Практична робота 5

Біотехнологія - це використання штучних методів для модифікації генетичного матеріалу живих організмів або клітин для отримання нових сполук або для виконання нових функцій. Біотехнологія використовується для поліпшення тваринництва і сільськогосподарських культур з початку землеробства шляхом селекційного розведення. З моменту відкриття структури ДНК в 1953 році, і особливо з моменту розробки інструментів і методів маніпулювання ДНК в 1970-х роках, біотехнологія стала синонімом маніпуляції ДНК організмів на молекулярному рівні. Основне застосування цієї технології - в медицині (для виробництва вакцин та антибіотиків) та в сільському господарстві (для генетичної модифікації сільськогосподарських культур). Біотехнологія також має багато промислових застосувань, таких як ферментація, обробка розливів нафти та виробництво біопалива, а також багато побутових застосувань, таких як використання ферментів у пральному порошку.

**Маніпулювання генетичним матеріалом**

Для виконання описаних вище застосувань біотехнологи повинні вміти витягувати, маніпулювати та аналізувати нуклеїнові кислоти.

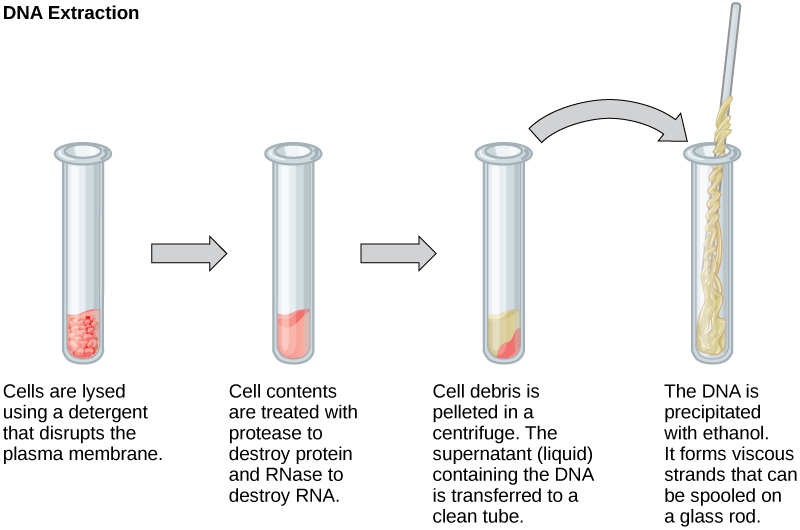
**Огляд структури нуклеїнової кислоти**

Щоб зрозуміти основні методи, що використовуються для роботи з нуклеїновими кислотами, пам'ятайте, що нуклеїнові кислоти - це макромолекули, виготовлені з нуклеотидів (цукру, фосфату та азотистої основи). Фосфатні групи на цих молекулах мають чистий негативний заряд. Цілий набір молекул ДНК в ядрі еукаріотичних організмів називається геномом. ДНК має дві взаємодоповнюючі нитки, пов'язані водневими зв'язками між парними основами.

На відміну від ДНК в клітинах-еукаріотах молекули РНК залишають ядро. РНК Messenger (мРНК) аналізується найчастіше, оскільки вона представляє гени, що кодують білок, які експресуються в клітці.

**Виділення нуклеїнових кислот**

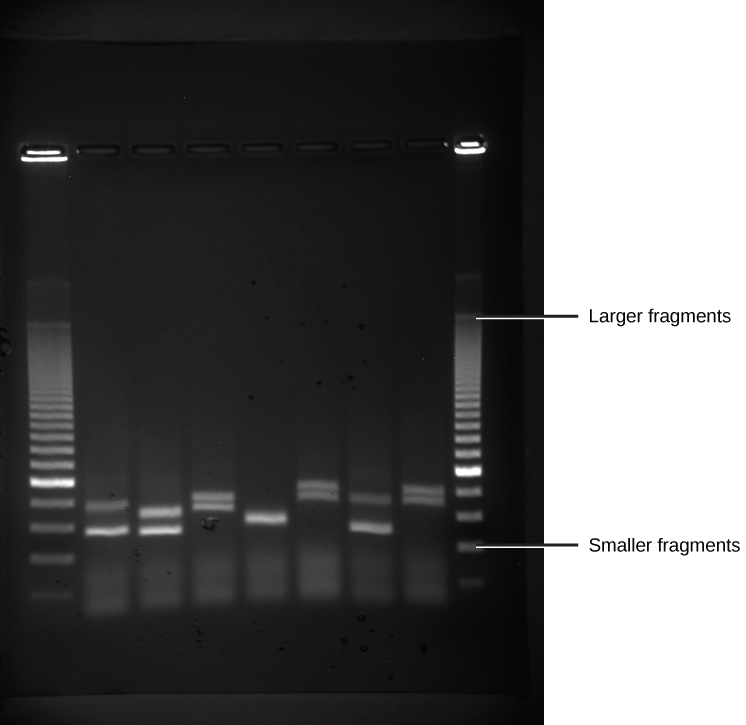
Для вивчення або маніпулювання нуклеїновими кислотами ДНК спочатку потрібно витягти з клітин. Для вилучення різних типів ДНК використовуються різні методики (рис. 10.1.110.1.1). Більшість методів екстракції нуклеїнових кислот передбачають кроки, спрямовані на розрив клітини, а потім використання ферментативних реакцій для знищення всіх небажаних макромолекул. Клітини розбиваються за допомогою миючого розчину, що містить буферні склади. Для запобігання деградації і забруднення макромолекули, такі як білки і РНК, інактивуються за допомогою ферментів. Потім ДНК виводиться з розчину за допомогою спирту. Отримана ДНК, оскільки вона складається з довгих полімерів, утворює желатинову масу.

**Малюнок**10.1.110.1.1**:** На цій діаграмі показаний основний метод, який використовується для вилучення ДНК.

РНК вивчається, щоб зрозуміти закономірності експресії генів у клітині. РНК природно дуже нестабільна, оскільки ферменти, що розщеплюють РНК, зазвичай присутні в природі. Деякі навіть виділяються нашою власною шкірою і їх дуже важко інактивувати. Подібно до екстракції ДНК, екстракція РНК передбачає використання різних буферів та ферментів для інактивації інших макромолекул та збереження лише РНК.

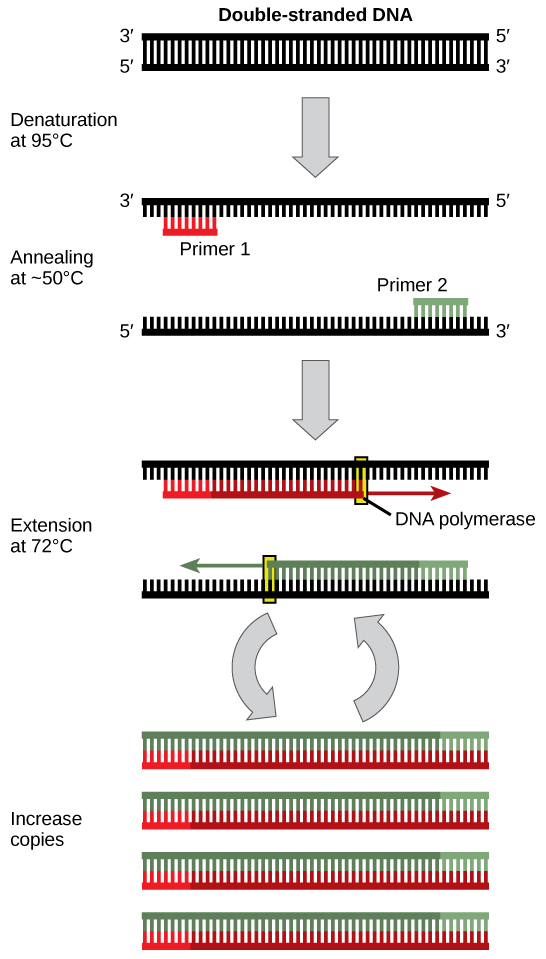
**гелевий електрофорез**

Оскільки нуклеїнові кислоти є негативно зарядженими іонами при нейтральному або лужному pH у водному середовищі, вони можуть переміщатися електричним полем. Гелевий електрофорез - це методика, яка використовується для поділу заряджених молекул на основі розміру і заряду. Нуклеїнові кислоти можуть бути розділені як цілі хромосоми, так і фрагменти. Нуклеїнові кислоти завантажуються в щілину на одному кінці гелевої матриці, подається електричний струм, і негативно заряджені молекули тягнуться до протилежного кінця гелю (кінець з позитивним електродом). Більш дрібні молекули рухаються через пори в гелі швидше, ніж більші молекули; ця різниця в швидкості міграції розділяє фрагменти виходячи з розміру. Нуклеїнові кислоти в гелевій матриці невидимі, поки вони не фарбуються сполукою, яка дозволяє їх бачити, наприклад, барвником. Чіткі фрагменти нуклеїнових кислот з'являються у вигляді смуг на певних відстанях від верхньої частини гелю (негативного кінця електрода), які засновані на їх розмірах (рис. 10.1.210.1.2). Суміш багатьох фрагментів різного розміру виглядає як довгий мазок, тоді як нерозрізана геномна ДНК, як правило, занадто велика, щоб пройти через гель і утворює єдину велику смугу у верхній частині гелю.

**Малюнок**10.1.210.1.2**:** Показані фрагменти ДНК з шести зразків, що виконуються на гелі, фарбуються флуоресцентним барвником і переглядаються під ультрафіолетовим світлом. (Кредит: модифікація роботи Джеймса Джейкоба, Томпкінс Кортленд Community College)

**Полімеразна ланцюгова реакція**

Аналіз ДНК часто вимагає зосередження уваги на одній або декількох конкретних областях генома. Це також часто включає ситуації, коли для подальшого аналізу доступні лише одна або кілька копій молекули ДНК. Ці кількості недостатні для більшості процедур, таких як гелевий електрофорез. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - методика, яка використовується для швидкого збільшення кількості копій конкретних ділянок ДНК для подальших аналізів (рис. 10.1.310.1.3). ПЛР використовує спеціальну форму ДНК-полімерази, ферменту, який реплікує ДНК, та інших коротких нуклеотидних послідовностей, які називаються праймерами, які з'єднуються з певною частиною ДНК, що реплікується. ПЛР використовується для багатьох цілей в лабораторіях. До них відносяться: 1) ідентифікація власника зразка ДНК, залишеного на місці злочину; 2) аналіз батьківства; 3) порівняння невеликих кількостей древньої ДНК з сучасними організмами; і 4) визначення послідовності нуклеотидів в конкретній області.

**Малюнок**10.1.310.1.3**:** Полімеразна ланцюгова реакція, або ПЛР, використовується для отримання безлічі копій певної послідовності ДНК за допомогою спеціальної форми ДНК-полімерази.

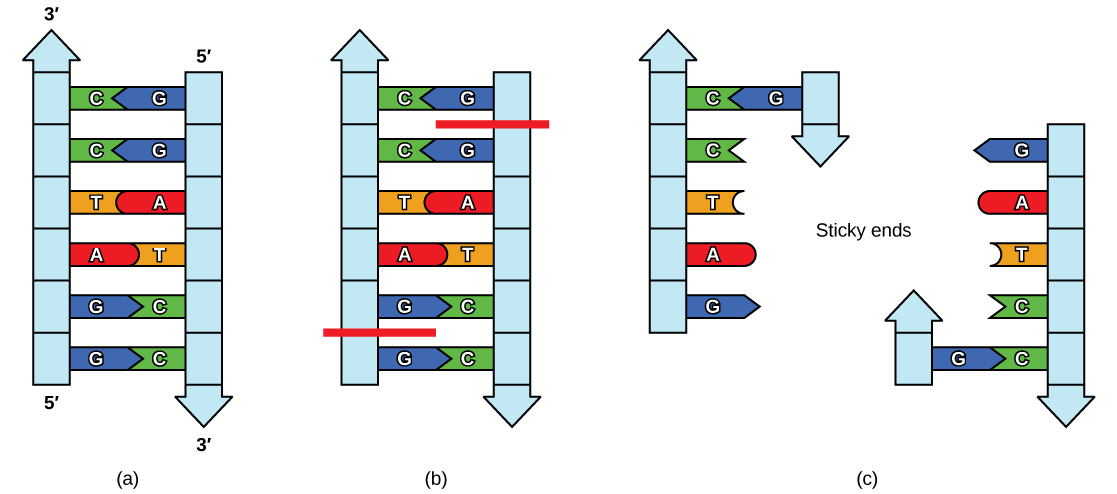
**Клонування**

Взагалі, клонування означає створення досконалої репліки. Як правило, слово використовується для опису створення генетично ідентичної копії. У біології відтворення цілого організму іменується як «репродуктивне клонування». Задовго до того, як були зроблені спроби клонувати весь організм, дослідники навчилися копіювати короткі ділянки ДНК - процес, який називають молекулярним клонуванням.

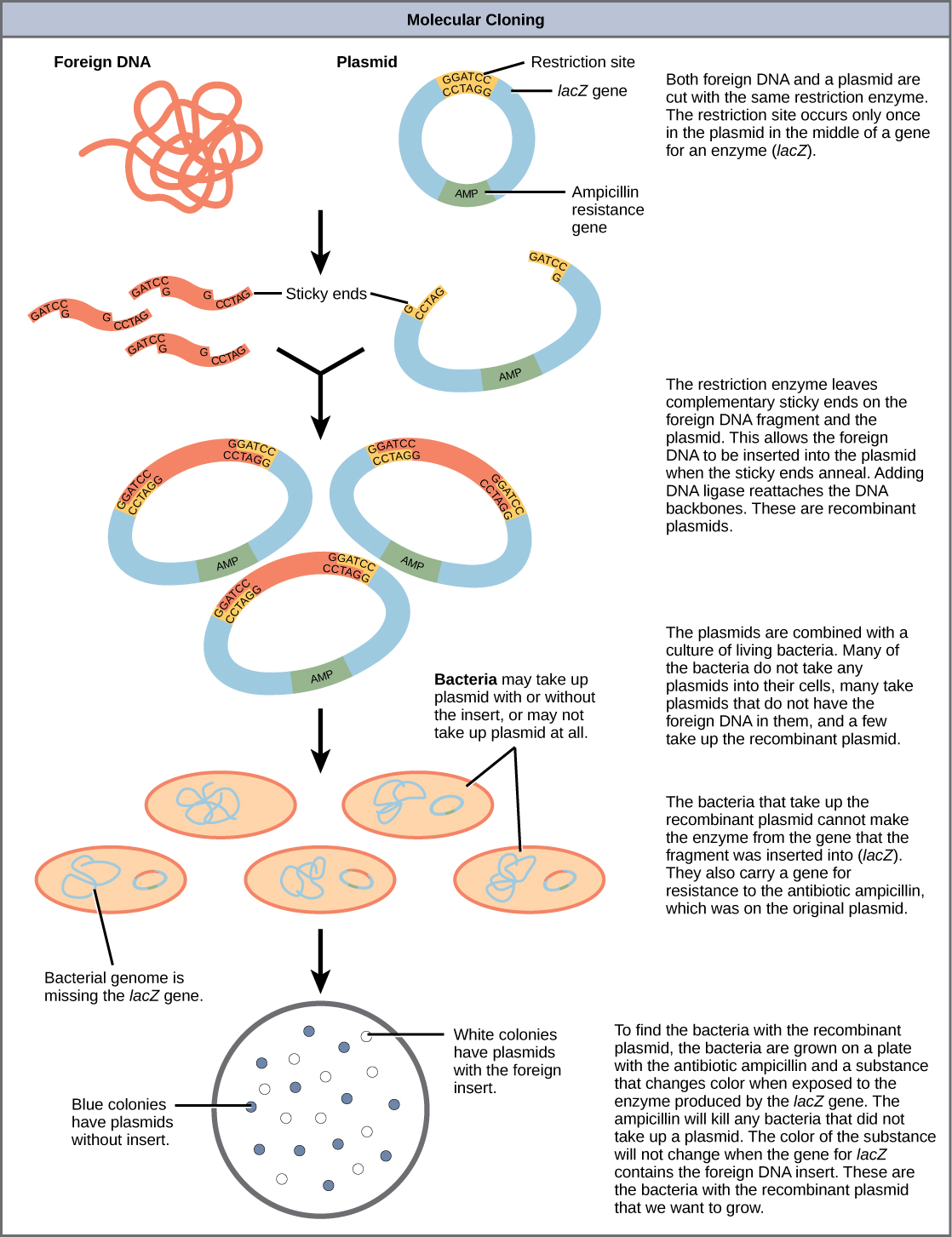
**Молекулярне клонування**

Клонування дозволяє створювати множинні копії генів, експресію генів, вивчати специфічні гени. Щоб фрагмент ДНК потрапив в бактеріальну клітину в формі, яка буде скопійована або виражена, фрагмент спочатку вставляється в плазміду. Плазміда (в цьому контексті також називається вектором) - це невелика кругова молекула ДНК, яка розмножується незалежно від хромосомної ДНК у бактерій. При клонуванні молекули плазміди можуть бути використані для забезпечення «транспортного засобу», в який можна вставити потрібний фрагмент ДНК. Модифіковані плазміди зазвичай повторно вводять в бактеріального господаря для реплікації. Коли бактерії діляться, вони копіюють власну ДНК (включаючи плазміди). Вставлений фрагмент ДНК копіюється разом з іншою частиною бактеріальної ДНК. У бактеріальній клітині фрагмент ДНК з генома людини (або іншого організму, який вивчається) називають чужорідною ДНК, щоб диференціювати його від ДНК бактерії (ДНК господаря).

Плазміди зустрічаються природним чином у бактеріальних популяціях (таких як *кишкова паличка*) і мають гени, які можуть сприяти сприятливим характеристикам організму, таким як антибіотикорезистентність (здатність не впливати антибіотиками). Плазміди були високо спроектовані як вектори для молекулярного клонування і для подальшого великомасштабного виробництва важливих молекул, таких як інсулін. Цінною характеристикою плазмідних векторів є легкість, з якою може бути введений чужорідний фрагмент ДНК. Ці плазмідні вектори містять багато коротких послідовностей ДНК, які можна вирізати різними загальнодоступними рестрикційними ферментами. Рестрикційні ферменти (також звані рестрикційними ендонуклеазами) розпізнають специфічні послідовності ДНК і розрізають їх передбачуваним чином; вони природним чином виробляються бактеріями як захисний механізм проти чужорідної ДНК. Багато рестрикційних ферментів роблять шахові розрізи в двох нитках ДНК, так що зрізані кінці мають від 2 до 4-нуклеотидного одноланцюгового звису. Послідовність, яка розпізнається ферментом рестрикції, - це чотирьох-восьмиядерна послідовність, яка є паліндромом. Як і зі словом паліндром, це означає, що послідовність читається однаково вперед і назад. У більшості випадків послідовність читається однаковою вперед на одну пасмо і назад на додатковій пасма. Коли виконується в шаховому порядку зріз в такій послідовності, звіси доповнюють (рис. 10.1.410.1.4).

**Малюнок**10.1.410.1.4**:** У цьому (а) місці розпізнавання ферментів з обмеженням шестинуклеотидів зверніть увагу, що послідовність шести нуклеотидів читає те саме в напрямку 5' до 3' на одній нитці, як це робиться в напрямку 5' до 3' на додатковій нитки. Це відомо як паліндром. (b) Рестрикційний фермент робить перерви в ланцюгах ДНК, і (c) розріз в ДНК призводить до «липких кінців». Інший шматок ДНК, вирізаний на будь-якому кінці тим же рестрикційним ферментом, може прикріпити до цих липких кінців і бути вставлений у щілину, зроблену цим розрізом.

Оскільки ці звіси здатні повертатися разом шляхом водневого зв'язку з додатковими свесами на шматку ДНК, вирізаному тим же ферментом рестрикції, вони називаються «липкими кінцями». Процес утворення водневих зв'язків між взаємодоповнюючими послідовностями на одиночних нитках з утворенням дволанцюгової ДНК називається відпалом. Додавання ферменту під назвою ДНК-лігаза, який бере участь у реплікації ДНК в клітині, постійно приєднується до фрагментів ДНК, коли липкі кінці збираються разом. Таким чином, будь-який фрагмент ДНК може бути зрощений між двома кінцями плазмідної ДНК, яка була розрізана з тим же ферментом рестрикції (рис. 10.1.510.1.5).



**Малюнок**10.1.510.1.5**:** На цій діаграмі показані кроки, пов'язані з молекулярним клонуванням.

Плазміди з введеними в них чужорідними ДНК називаються рекомбінантними молекулами ДНК, оскільки вони містять нові комбінації генетичного матеріалу. Білки, які виробляються з рекомбінантних молекул ДНК, називаються рекомбінантними білками. Не всі рекомбінантні плазміди здатні експресувати гени. Плазміди також можуть бути розроблені для експресії білків лише при стимулюванні певними факторами навколишнього середовища, щоб вчені могли контролювати експресію рекомбінантних білків.

**Репродуктивне клонування**

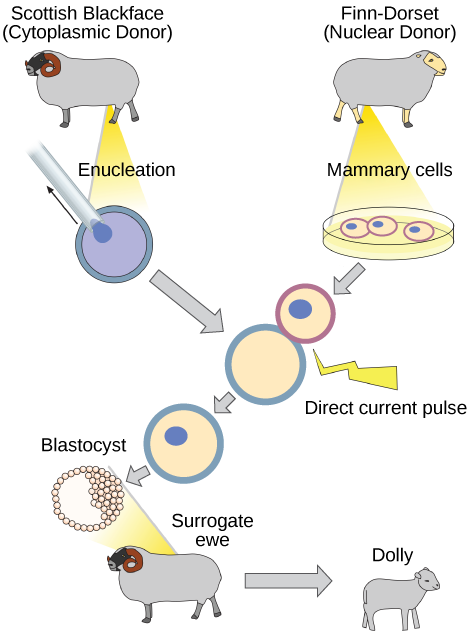
Репродуктивне клонування - це метод, який використовується для виготовлення клону або ідентичної копії всього багатоклітинного організму. Більшість багатоклітинних організмів піддаються розмноженню статевим шляхом, що передбачає внесок ДНК двох особин (батьків), що унеможливлює генерацію ідентичної копії або клона будь-якого з батьків. Останні досягнення біотехнології дозволили розмножено клонувати ссавців у лабораторії.

Природне статеве розмноження передбачає об'єднання під час запліднення сперматозоїда та яйцеклітини. Кожна з цих гамет гаплоїдна, тобто вони містять один набір хромосом у своїх ядрах. Отримана клітина, або зигота, потім диплоїдна і містить два набори хромосом. Ця клітина ділиться мітотично, виробляючи багатоклітинний організм. Однак об'єднання будь-яких двох клітин не може виробляти життєздатну зиготу; в цитоплазмі яйцеклітини є компоненти, які необхідні для раннього розвитку ембріона під час його перших кількох клітинних поділів. Без цих положень не було б подальшого розвитку. Тому для отримання нової особини потрібно як диплоїдний генетичний комплемент, так і цитоплазма яйцеклітини. Підхід до отримання штучно клонованої особини полягає в взятті яйцеклітини однієї особини і видаленні гаплоїдного ядра. Потім в яйцеклітину поміщається диплоїдне ядро з клітини тіла другої особини - донора. Потім яйце стимулюють ділитися, щоб розвиток тривав. Це звучить просто, але насправді потрібно багато спроб, перш ніж кожен з кроків буде успішно завершений.

Першим клонованим сільськогосподарським тваринам була Доллі, вівця, яка народилася в 1996 році. Рівень успішності репродуктивного клонування на той час був дуже низьким. Доллі прожила шість років і померла від пухлини легенів (рис. 10.1.610.1.6). Були припущення, що оскільки клітинна ДНК, яка породила Доллі, походить від старшої людини, вік ДНК, можливо, вплинув на її тривалість життя. Починаючи з Доллі, кілька видів тварин (таких як коні, бики та кози) були успішно клоновані.

Були спроби виробляти клоновані ембріони людини як джерела ембріональних стовбурових клітин. При процедурі ДНК дорослої людини вводиться в яєчну клітину людини, яку потім стимулюють до поділу. Технологія схожа на технологію, яка використовувалася для виробництва Доллі, але ембріон ніколи не імплантується сурогатній матері. Вироблені клітини називаються ембріональними стовбуровими клітинами, оскільки вони здатні розвиватися в багато різних видів клітин, таких як м'язові або нервові клітини. Стовбурові клітини можуть бути використані для дослідження і в кінцевому підсумку забезпечити терапевтичне застосування, наприклад, заміна пошкоджених тканин. Перевага клонування в цьому випадку полягає в тому, що клітини, які використовуються для регенерації нових тканин, будуть ідеально відповідати донору вихідної ДНК. Наприклад, хворому на лейкемію не потрібен брат із сірником тканин для трансплантації кісткового мозку.

АРТ КОНК

**Ілюстрація**10.1.610.1.6**:** Вівця Доллі була першою сільськогосподарською твариною, яку було клоновано. Для створення Доллі ядро було вилучено з донорської яйцеклітини. Онуклеированное яйце поміщали поруч з іншою клітиною, потім вони були шоковані, щоб зростися. Вони знову були шоковані, щоб розпочати дивізіон. Клітини дозволяли ділитися протягом декількох днів, поки не була досягнута рання ембріональна стадія, перш ніж імплантувати сурогатній матері.

Чому Доллі була Фінн-Дорсет, а не шотландською вівцею Blackface?

**Генна інженерія**

Використання рекомбінантної технології ДНК для модифікації ДНК організму для досягнення бажаних рис називається генною інженерією. Додавання чужорідних ДНК у вигляді рекомбінантних ДНК-векторів, які генеруються молекулярним клонуванням, є найбільш поширеним методом генної інженерії. Організм, який отримує рекомбінантну ДНК, називається генетично модифікованим організмом (ГМО). Якщо чужорідна ДНК, яка вводиться, походить від іншого виду, організм-хазяїн називається трансгенним. Бактерії, рослини та тварини були генетично модифіковані з початку 1970-х років для академічних, медичних, сільськогосподарських та промислових цілей. Ці програми будуть більш детально розглянуті в наступному модулі.

Хоча класичні методи вивчення функції генів починалися з даного фенотипу і визначали генетичну основу цього фенотипу, сучасні методики дозволяють дослідникам почати роботу на рівні послідовності ДНК і запитати: «Що робить цей ген або елемент ДНК?» Ця методика, яка називається зворотною генетикою, призвела до зміни класичної генетичної методології. Одним із прикладів цього методу є аналогічний пошкодженню частини тіла для визначення її функції. Комаха, що втрачає крило, не може літати, а значить, функцією крила є політ. Класичний генетичний метод порівнює комах, які не можуть літати з комахами, які можуть літати, і зауважує, що нелітаючі комахи втратили крила. Аналогічно в зворотному генетичному підході, мутація або видалення генів надає дослідникам підказки про функцію генів. З іншого боку, зворотна генетика може бути використана, щоб змусити ген перенапружуватися себе, щоб визначити, які фенотипічні ефекти можуть виникнути.

Висновок

Нуклеїнові кислоти можуть виділятися з клітин з метою подальшого аналізу шляхом розщеплення клітин і ферментативного руйнування всіх інших основних макромолекул. Фрагментовані або цілі хромосоми можна розділити за розміром гелевим електрофорезом. Короткі розтяжки ДНК можуть бути посилені за допомогою ПЛР. ДНК можна розрізати (а згодом повторно зростити) за допомогою рестрикційних ферментів. Молекулярні та клітинні методи біотехнології дозволяють дослідникам генетично інженерів організмів, модифікуючи їх для досягнення бажаних рис.

Клонування може включати клонування дрібних фрагментів ДНК (молекулярне клонування) або клонування цілих організмів (репродуктивне клонування). При молекулярному клонуванні бактеріями потрібний фрагмент ДНК вставляється в бактеріальну плазміду за допомогою рестрикційних ферментів, а плазміда забирається бактерією, яка потім експресує чужорідну ДНК. Використовуючи інші методики, чужорідні гени можуть бути вставлені в еукаріотичні організми. У кожному випадку організми називаються трансгенними організмами. При репродуктивному клонуванні донорське ядро потрапляє в енуклеированную яйцеклітину, яку потім стимулюють ділитися і розвиватися в організмі.

У методах зворотної генетики ген якимось чином мутують або видаляють, щоб виявити його вплив на фенотип всього організму як спосіб визначення його функції.