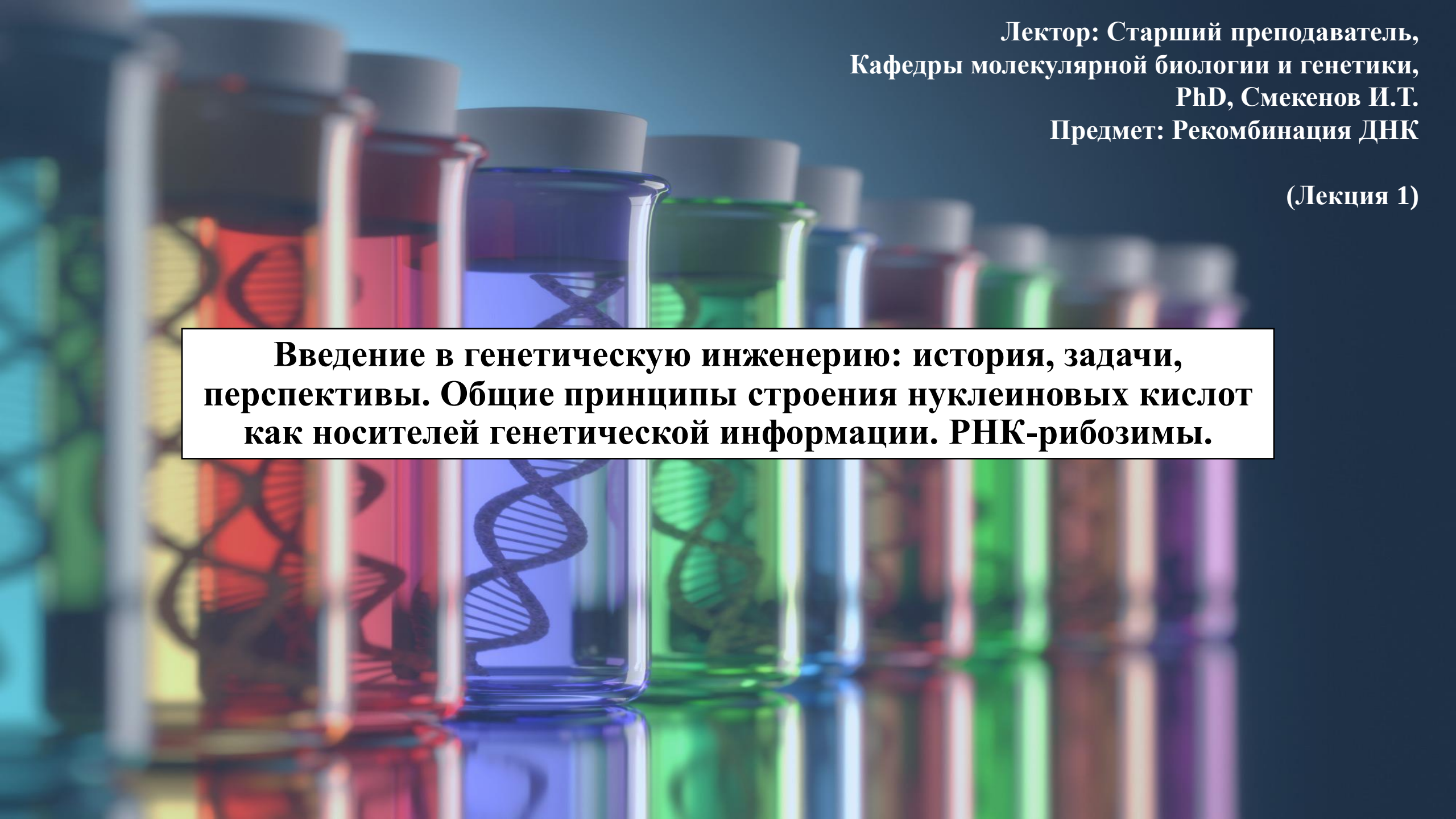




Лектор: Старший преподаватель,
Кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Сmekенов И.Т.
Предмет: Рекомбинация ДНК

(Лекция 1)

Введение в генетическую инженерию: история, задачи, перспективы. Общие принципы строения нуклеиновых кислот как носителей генетической информации. РНК-рибозимы.

ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Объяснить основы генетических технологий и их применение, а также рассмотреть строение и функционирование нуклеиновых кислот, включая роль рибозимов и центральную догму молекулярной биологии.

ЗАДАЧИ

- ☒ Изучить общие принципы строения нуклеиновых кислот и их роль в хранении и передаче генетической информации.
- ☒ Рассмотреть различия между ДНК и РНК, включая их структурные и функциональные особенности.
- ☒ Обсудить рибозимы, их примеры и значимость в молекулярной биологии, включая рибосомы как рибозимы.

Ключевые термины

Генетические технологии, Нуклеиновые кислоты, ДНК, РНК, Рибозимы, Рибосома, Центральная догма молекулярной биологии.

✓ **Введение.**

Генетические технологии — это совокупность методов, позволяющих изменять, изучать и использовать генетический материал живых организмов. Они лежат в основе современной биотехнологии, медицины и сельского хозяйства.

✓ **Генетические технологии и их применение.**

Применяются для создания генетически модифицированных организмов (ГМО), разработки вакцин, диагностики наследственных заболеваний, генной терапии и производства рекомбинантных белков. Основные методы включают клонирование генов, ПЦР, секвенирование, редактирование генома (CRISPR-Cas9, TALEN, ZFN).

✓ **Общие принципы строения нуклеиновых кислот.**

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) — полимеры, состоящие из нуклеотидов, каждый из которых включает азотистое основание, сахар и фосфатную группу. Их основная функция — хранение, передача и реализация генетической информации.

✓ **Различия между ДНК и РНК.**

ДНК содержит дезоксирибозу, а РНК — рибозу. ДНК — двойная спираль, РНК чаще одноцепочечна. В ДНК тимин заменяет урацил, присутствующий в РНК. ДНК — носитель наследственной информации, РНК участвует в её реализации (тРНК, рРНК, мРНК и др.).

✓ **РНК-рибозимы.**

Рибозимы — это РНК, обладающие каталитической активностью. Они способны разрезать и лигировать нуклеотидные цепи без участия белков. Их открытие подтвердило гипотезу о «РНК-мире», где РНК могла одновременно служить и генетическим материалом, и катализатором.

✓ **Рибосома как рибозим.**

Рибосома, ключевой элемент в синтезе белков, представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс. Каталитическая активность рибосомы (образование пептидных связей) обеспечивается её рРНК-компонентом, что делает её естественным рибозимом.

✓ **Центральная догма молекулярной биологии.**

Генетическая информация передаётся в направлении:

ДНК → РНК → Белок.

Это отражает процессы репликации, транскрипции и трансляции, обеспечивающие непрерывность и реализацию наследственной информации.



ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Что такое генетические технологии и где они применяются?
- 2) В чём заключается значение нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации?
- 3) Каково химическое и структурное различие между ДНК и РНК?
- 4) Какую роль играет РНК в процессах транскрипции и трансляции?
- 5) Что такое рибозимы и каково их биологическое значение?
- 6) Почему рибосому можно считать рибозимом?
- 7) В чём суть центральной догмы молекулярной биологии и какие процессы она описывает?
- 8) Какие современные методы лежат в основе генных и молекулярных технологий?

➤ ГИ возникла в в начале 70-х годов

Генетическая инженерия – перспективное направление современной генетики, имеющее большое научное и практическое значение и лежащее в основе современной биотехнологии.



Центральная догма молекулярной биологии

Генная инженерия - это совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

Цель: конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека.

Результат: получение ГМ организмов и культур тканей, а также мутантные линии различных организмов.

➤ Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

➤ Достижения, которые обусловили рождение и успешное развитие ГИ

- Доказательство в 1944 г. О. Эйвери с соавторами роли ДНК как носителя генетической информации и открытие в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК;
- Экспериментальное подтверждение универсальности генетического кода;
- Интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой прежде всего стали бактерия *Escherichia coli*, а также ее вирусы и плазмиды;
- Отработка простых методов выделения высокоочищенных препаратов неповрежденных молекул ДНК плазмид и вирусов;
- Разработка методов введения в чувствительные клетки молекул ДНК вирусов и плазмид в биологически активной форме, обеспечивающей репликацию молекул ДНК и/или экспрессию кодируемых ими генов;
- Открытие ряда ферментов, использующих ДНК в качестве субстрата катализируемых ими реакций, особенно рестриктаз и ДНК-лигаз.

➤ Фундаментальные открытия

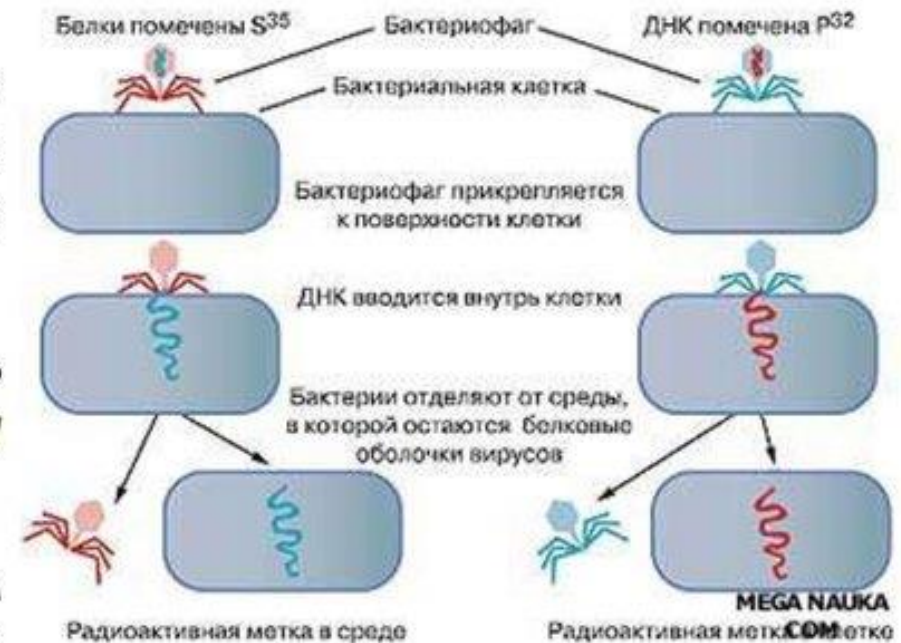
В 1923 г. увидела свет небольшая работа Ф. Гриффита, микробиолога из Оксфорда. Он описал явление «трансформации» — преобразования пневмококков, вызывающих пневмонию.



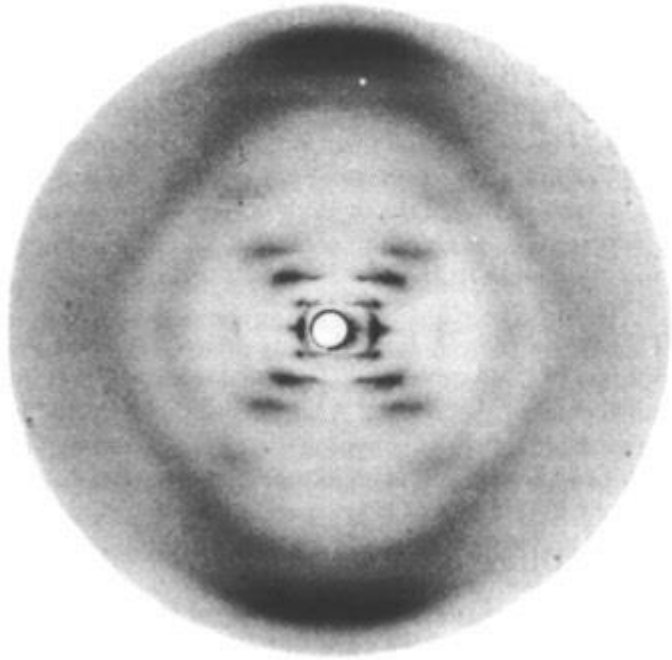
В 1944 году Эйвери, Мак Леод и Мак Карти показали, что носителем наследственной информации является ДНК.

➤ В 1952 г. Альфред Херши и Марта Чейз провели блестящий эксперимент, доказав, что наследственным материалом бактериофага T2 является ни что иное, как ДНК.

- Херши и Чейз использовали радиоизотопный метод.
- Они метили ДНК радиоактивным фосфором (^{32}P), а белки – радиоактивной серой (^{35}S).
- Сначала бактериальные клетки выращивали на питательной среде в присутствии изотопа фосфора или серы, а затем инфицировали такие клетки фагом T2.
- в потомстве фагов должны присутствовать *или* вирусные частицы с меченой ДНК, *или* белковые оболочки.
- Эти частицы выделяли из культуры и затем инфицировали мечеными фагами бактериальные клетки, выросшие на обычной среде.
- бактерии лизировались, освобождая потомство фага, меченное ^{32}P , но не ^{35}S .



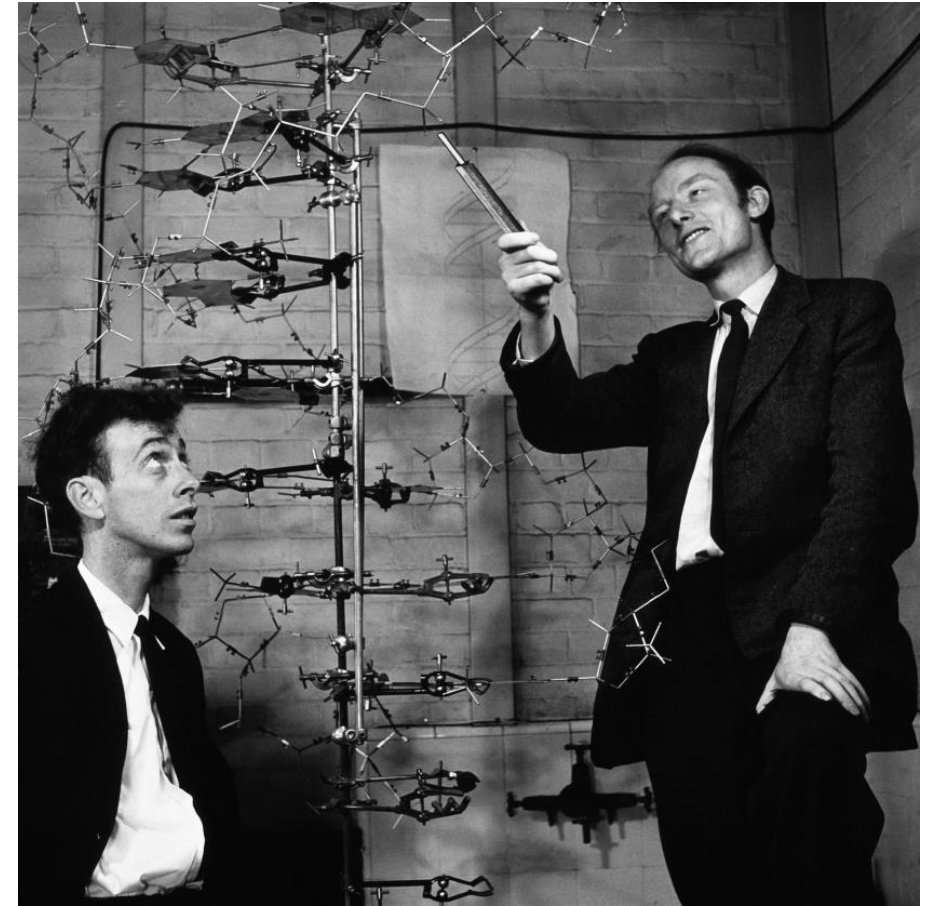
➤ Фундаментальные открытия



Именно результат, полученный Р. Франклин, сыграл решающую роль в прозрении.

Crystallographic Analysis of DNA

- ① DNA forms a helix
- ② Twists every 34 angstrom
- ③ 10 bases per twist
- ④ DNA is double stranded
- ⑤ Phosphates are on the outside



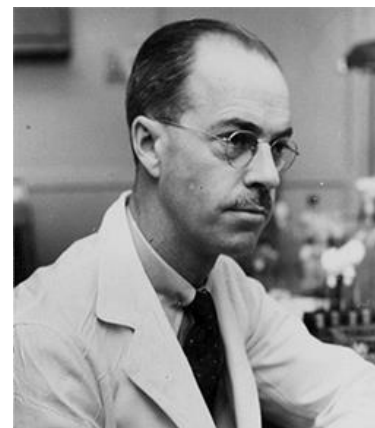
В 1953 году Дж. Уотсон и Ф. Крик создали двуспиральную модель ДНК.

➤ Фундаментальные открытия

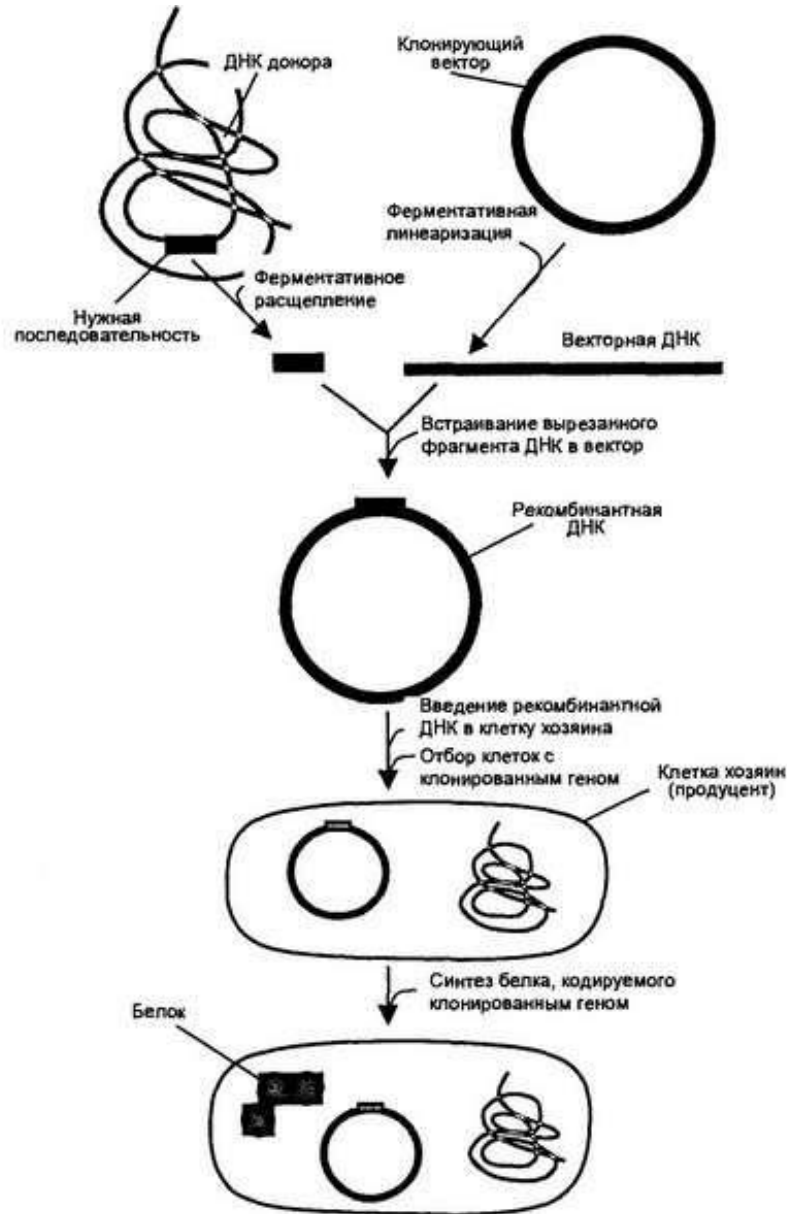
На рубеже 50 - 60-х годов были выяснены свойства генетического кода, а к концу 60-х годов его универсальность была подтверждена экспериментально.

Формально датой рождения генетической инженерии следует считать **1972** год, когда в Стенфордском университете П. Берг, С. Коэн, Х. Бойер с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага и *E. coli*.

		Second base				
		U	C	A	G	
First base	U	UUU } фенилаланин UUC } UUA } лейцин UUG }	UCU } UCC } серин UCA } UCG }	UAU } тирозин UAC } UAA } стоп-кодон UAG } стоп-кодон	UGU } цистеин UGC } UGA } стоп-кодон UGG } триптофан	U C A G
	C	CUU } лейцин CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } пролин CCA } CCG }	CAU } гистидин CAC } CAA } глутамин CAG }	CGU } CGC } аргинин CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } изолейцин AUC } AUA } AUG } метионин старт-кодон	ACU } ACC } треонин ACA } ACG }	AAU } аспарагин AAC } AAA } лизин AAG }	AGU } серин AGC } AGA } аргинин AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } валин GUA } GUG }	GCU } GCC } аланин GCA } GCG }	GAU } аспарагиновая кислота GAC } GAA } глутаминовая кислота GAG }	GGU } GGC } глицин GGA } GGG }	U C A G



➤ Стратегия генетической инженерии



- выявленные гибридных ДНК
- структурно-функциональное изучение белков и ДНК (секвенирования, Масс-спектрометрия)
- Изучения взаимодействия белков и внутриклеточную сигнализацию
- Включение данных в базу данных (Геном человека)

Молекулы ДНК, создаваемые методами генетической инженерии, часто называют **рекомбинантными ДНК** (рекДНК).

Детерминируемые гибридными генами «составные» белки, состоящие из ковалентно связанных аминокислотных последовательностей разных белков — **химерные белки**.

➤ Фундаментальные открытия

В 1978 году исследователи из компании «Genentec» впервые получили инсулин в специально сконструированном штамме кишечной палочки.

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

В 1982 году гормон роста человека был получен в культуре *E. coli* и животных клеток в институте Пастера во Франции, а с 1984 года начато промышленное производство инсулина и в СССР.

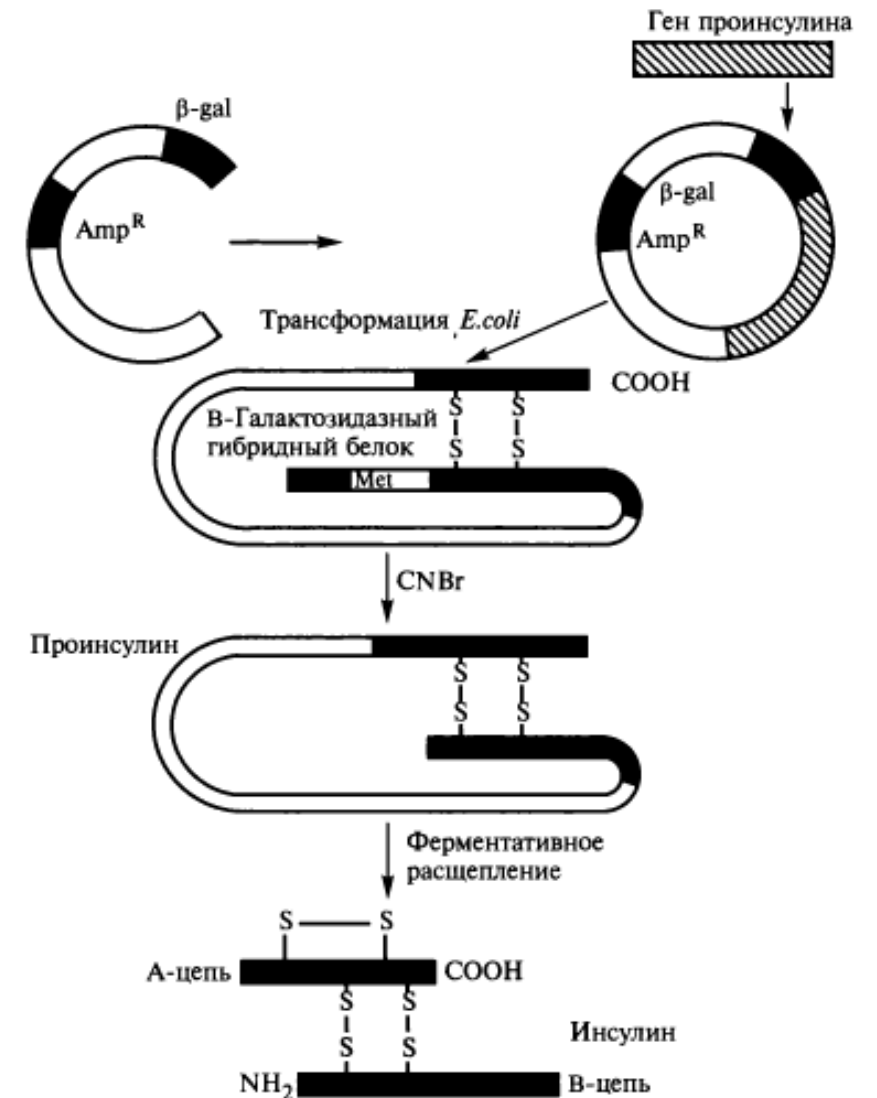
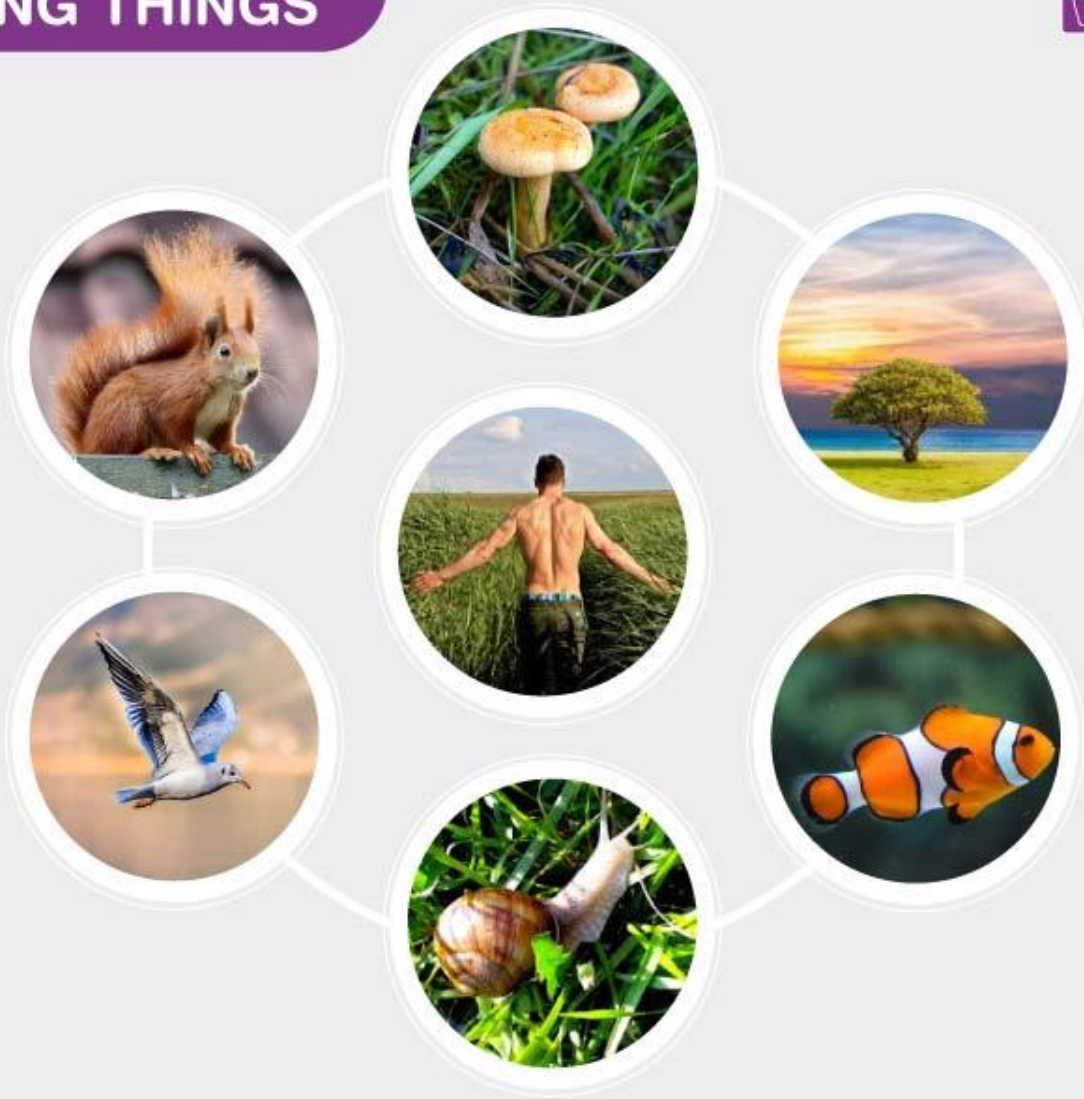


Рис. 5.11. Схема синтеза инсулина

➤ **Нуклеиновые кислоты содержатся во всех живых клетках и в вирусах.**

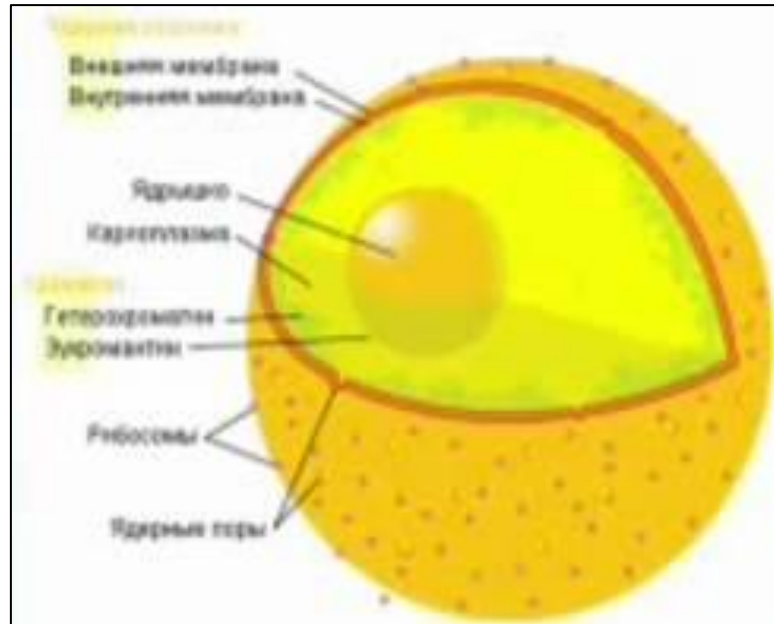
LIVING THINGS

BYJU'S
The Learning App



- Контролируют процессы наследственности и развития

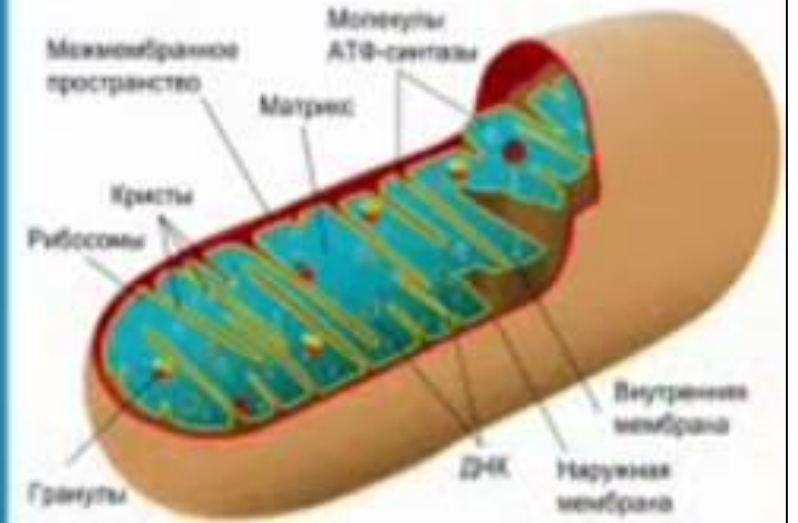
➤ Расположение нуклеиновых кислот



Ядро

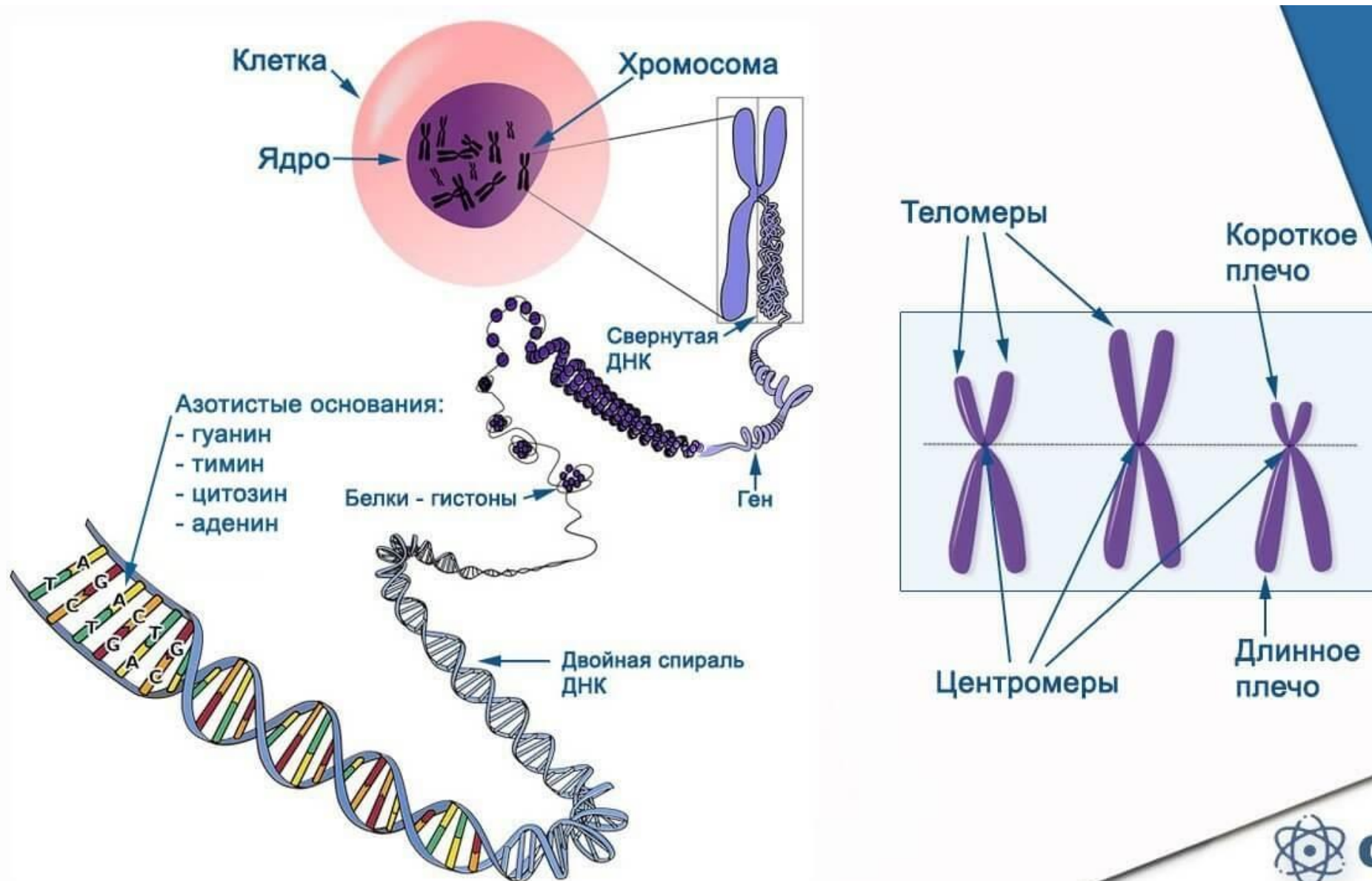


Хлоропласт

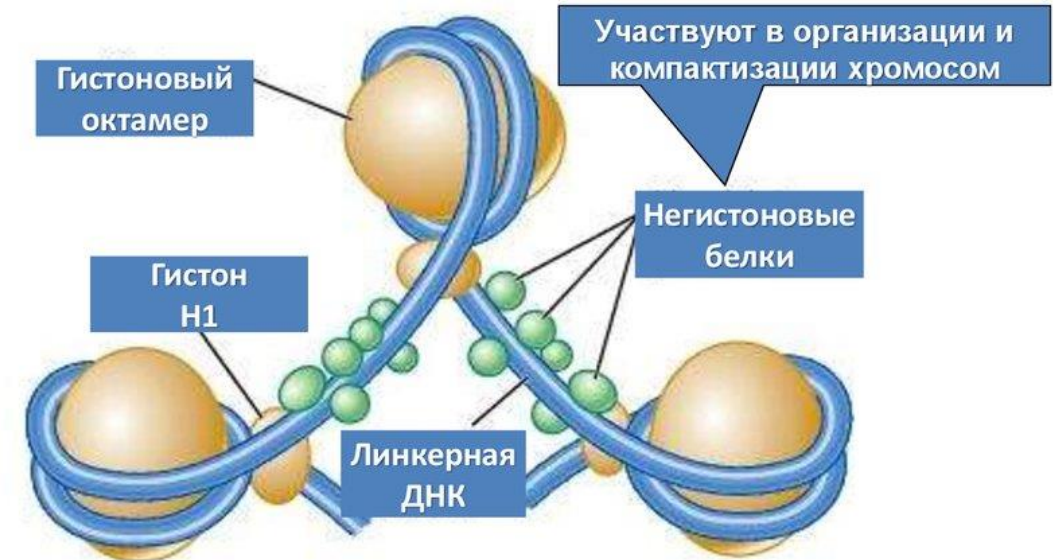
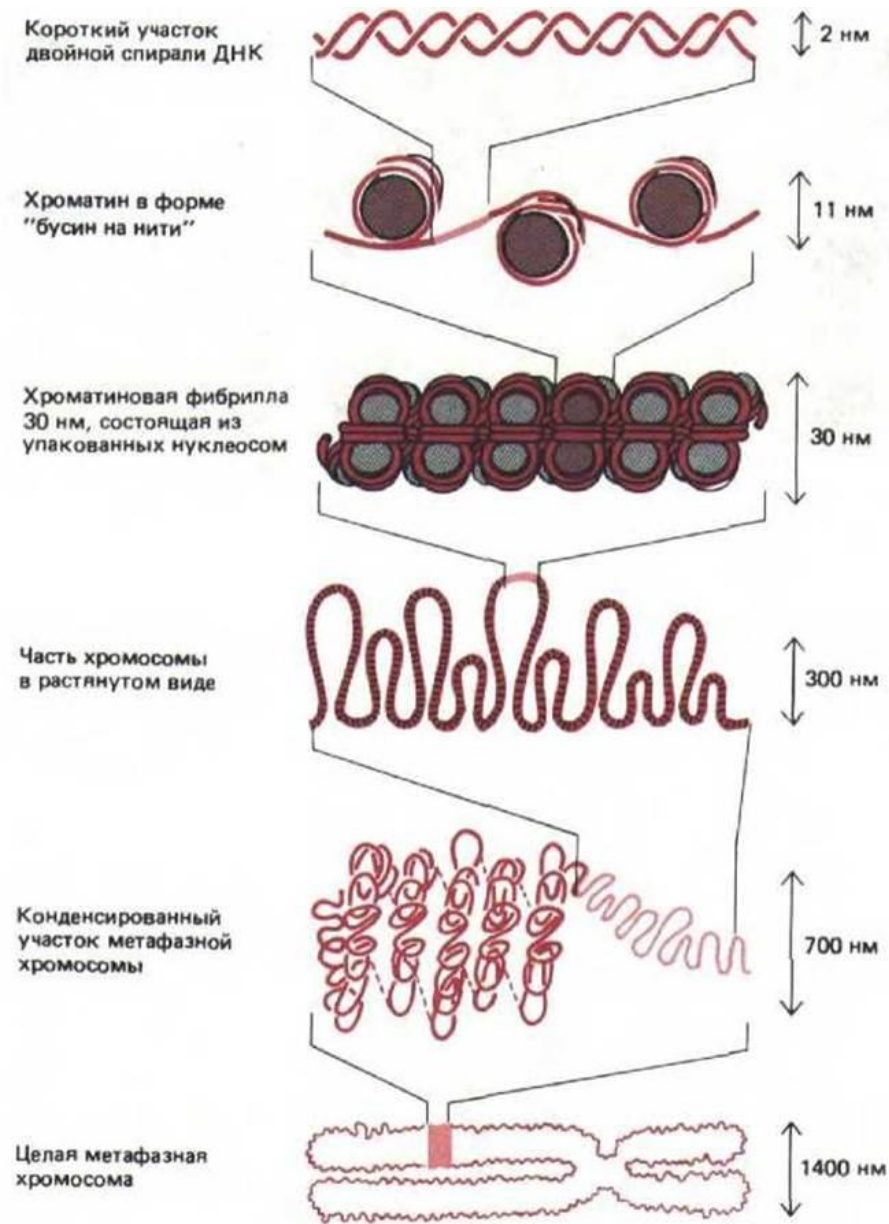


Митохондрия

➤ ДНК - это молекула, состоящая из двух полинуклеотидных цепей, которые наматываются друг на друга, образуя двойную спираль, несущую генетические инструкции.



• СТРУКТУРА ХРОМОСОМЫ ЭУКАРИОТ

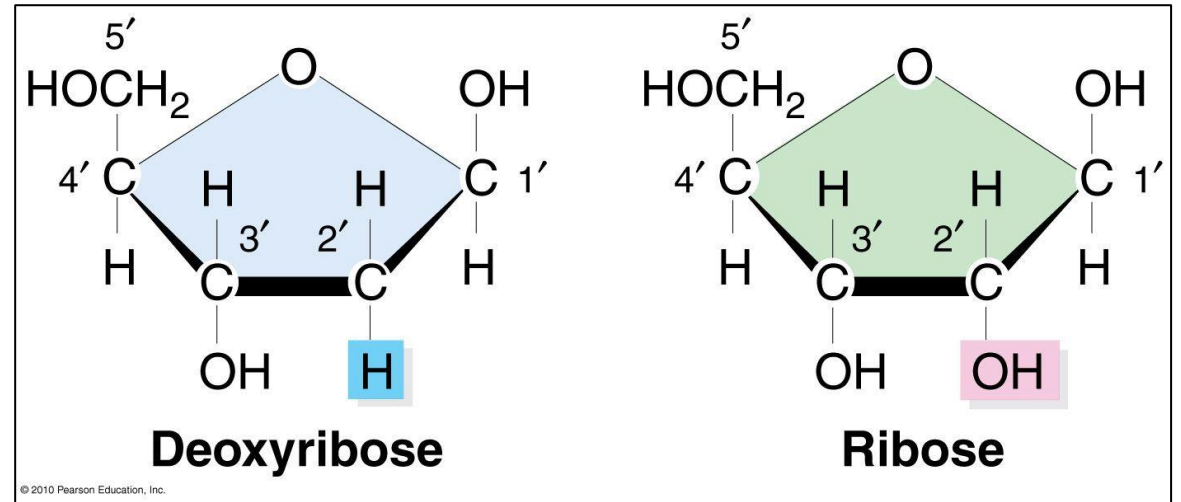
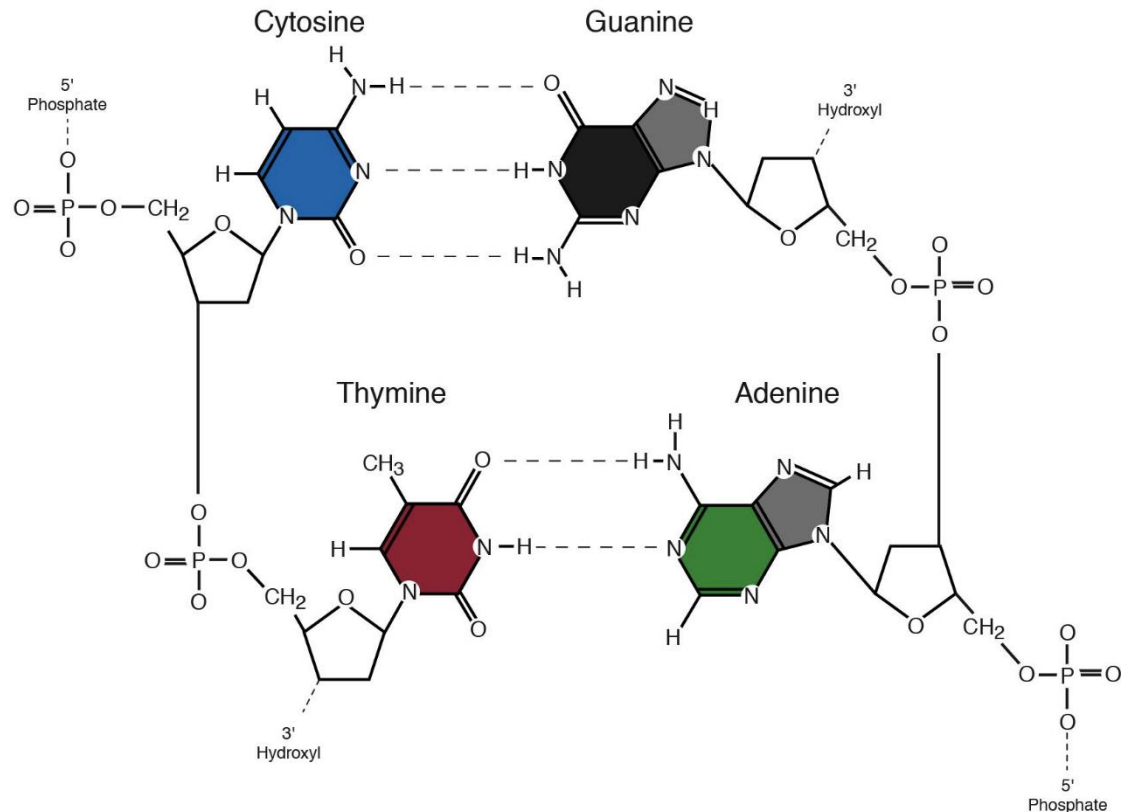
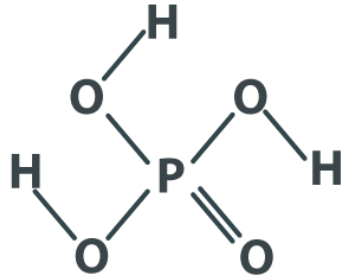
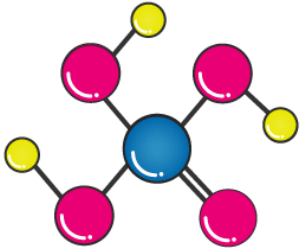


Нуклеосома показана в состоянии связи с гистонами и негистоновыми белками.

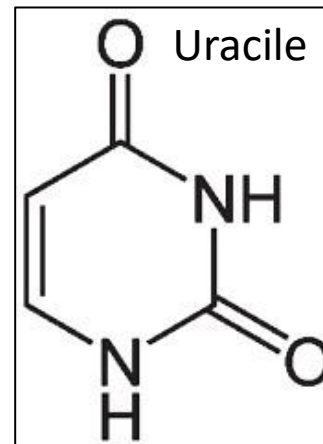
Гистон Н1 – «заклинивает» нить ДНК в области входа и выхода витка ДНК на нуклеосоме.

➤ ДНК и РНК различаются по структуре и функциям

PHOSPHORIC ACID STRUCTURE

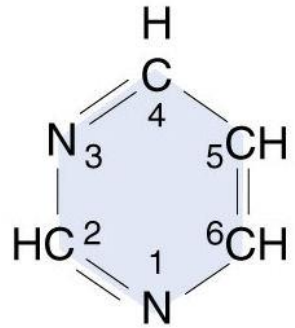


Сахар дезоксирибозы менее реакционноспособен из-за связей C-H.

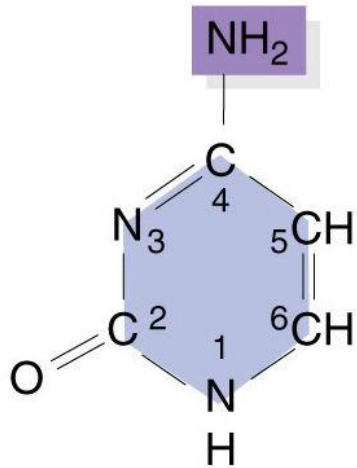


Важным свойством ДНК является то, что 3',5'-фосфодиэфирная связь углеводно-фосфатного остова молекулы наиболее чувствительна как к химическому, так и к ферментативному расщеплению.

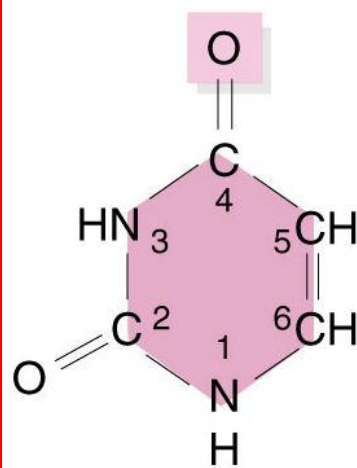
➤ Азотистые основания, содержащиеся в нуклеотидах, классифицируются как пиримидины или пурины.



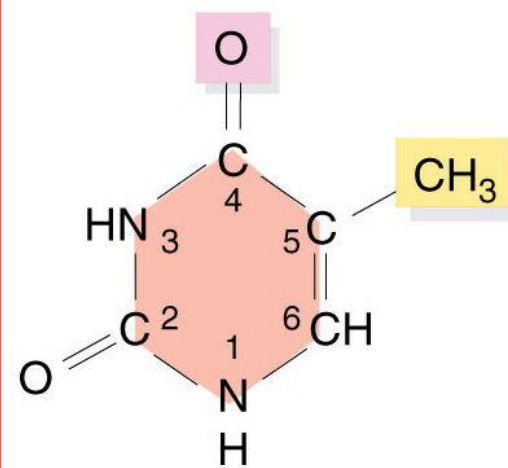
Pyrimidine



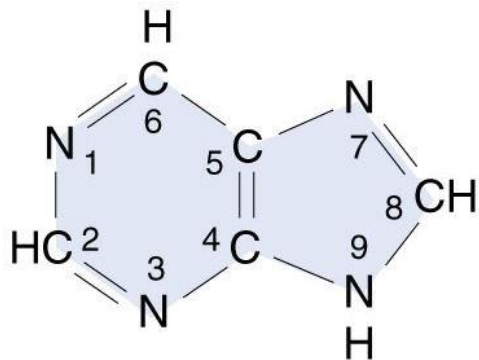
Cytosine (C)



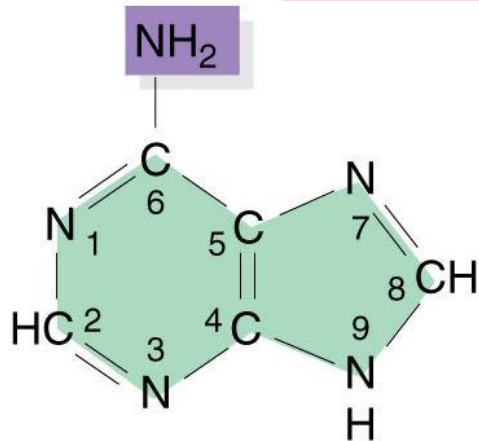
Uracil (U)
(found in RNA)



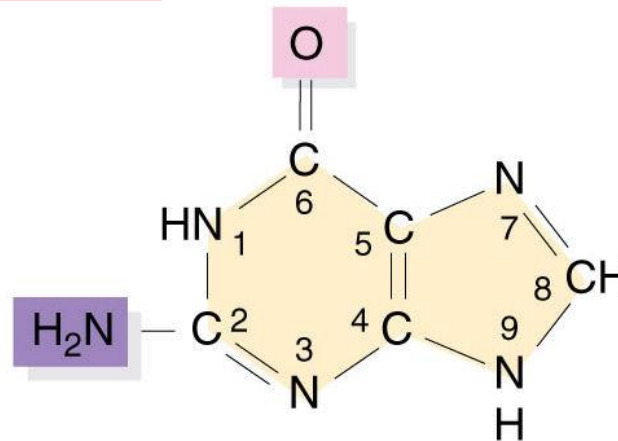
Thymine (T)
(found in DNA)



Purine

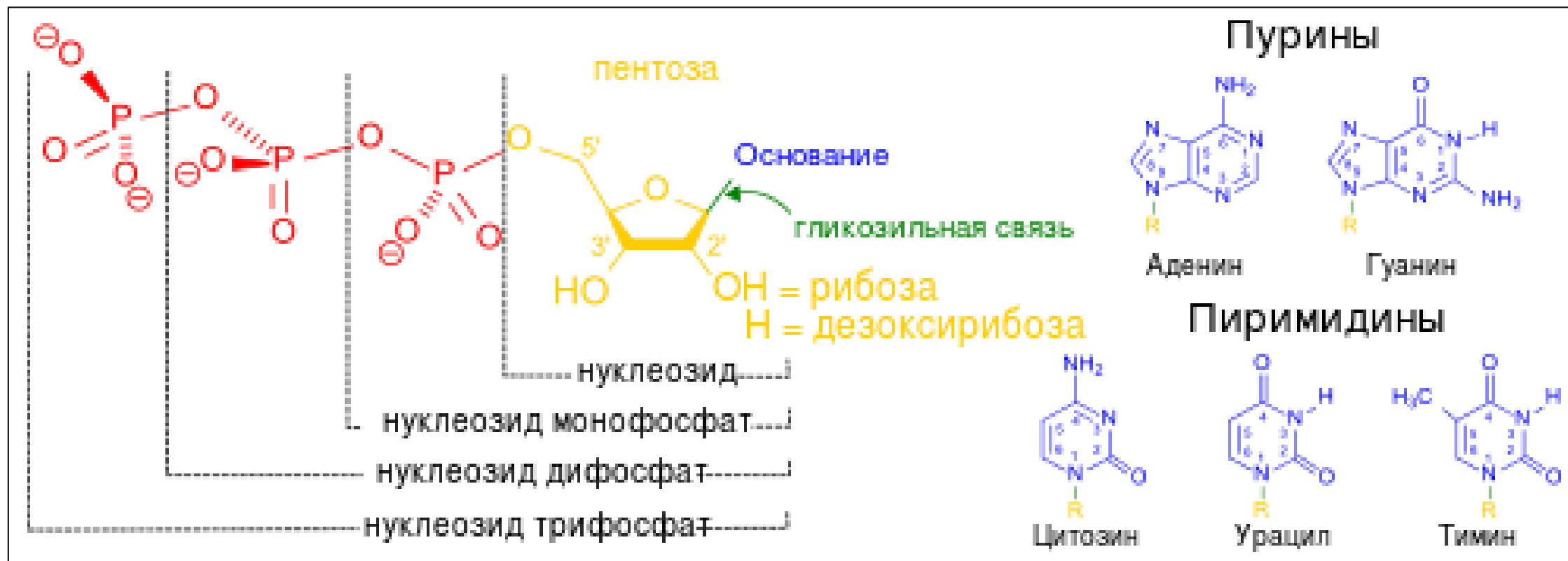


Adenine (A)

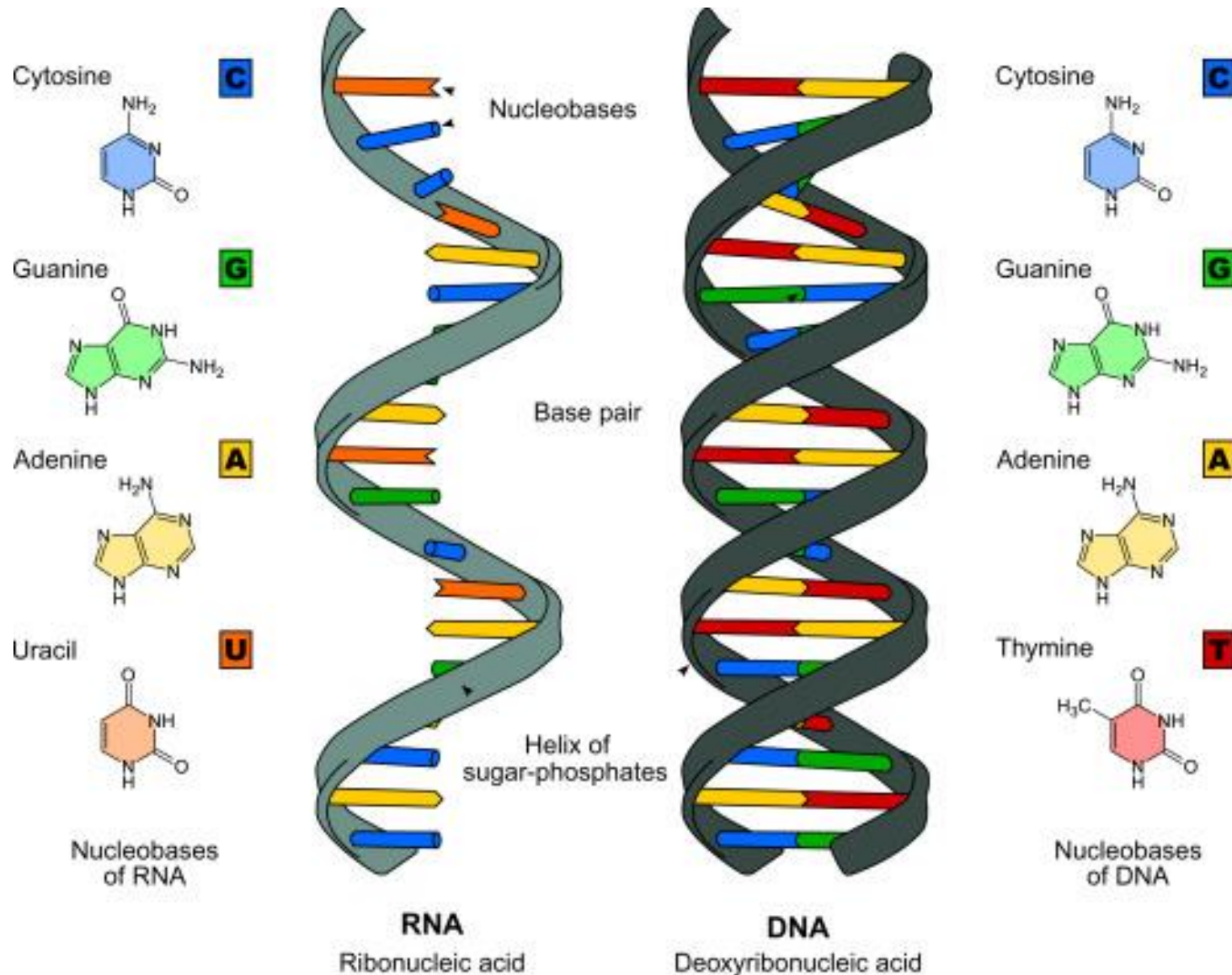


Guanine (G)

- Повторяющиеся или мономерные звенья, которые связаны вместе с образованием нуклеиновых кислот, известны как нуклеотиды.



➤ Структура ДНК и РНК

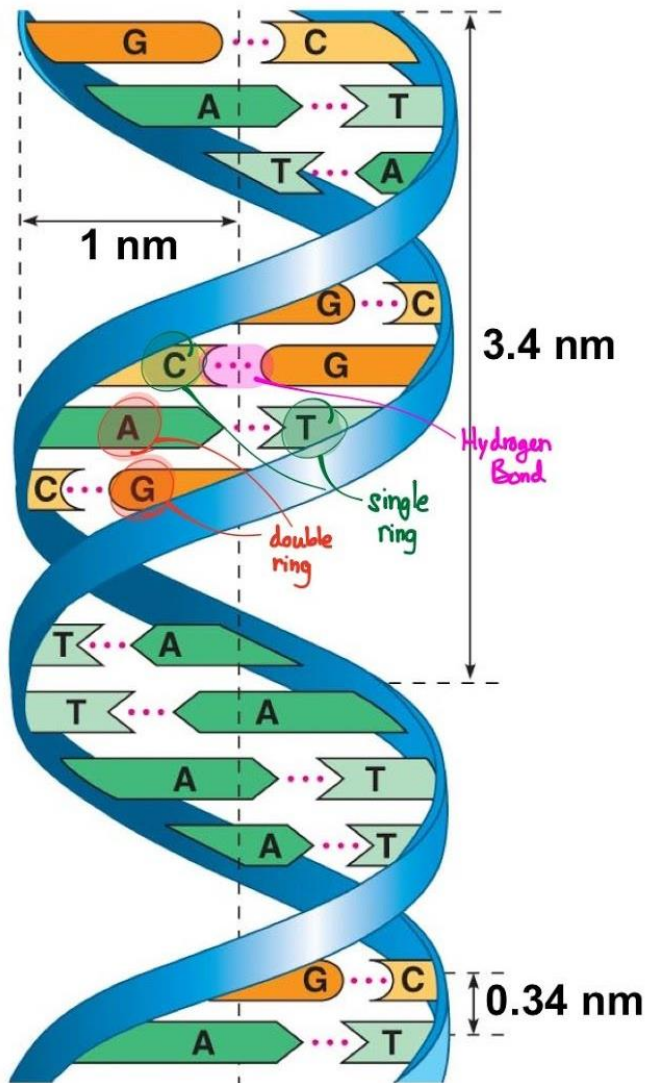


Молекула ДНК очень стабильна и обеспечивает хранение генетической информации в течение многих лет без каких-либо повреждений.

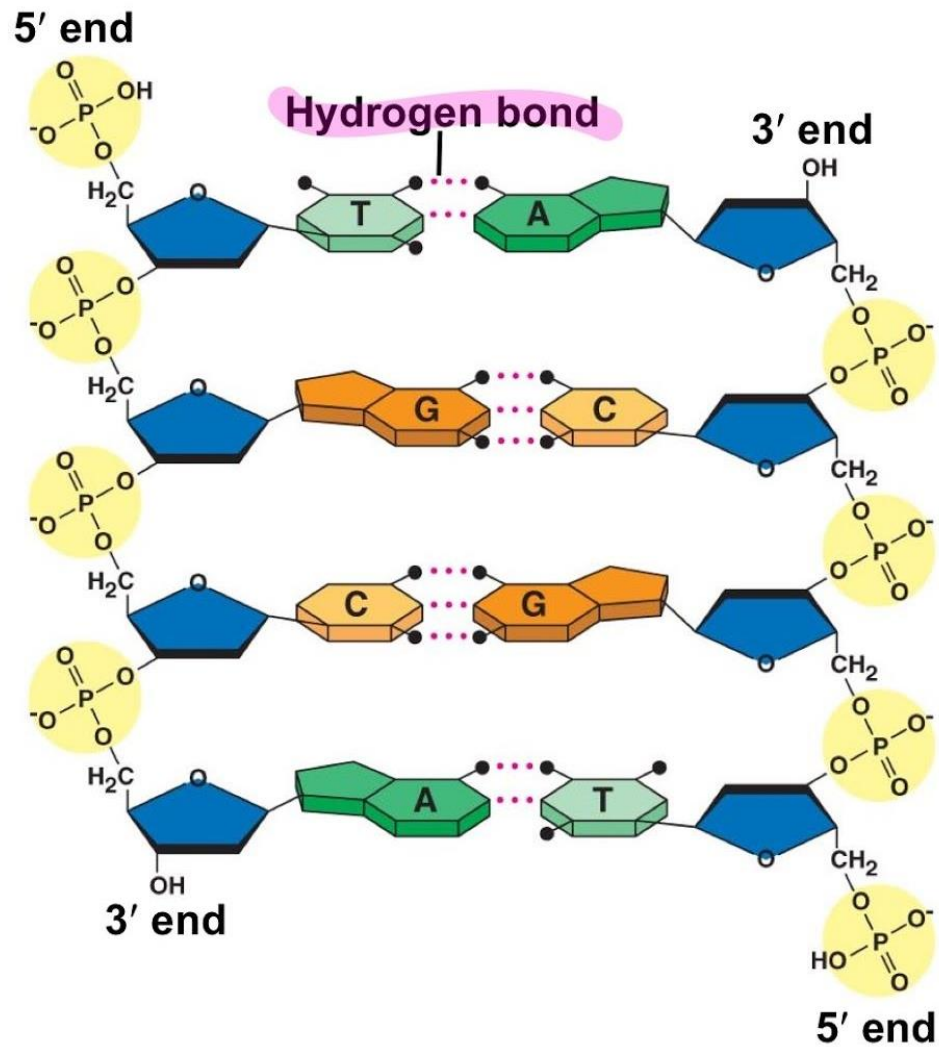
В ДНК есть небольшие бороздки, которые затрудняют прикрепление повреждающих ферментов и их атаку.

РНК легко может быть изменена путем деградации, поэтому она нестабильна.

➤ Структура ДНК

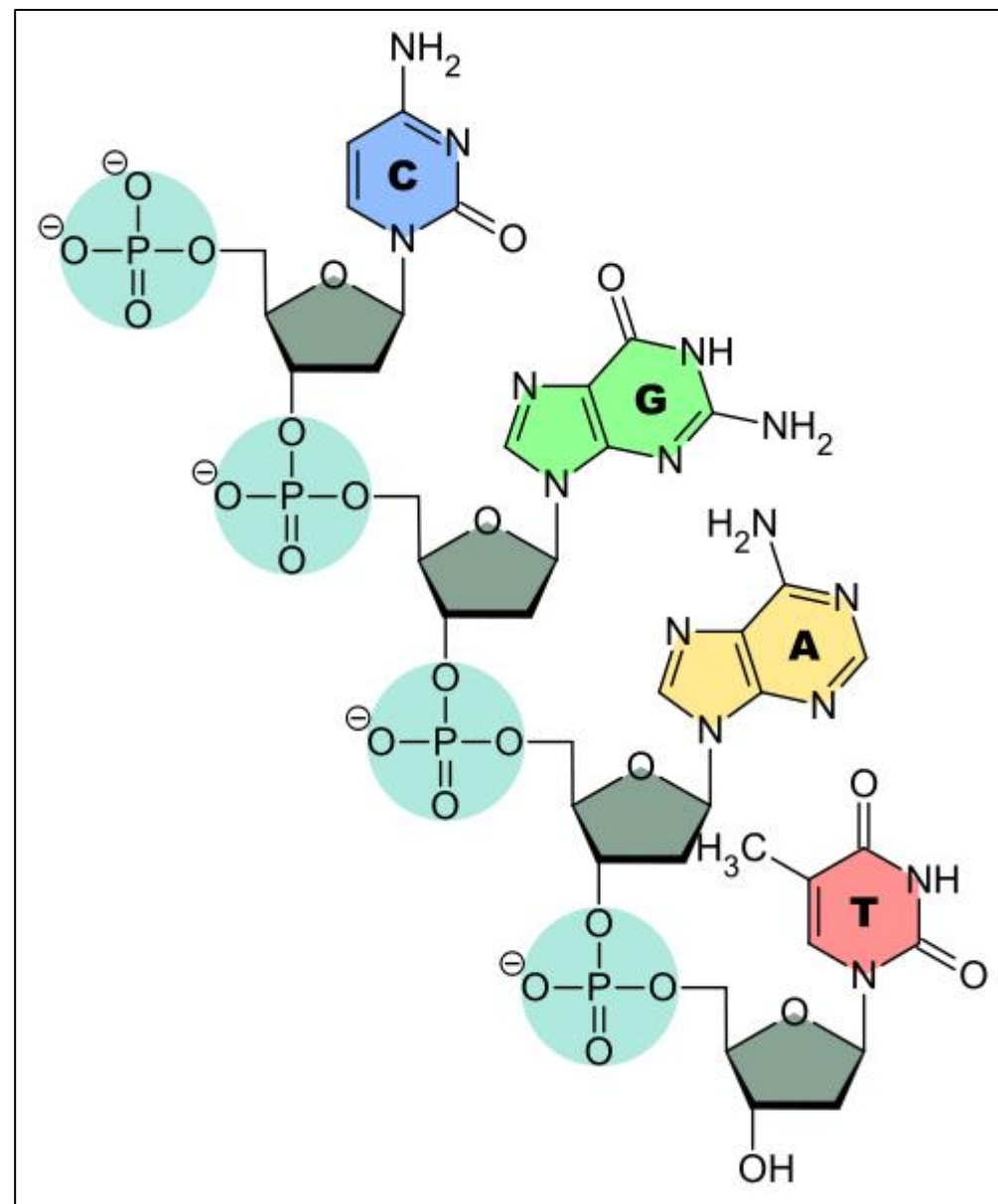
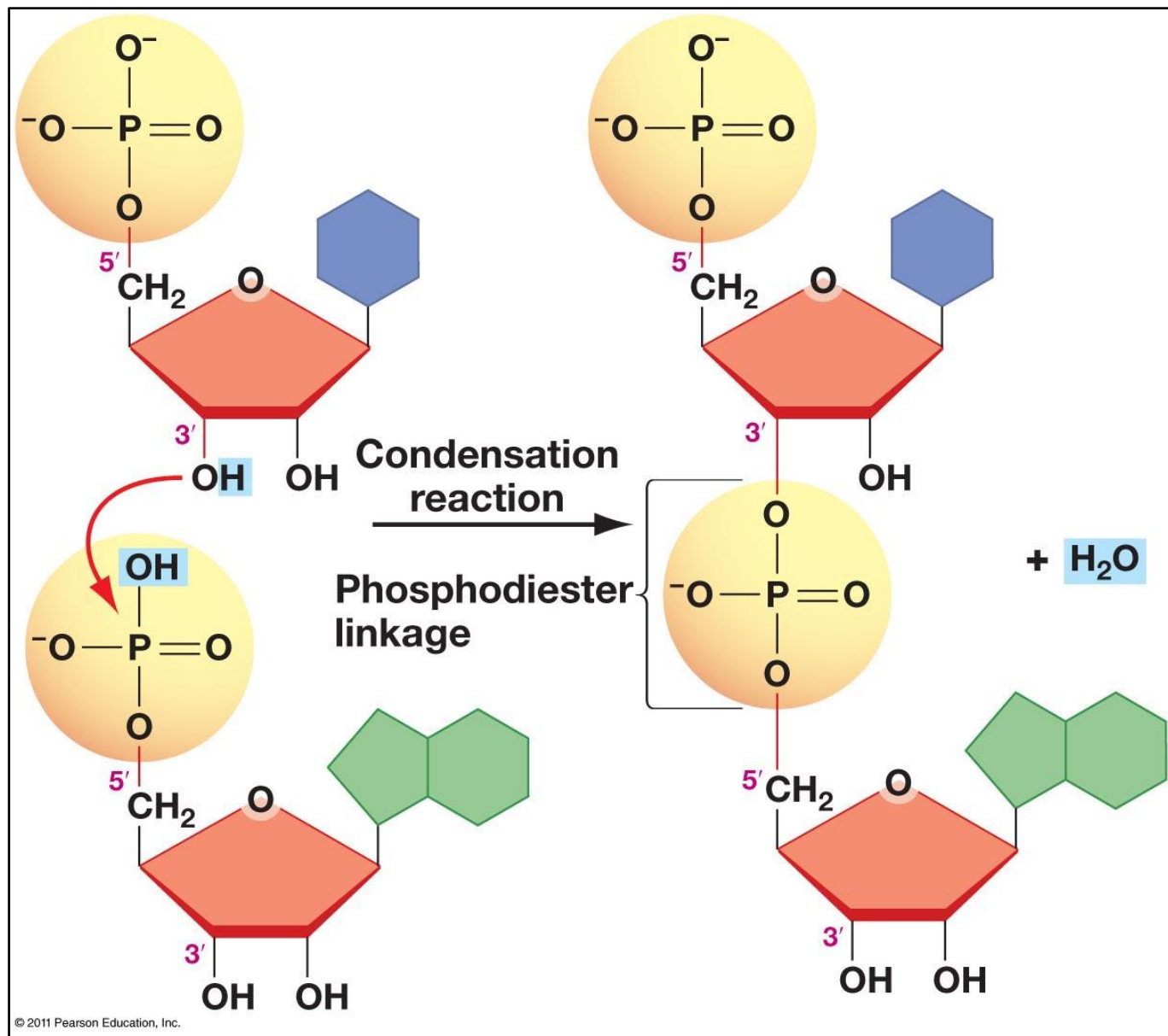


(a) Key features of DNA structure

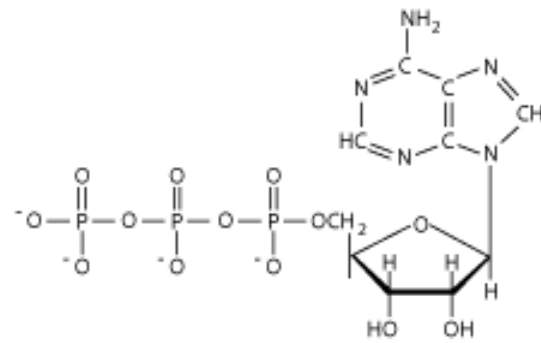


(b) Partial chemical structure

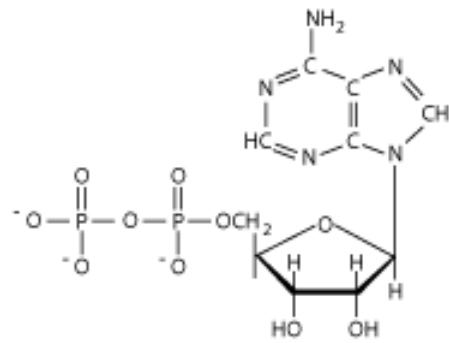
➤ Структура ДНК



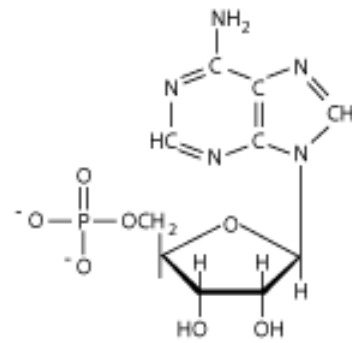
➤ Структура ДНК



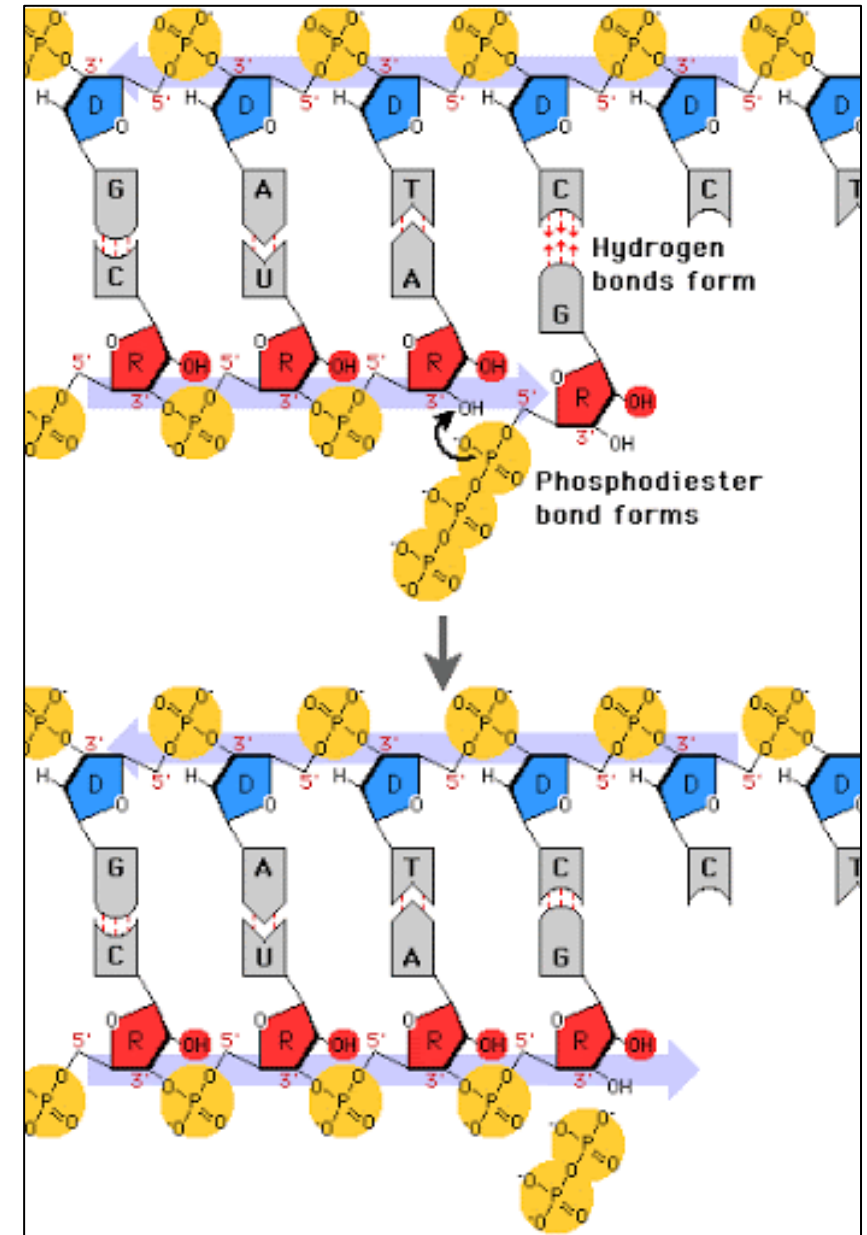
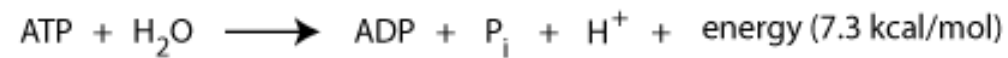
Adenosine triphosphate
(ATP)



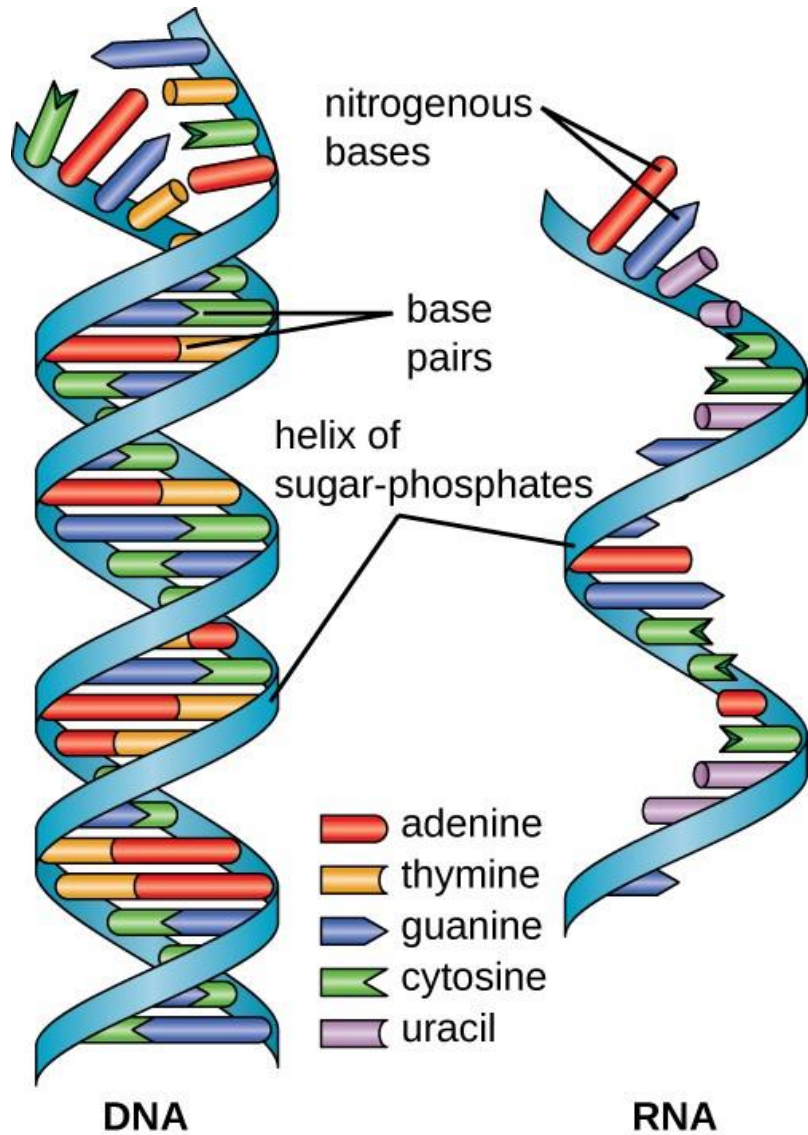
Adenosine diphosphate
(ADP)



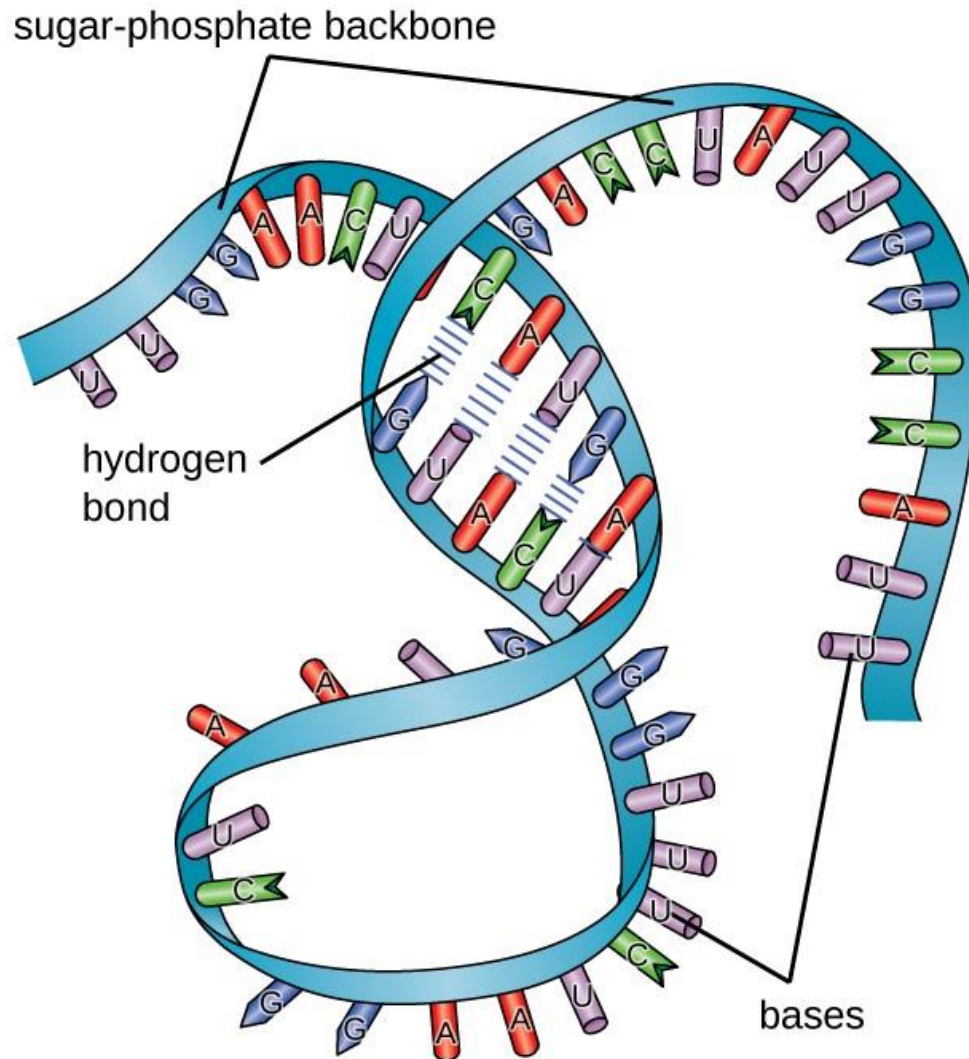
Adenosine monophosphate
(AMP)



➤ Основная функция РНК - синтез белка.



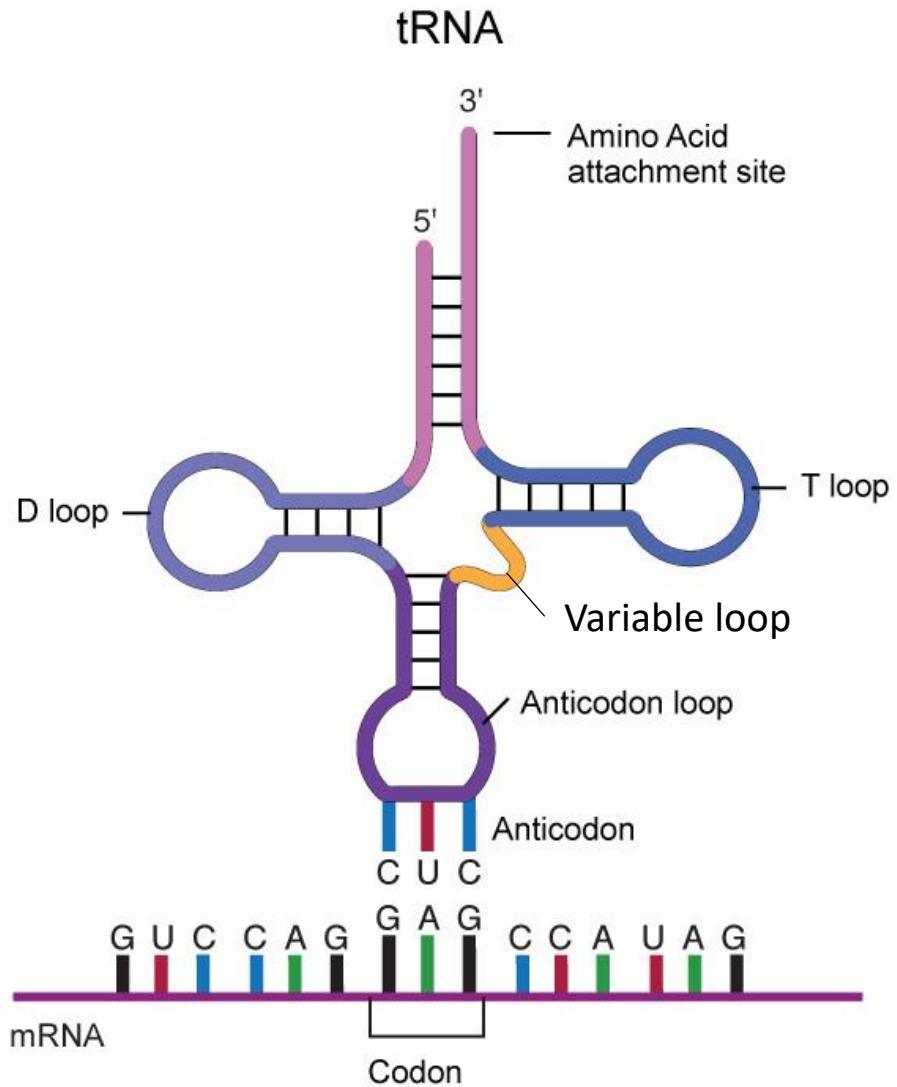
(a)



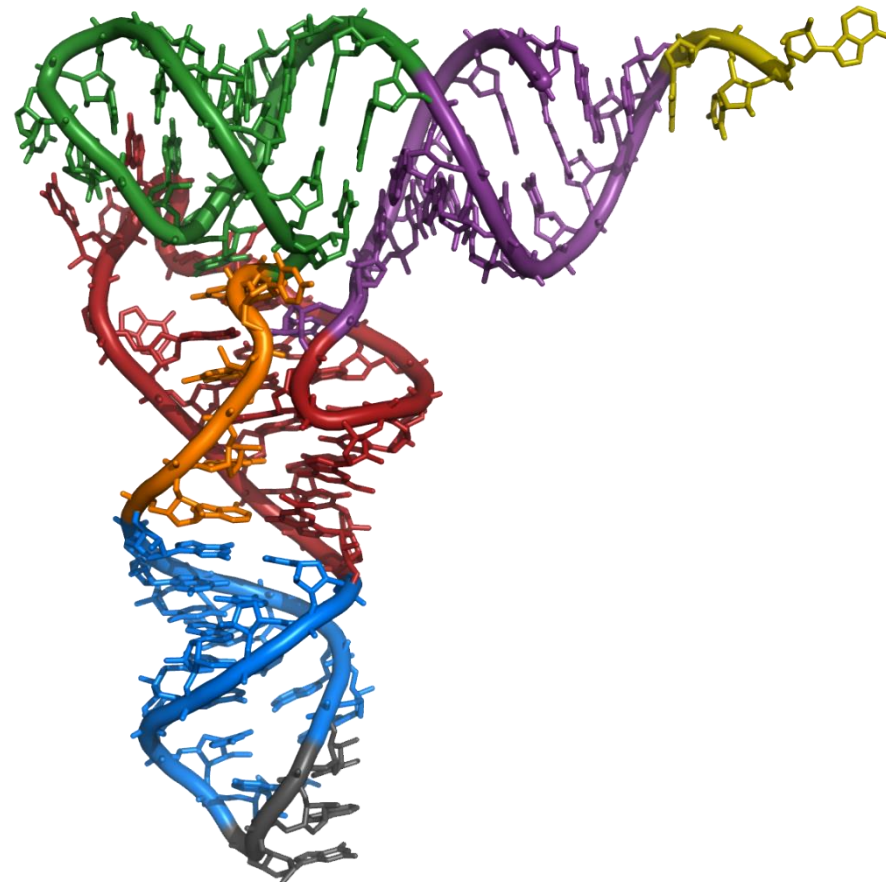
(b)

РНК участвует в пути экспрессии генов, с помощью которого генетическая информация в ДНК используется для синтеза белков, определяющих функцию клетки.

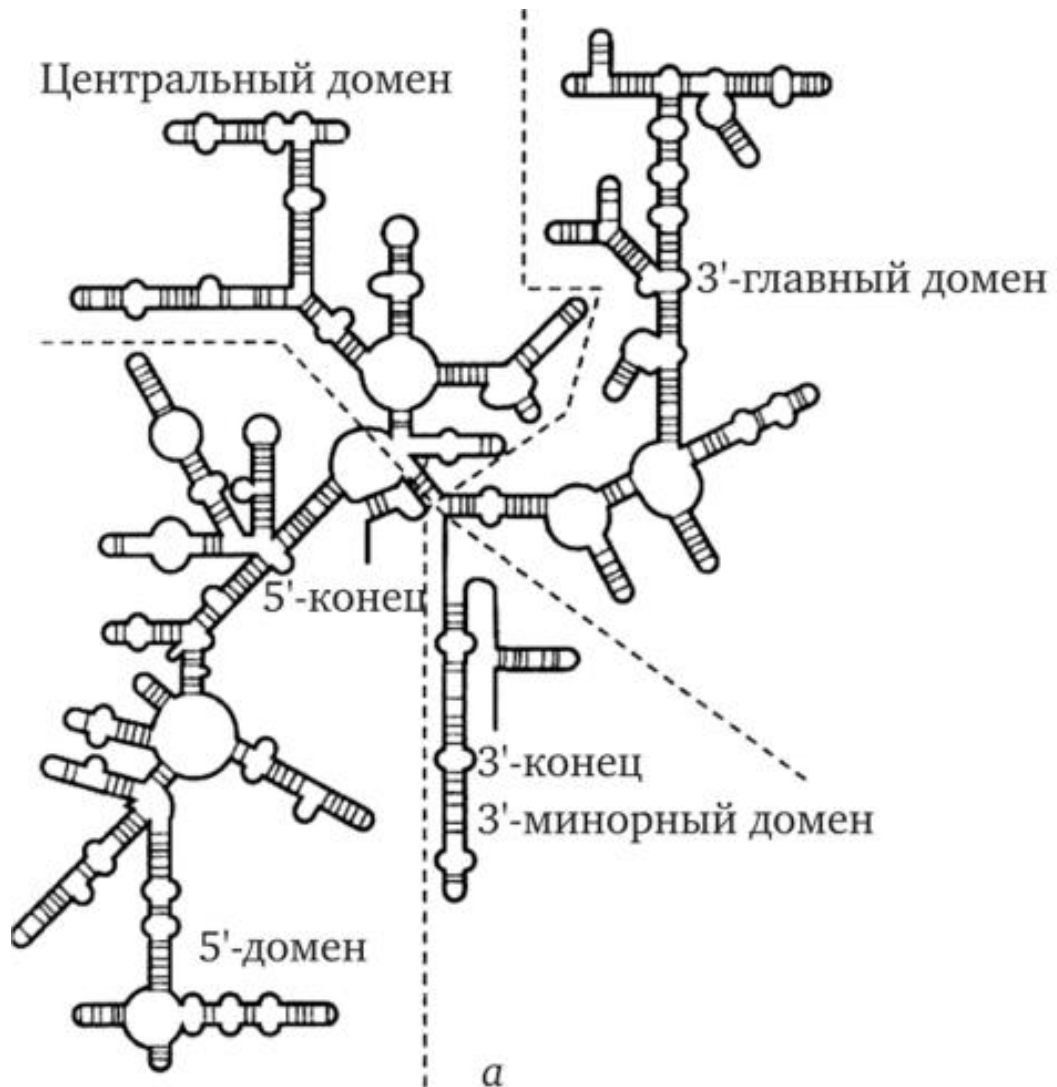
➤ Трансферная РНК (тРНК)



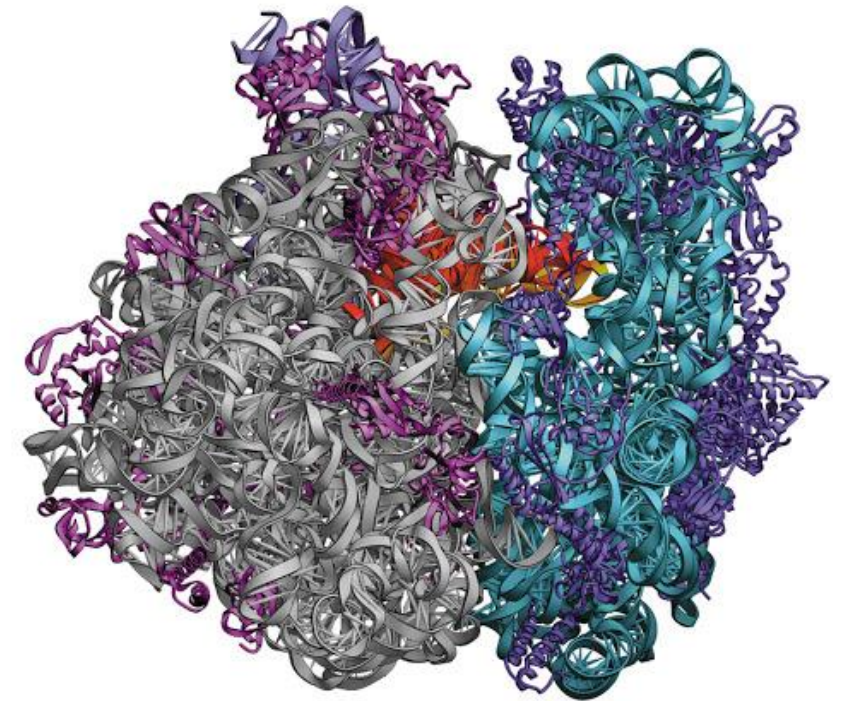
- РНК-переносчик переносит аминокислоты на рибосому.
- Это небольшие молекулы, содержащие около 75 нуклеотидов.



➤ Рибосомная РНК (рРНК)

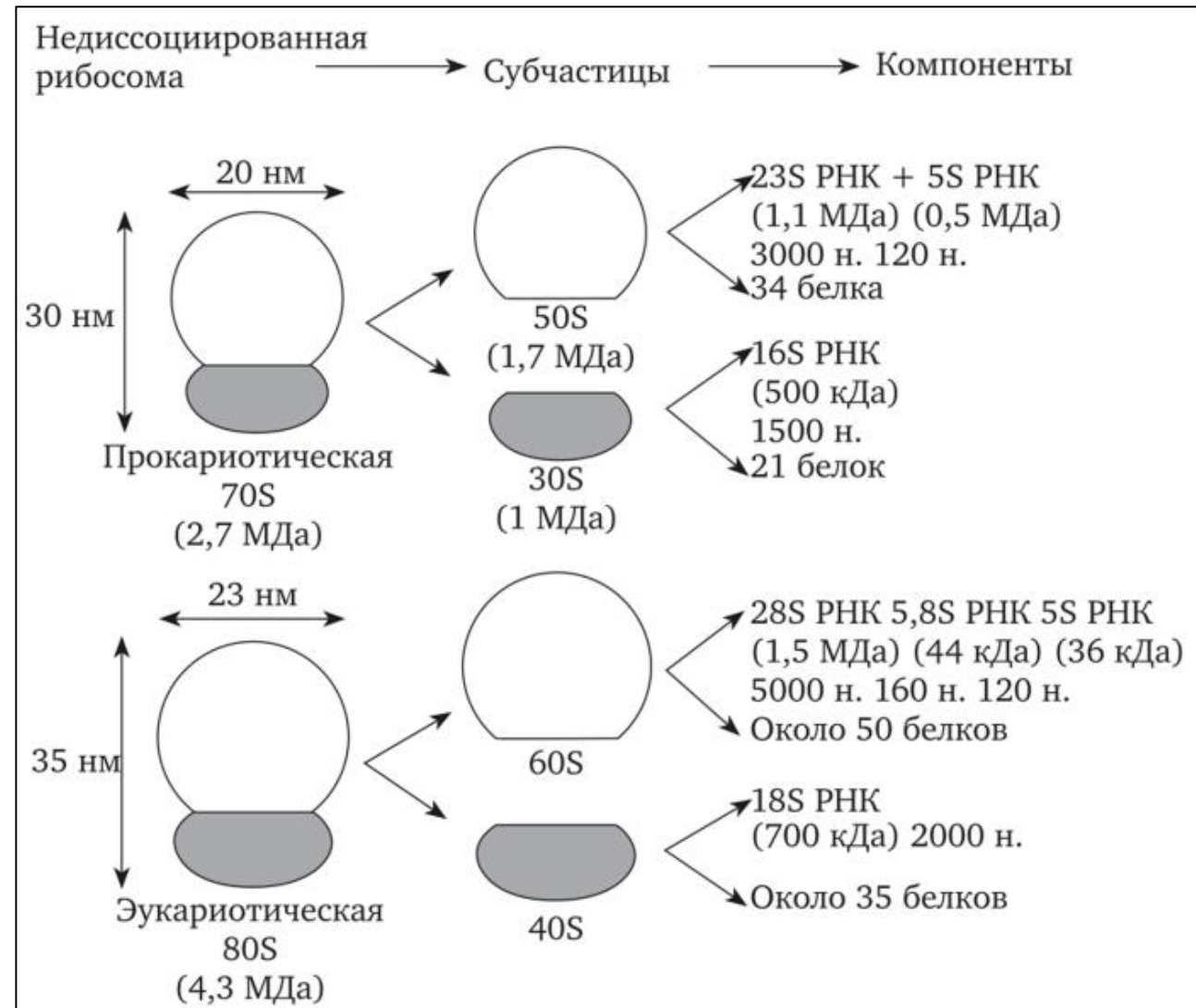


- Рибосомная РНК соединяется с белком с образованием рибосом.
- Рибосомы действуют как место синтеза белка и включают ферменты, участвующие в этом процессе.



Структура рибосом

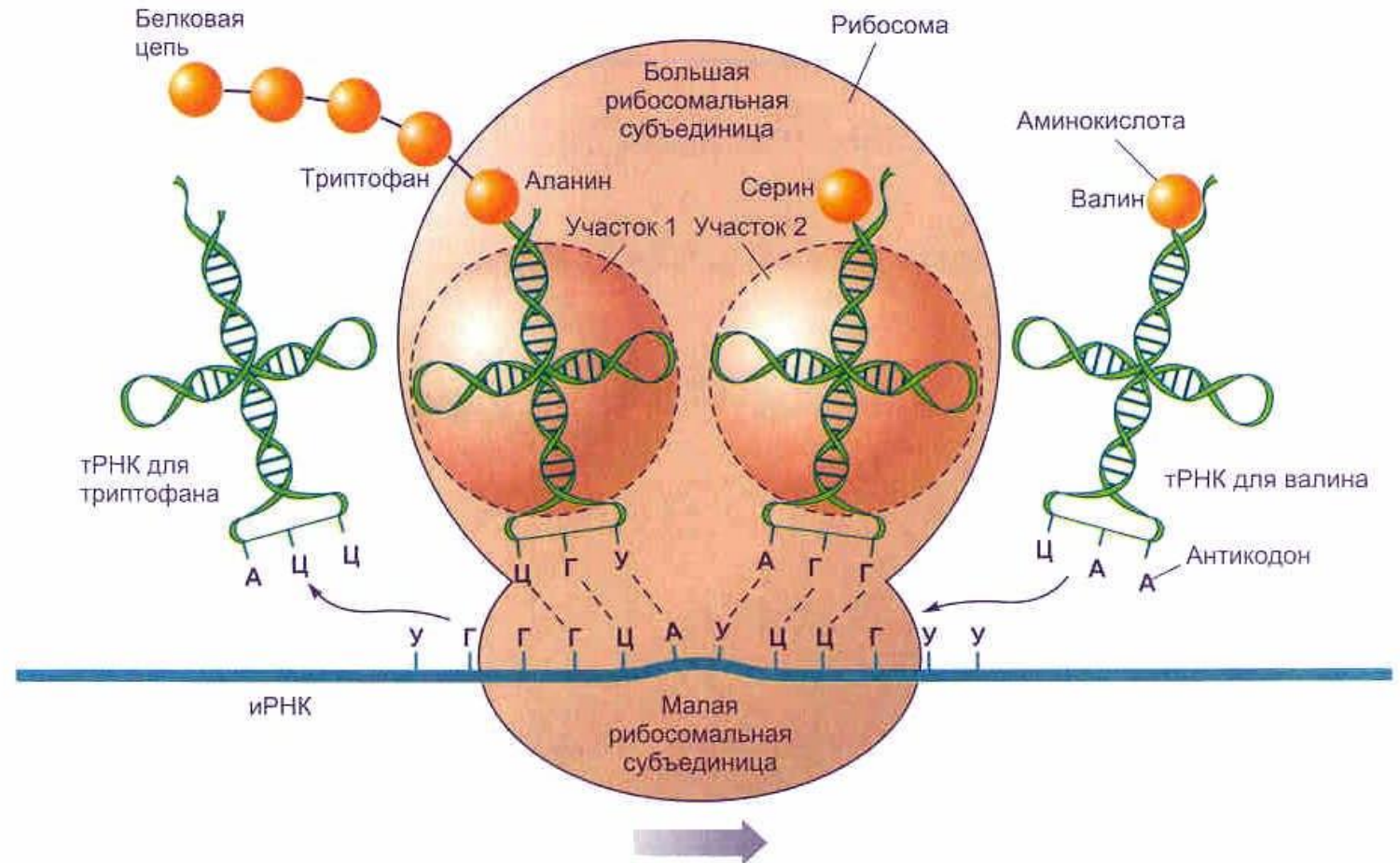
- **Рибосомы** - немембранные самые мелкие клеточные органеллы
- 1. **Прокариотические 70S.**
- 2. **Эукариотические 80S.**
- 3. **Рибосомы митохондрий (55S - у животных, 75S - у грибов).**
- 4. **Рибосомы хлоропластов (70S у высших растений).**
- **S - коэффициент седиментации или константа Сведберга.** Отражает скорость осаждения молекул или их компонентов при центрифугировании, зависящую от конформации и молекулярного веса.



➤ Рибосомная РНК (рРНК)

- **Рибозим** (сокращение от «рибонуклеиновая кислота» и «энзим») - **каталитической РНК** — это молекула РНК, обладающая каталитическим действием.
- Многие рибозимы естественного происхождения катализируют расщепление самих себя или других молекул РНК, кроме того образование пептидной связи в белках происходит при помощи **рРНК** рибосомы.

В 1967 году Карл Вёзе, Френсис Крик и Лесли Оргель впервые выдвинули предположение, что РНК может быть катализатором. Это предположение основывалось на том, что РНК может образовывать сложную вторичную структуру



ЛИТЕРАТУРА

1. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия», Учебно-справочное пособие. 3-е изд. Новосибирск: СУИ, 2008 – 514 с
2. Жимулев И.Ф. «Общая и молекулярная генетика» учебное пособие. Новосибирск: СУИ, 2007.
3. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, NY.
4. Маниатис Т., Фрих Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.
5. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
6. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
7. Brown T.A. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 7th edition. Wiley-Blackwell, 2016.
8. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. Molecular Cell Biology. 9th edition. W.H. Freeman, 2021.