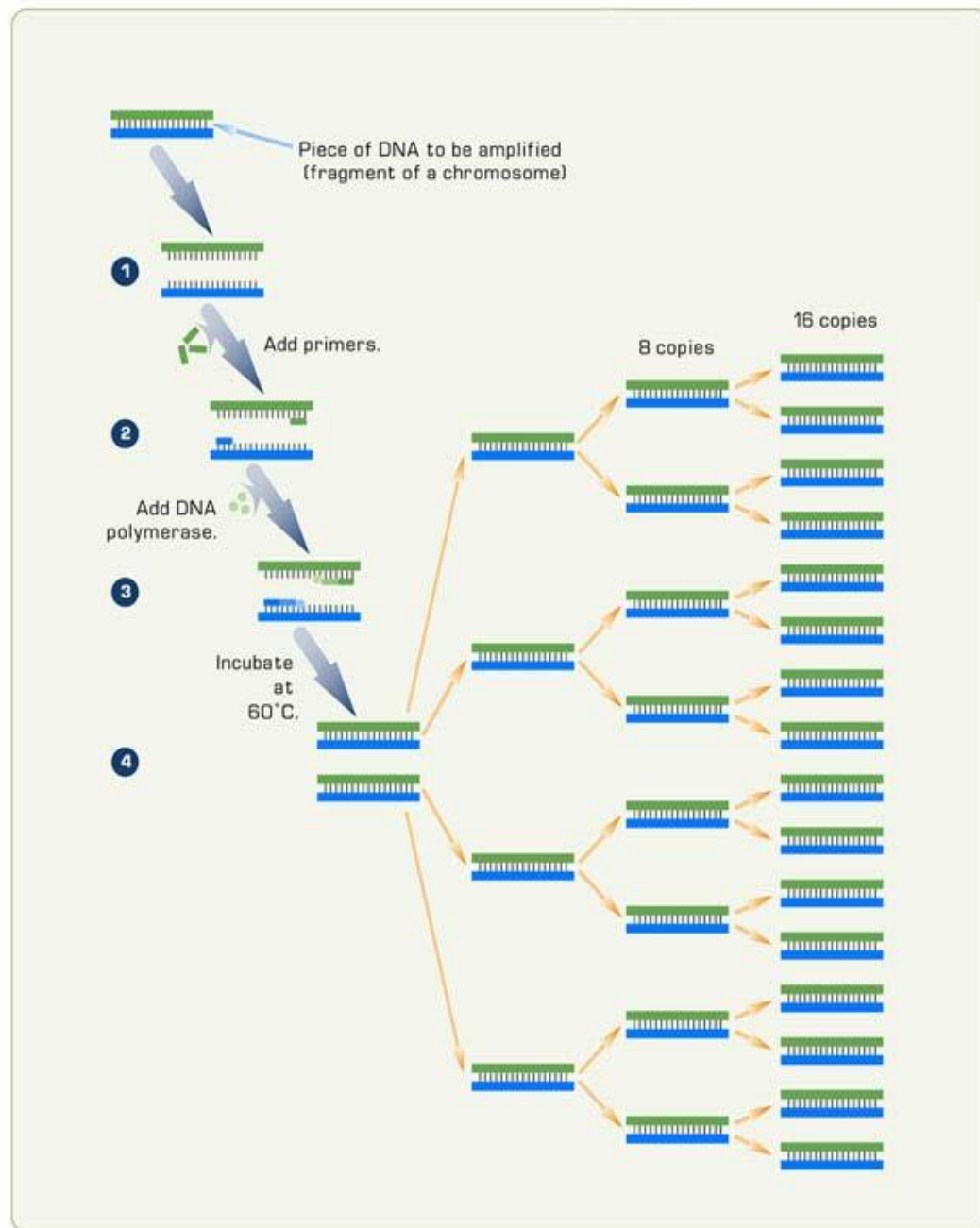


Other ?

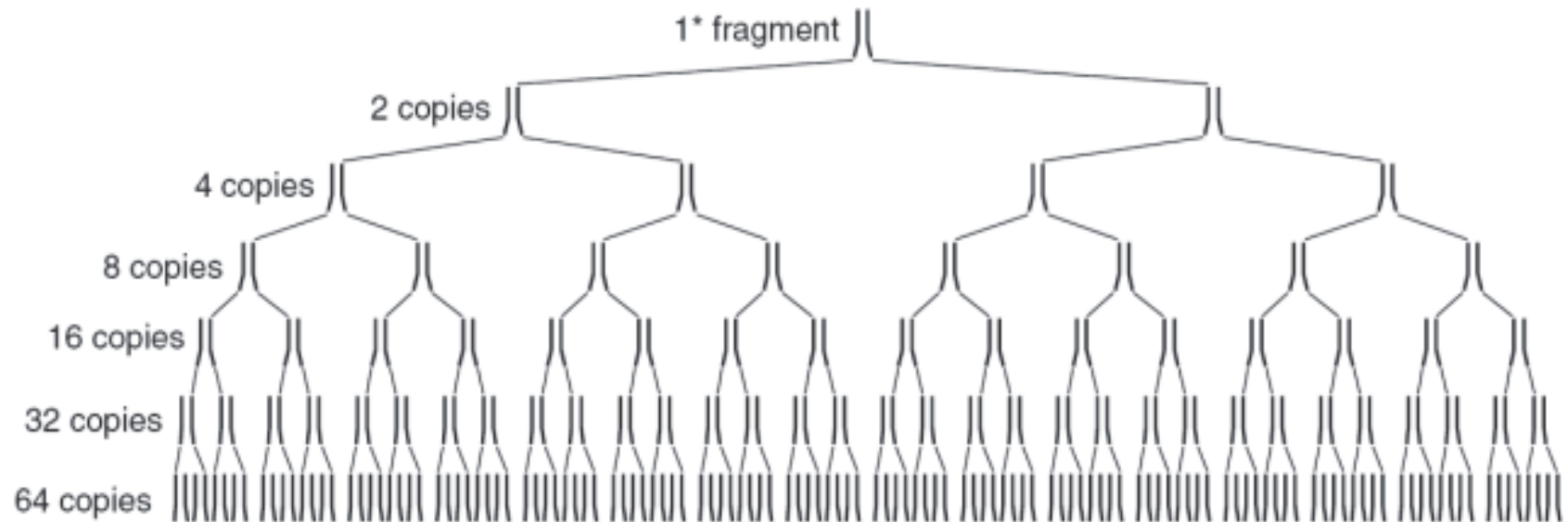


Генная инженерия без клонирования

Полимеразная цепная реакция

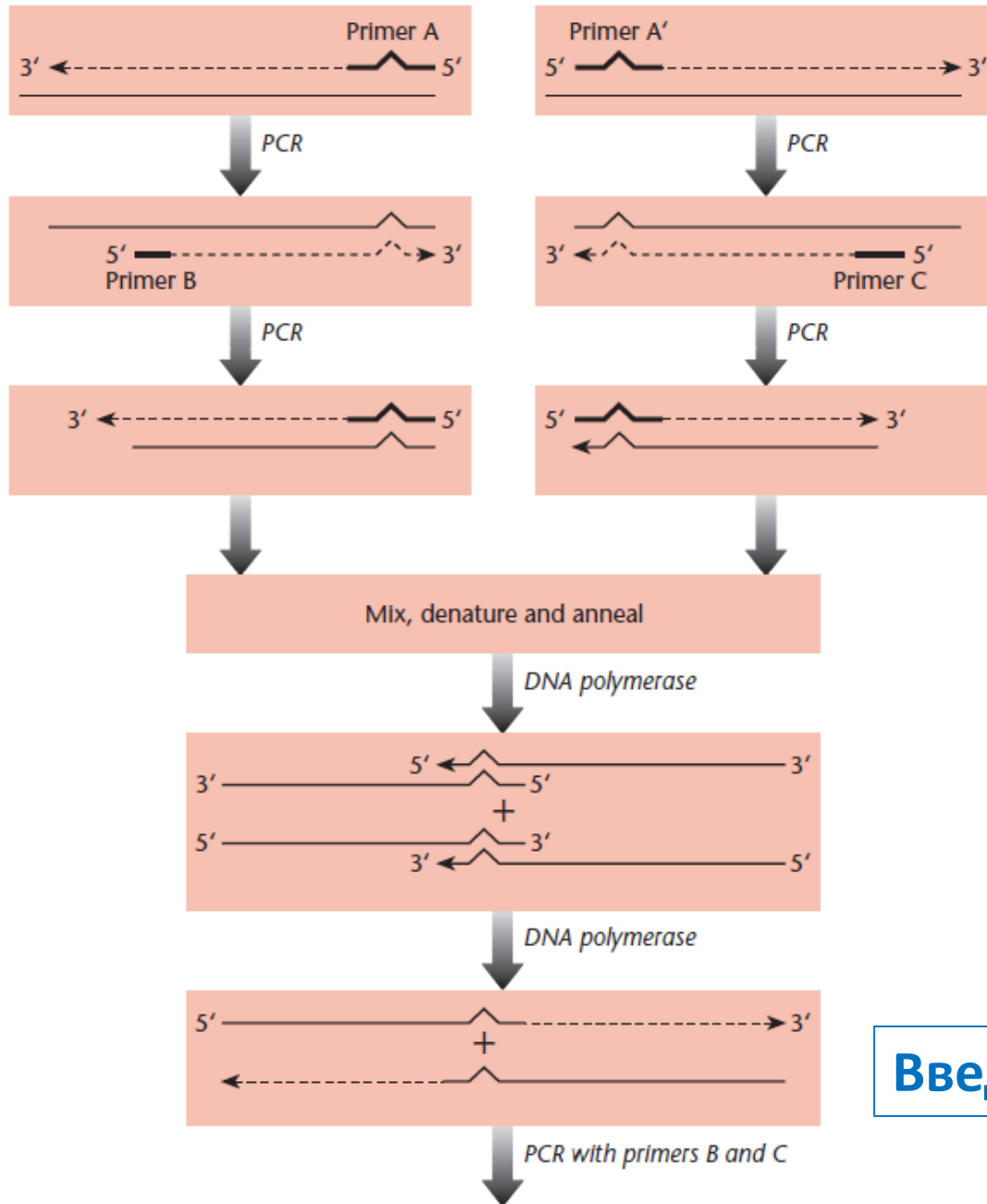


ПЦР как молекулярная копировальная машина («молекулярный ксерокс»)



■ После 6 циклов ПЦР образуется 64 идентичных копии исходного генетического локуса (ампликона)

Направленный мутагенез с использованием ПЦР и перекрывающихся праймеров



Введение точечных мутаций

Кари Б. Муллис (Kary B. Mullis) – изобретатель полимеразной цепной реакции (ПЦР)



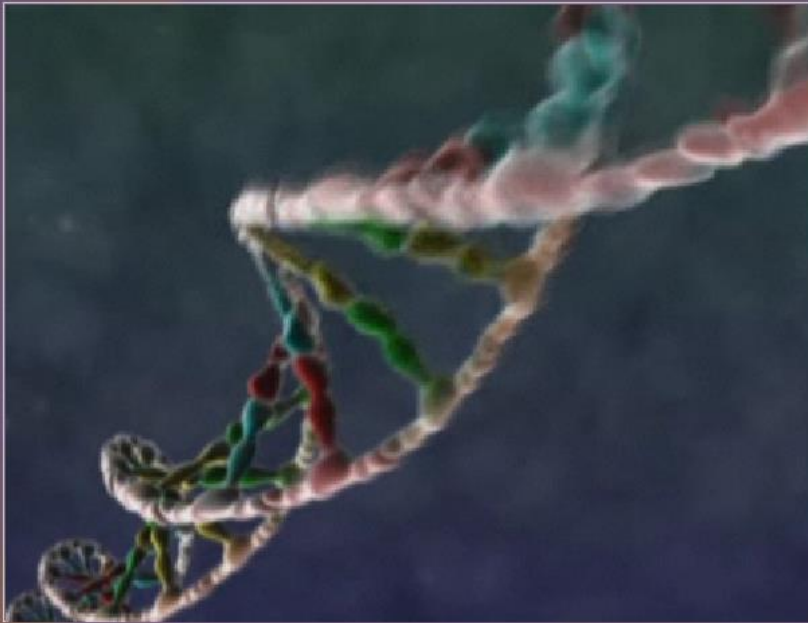
- Американский биохимик 1944 г.р.
- Патент - 1985 г., фирма Cetus Corp. California
- Нобелевская премия по химии – 1993 г.



[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)



[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)



[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)



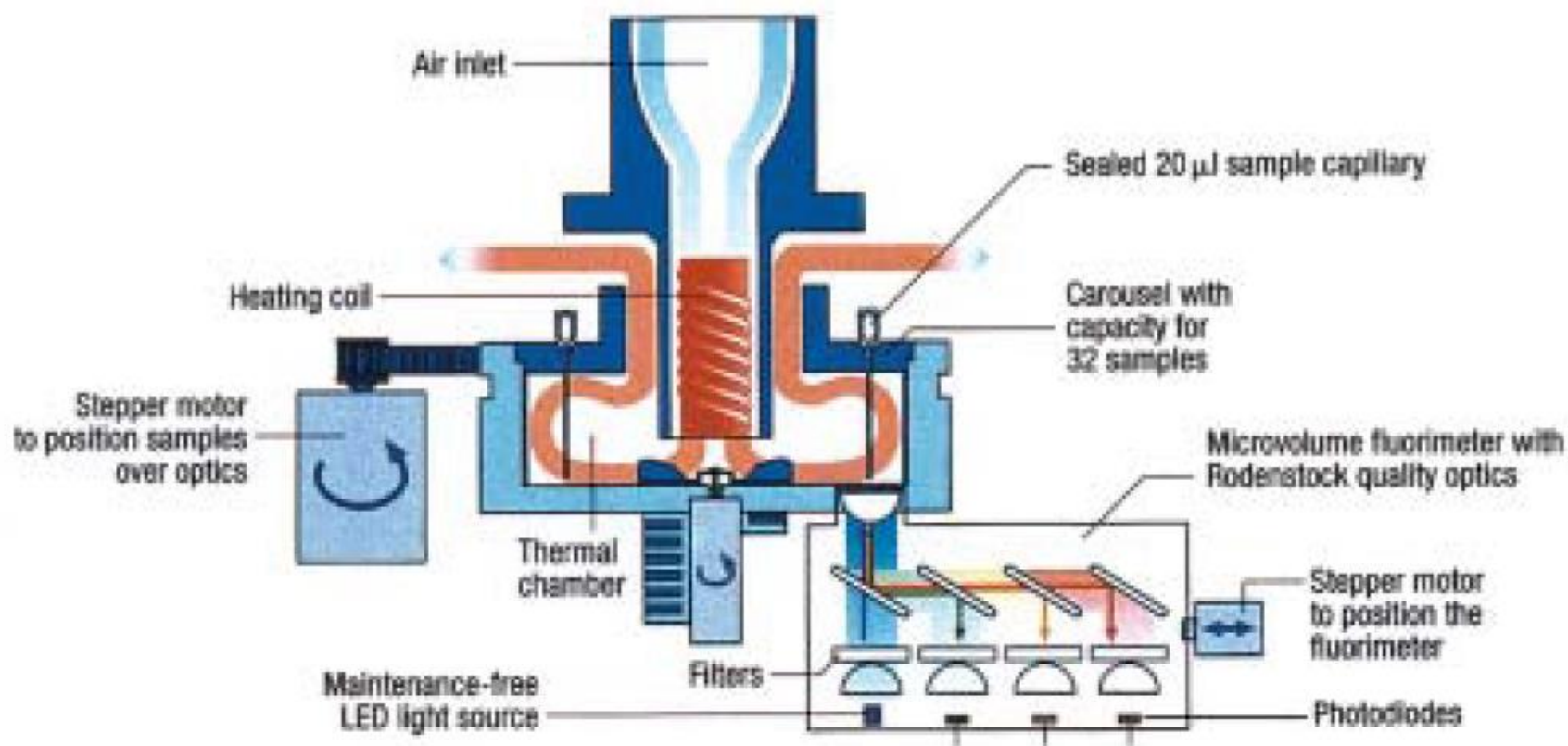
Количественная ПЦР

ПЦР в реальном времени

Real-time PCR

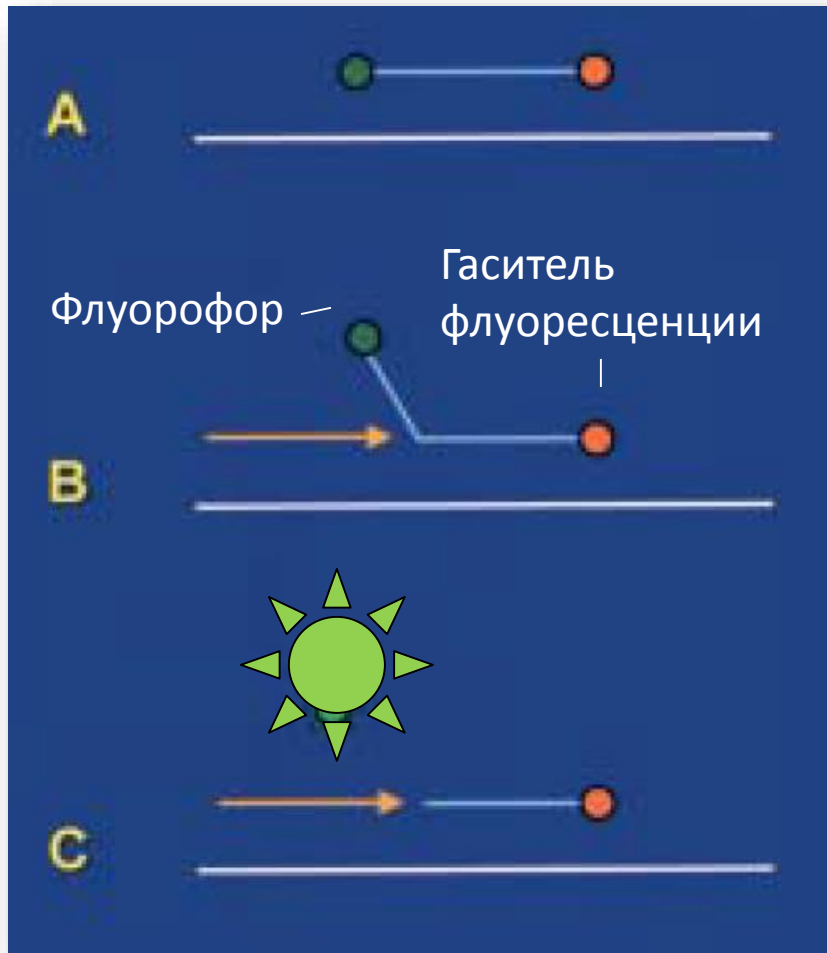
**Позволяет, не открывая пробирки, непрерывно
следить за накоплением продуктов ПЦР в пробах**

Устройство капиллярного амплификатора LightCycler



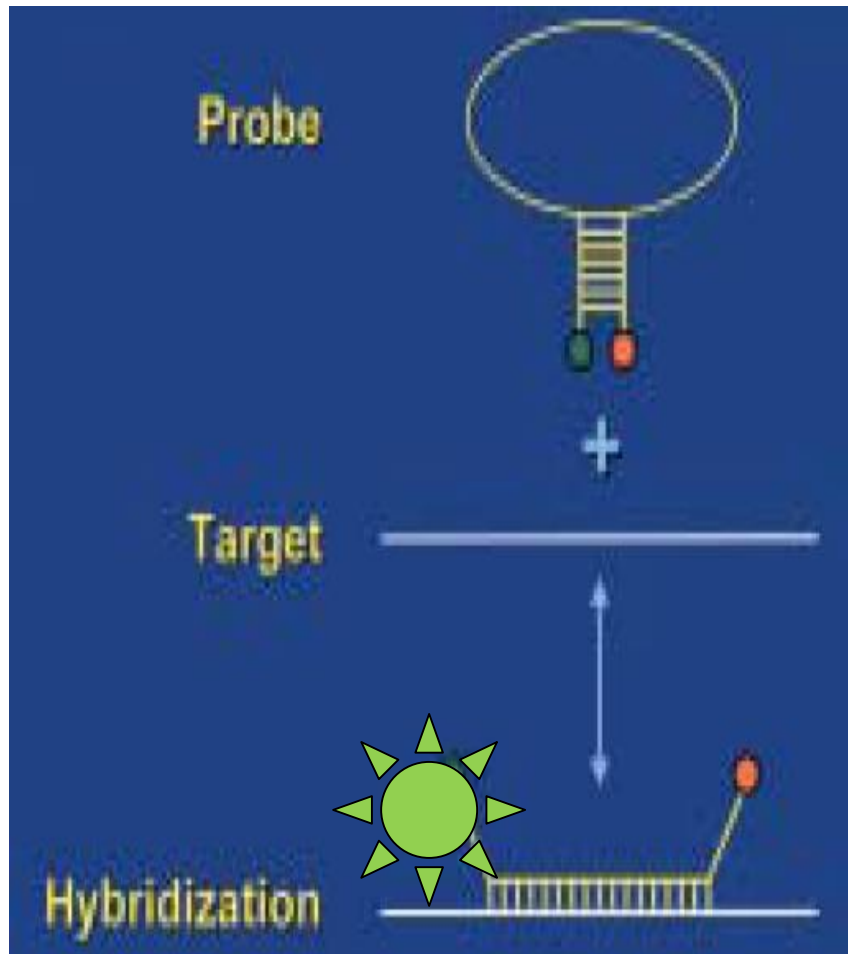
Капилляры объемом 20 мкл обеспечивают высокое соотношение поверхности к объему и высокую скорость теплообмена. 30 циклов завершаются за 20-30 мин

Принцип действия зондов TaqMan



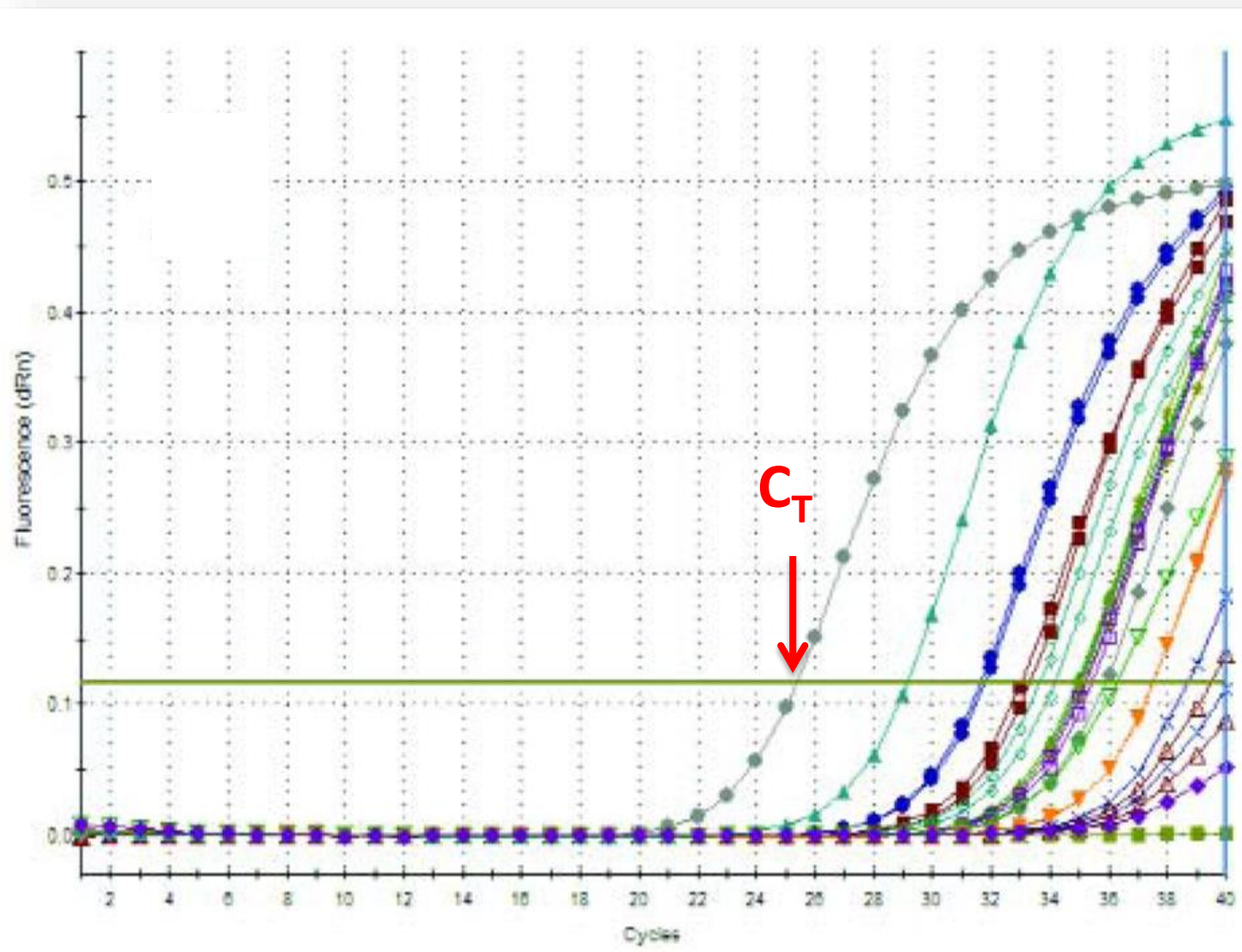
■ 5'→3'-экзонуклеаза
Taq-ДНК-полимеразы
отщепляет
флуоресцентный
краситель, который
начинает
флуоресцировать в
реакционной смеси

Принцип действия зондов – молекулярных маяков (molecular beacon probes)



- В растворе зонды образуют структуру «стебель-петля», что приводит к сближению флуорофора и гасителя флуоресценции

Мониторинг накопления продуктов ПЦР в реальном времени протекания реакции

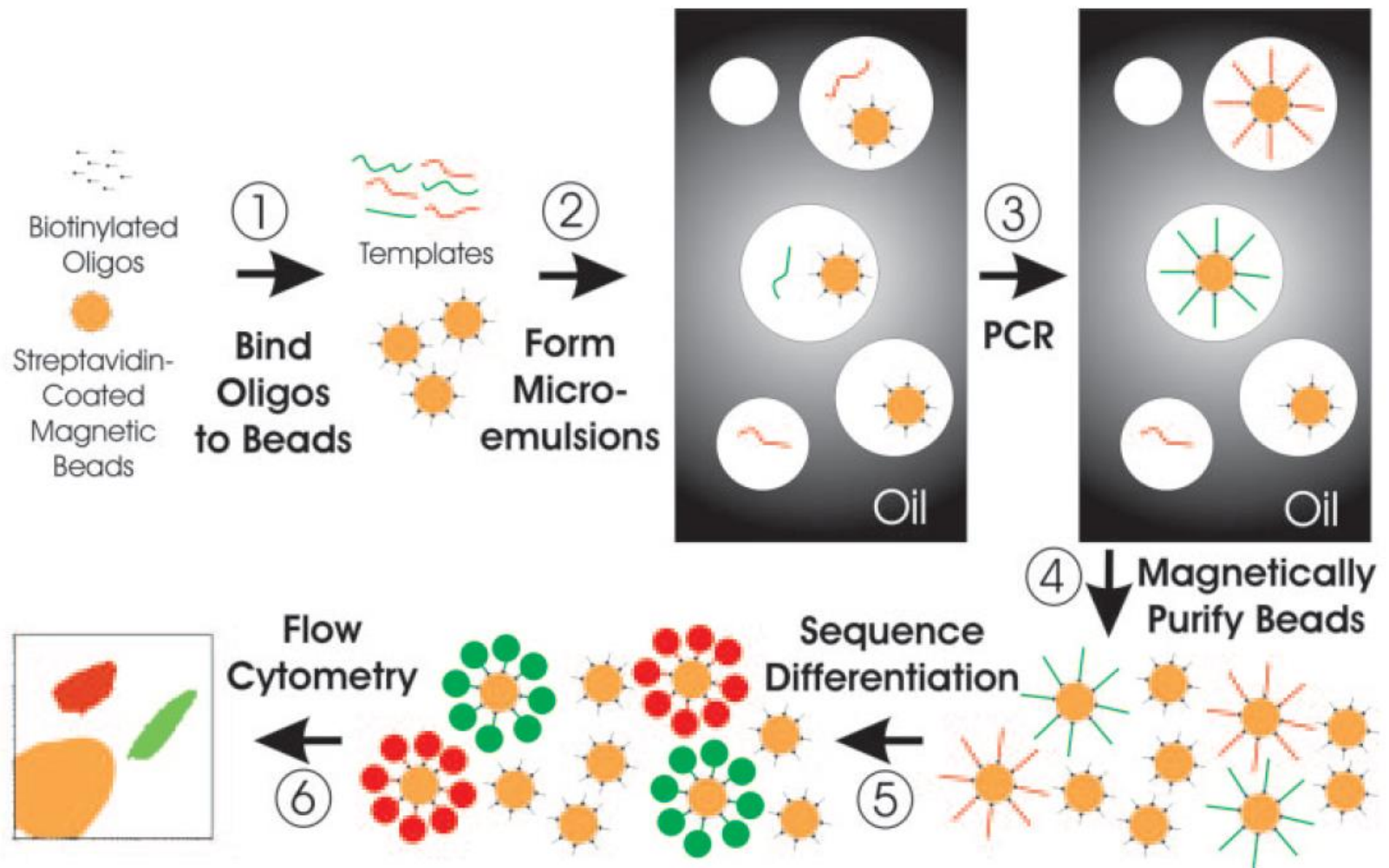


C_T —
пороговый
цикл

Российские производители амплификаторов для проведения ПЦР в реальном времени

- *Институт аналитического приборостроения РАН, С-Петербург совместно с фирмой «Синтол», Москва*
- *Фирма «ДНК-Технология», Москва*
- *Флуоресцентно-меченые зонды – «ДНК-синтез», (ИБХ РАН), фирма «Синтол», Москва*

Цифровая ПЦР (Digital PCR) (на основе эмульсионной ПЦР)



ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА В СВЕТЕ НОВЫХ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

Фредерик Сенгер – духовный и крестный отец автоматических ДНК-секвенаторов первого поколения



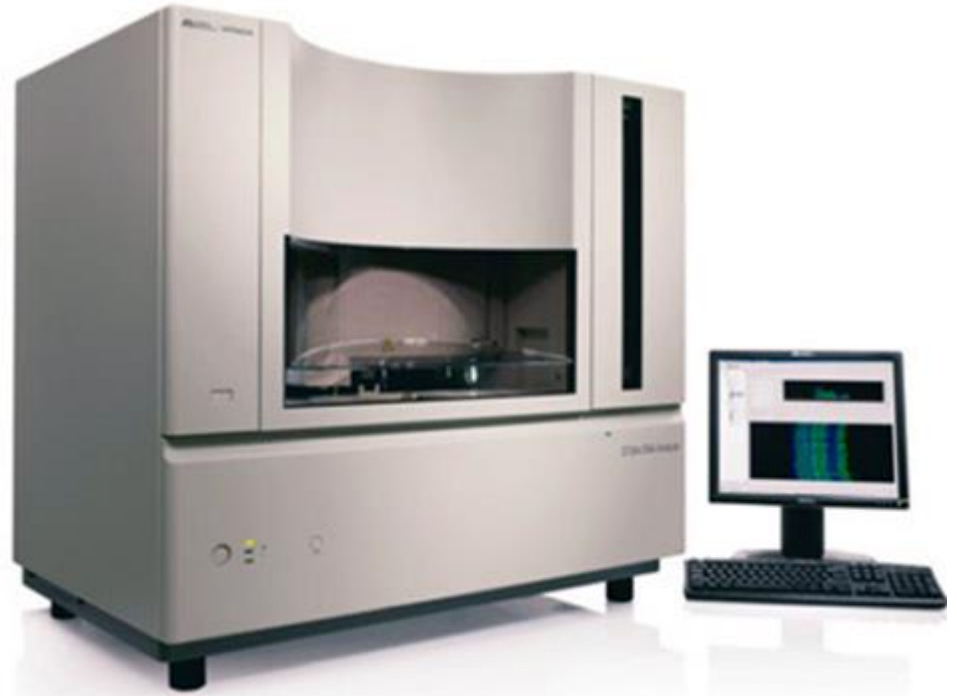
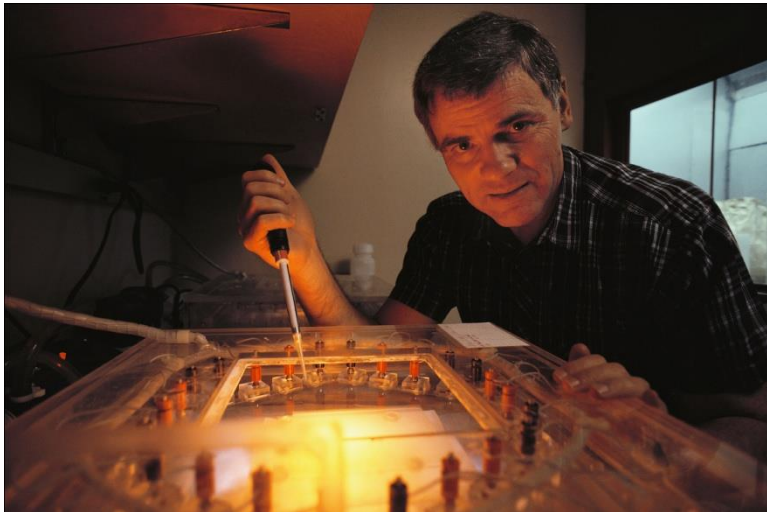
Дважды лауреат Нобелевской премии по химии

1958 г. – первичная структура инсулина

1980 г. – метод секвенирования ДНК

Метод секвенирования ДНК по Сенгеру введен в научную практику в 1977 г.

Лерой Худ (Leroy Hood) – родной отец автоматических ДНК- секвенаторов первого поколения



Современный автоматический ДНК-анализатор ABI 3730 фирмы Applied Biosystems

- 48 капилляров
- Время анализа – 2 часа
- Длина секвенируемого фрагмента ДНК - ~500 п.н.

Секвенирование генома человека – кульминация использования метода Сенгера

Основные участники проекта «Геном человека»:

- **Международный консорциум (1990- 2000 г.г.)**
Университеты и исследовательские центры США, Англии, Японии, Франции, Германии, Китая, Канады и Новой Зеландии
- **Американская частная фирма Celera (1998-2000 г.г.)**

Затраты проекта:

В каждом случае по ~3 миллиарда долларов

Френсис Коллинз (Francis Collins) – координатор международной программы «Геном человека»



В 1993 г сменил Д. Уотсона на посту
Национального центра по
исследованию генома человека

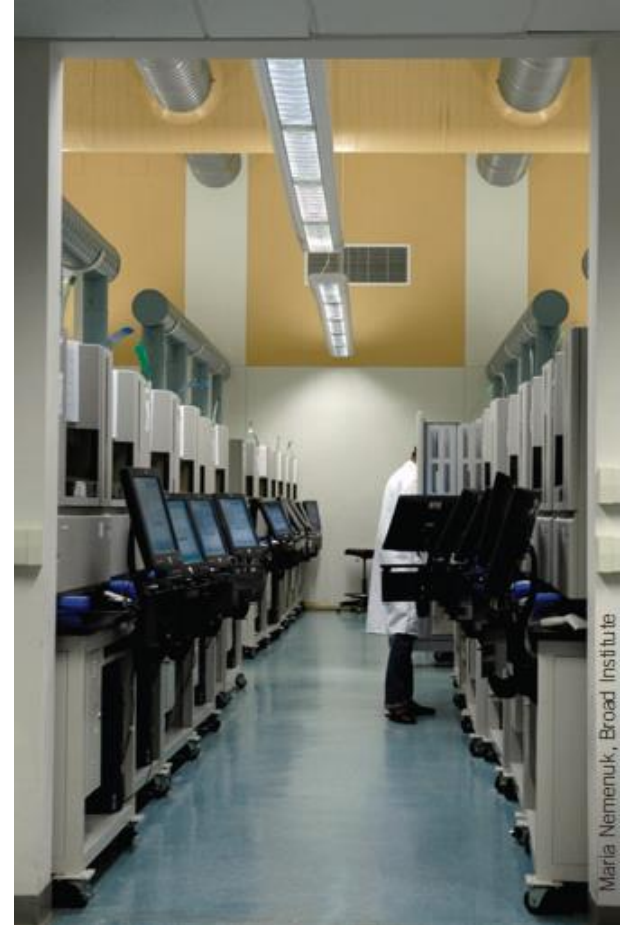
Становится координатором
Международного консорциума по
секвенированию генома человека

В настоящее время директор
Национального института здоровья,
США

Крейг Вентер – основатель фирмы Selera

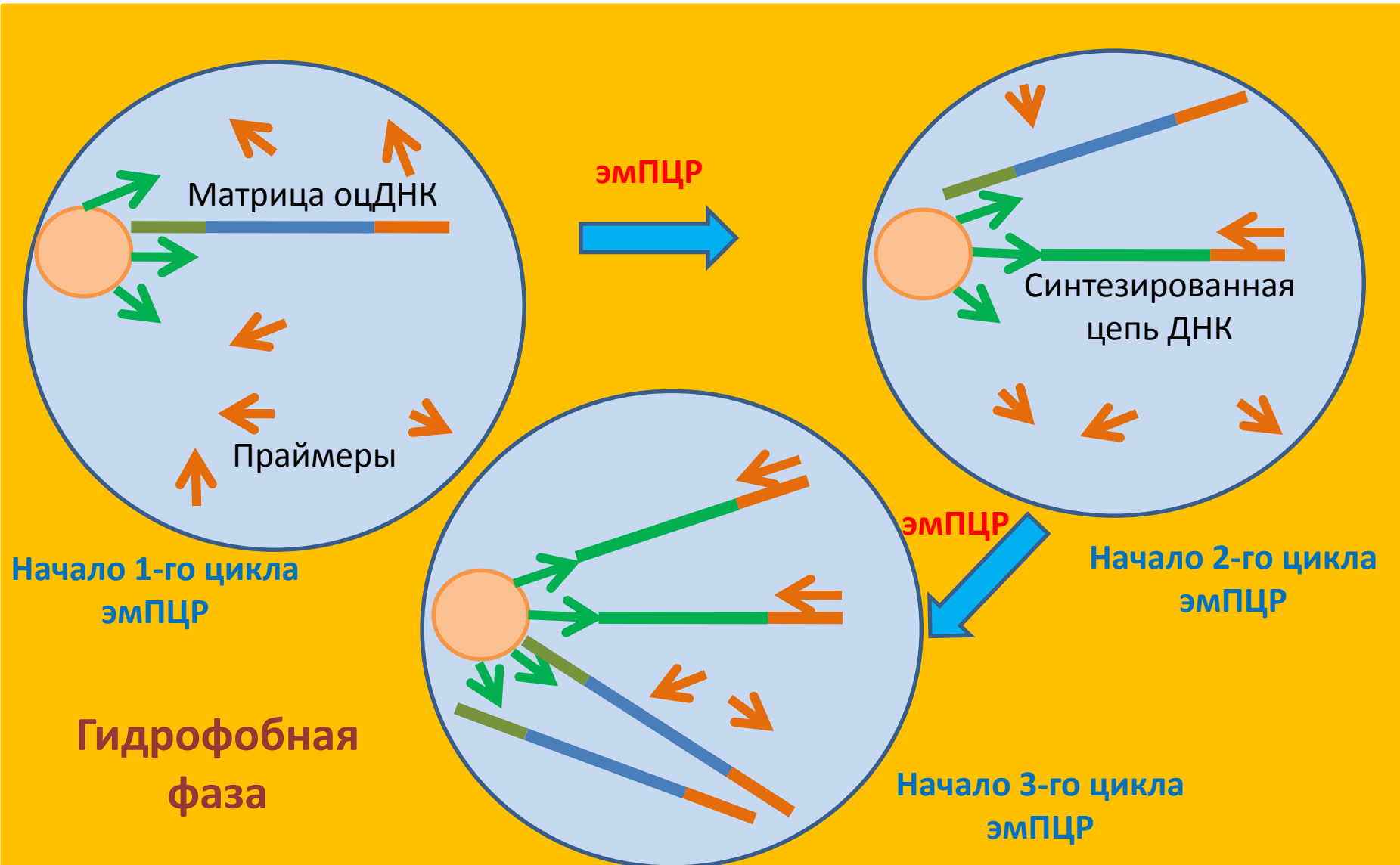


Craig Venter:
«Геном человека – это Я!»



**Цех секвенирования
ДНК методом Сенгера**

Эмульсионная (эм)ПЦР на микрочастицах с иммобилизованным праймером

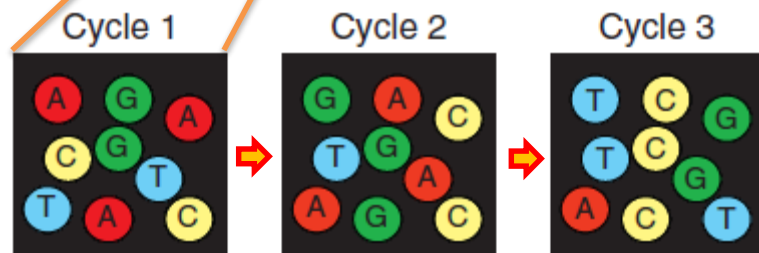
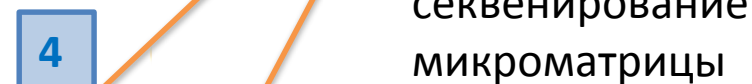
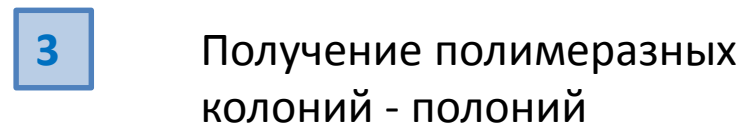


Системы секвенирования ДНК второго поколения



Фрагменты ДНК лигируют с олигонуклеотидными адаптерами, каждый фрагмент одновременно амплифицируют *in vitro* и секвенируют с использованием флуоресцентных красителей

Полонии – полимеразные колонии



What is base 1? What is base 2? What is base 3?

Секвенатор второго поколения фирмы *Illumina*



HiSeq 2500/1500

Производительность – 600 Gb (6×10^{11} bp) за 11 дней;
Макс. длина секвенируемого фрагмента – 2×100 bp;
Секвенирование синтезом, молек. колонии - кластеры на стекле

Цех секвенаторов 2-го поколения в Китае



China's Sequencing Powerhouse Comes of Age

With new sequencing centers in Europe and the United States, BGI hopes its growing clout will help deliver the benefits promised by genomics—and revenue to pay off a mounting debt

Фирма BGI-Shenzhen, ноябрь 2011

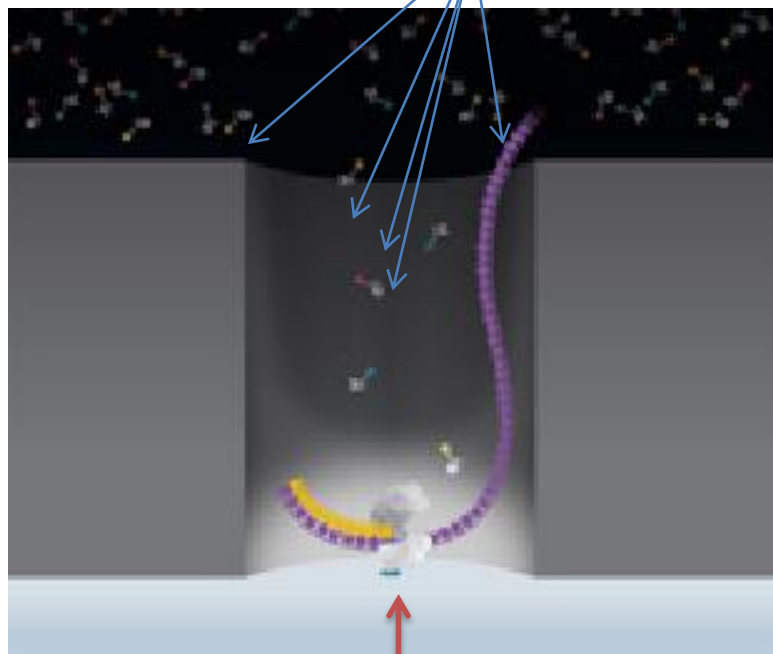
Секвенатор третьего поколения *PacBio RS* фирмы Pacific Biosciences



Система коммерциализирована и активно продается в течение последнего года

Схема синтеза ДНК в ZMW-волноводе

Меченые dNTPs

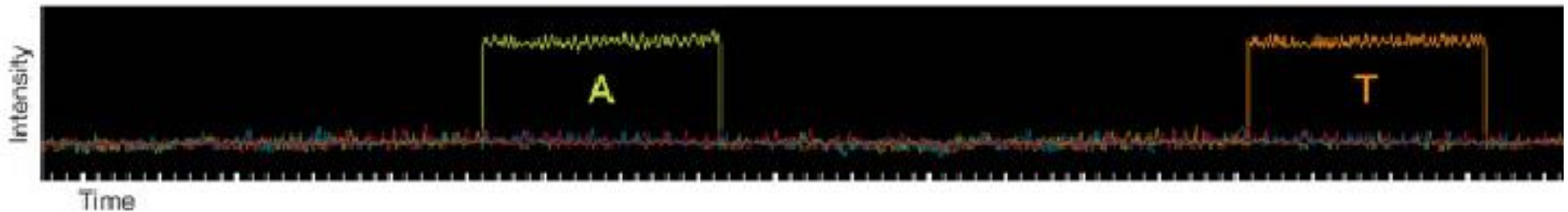


Одна молекула ДНК-полимеразы
иммобилизована на дне каждого
волновода

Включившийся dNTP



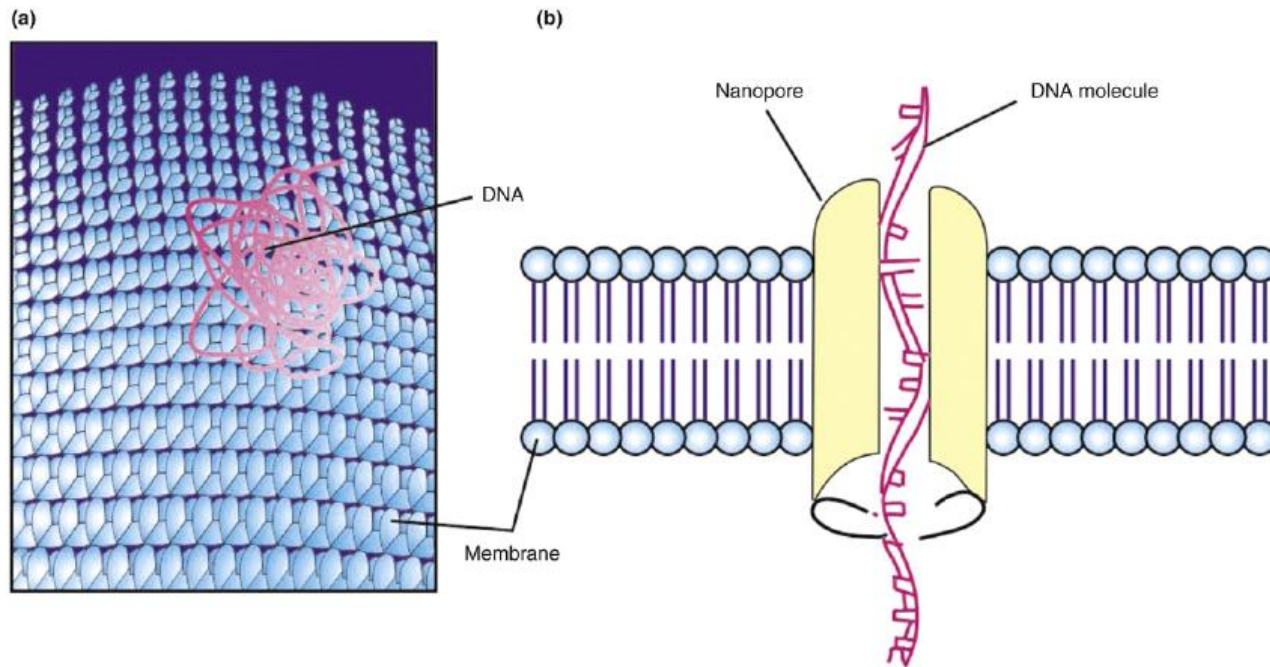
Процесс секвенирования ДНК на SMRT-чипе



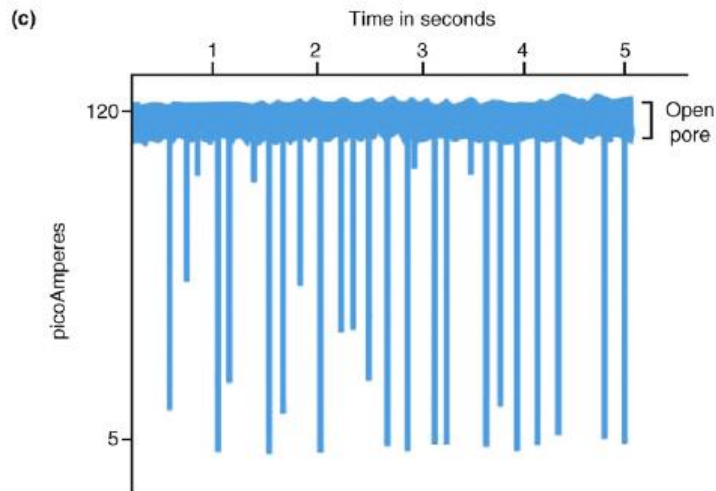
Включающийся в ДНК меченый нуклеотид задерживается в объеме считывания флуоресценции в течение миллисекунд, свободно диффундирующий нуклеотид – в течение наносекунд.

Включение обнаруживается в виде вспышки света определенной длины волны, характерной для конкретного нуклеотида..

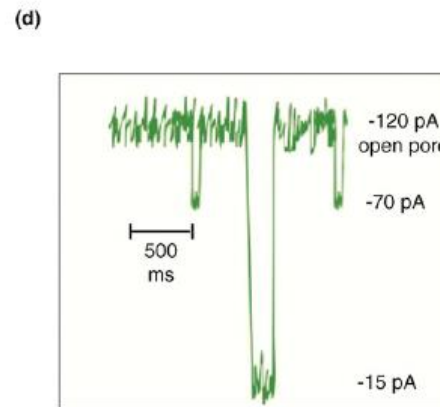
Секвенирование через нанопоры



Часть мембраны с нанопорой, через которую проходит одноцепочечная ДНК



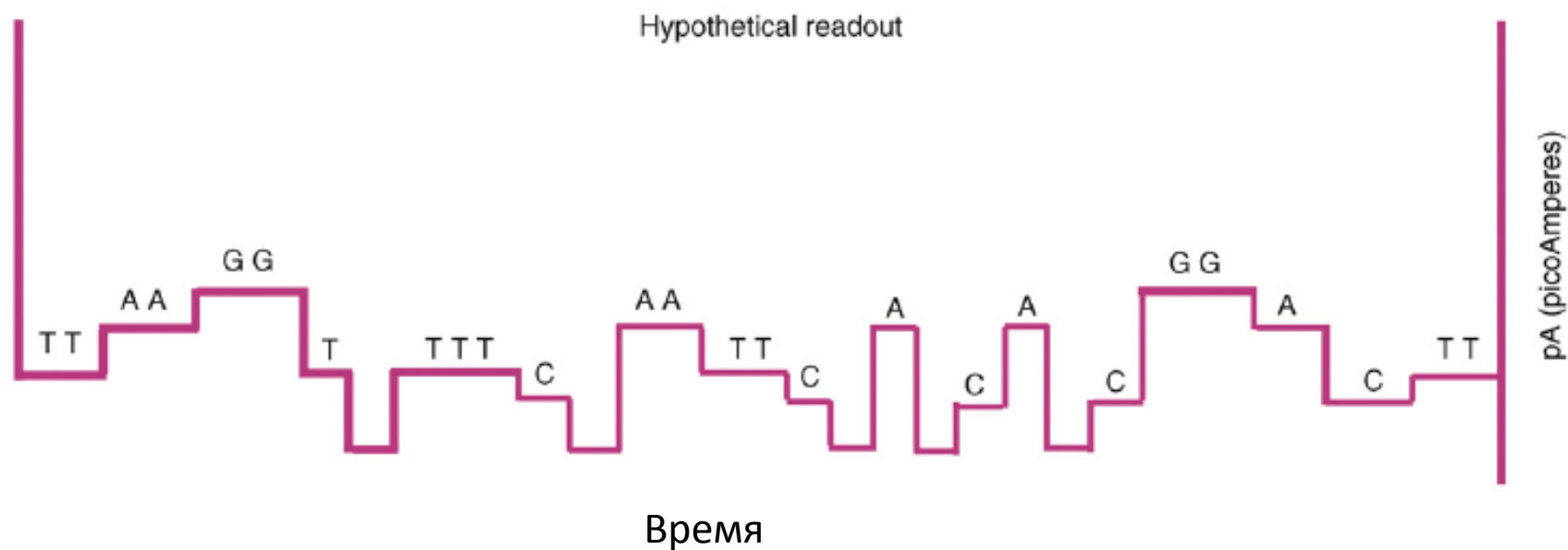
Уникальная последовательность



Гомополимер

Изменения силы тока, проходящего через мембрану, под действием отдельных нуклеотидов ДНК

Профиль изменений силы электрического тока во времени при секвенировании через нанопоры



Секвенатор третьего поколения фирмы Oxford Nanopore Technologies (2012 г)



Производительность 1 млрд нуклеотидов
за 6 часов

Десятки тысяч нуклеотидов/1 прогон

Компьютер – ноутбук с USB-разъемом

Стоимость ~\$900



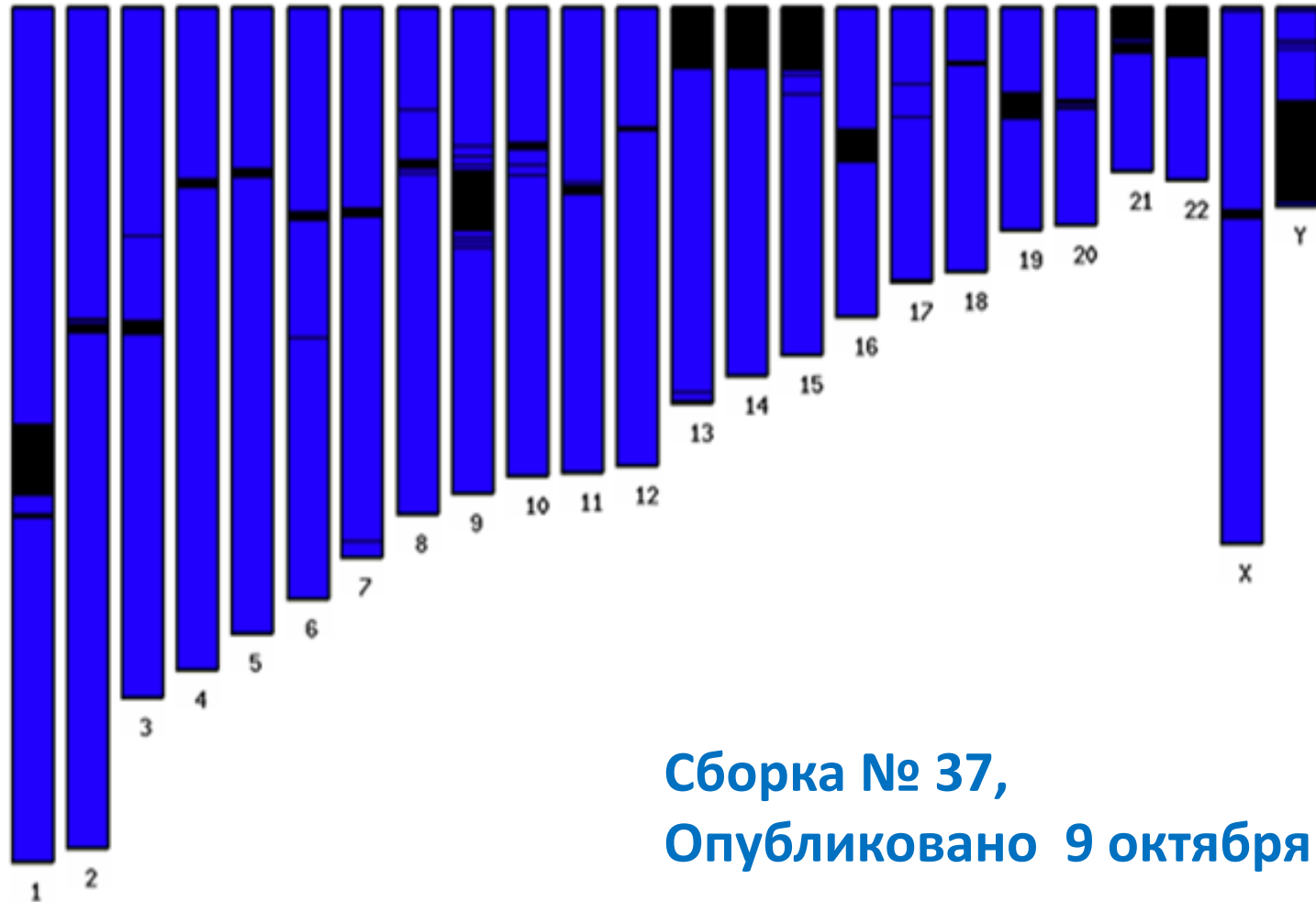
Дэвид Димер (David Deamer) -

Предложил принцип метода
секвенирования через нанопоры в
1989 году

THE SEQUENCE EXPLOSION



Современное состояние эталонной последовательности генома человека

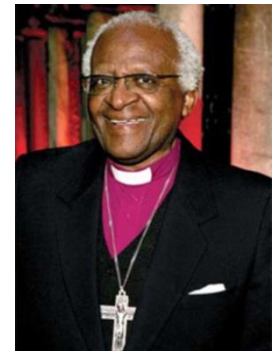
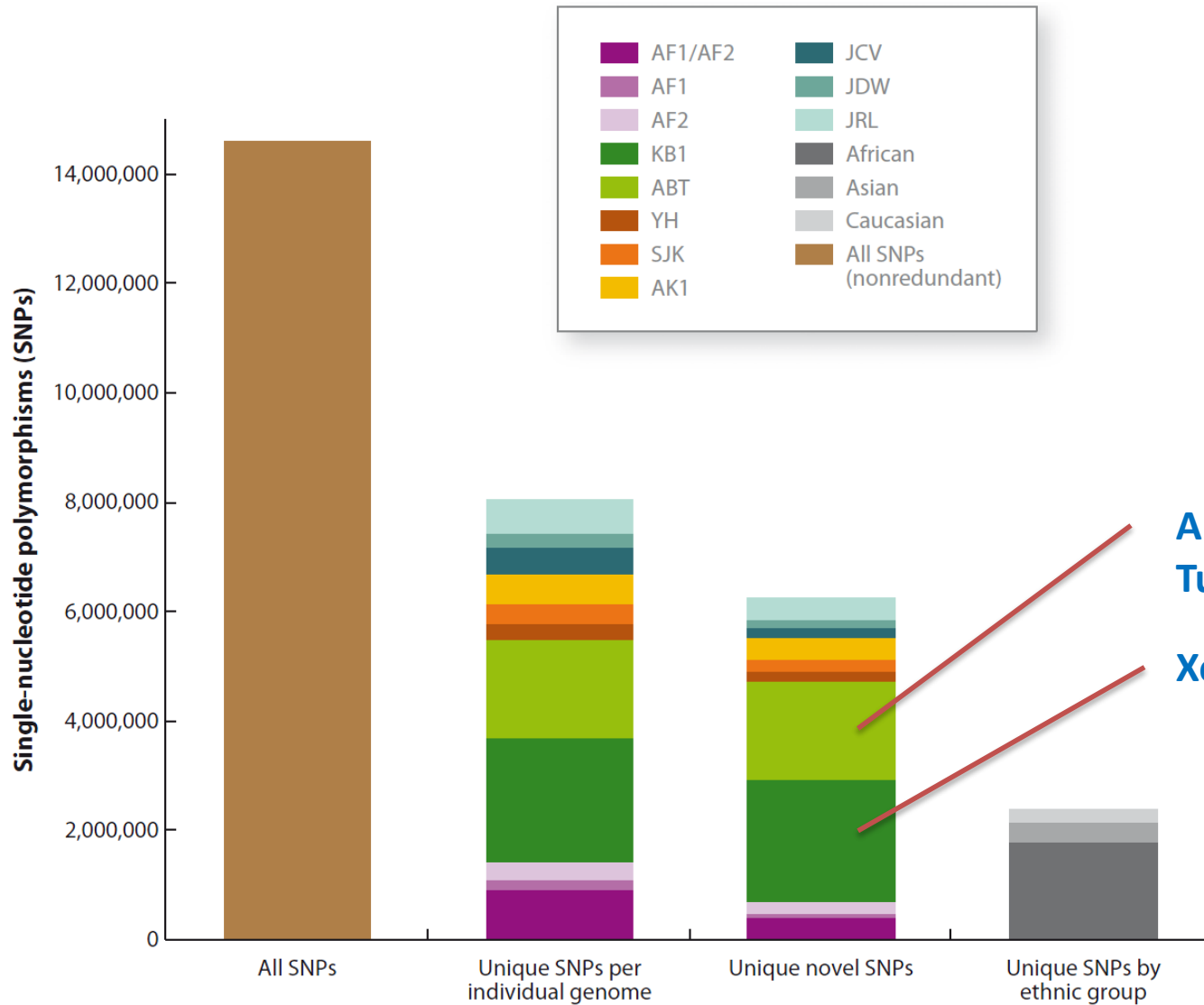


Сборка № 37,
Опубликовано 9 октября 2009 г.

Международный проект «1000 геномов»

- ❖ Цель – оценка генетического разнообразия в популяциях человека и построение общедоступного исчерпывающего каталога генетических различий
- ❖ Основные участники: США, Китай, Великобритания
- ❖ Начало: январь 2008, завершение пилотной фазы – 2010. В завершающей фазе секвенирование 2500 дополнительных персональных геномов (перекрывание 4x). Идентификация всех вариантов с частотой $\geq 0.1\%$.
- ❖ Структура исследований в пилотной фазе:
 - 1) Секвенирование с низким перекрыванием (2-4x) геномов **179 индивидуумов** из трех популяций. Цель: выявление всех вариантов с частотой $\geq 1\%$. Обнаружено 14 089 000 SNP и 1 033 000 indels (соответственно 54 и 57% - новые)
 - 2) Глубокое секвенирование (перекрывание $\sim 40x$) **двух трио (отец, мать, ребенок)** из популяций кавказоидов и Yoruban (Западная Африка). Частота спонтанных мутаций – 10^{-8} /основание/поколение.
 - 3) Глубокое секвенирование **8140 экзонов у 697 индивидуумов**. Цель – выявление «нормальных» вариантов в кодирующих последовательностях. Выявлено 12 758 SNP и только 96 indels. 70% SNP – новые.

Сравнение SNP десяти персональных геномов



Архиепископ Desmond Tutu, ЮАР

Хойсан (Khoisan), ЮАР

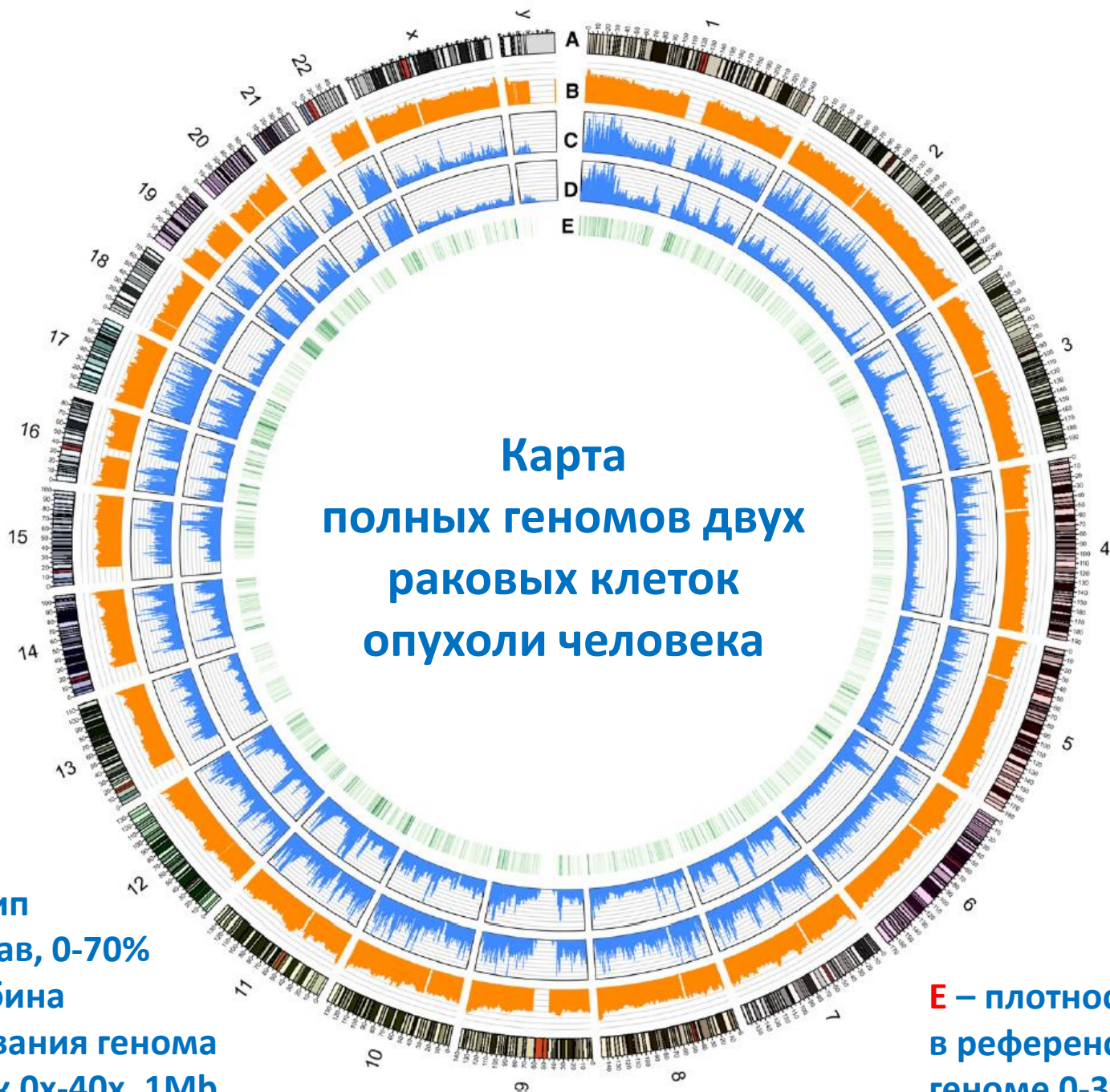


Геном каждого человека уникален

- ❖ ~3 500 000 SNP и ~1000 больших (>500 bp) CNV отличают геном каждого человека от референсной последовательности
- ❖ Каждый персональный геном содержит 400 000-500 000 новых SNP, отсутствующих в dbSNP и ~.
- ❖ В среднем каждый геном содержит 20 000-25 000 вариантов кодирующих частей генов. Из них 9 000-11 000 – несинонимические замены
- ❖ Геном «нормального здорового» индивидуума содержит 40-100 вредных вариантов генов в гетерозиготном состоянии. Это число будет возрастать. У них обнаружены также вредные гомозиготные или гемизиготные мутации.

Пангеном человека

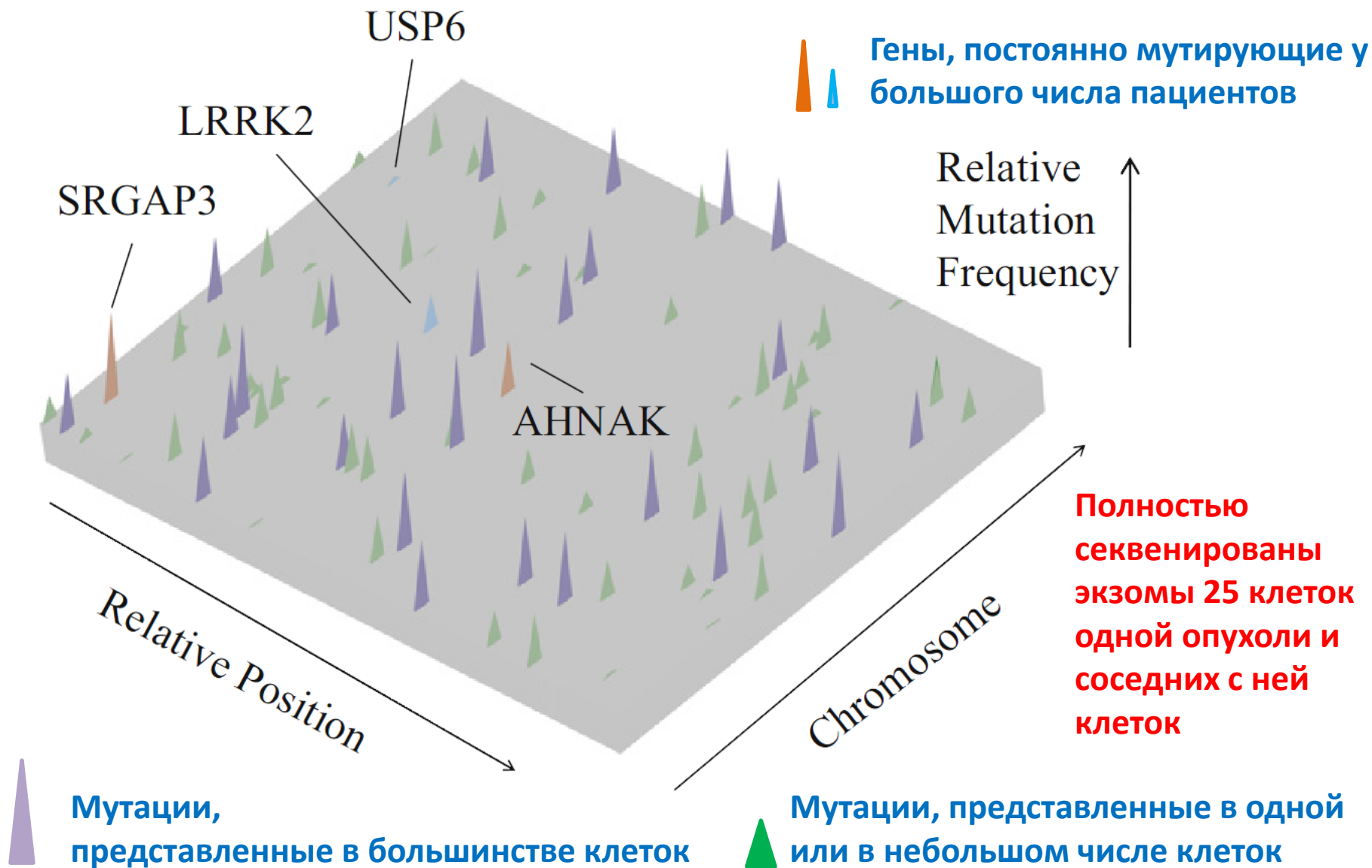
- ❖ Каждый секвенированный геном человека содержит миллионы пар нуклеотидов некартированных последовательностей, отсутствующих в референсном или любом другом исследованном геноме.
- ❖ Среди них есть повторы, регуляторные последовательности и гены.
- ❖ По количеству нуклеотидов две гомологичных хромосомы из персональных геномов совпадают на 99,5% (ранее считалось, что сходство составляет 99,99%)



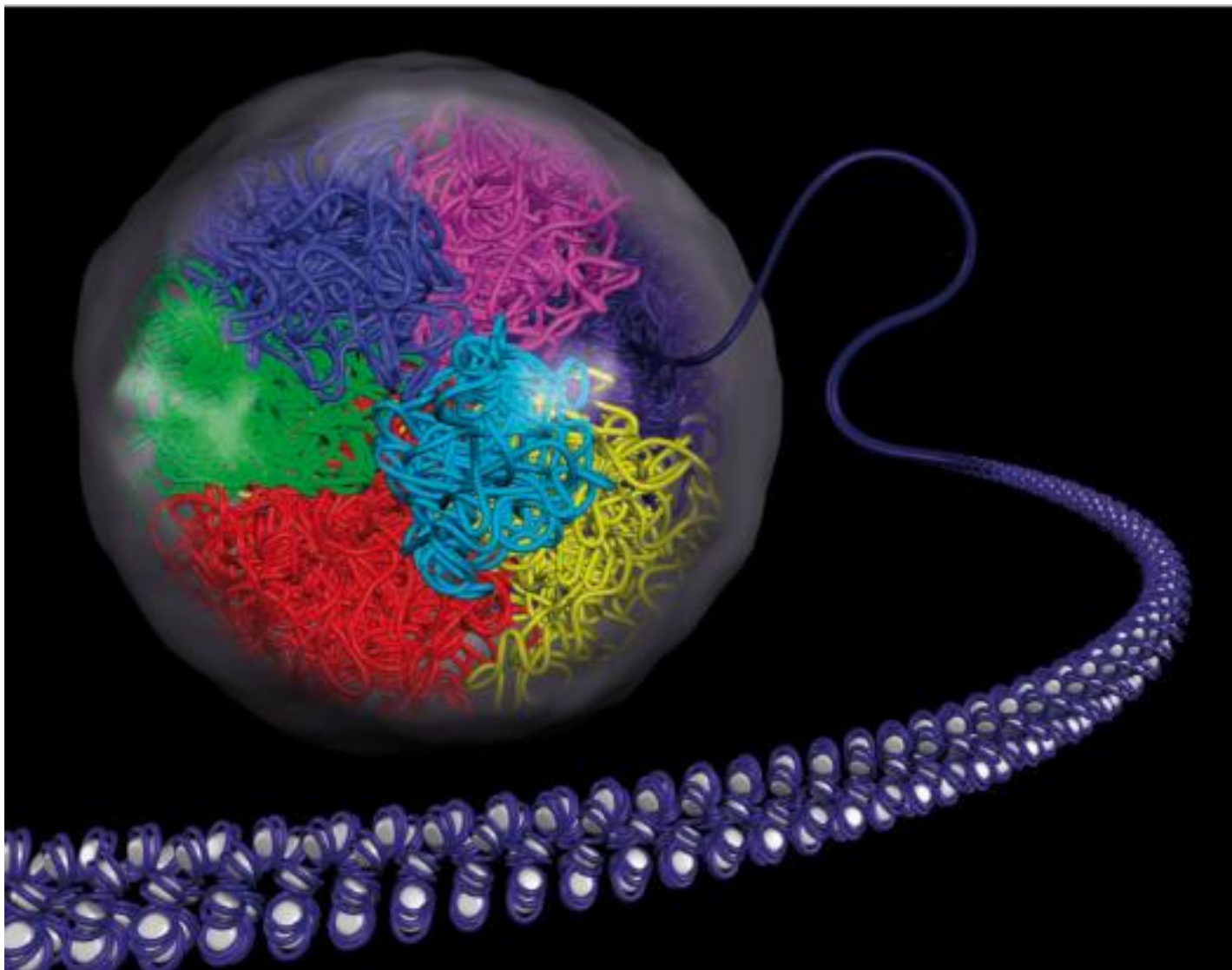
А – кариотип
В – GC-состав, 0-70%
С и **Д** – глубина
секвенирования генома
двух клеток 0х-40х, 1Mb

Е – плотность генов
в референсном
геноме 0-30/100 kb

Внутриопухолевый ландшафт генных мутаций у одного пациента с карциномой почек



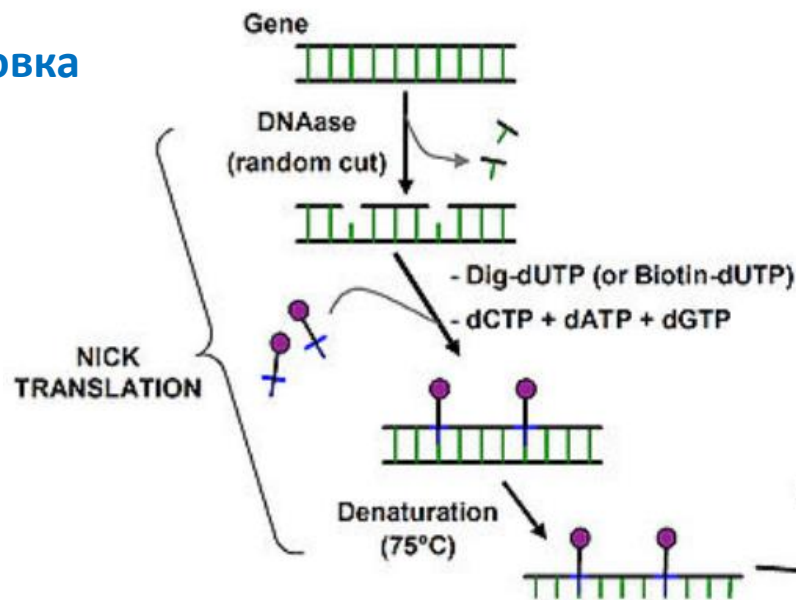
Анализ геномов и экспрессии генов на уровне транскрипции



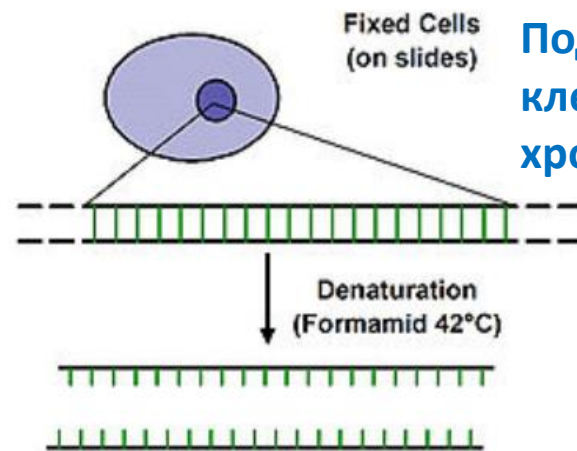
Флуоресцентная гибридизация in situ

FISH – Fluorescent In Situ Hybridization

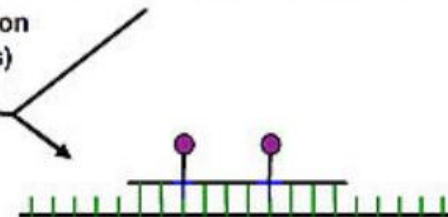
Подготовка зонда



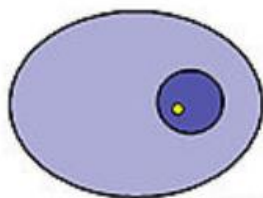
Подготовка клеток или хромосом



Hybridization (on slides)



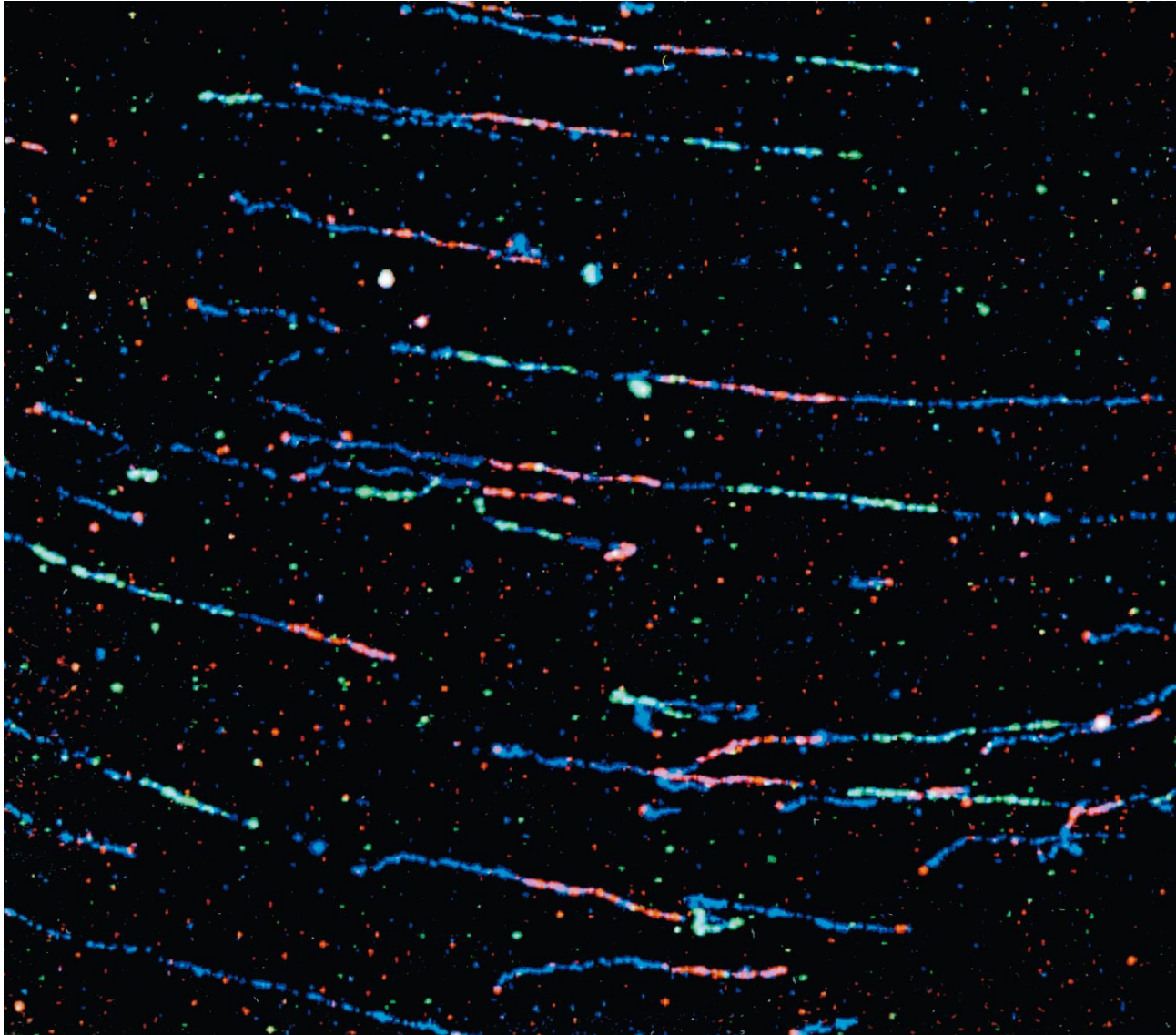
Antibodies anti-Dig (or Avidin) linked with a fluorophor



Epifluorescent Microscopy
→ The gene is located



Физическое картирование YAC-ДНК с помощью FISH



FISH –
флуоресцентная
гибридизация in situ

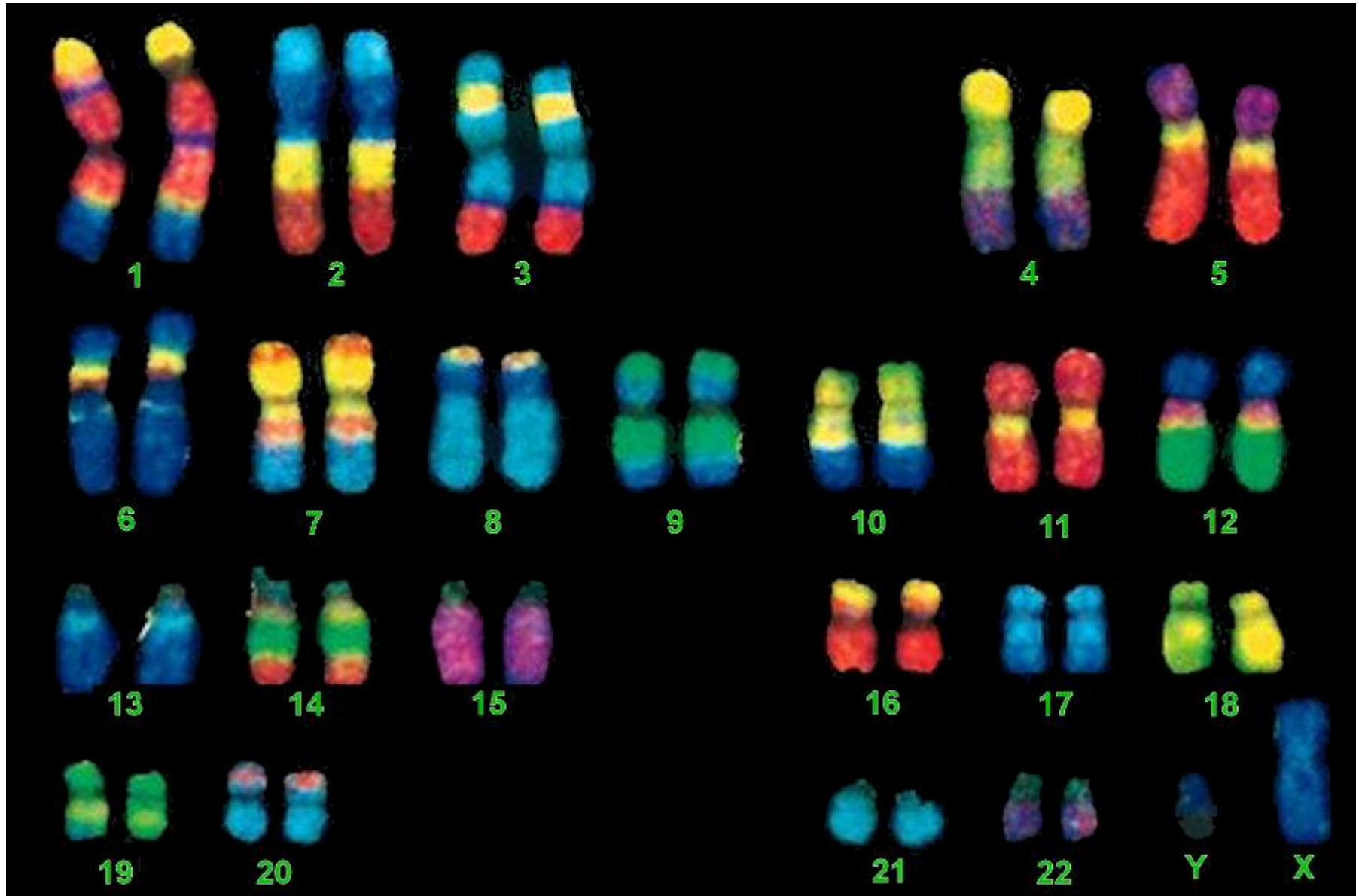
Голубой цвет -
индивидуальные
цепи YAC-ДНК

Красный и **зеленый** –
меченые
полинуклеотидные
зонды

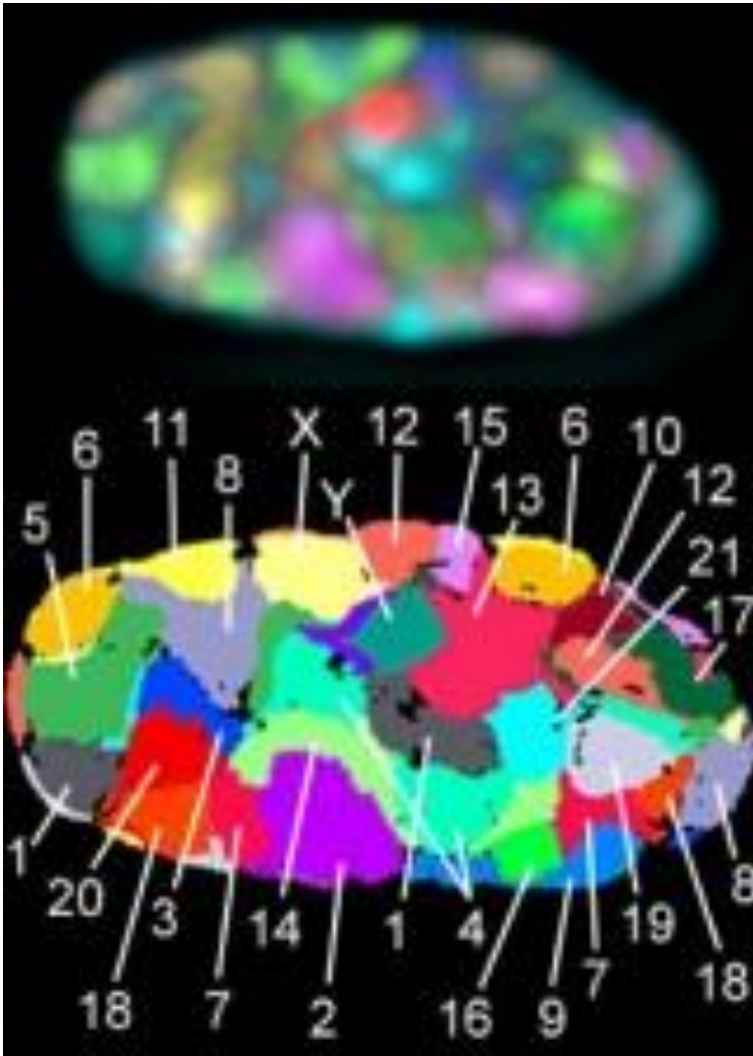
Разрешение метода –
от 3 до 5 т.п.н.

Флуоресцентная
микроскопия

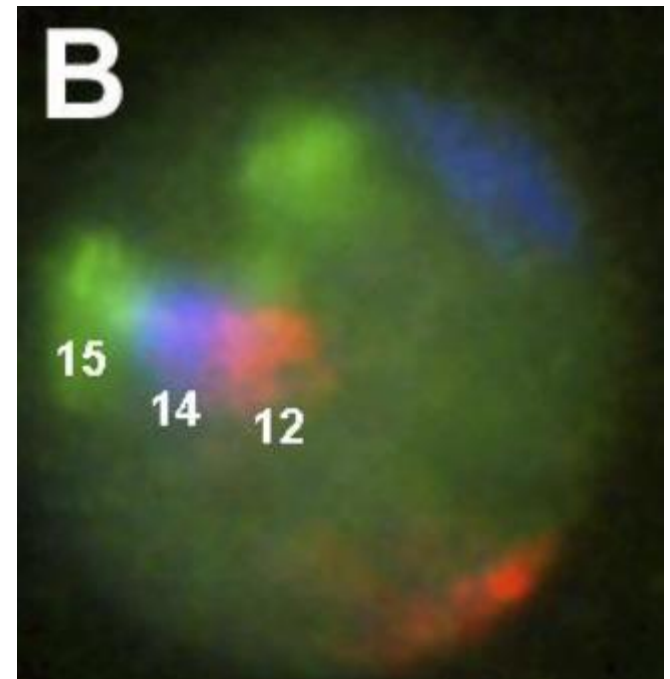
Идентификация всех хромосом человека методом FISH (Chromosome Painting)



Хромосомные территории в интерфазных ядрах (многоцветная FISH)



Хромосомы в интерфазном ядре фибробластов человека



Хромосомы 12, 14 и 15 в интерфазном ядре лимфоцитов мыши

Три группы современных методов определения профилей глобальной экспрессии генов Global Gene Expression Profiling (GGEP)

Использование гель-электрофореза:

дифференциальный дисплей

Использование секвенирования ДНК:

серийный анализ экспрессии генов, **NGS кДНК**

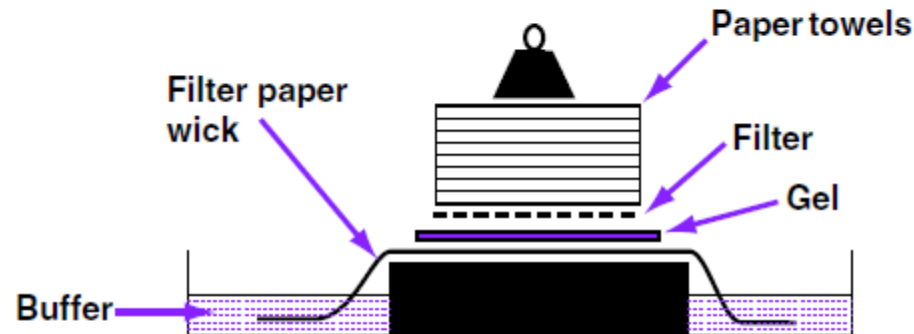
Использование гибридизации:

биочиповые технологии

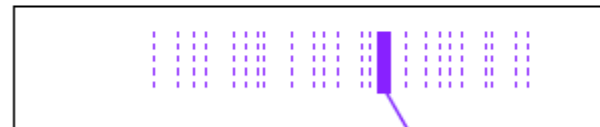
Гибридизация по Саузерну



Гель



Перенос
фрагментов
ДНК



Positive band

Результат
авторадио-
графии

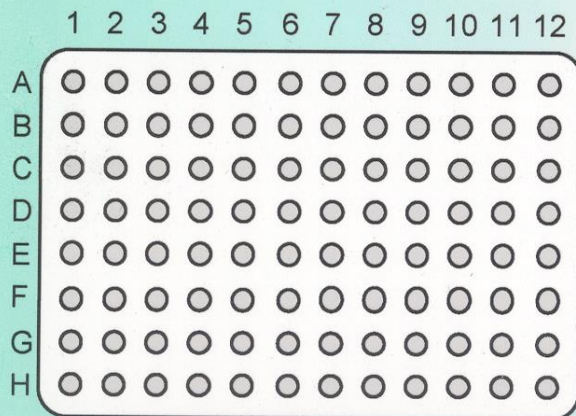
Edwin M. Southern (1938)

Схема переноса фрагментов НК на мембрану
Southern , 1975-1979

Обратный Северный блоттинг/Саузерн

Angeordnete Klone (Array) aus der Subtraktion.

Träger: Nylon Membran



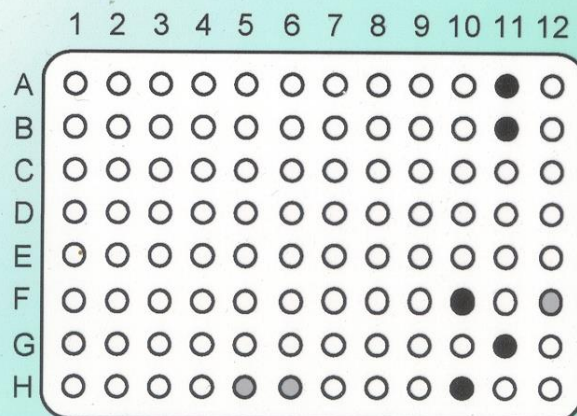
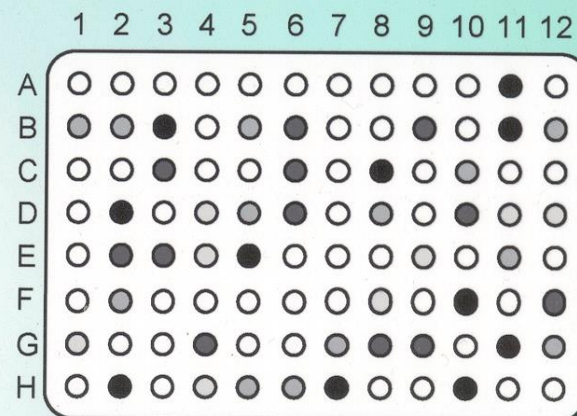
Reverse Northern / Southern:
 Fixierte (klonierte) Target
 RNA/DNA bekannter Sequenz.
 Die Sonde ist ein komplexes
 Nukleinsäuregemisch.
 (Inverser Ansatz)

Tester population*

Hybridisierung
 Exposition

Driver population*

* Driver und Tester sind
 markiert (= Sonde) /
 komplexe Gemische von
 Nukleinsäure



Клоны отдельных кДНК, уникальных для тестерной популяции мРНК, иммобилизовали на фильтре и гибридизовали с мечеными мРНК тестерной или драйверной популяций

Биочип с иммобилизованными кДНК

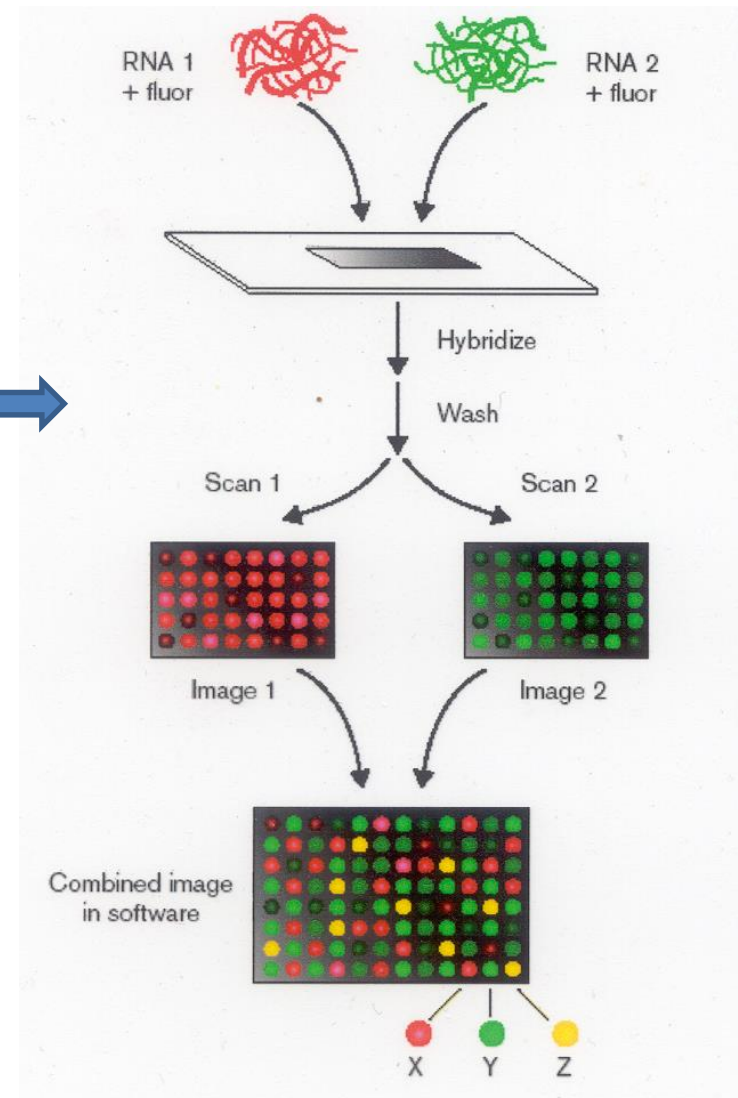
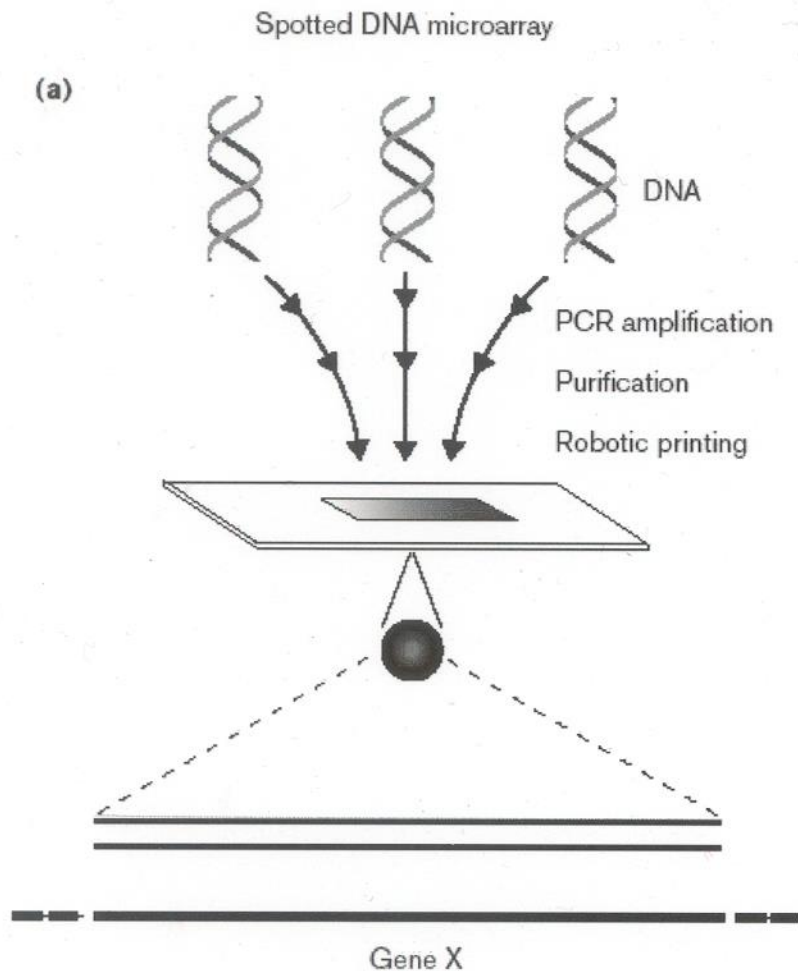
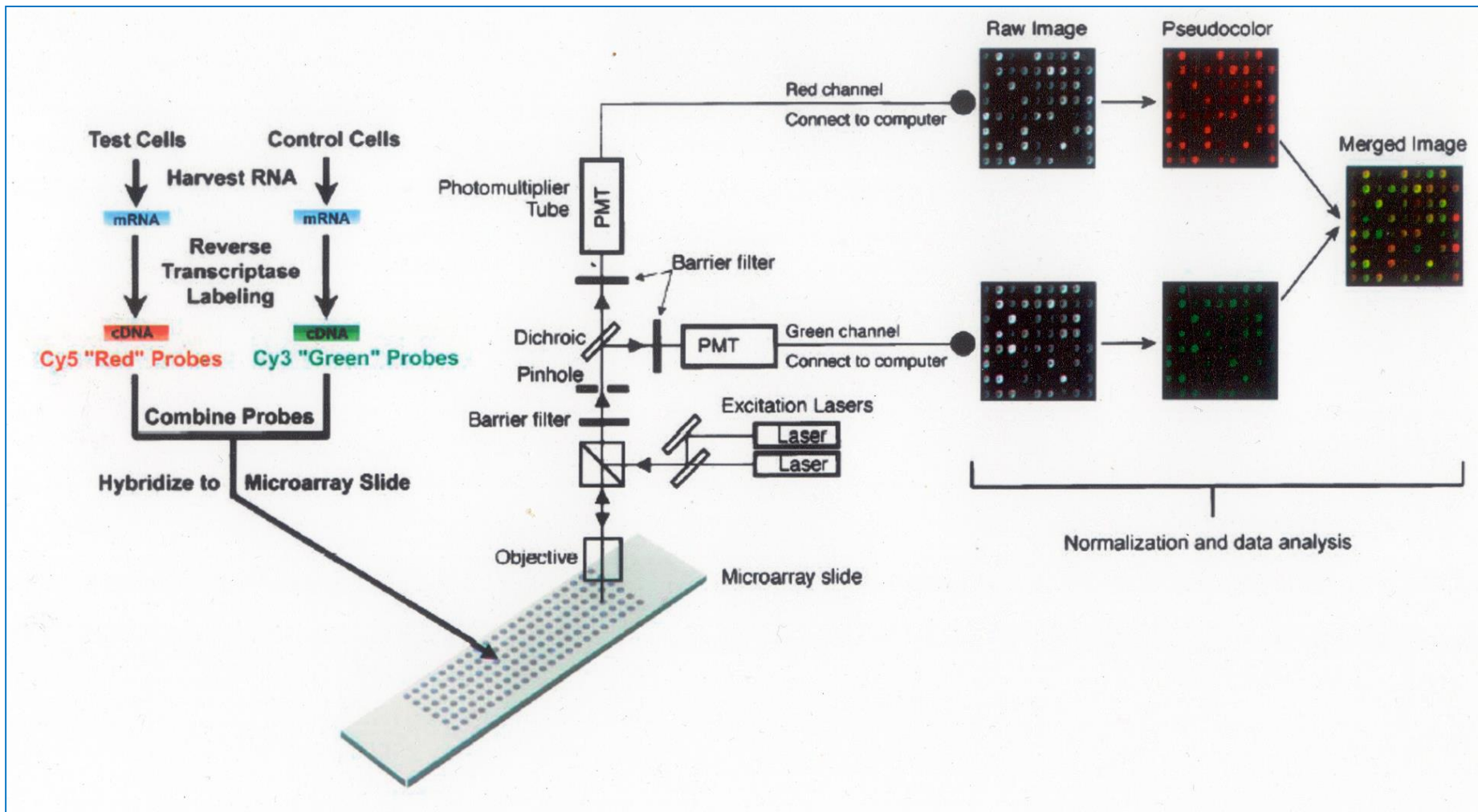
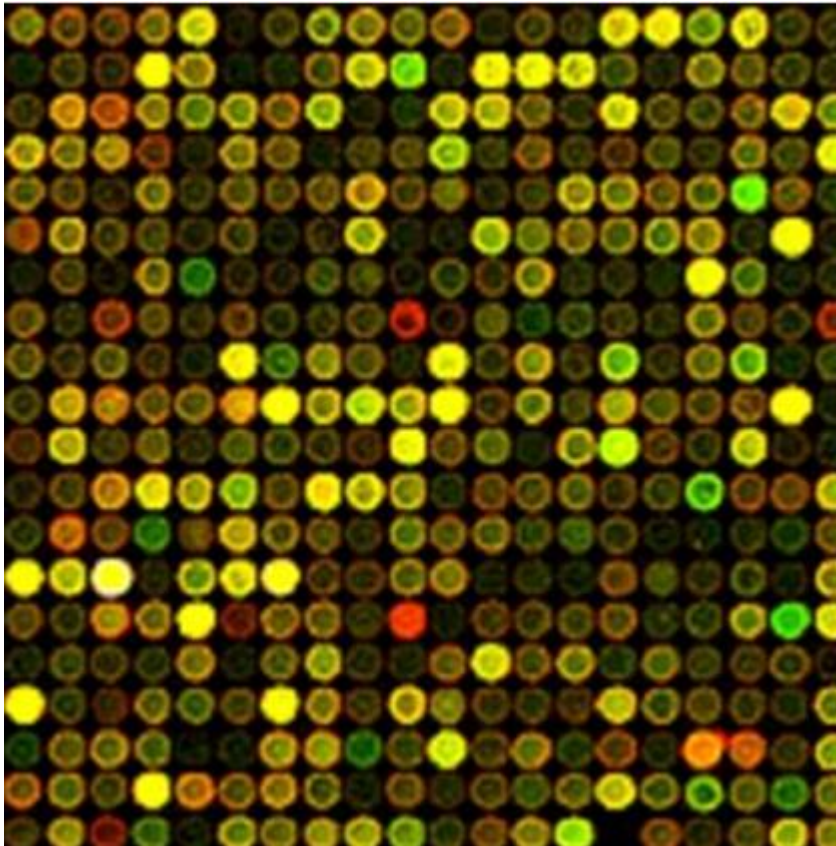


Схема сканирования ДНК-биочипа считывающим устройством

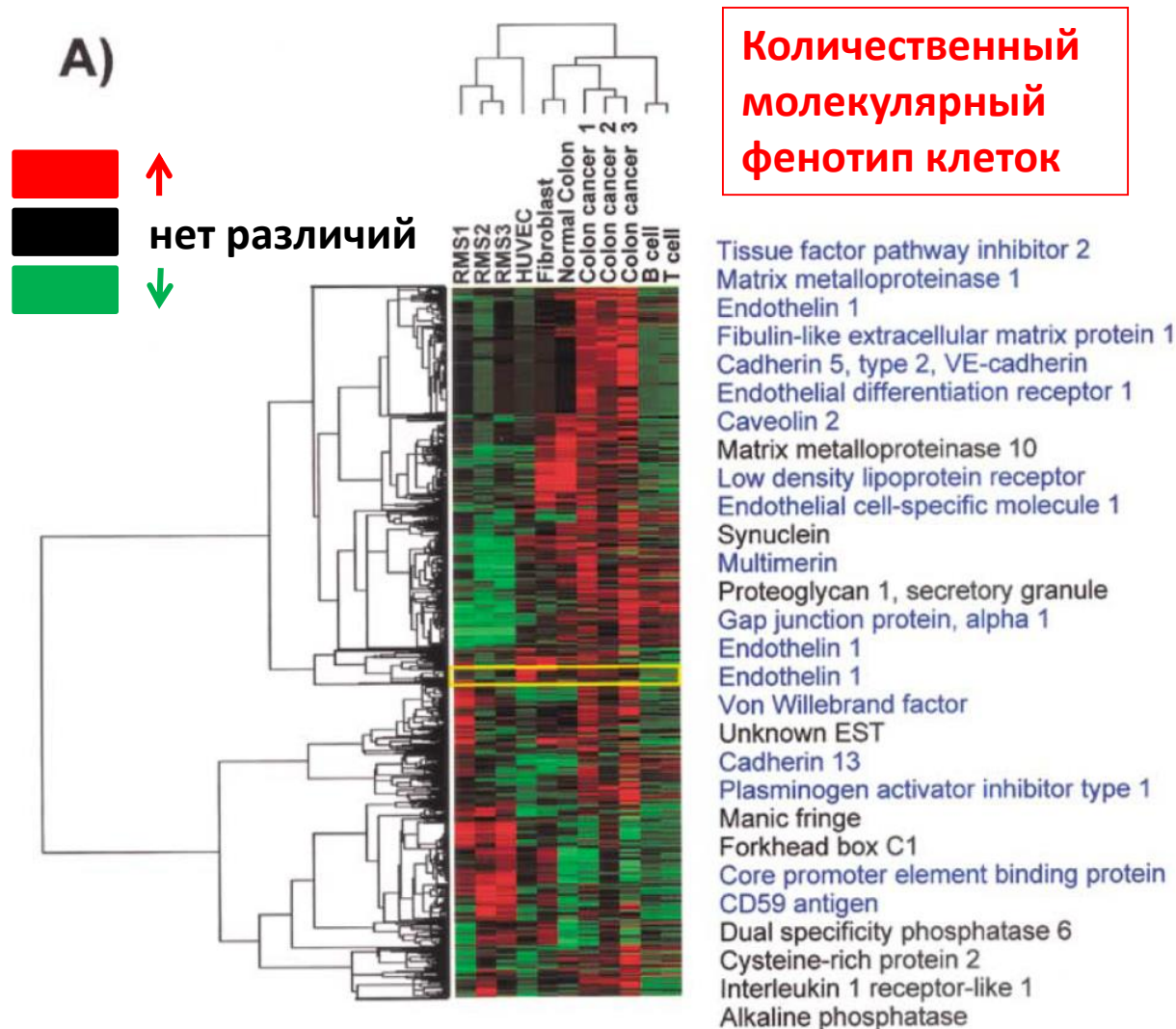


Олигонуклеотидный биочип после компьютерного псевдоокрашивания



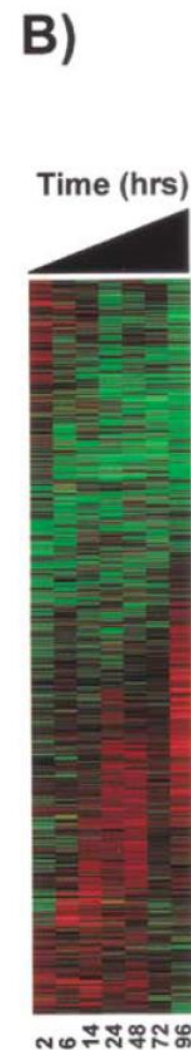
Соотношение
интенсивности
флуоресценции в каждой
точке от двух флуорофоров
(красного и зеленого)
позволяет представлять
данные в виде оттенков
зеленого и красного цвета

Исследование транскрипции с помощью биочипов



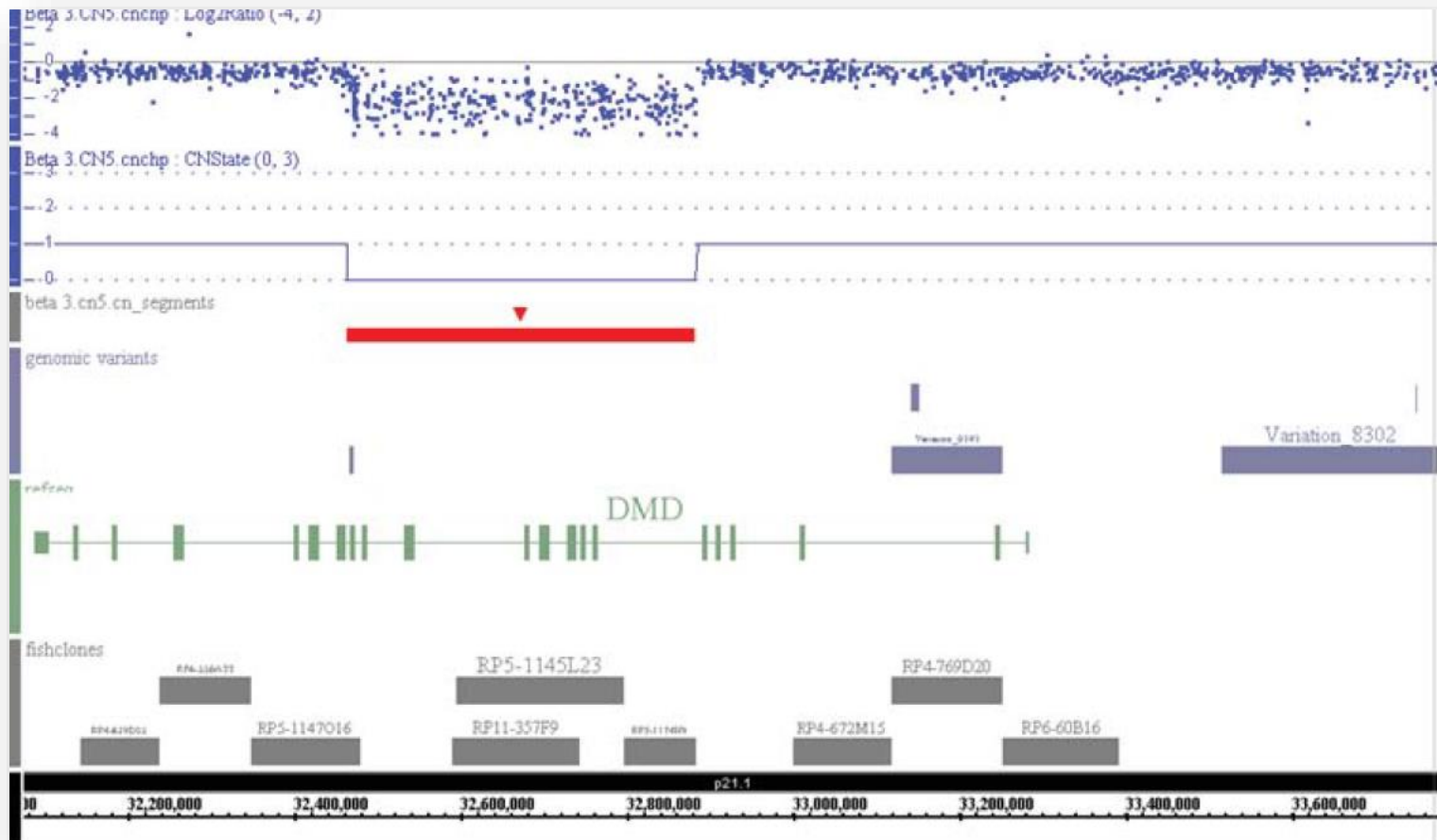
Транскрипция 4132 генов в клетках разных типов у человека. Выделены клетки эндотелия

**Количественный
молекулярный
фенотип клеток**



Клетки аденокарциномы, обработанные ингибитором

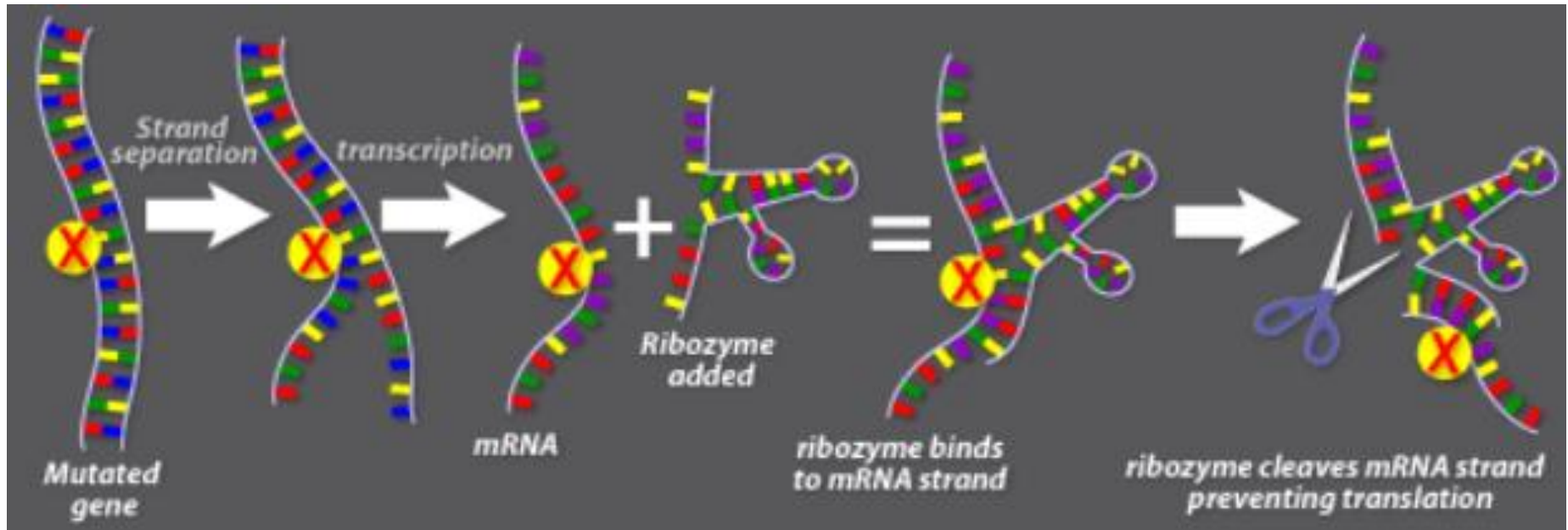
Выявление делеции длиной в 419 т.п.н. на хромосоме Хр21.1 человека с помощью биочипа Affimetrix SNP Array 6.0



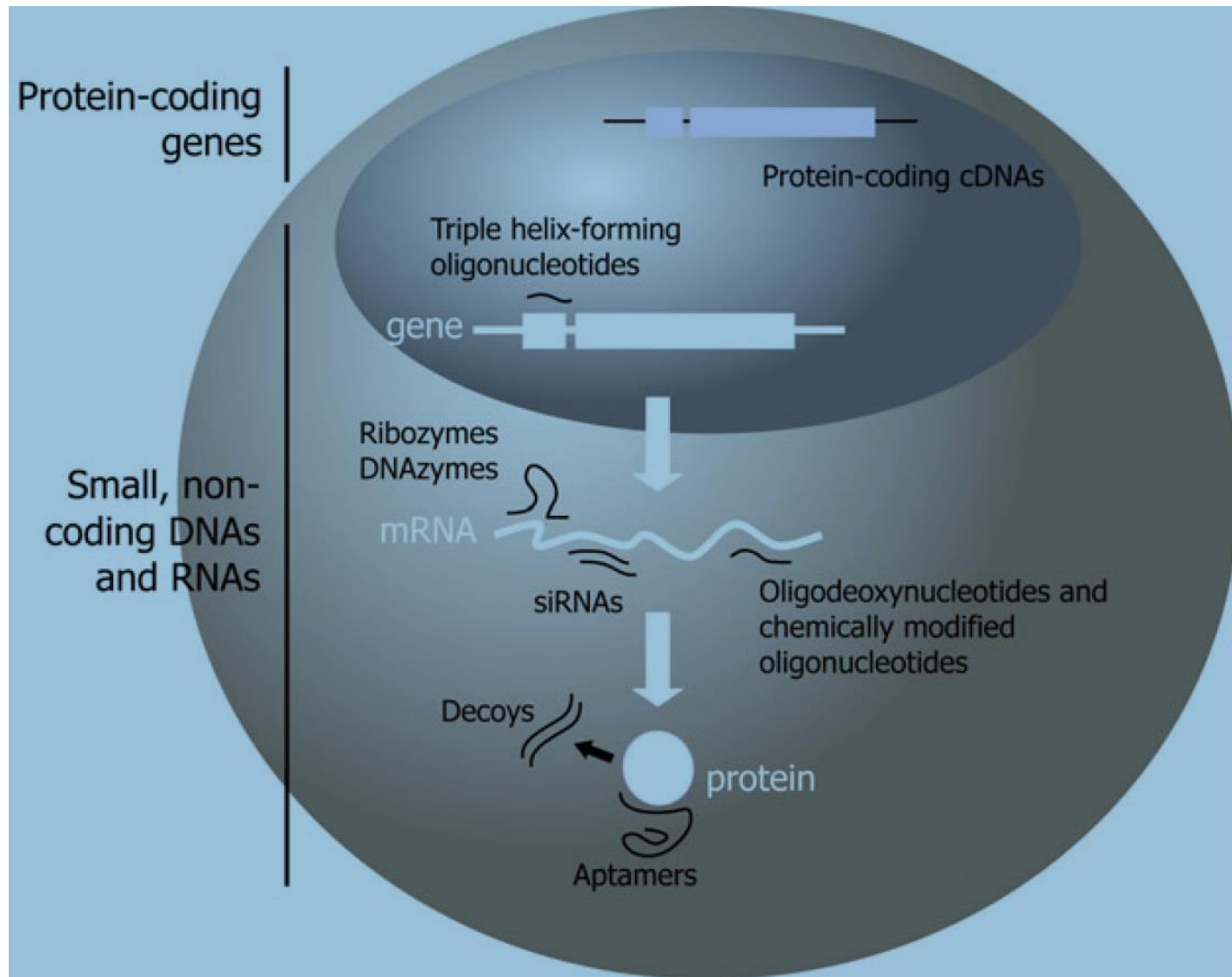
Биочип содержит 1,8 млн маркеров, в том числе 900 000 зондов для индивидуальных SNP, равномерно распределенных вдоль генома человека

Технологии антисмысловых последовательностей

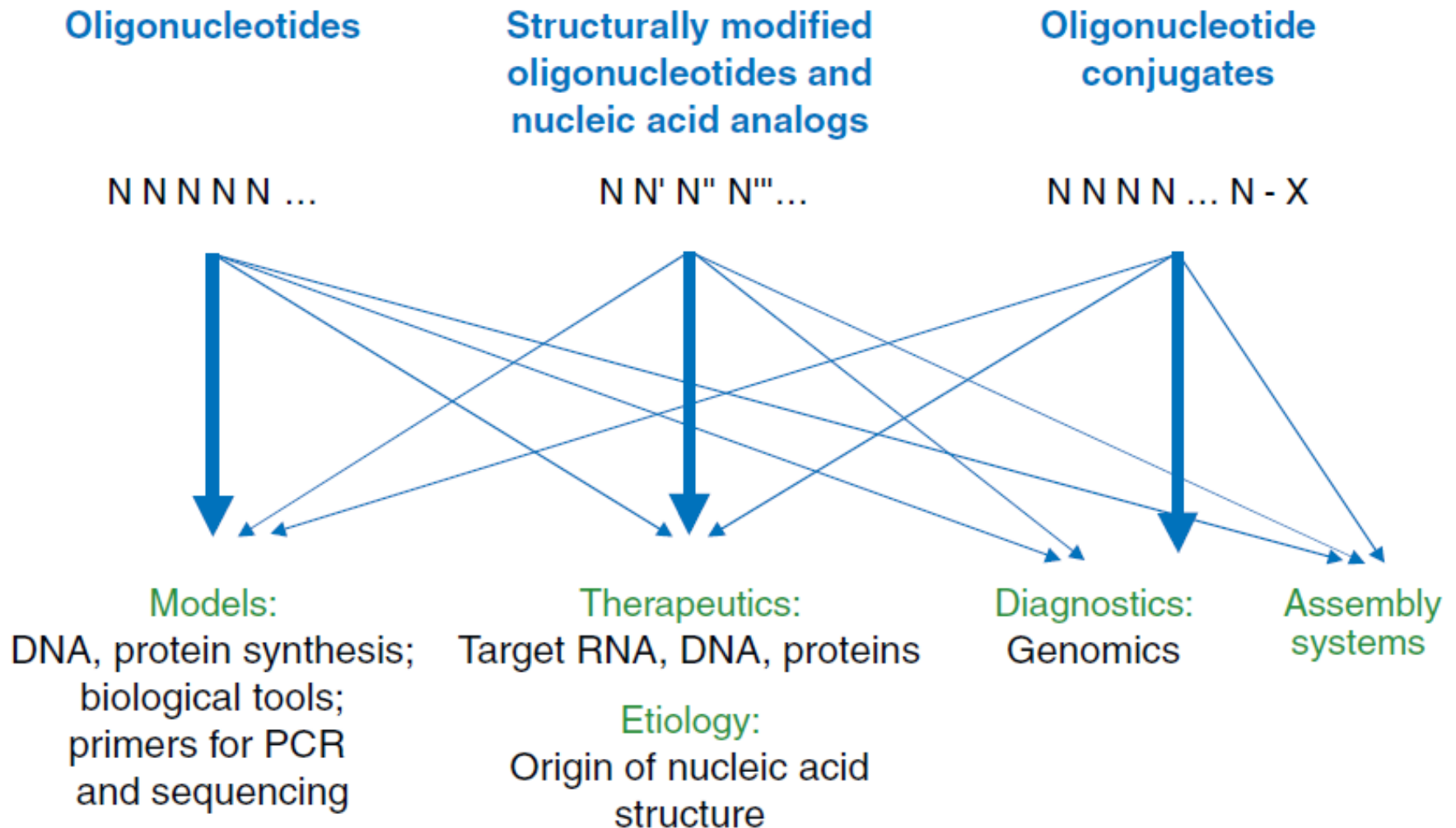
Нуклеиновые кислоты как ферменты



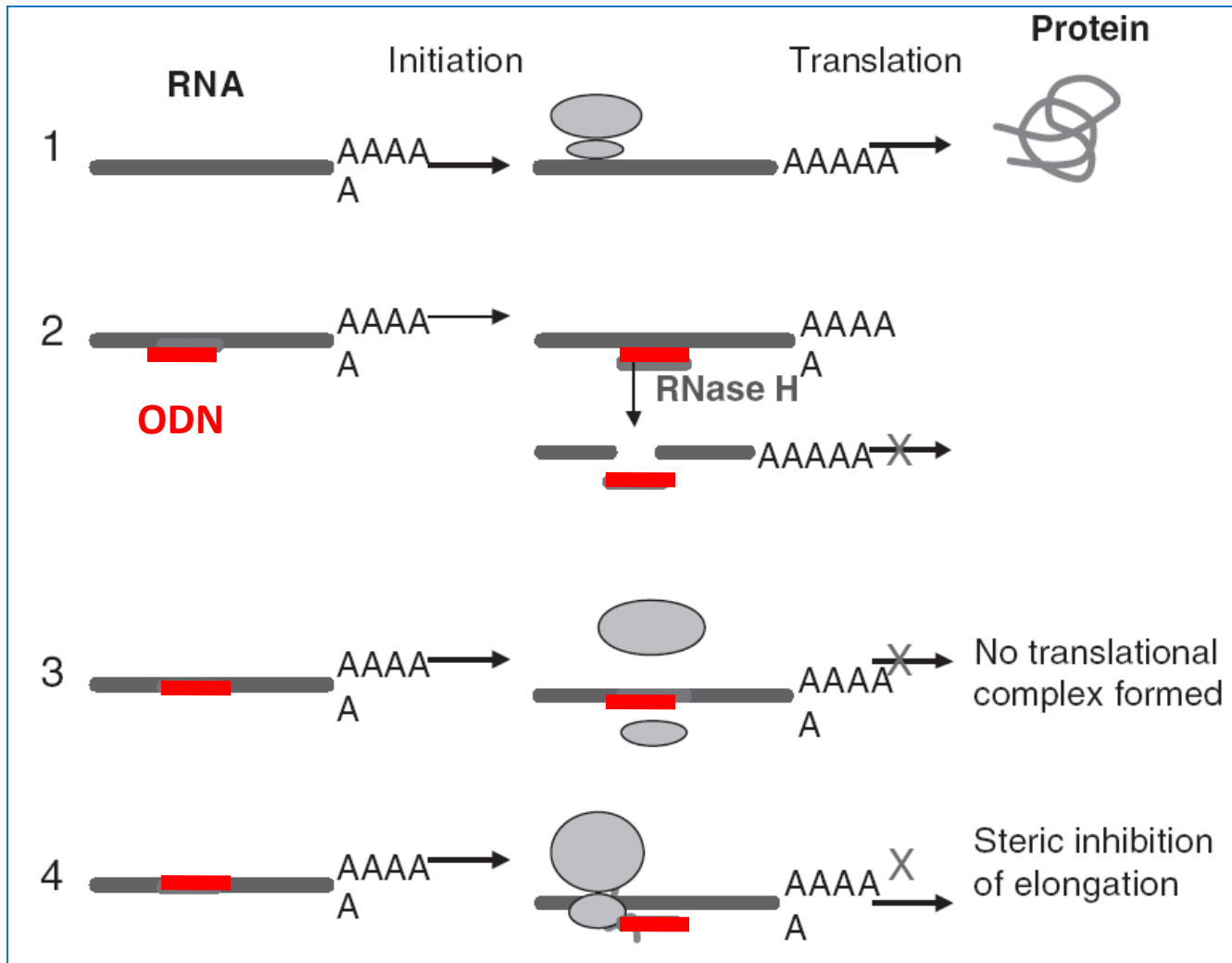
Использование нуклеиновых кислот для изменения экспрессии генов в эукариотических клетках



Сферы применения синтетических олигонуклеотидов



Механизмы подавления трансляции антисмысловыми олигонуклеотидами (ODN)



Трансляция в
норме

Разрушение РНК
РНКазой Н

Блок инициации

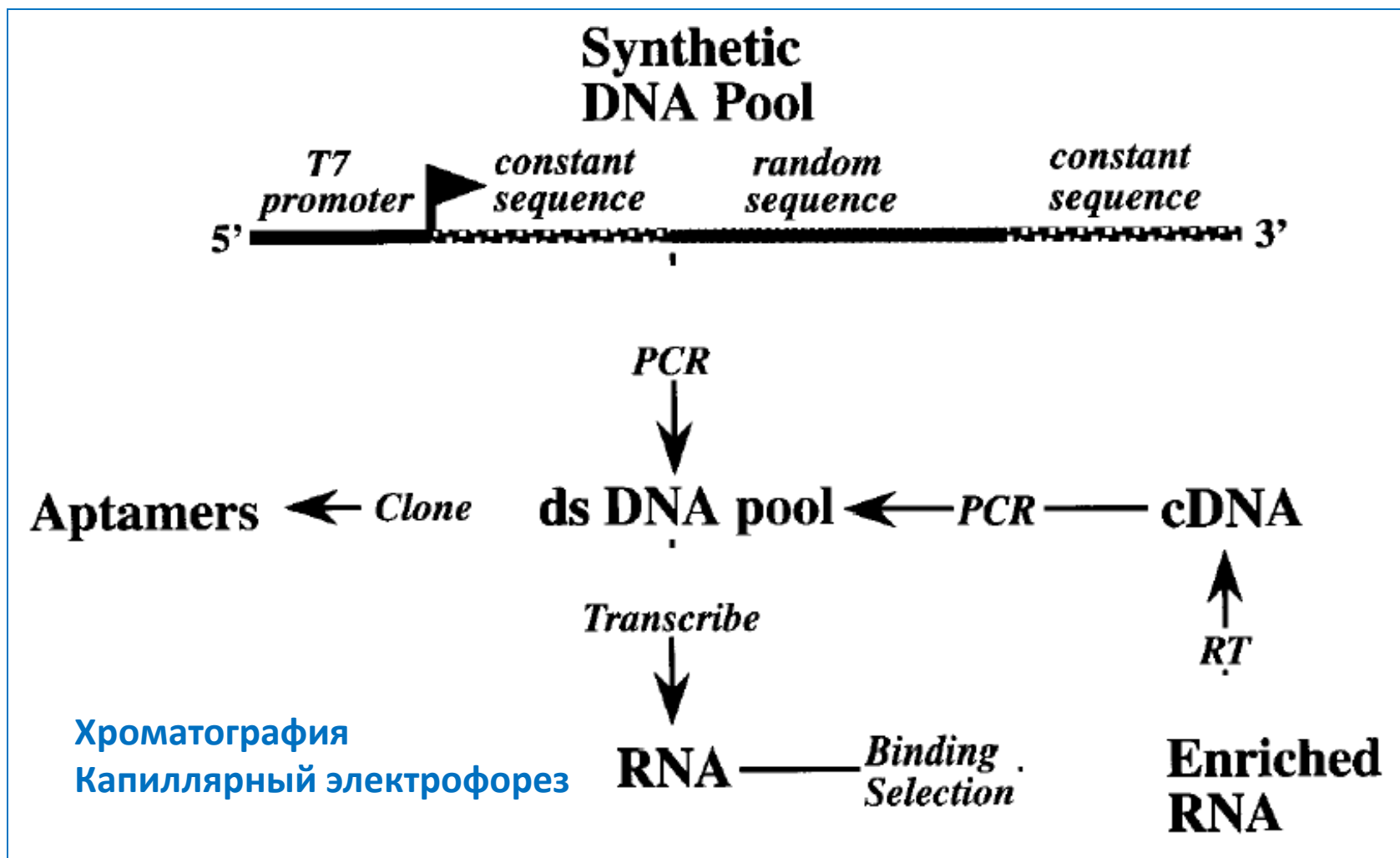
Блок элонгации

Олигонуклеотидные аптамеры

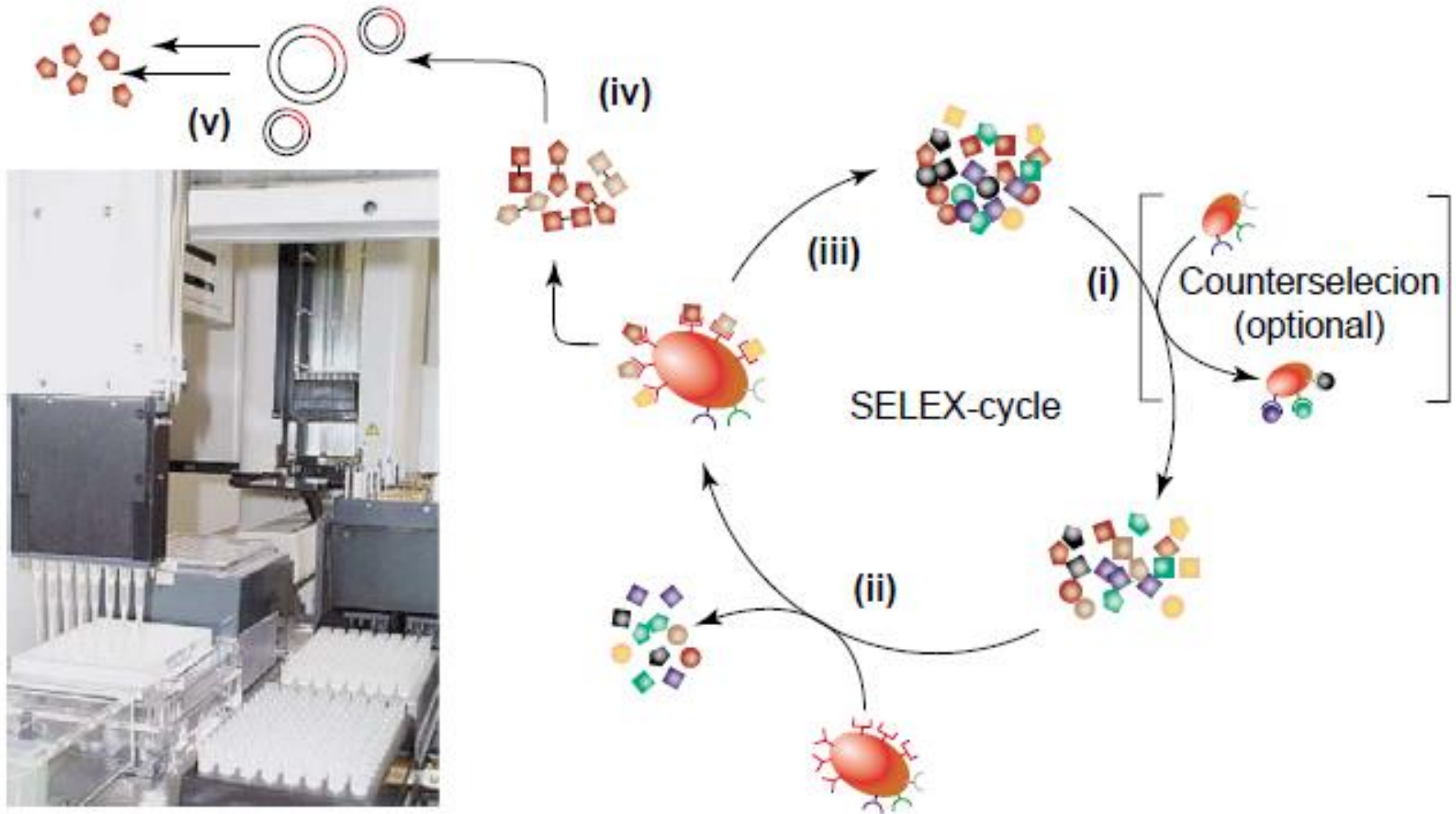


ДНК-аптамер ARC1172 в комплексе с доменом A1 фактора фон Виллебранда

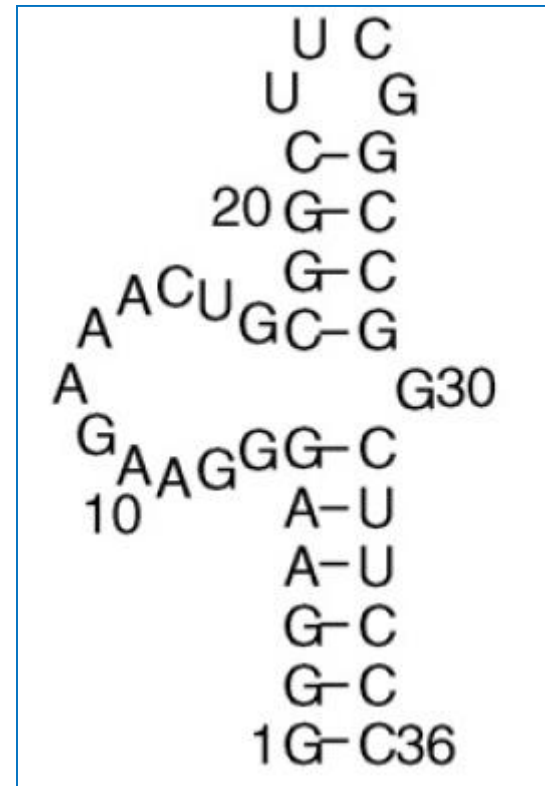
Схема отбора олигонуклеотидных аптамеров из комбинаторной библиотеки



Автоматизированная система отбора аптамеров RNA-SELEX



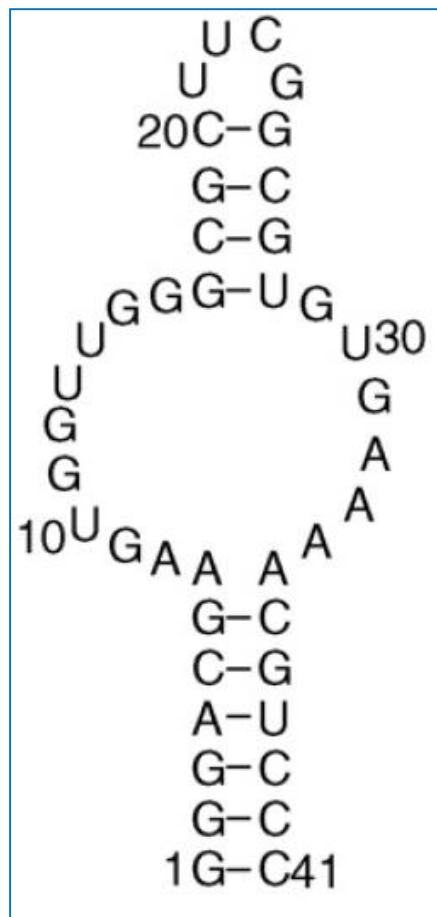
РНК-аптамер, взаимодействующий с АМР



36 nt

Контакты преимущественно с кольцом
аденина, но не рибозой.
Может связывать АТР, NAD

РНК-аптамер, взаимодействующий с GTP



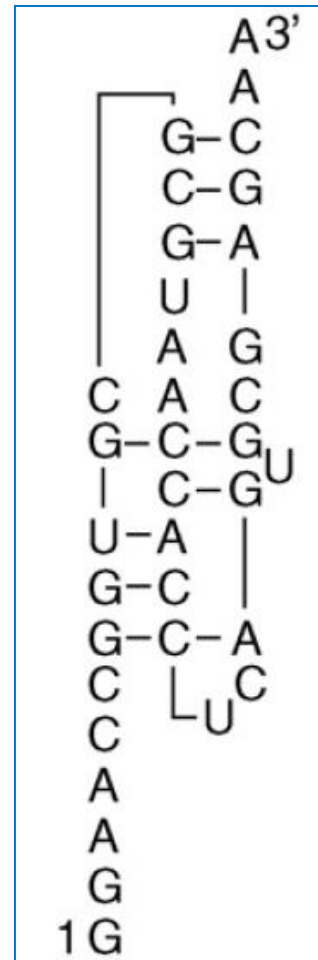
41 nt

Лиганд погружен в
связывающий карман

$K_D \sim 75$ nM

Обнаруживает много
третичных
взаимодействий,
объясняющих высокое
сродство аптамера к
лиганду

РНК-аптамер, взаимодействующий с витамином В12



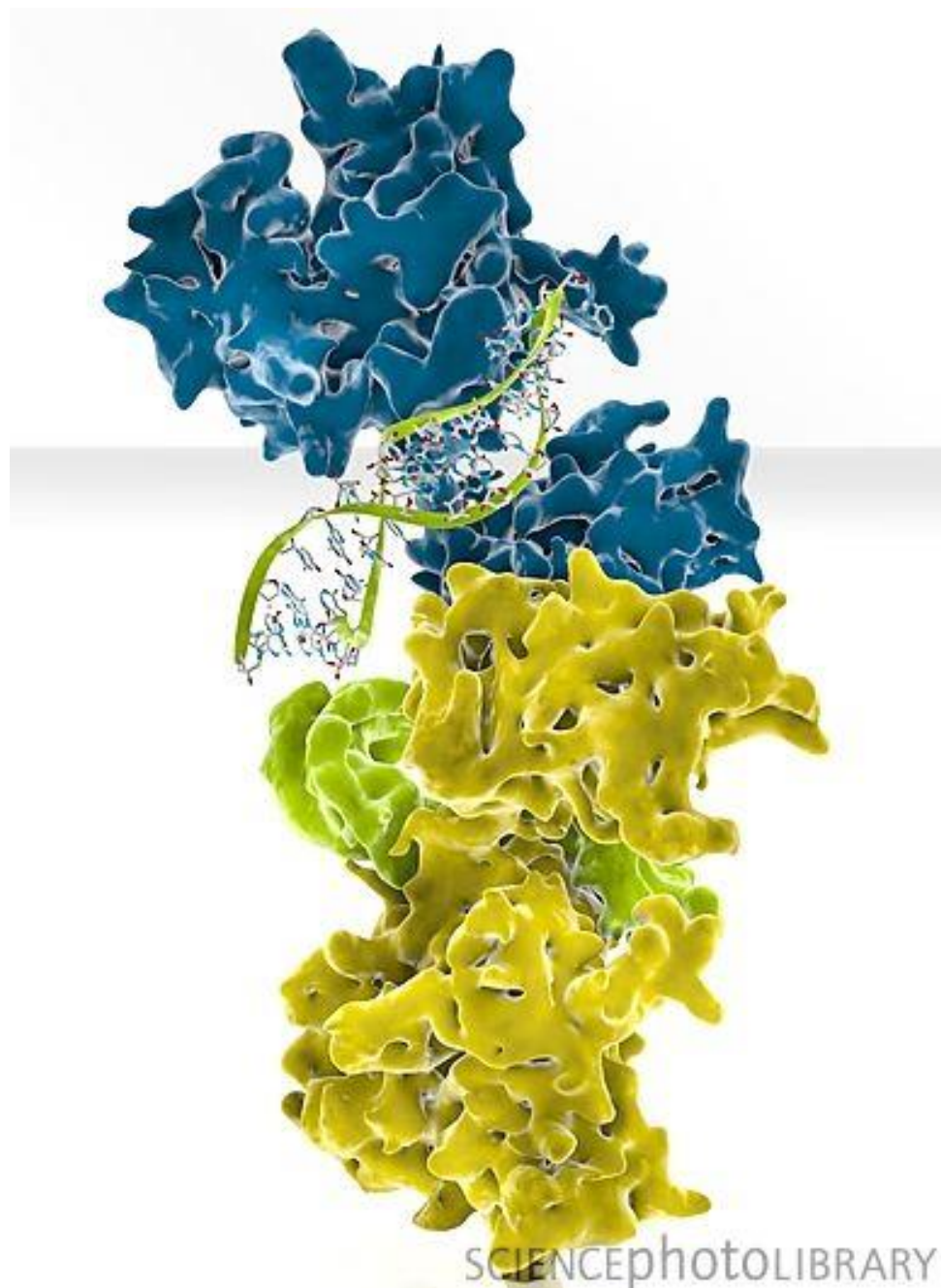
Лиганд
взаимодействует с
периферией
аптамера

35 nt

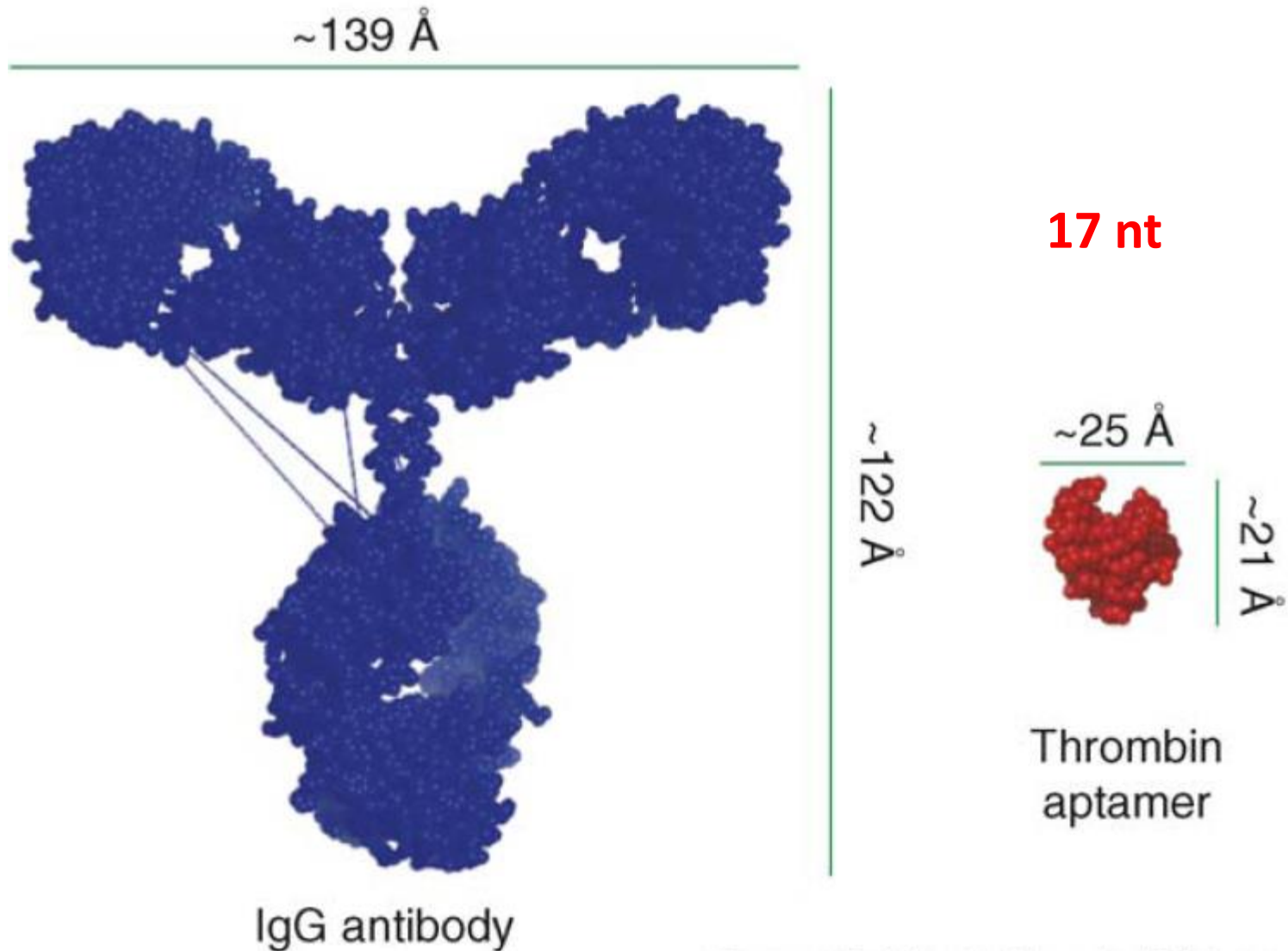
РНК-аптамер, ингибирующий фактор транскрипции NF- κ B

Аптамер (зеленый) представлен в
двух разных видах в комплексе с
двумя молекулами фактора
транскрипции

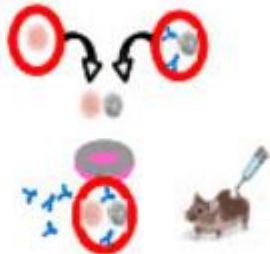
Подавление реакции воспаления



Сравнение размеров молекул антитела и олигонуклеотидного аптамера

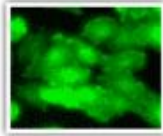


Преимущества олигонуклеотидных аптамеров перед антителами

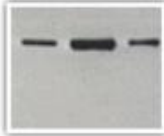
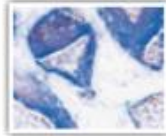
	Aptamer Technology	Antibody Technology
Production	 Chemical synthesis Inexpensive easy	 Cell culture and animal need Expensive Labor intensive
Discovery time	 SELEX 8 weeks	 ~6 months
Stability	 Stable in harsh condition No loss of activity	 Unstable in harsh condition Potential loss of functions
Modification	Easy for chemical modification fluorecent, affinity tag.	Difficult for chemical modification
Size	Small size (<30 KDa) Easy membrane penetration, short blood residence	Large size (~150 KDa) Difficult membrane penetration, long blood residence

Области современного применения аптамеров

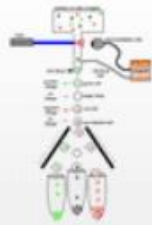
Research Reagent



In Vitro/Vivo Imaging



Western Blot



FACS

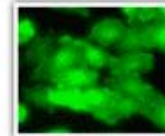


Affinity Chromatography

Medical Diagnosis



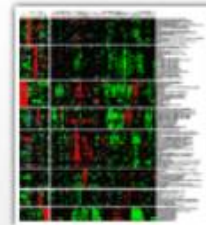
Histochemistry



Cytochemistry



Diagnostic Imaging



Diagnostic Protein Chip

Disease Treatment



Therapeutics



Drug Delivery

Non-medical Diagnosis



Environmental
Pollutant
Detection



Hazard
Detection



Food
Inspection

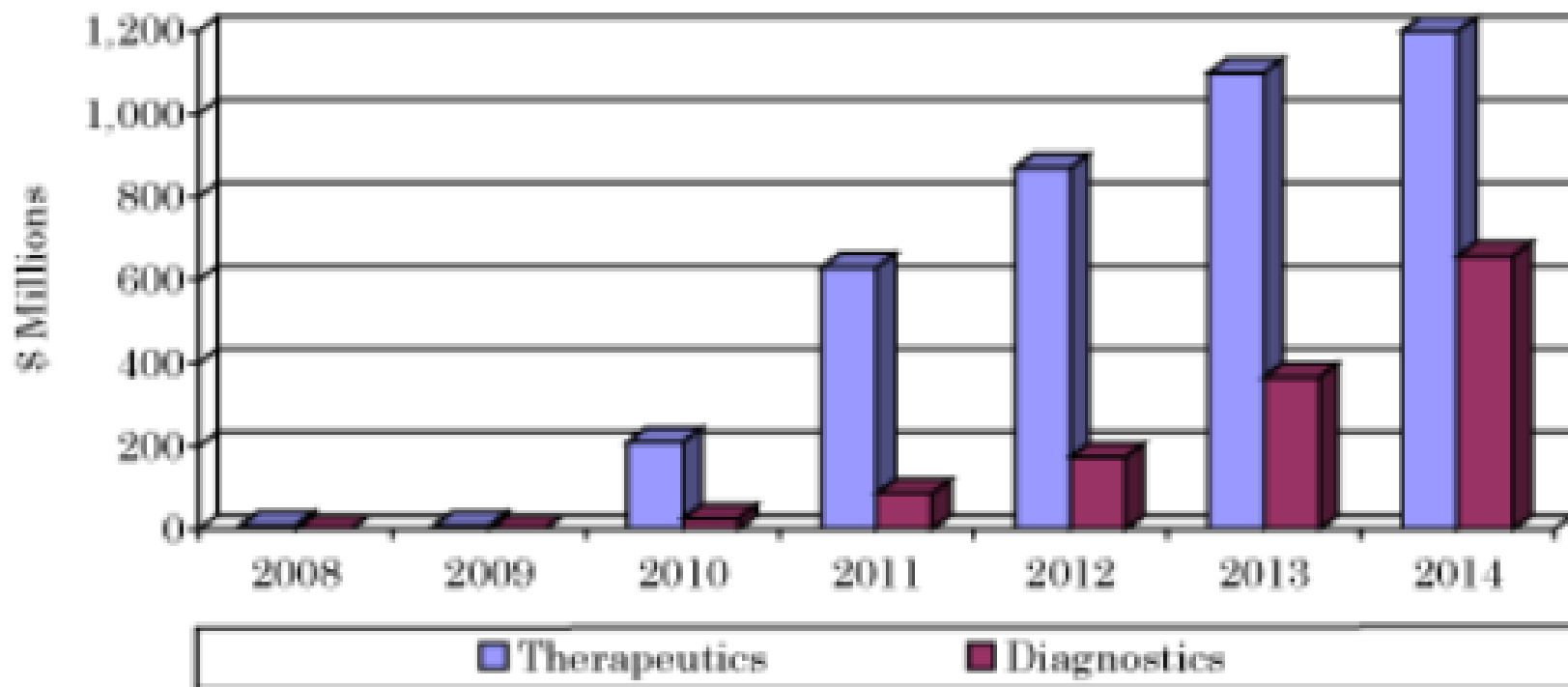


Bio-Production
Process



Aptamer

Глобальный рынок аптамеров медицинского назначения (млн \$)



Томас Чех – первооткрыватель рибозимов



Thomas Cech

1982 г. Аутосплайсинг интрона
рибосомной 35S-РНК жгутикового
простейшего *Tetrahymena*

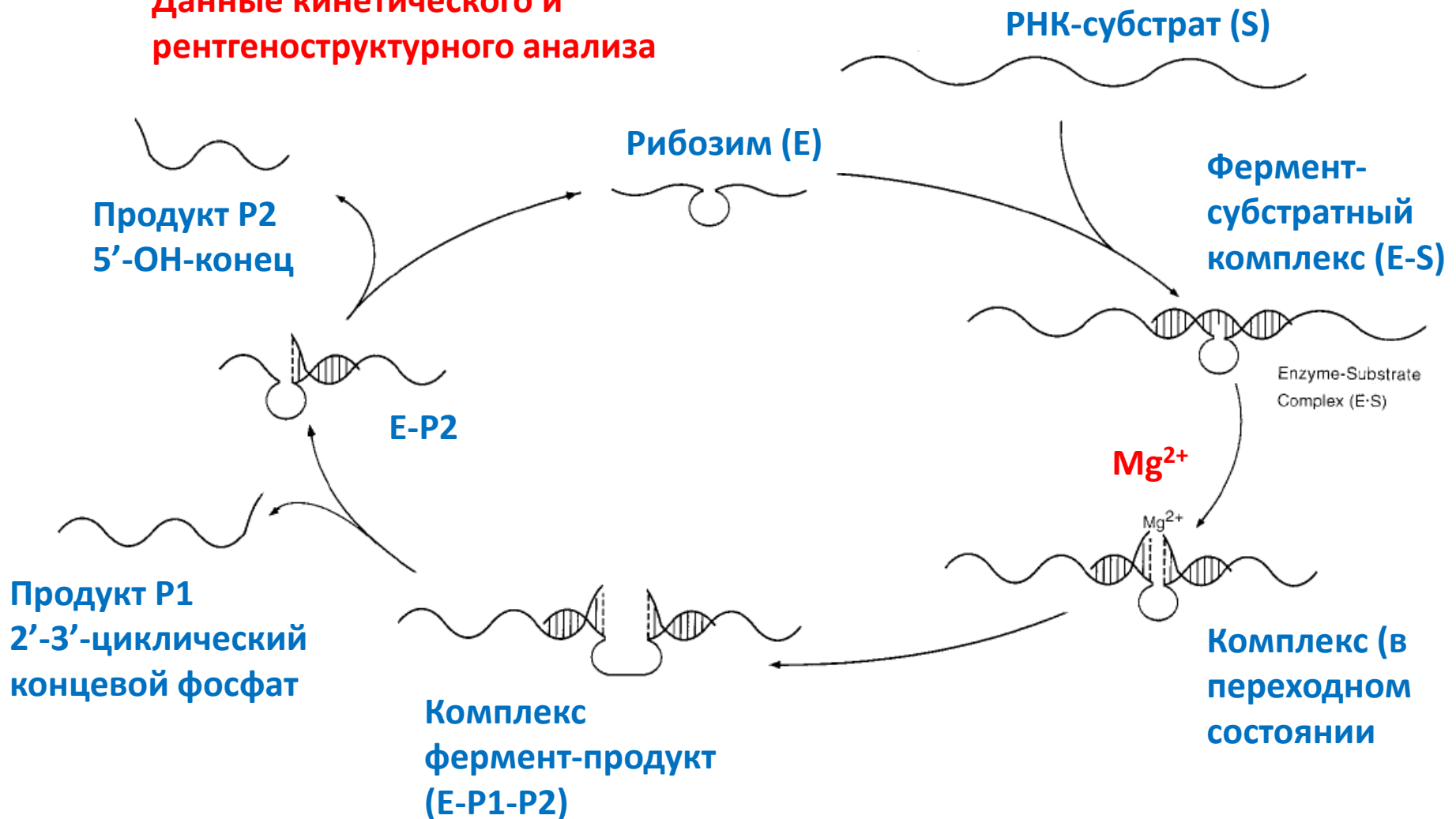
*Нобелевская премия по химии 1989 г.
совместно с Sidney Altman*

Сидни Олтман (Sidney Altman) получает Нобелевскую премию за РНКазу Р

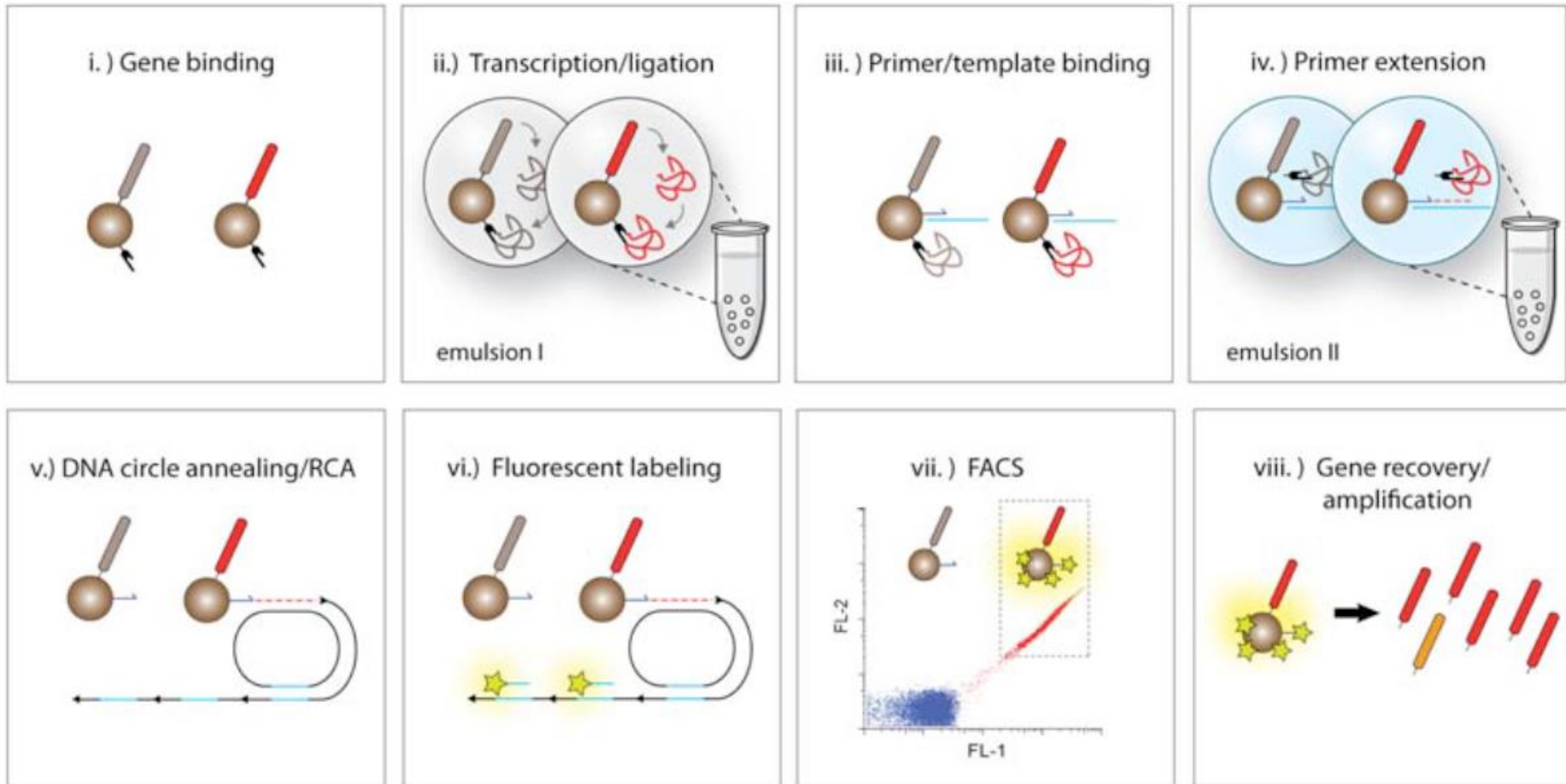


Каталитический цикл рибозима

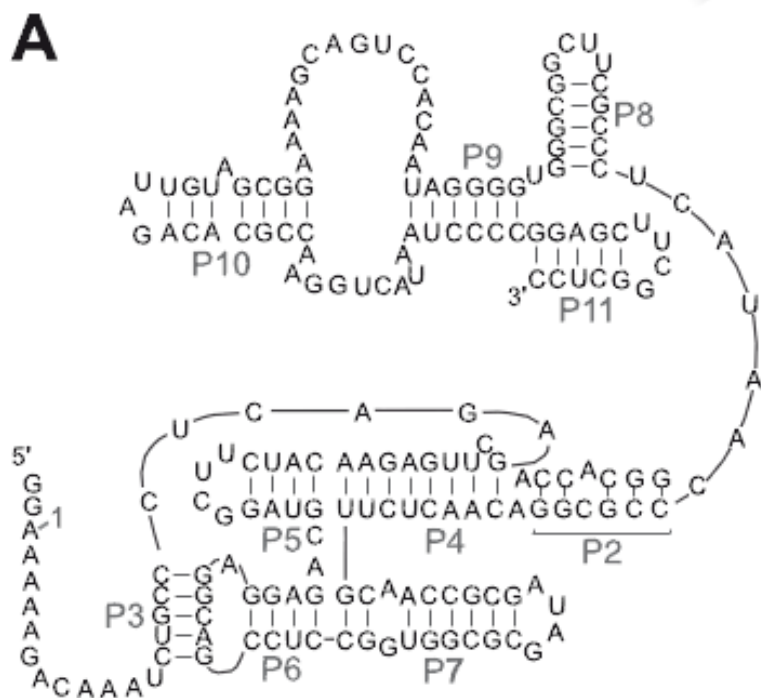
Данные кинетического и рентгеноструктурного анализа



Получение рибозима, обладающего РНК-полимеразной активностью методом СBT (Compartmentalized Bead-Tagging)

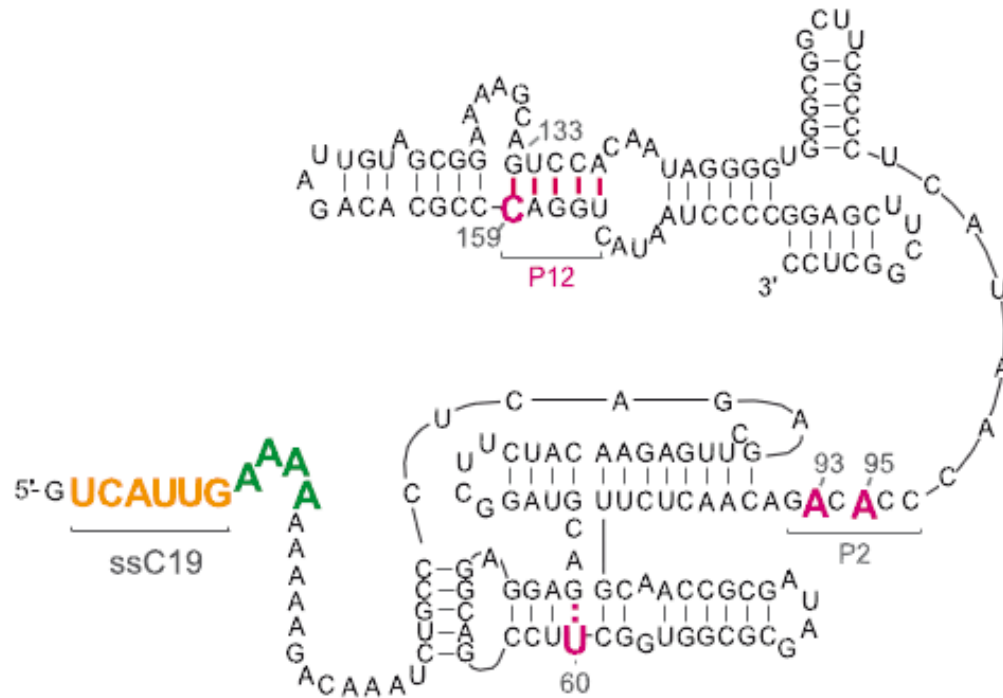


A



R18

Исходный рибозим



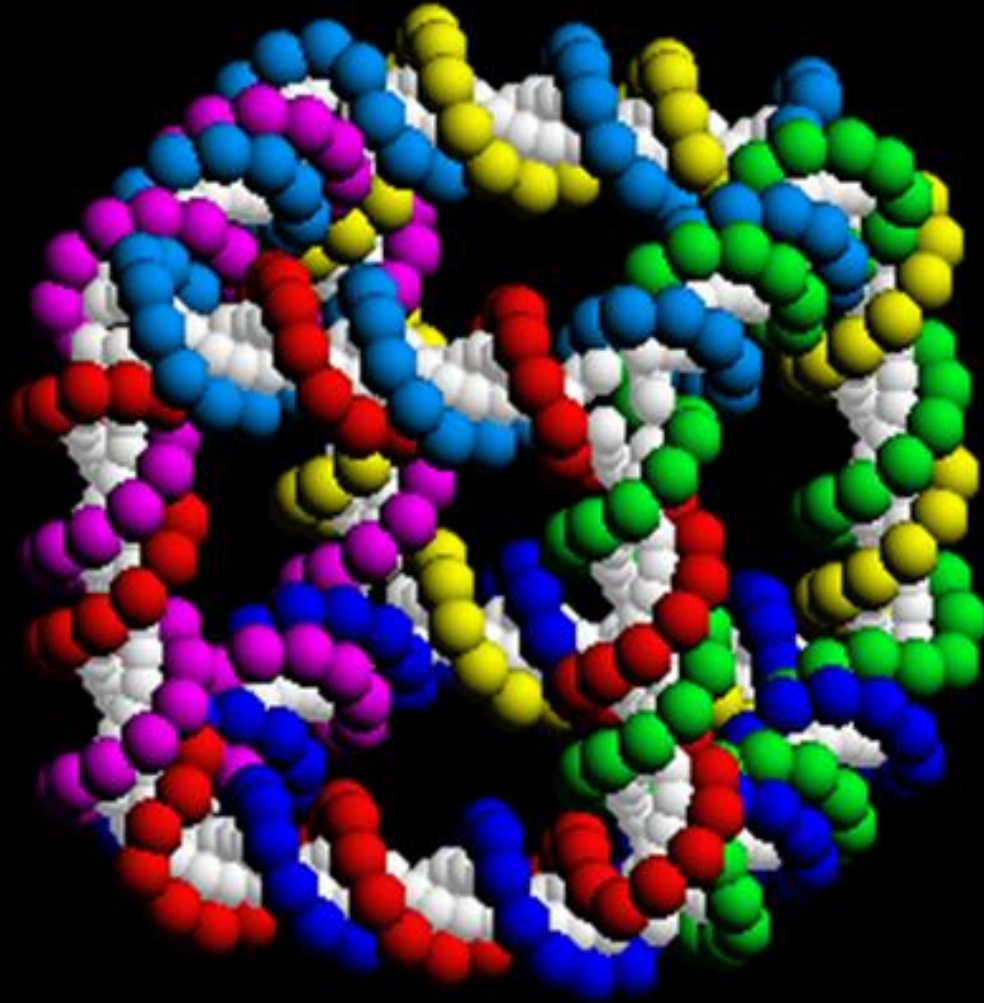
tC19Z

Окончательный вариант рибозима

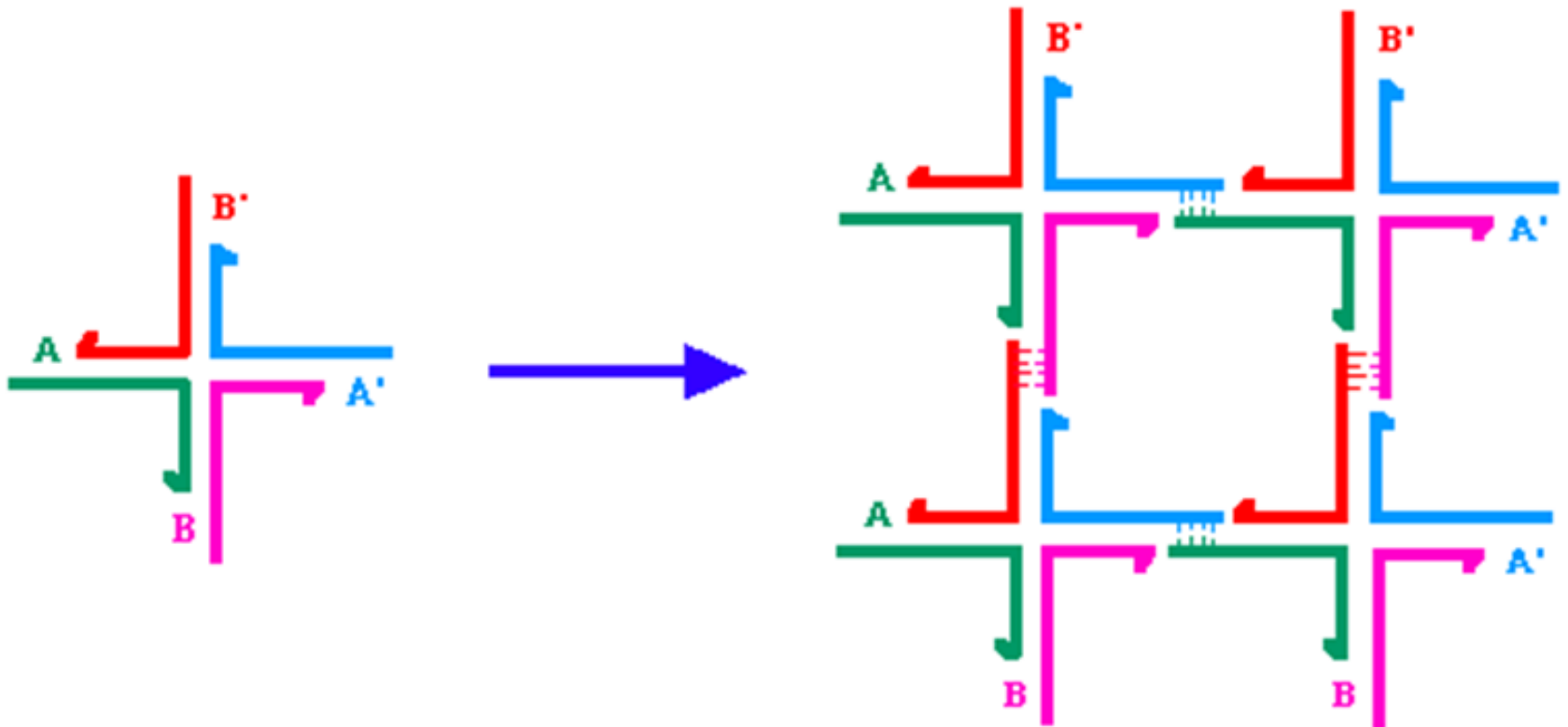
Реакции, осуществляемые дезоксирибозимами

Реакция	Связь	Ускор	Реакция	Связь	Ускор
Гидролиз РНК	O-P	10^8	Реакция Diels-Alder	C-C	4×10^5
Лигирование РНК (3'-5')	O-P	10^5	Депуринизация ДНК	C-N	
Лигирование РНК (ветвление)	O-P	5×10^6	Окислительный разрыв ДНК	C-O	10^6
Лигирование РНК (петля)	O-P	10^5	Фотореактивация тиминовых димеров	C-C	3×10^4
Фосфорилирование ДНК	O-P	10^9	Гидролиз фосфорамидата	N-P	10^3
Аденилирование ДНК	O-P	2×10^{10}	Введение металлов в порфирины	Cu-N	10^3
Лигирование ДНК	O-P	10^5	Нуклеопептидная связь	O-P	5×10^5

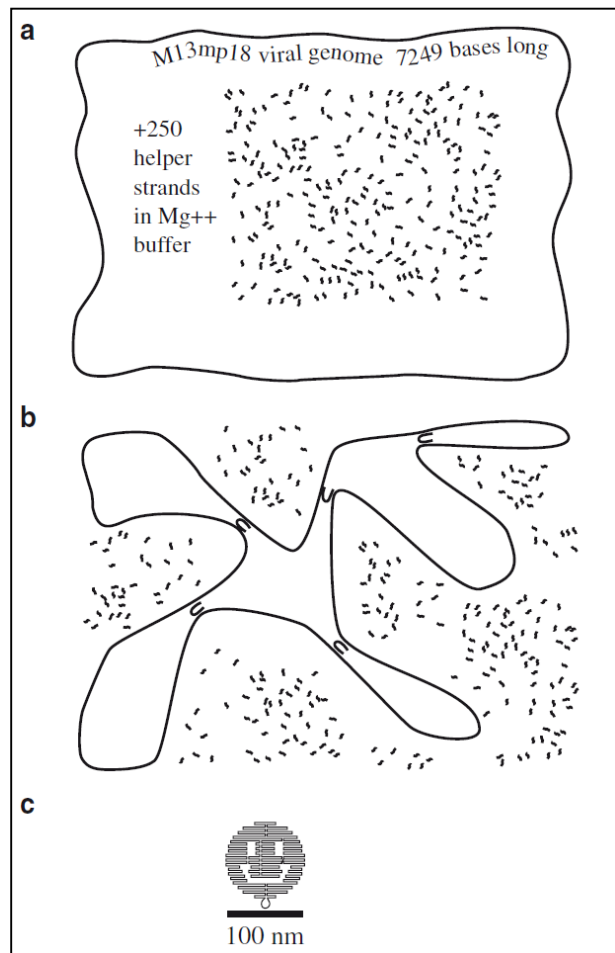
ДНК в наноконструкторе



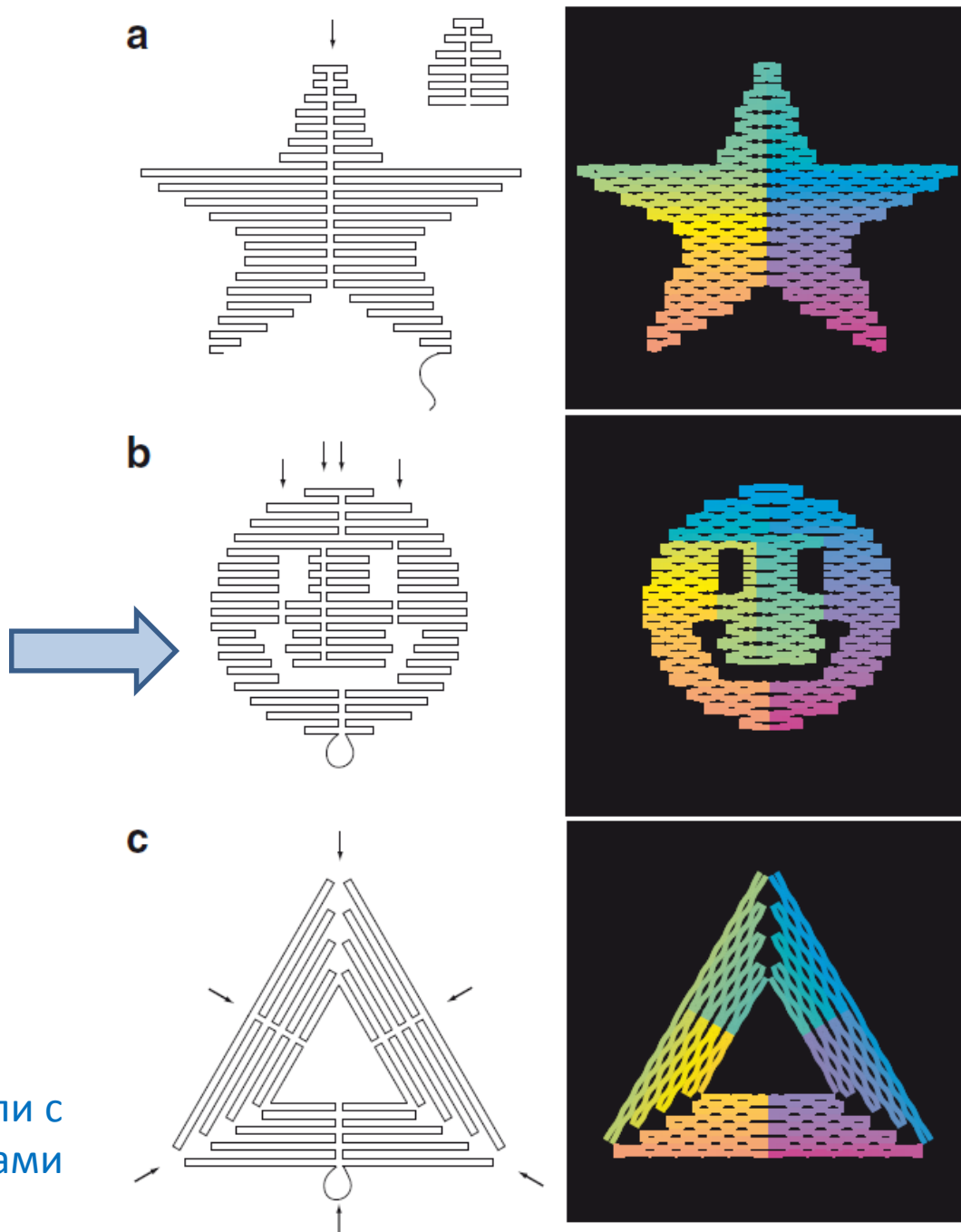
Образование двумерных решеток из стабильных конструкций с липкими концами



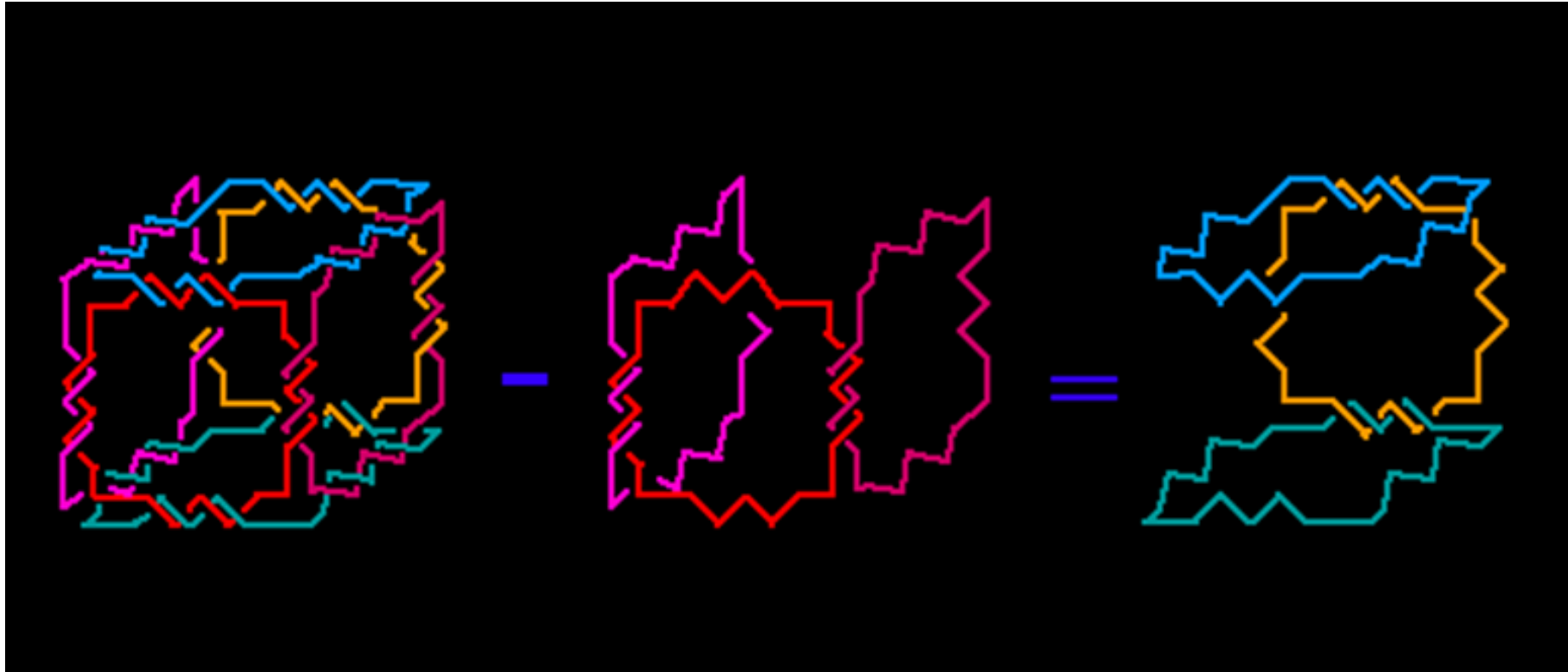
Сложные ДНК-оригами



оцДНК фага М13 (7240 nt) смешивали с 250 олигонуклеотидами-помощниками (32 nt) и охлаждали 2 ч до 20°C

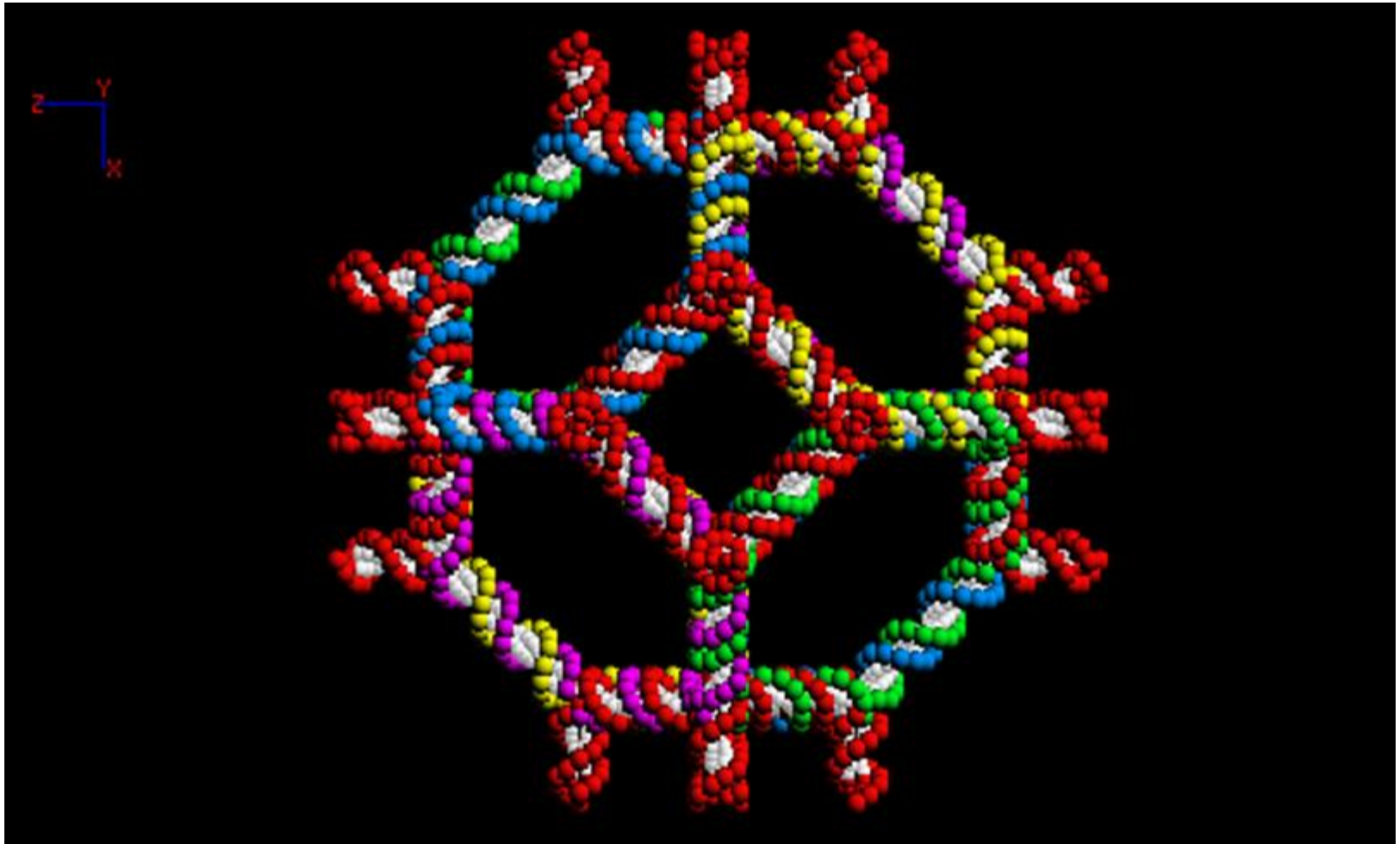


Куб как сумма линейных катенанов ДНК



Линейные тройные катенаны ДНК (в центре рисунка) спонтанно собираются с образованием куба (слева)

Усеченный октаэдр, построенный из ДНК



Фигура построена из 14 кольцевых молекул оцДНК. Цветные точки – сахаро-фосфатный остов ДНК, белые точки – азотистые основания. Вид сверху.

Трансгенные животные



Кролик, экспрессирующий зеленый флуоресцирующий белок (GFP)

Трансгенез:

**введение генов в
эукариотический организм путем
генетической трансформации,
трансфекции или переносом
ядер соматических клеток
(неполовым путем)**

Первый «клон», полученный путем пересадки ядра соматической клетки



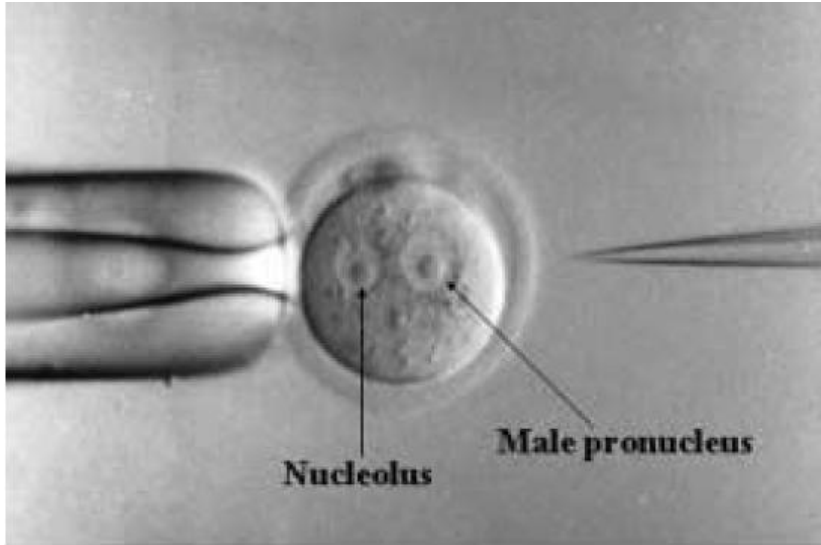
Овца Долли (1997-2003) и ее первый ягненок Бонни (1998)

Рослинский институт в Шотландии близ Эдинбурга

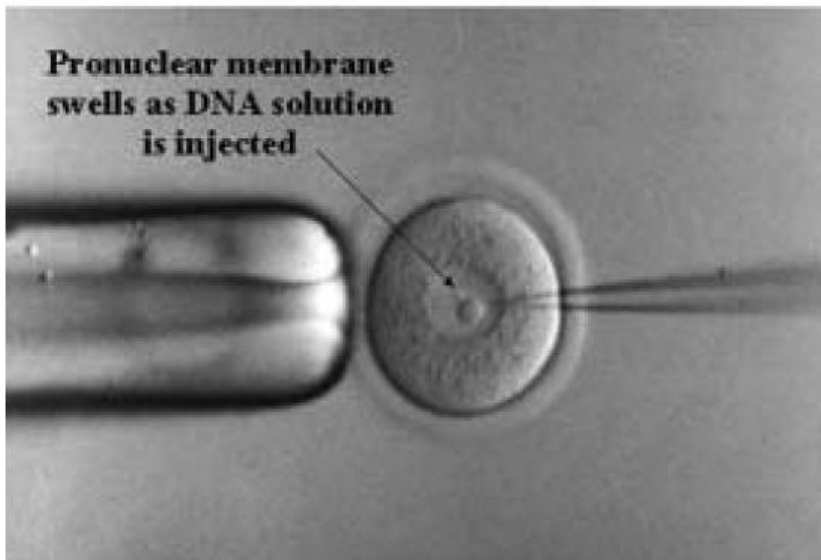
Три способа получения трансгенных ЖИВОТНЫХ

1. Прямая инъекция ДНК в пронуклеусы оплодотворенных яйцеклеток
2. Использование рекомбинантных вирусов для заражения эмбриональных клеток зародыша
3. Использование эмбриональных стволовых клеток (ES)

Прямая инъекция ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки мыши



Оплодотворенная яйцеклетка фиксирована удерживающей пипеткой. Справа игла, содержащая ДНК



Инъекция раствора ДНК в пронуклеус сопровождается увеличением его объема

Трансгенные игрушки (*Callithrix jacchus*), экспрессирующие EGFP в конечностях. Использован ретровирусный вектор



Инъекция в
бластоцист

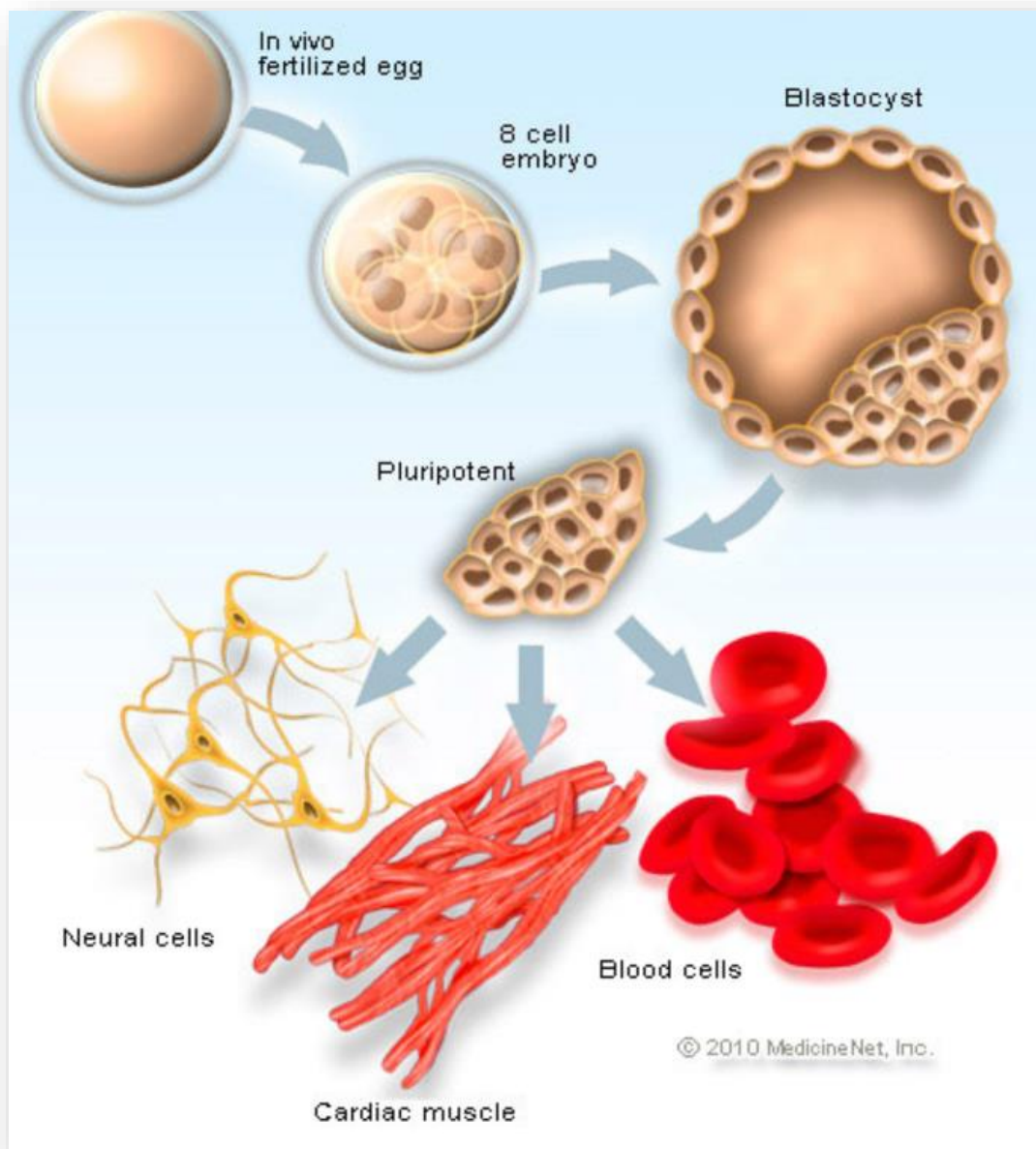


NATURE,
459, 523,
2009

Экспрессия GFP, интегрированного в X-хромосому

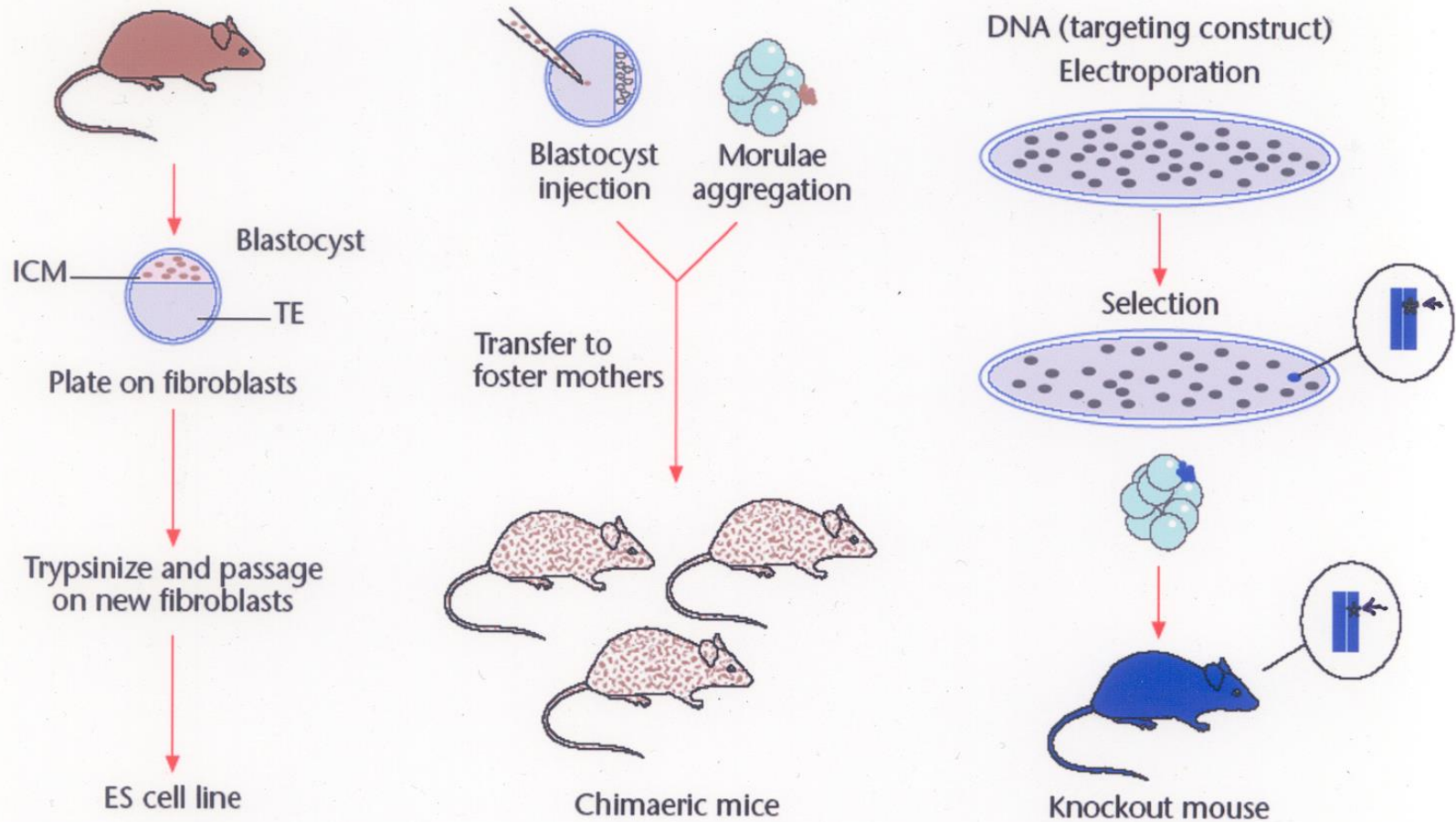


Демонстрация случайной инактивации X-хромосомы у самок



**Технологии,
основанные на
использовании
эмбриональных
стволовых (ES)
клеток**

Этапы технологии, основанной на использовании эмбриональных стволовых клеток



Получение линий ES

Создание трансгенных
зародышей

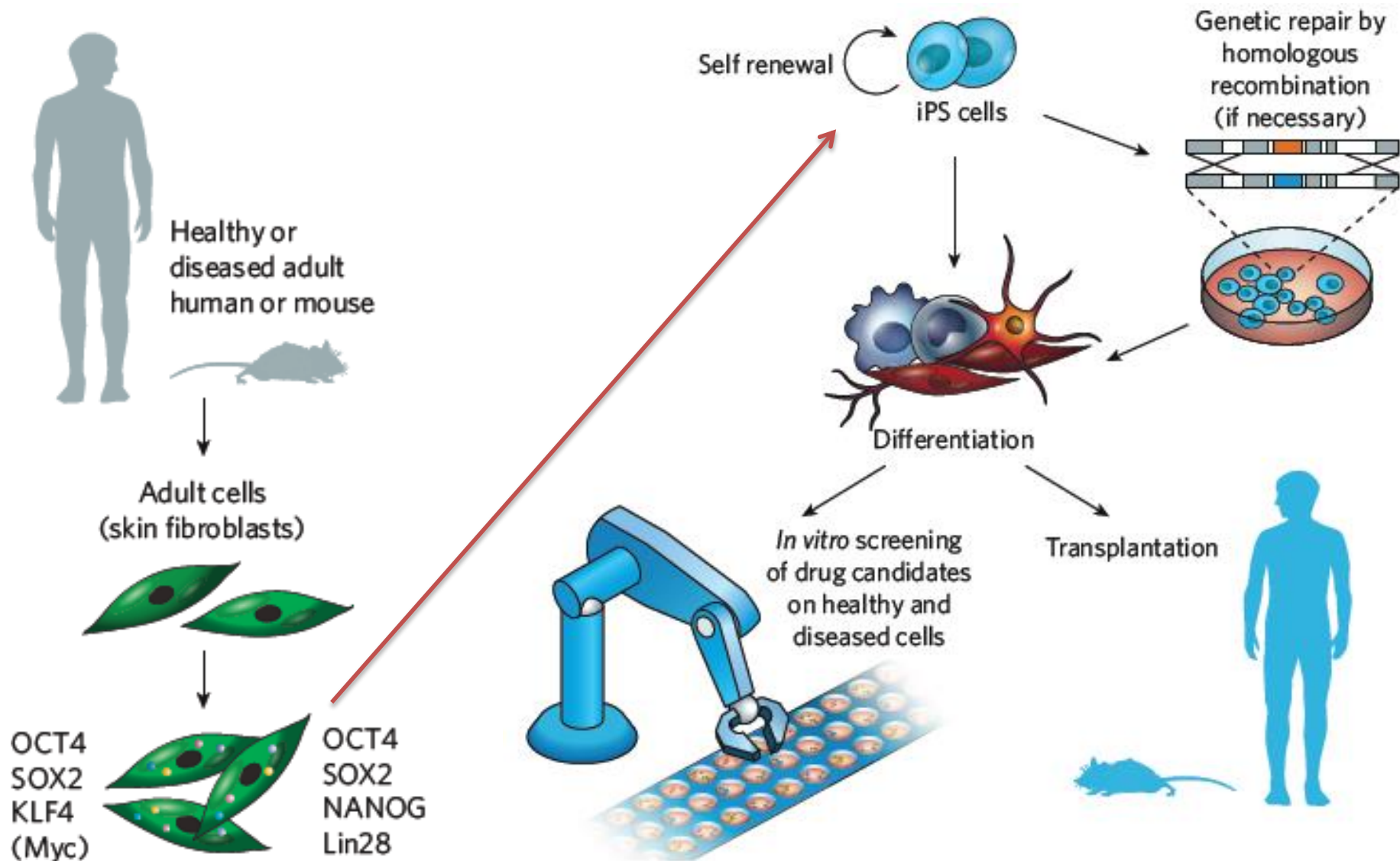
Генетическая
модификация ES



**Химерный эмбрион
трансгенной мыши,
экспрессирующий
 β -галактозидазу
*E.coli***

**Окрашены потомки
эмбриональных
стволовых клеток,
экспрессирующие β -
галактозидазу, после
окраски X-gal**

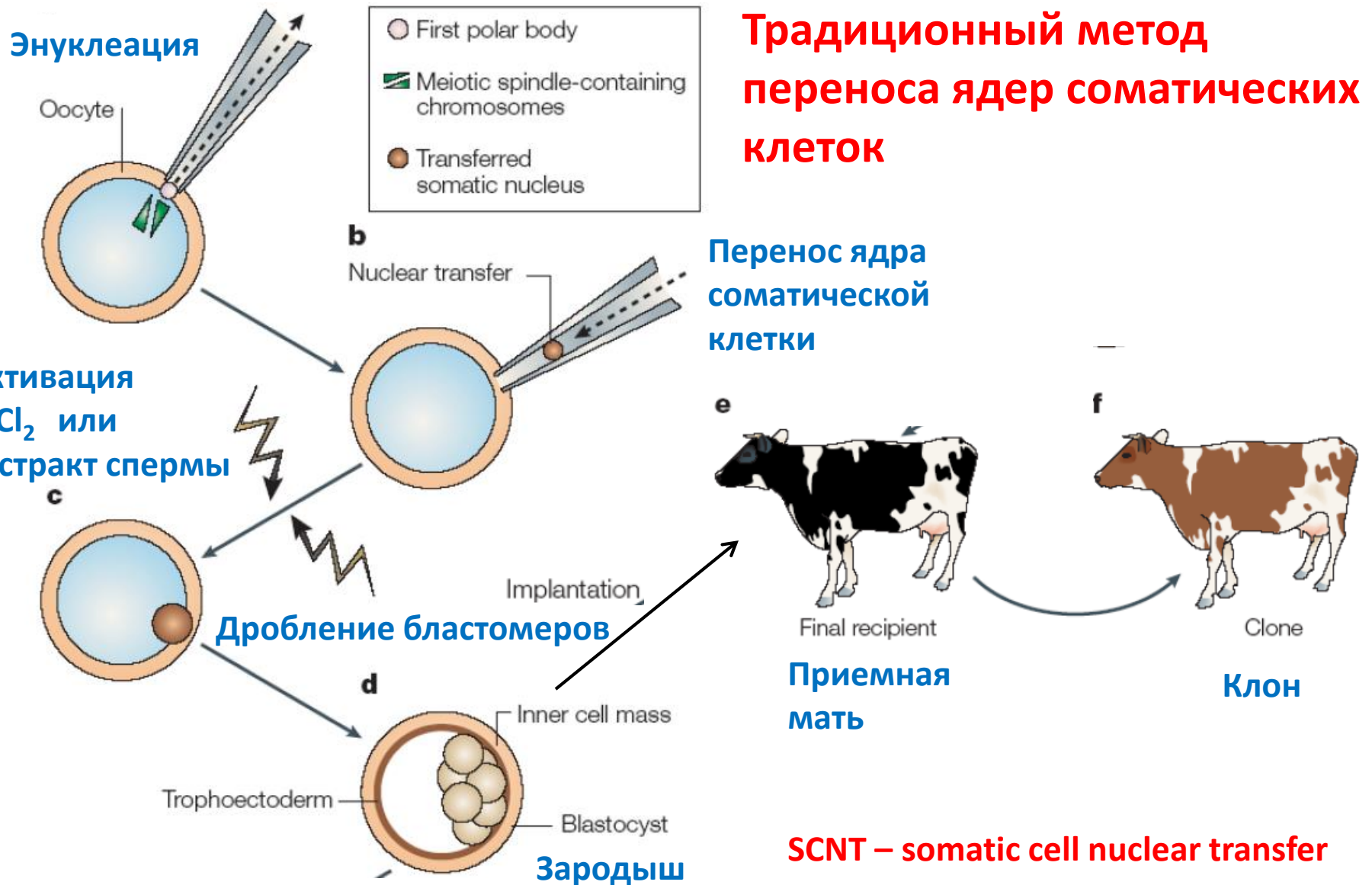
Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) и их трансплантация в целях терапии



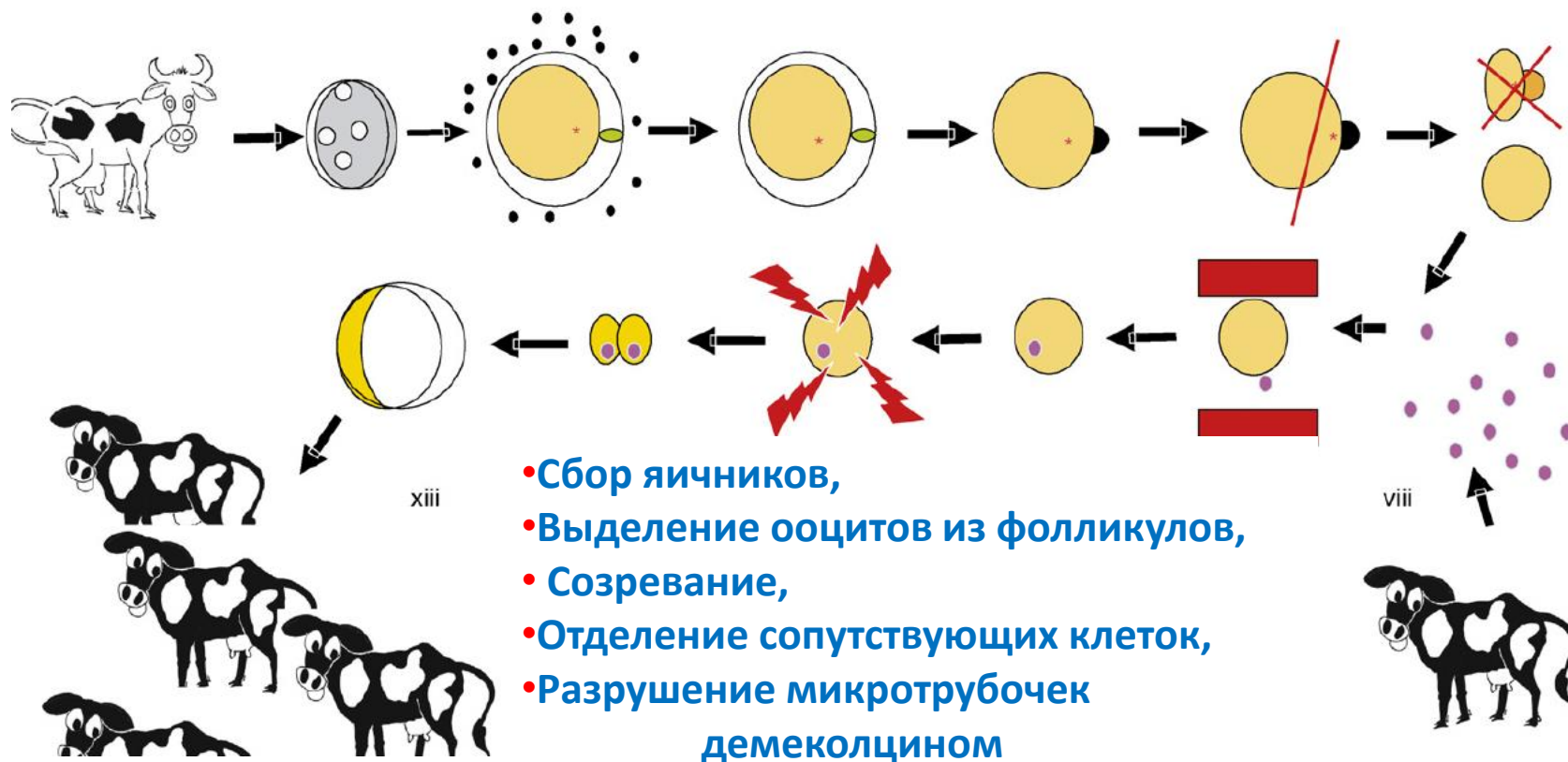
Клонирование животных



Стадии процесса клонирования млекопитающих



Стадии клонирования млекопитающих вручную (Handmade cloning - НМС)



- Сбор яичников,
- Выделение ооцитов из фолликулов,
- Созревание,
- Отделение сопутствующих клеток,
- Разрушение микротрубочек декеколцином

- Разрушение *zonae pellucidae* проназой
- Ядро в выпячивании удаляется лезвием
- Кариопласт удаляется, цитопласт - акцептор
- Культивирование соматических клеток

- Фитогемагглютинин, индивидуал. прикрепление к цитопласту
- Электрослияние
- Химическая активация

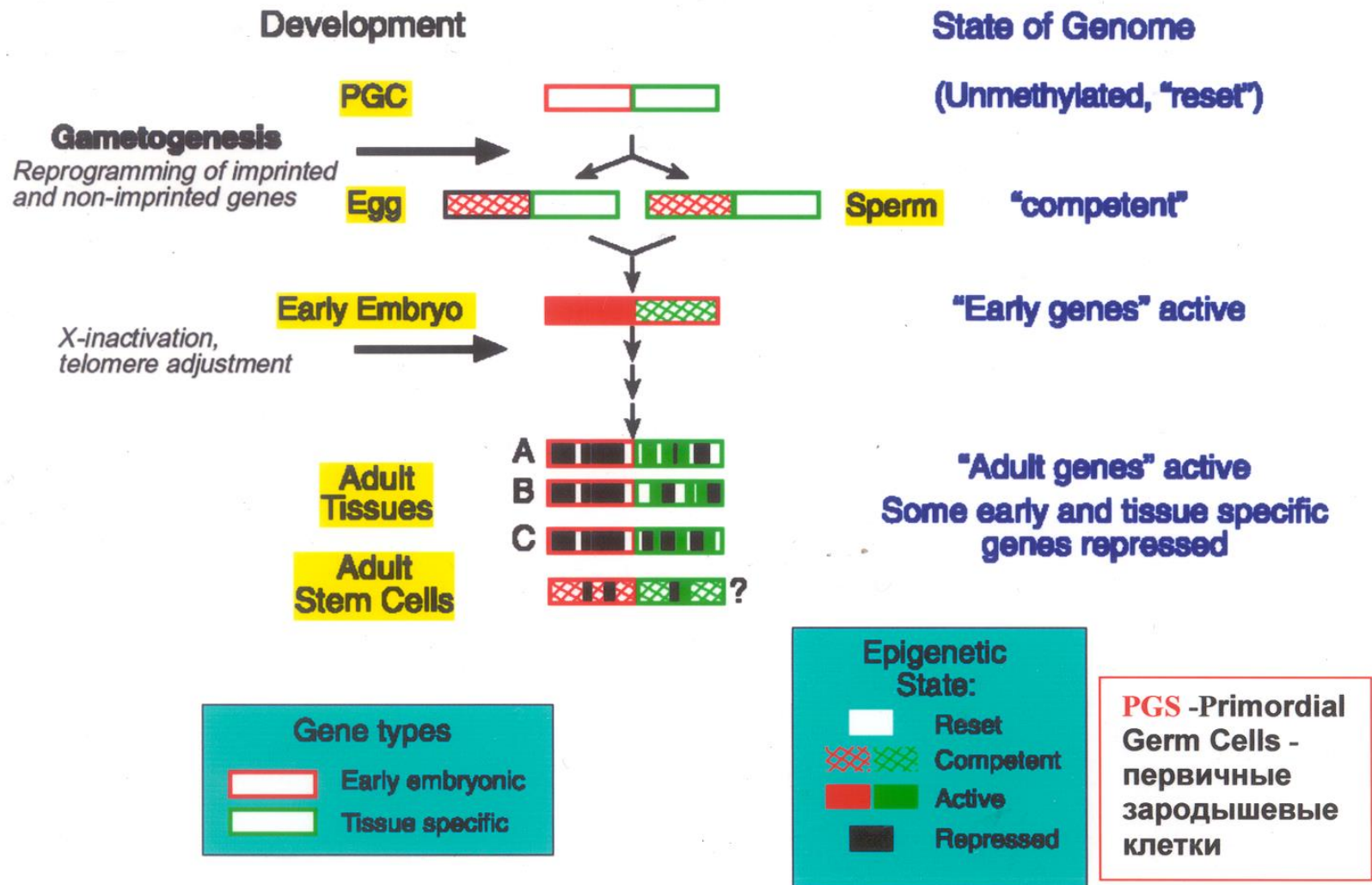
Клоны поросят, полученные вручную и традиционным методом



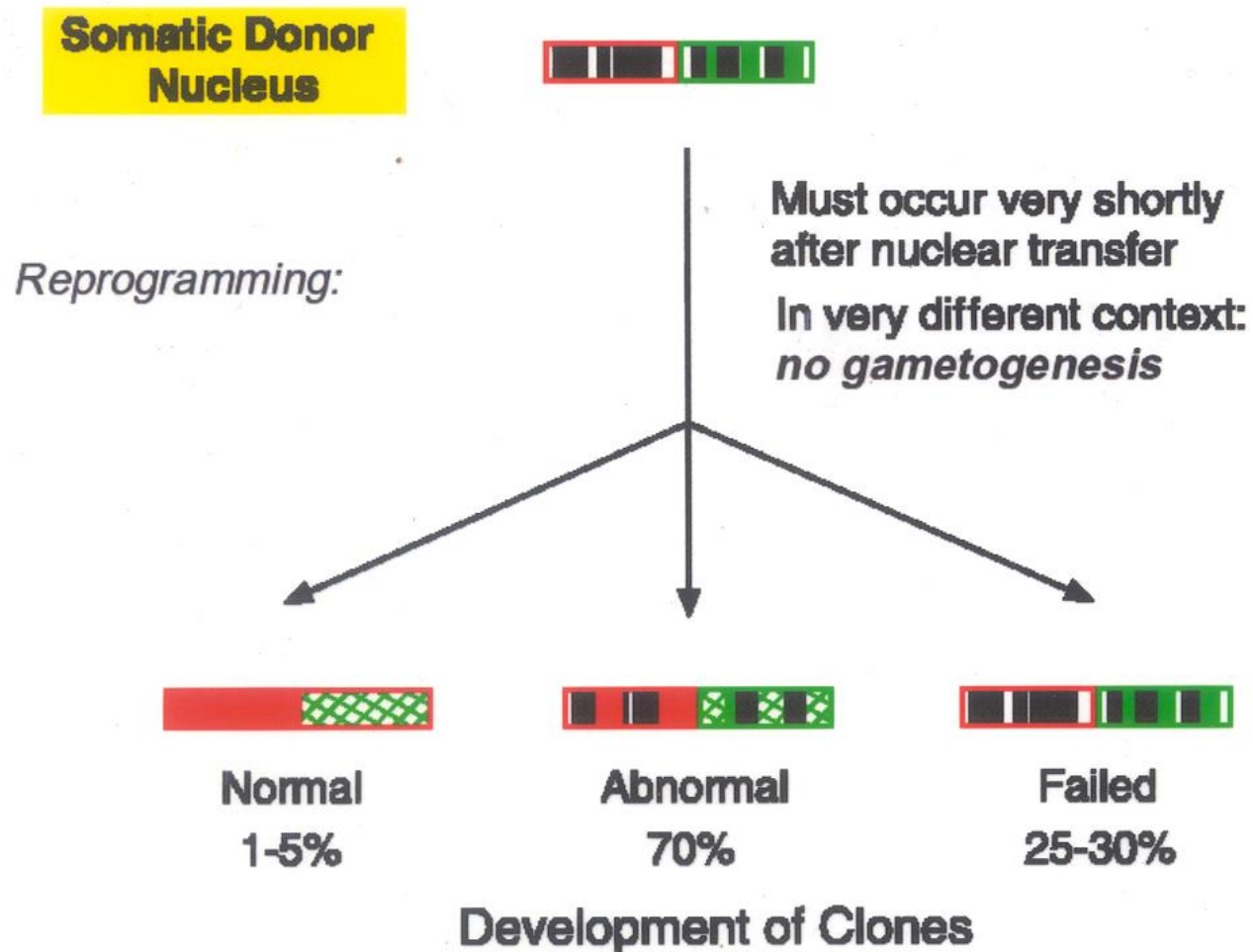
Основные патологические фенотипы, отмеченные у клонированных животных

Organ	Cattle	Sheep	Goats	Pigs	Mice
Cloning efficiency (%)	0–5	0.4–4.3	0.7–7.2	0.1–0.9	0.2–5.8
Placenta	Impaired development, oedematous cotyledons, enlarged umbilical vessels, hydrallantois	Reduced vascularity	–	–	Placentomegaly
BW	Higher	–	–	Lower	–
Heart	RV enlargement	Hypertrophy	–	RV enlargement	–
Lungs	Hypertension¶	Hypertension, MPV	Pneumonia	–	Pneumonia
CNS	–	Pathology	–	–	–
Kidneys	Abnormalities (including size abnormalities)	Defects, hydronephrosis	–	–	–
HLS	Lymphoid hypoplasia, anaemia	–	–	–	Immune impairment
Endocrine	Diabetes	–	–	–	–
Liver	Fibrosis, fatty liver	Enlargement, BDP, fibrosis	–	–	Hepatic necrosis
MS	Limb deformities	Body-wall defects	–	–	–

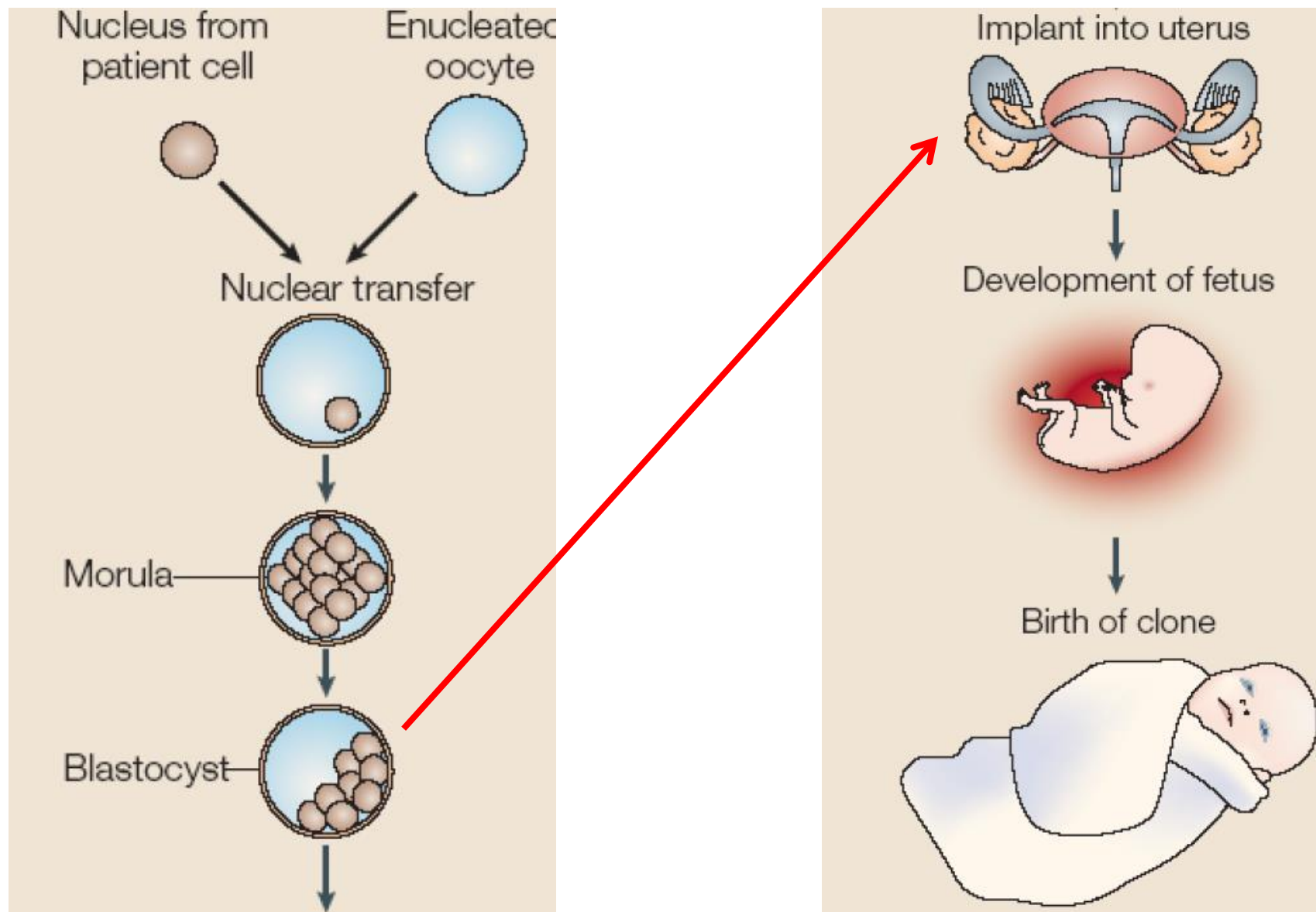
Программирование генома в нормальном развитии



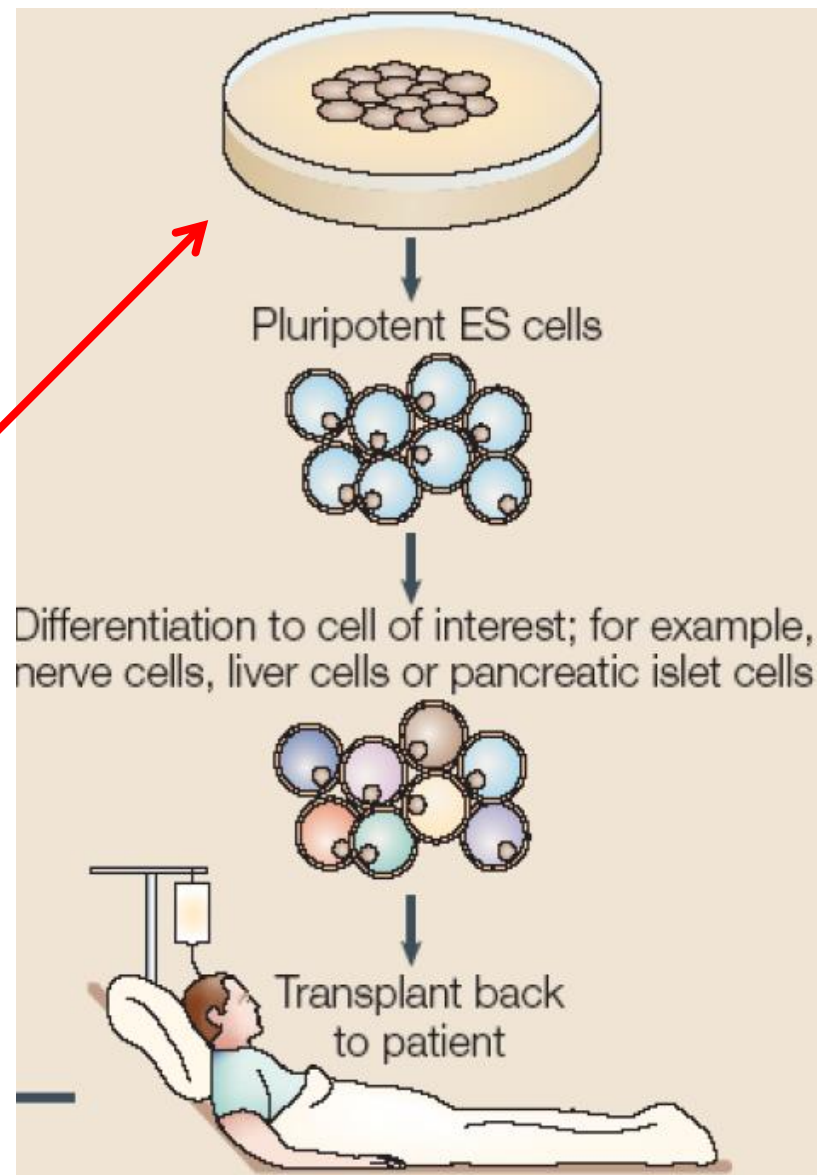
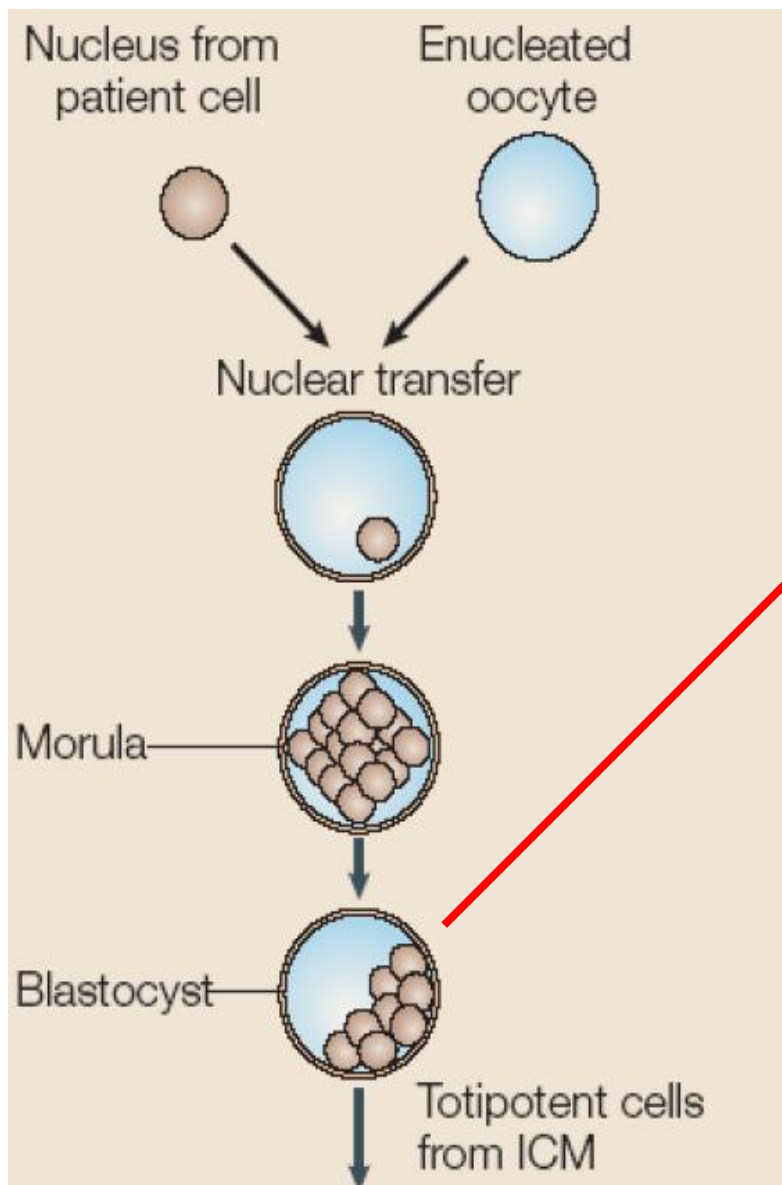
Перепрограммирование генома соматических клеток после пересадки ядер



Репродуктивное клонирование человека



Нерепродуктивное (терапевтическое) клонирование человека



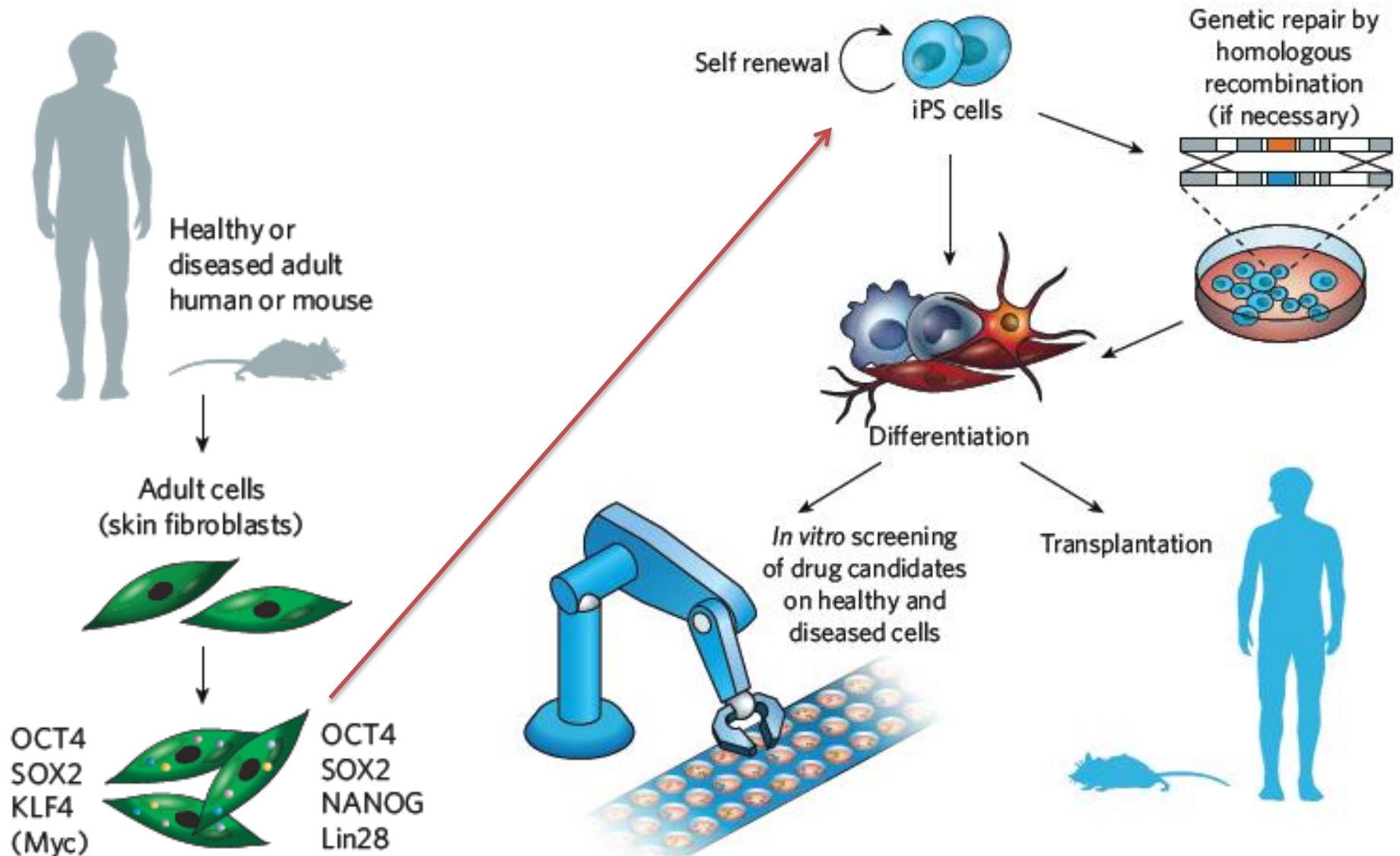
У Сук Хван приносит извинения за допущенные фальсификации и прощается с Сеульским университетом



*Хван У Сук с клонированным Снаппи
(афганская борзая)*

За последние годы в Южной Корее
удалось клонировать корову, кота,
свинью, волка и койота

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) и их трансплантация в целях терапии



Резюме

- ❖ С появлением генной инженерии начался новый этап эволюции биосферы Земли, все последствия которого мы не в состоянии предвидеть
- ❖ Руками человека Природа пытается познать и усовершенствовать самую себя
- ❖ Синтетическая биология – венец генной инженерии. Виртуальный отбор наилучших вариантов
- ❖ Сверхразум и сверхчеловек *VS* катастрофы
- ❖ Жизнь на Земле бессмертна

Трансгенные растения



**В основе искусственного
трансгенеза у растений
как и у животных
лежит концепция эмбриональных
стволовых клеток**

Основные этапы получения трансгенных растений

