

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.04.02 Генетически модифицированные продукты питания

Направление подготовки : 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Профиль подготовки: Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения : очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Введение	3
1.2 Лекция № 2 Модифицированные организмы и биобезопасность. Состояние проблемы	8
1.3 Лекция № 3 Генетический риск и биобезопасность при получении ГМО	14
1.4 Лекция № 4 Биобезопасность в клеточных, тканевых и органогенных технологиях получения ГМО	15
1.5 Лекция № 5. Методы оценки продуктов, содержащих ГМО на биобезопасность	18
1.6 Лекция № 6 Контроль и регулирование деятельности при получении и использовании ГМО	21
1.7 Лекция № 7. Методы генной инженерии	26
1.8 Лекция № 8 Задачи молекулярной биологии в XXI веке	29
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	34
2.1. Лабораторная работа № ЛР-1 Генетика и генетическая информация	34
2.2. Лабораторная работа № ЛР-2 Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания	35
2.3. Лабораторная работа № ЛР-3 Общая схема реализации генетической информации	36
2.4. Лабораторная работа № ЛР-4 Механизмы реализации генетической информации	37
2.5. Лабораторная работа № ЛР-5 Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот	38
2.6. Лабораторная работа № ЛР-6 Хромосомы: строение и функционирование	39
2.7. Лабораторная работа № ЛР -7 Переработка, передача и изменение генетической информации в ряду поколений	41
2.8. Лабораторная работа № ЛР-8 Сохранение и защита генетической информации	44
2.9. Лабораторная работа № ЛР-9 Развитие многоклеточного организма	44
2.10. Лабораторная работа № ЛР-10 Иммунитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы	45
2.11. Лабораторная работа № ЛР-11 Получение животных и растительных трансгенных организмов	47
2.12. Лабораторная работа № ЛР-12 Геномика и генная терапия	50
2.13. Лабораторная работа № ЛР-13 Молекулярная биология и возникновение жизни	54
2.14. Лабораторная работа № ЛР-14 Молекулярная биология и происхождение человека	57
2.15. Лабораторная работа № ЛР-15 Методологические основы разработки рецептур и технологий генетически модифицированных продуктов питания	58
2.16. Лабораторная работа № ЛР-16 Степень безопасности трансгенных пищевых продуктов	59

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция №1(4 часа).

Тема: «Введение»

1.1.1 Вопросы лекции:

Молекулярная биология как фундаментальная основа для разработки высокоэффективных биотехнологических методов.

Живые организмы и их клетки

Генетика и генетическая информация

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

Молекулярная биология как фундаментальная основа для разработки высокоэффективных биотехнологических методов.

В настоящий момент вряд ли у кого-нибудь может возникнуть сомнение в том, что современная биология представляет собой наиболее разнообразную область естественных наук. Действительно, она включает казалось бы совершенно не связанные между собой разделы научных знаний: микробиологию, анатомию растений и животных, биохимию, иммунологию, клеточную биологию, физиологию растений и животных, различные систематики, экологию, генетику, биофизику, математику и много других областей естествознания.

Постоянно увеличивающееся разнообразие современной биологии началось после окончания второй мировой войны, когда в биологию внедрились другие естественнонаучные дисциплины, такие как физика, химия и математика, которые сделали возможным описание жизненных процессов на новом качественном уровне – на уровне клетки и молекулярных взаимодействий.

Именно существенные успехи в фундаментальных исследованиях в области биохимии, молекулярной генетики и молекулярной биологии, достигнутые во второй половине текущего столетия, создали реальные предпосылки управления различными (пусть, возможно и не самыми главными) механизмами жизнедеятельности клетки. Сложившаяся благоприятная ситуация в биологии явилась мощным толчком в развитии современной биотехнологии, весьма важной области практического приложения результатов фундаментальных наук. Можно с уверенностью утверждать, что биотехнология является наиболее разительным примером того, как результаты, казалось бы "чистой науки", находят применение в практической деятельности человека. Основой, обеспечивающей благоприятную ситуацию для бурного развития биотехнологии, явились революционизирующие открытия и разработки:

- доказательства роли нуклеиновых кислот в хранении и передаче наследственной информации в биологических системах (имеются в виду индивидуальные клетки и отдельные организмы, а не их популяции);
- расшифровка универсального для всех живых организмов генетического кода;
- раскрытие механизмов регуляции функционирования генов в процессе жизни одного поколения организмов;
- совершенствование существовавших и разработка новых технологий культивирования микроорганизмов, клеток растений и животных;
- как логическое следствие из вышесказанного, явилось создание (возникновение) и бурное развитие методов генетической и клеточной инженерии, с помощью которых искусственно создаются новые высокопродуктивные формы организмов, пригодные для использования в промышленных масштабах.

Абсолютно новым направлением является так называемая инженерная энзимология, возникшая вследствие развития современных методов изучения структуры и синтеза белков-ферментов и выяснения механизмов функционирования и регуляции активности этих соединений (важных элементов клетки). Достижения в этой области позволяют направленно модифицировать белки различной сложности и специфичности функционирования, разрабатывать создание мощных

катализаторов промышленно ценных реакций с помощью высоко стабилизированных иммобилизованных ферментов.

Все эти достижения вывели биотехнологию на новый уровень ее развития, позволяющий сознательно и целенаправленно управлять сложными клеточными процессами. Данная новая область биологических знаний и ее последние достижения уже стали крайне важными для здоровья и благополучия человека.

И все же, что ожидает биотехнологию, в случае реализации всех надежд, которые на нее возлагаются? И наконец, что же такое биотехнология и каковы ее направления деятельности?

Термин «биотехнология» был введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки при описании процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология – это «все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».

Однако этот термин в те годы не получил широкого распространения. Только в 1961 г. к нему вновь вернулись после того как шведский микробиолог Карл Герен Хеден порекомендовал изменить название научного журнала "Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology" (Журнал микробиологической и химической инженерии и технологии), специализирующегося на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, на "Biotechnology and Bioengineering" (Биотехнология и биоинженерия). С этого момента биотехнология оказалась четко и необратимо связана с исследованиями в области «промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов».

Понятие биотехнология может быть представлено многими определениями:

- использование биологических объектов, систем или процессов для производства необходимых продуктов или для нужд сервисной индустрии;
- комплексное применение биохимических, микробиологических и инженерных знаний с целью промышленного использования потенциальных возможностей микроорганизмов, культур клеток и отдельных их компонентов или систем;
- технологическое использование биологических явлений для воспроизводства и получения (изготовления) различных типов полезных продуктов;
- приложение научных и инженерных принципов для обработки материалов биологическими агентами с целью получения необходимых продуктов или создания сервисных технологий.

Биотехнология на самом деле не что иное, как название, данное набору технических приемов (подходов) и процессов, основанных на использовании для этих целей биологических объектов. Термин биотехнология включает составляющие «биос», «техне», «логос» греческого происхождения (от греч. «биос» – жизнь, «техне» – искусство, мастерство, умение и «логос» – понятие, учение).

Таким образом, как это явствует из приведенных определений, биотехнология по существу сводится к использованию микроорганизмов, животных и растительных клеток или же их ферментов для синтеза, разрушения или трансформации (превращения) различных материалов с целью получения полезных продуктов для различных нужд человека.

Биотехнологические направления имеют своей целью создание и практическое внедрение (т. е. практическое использование):

- новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов, используемых в здравоохранении для диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний;
- биологических средств защиты сельскохозяйственных растений от возбудителей заболеваний и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений и животных; новых сортов растений, устойчивых к разного рода неблагоприятным воздействиям (факторам внешней среды); новых пород животных с полезными свойствами (трансгенные животные);
- ценных кормовых добавок для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных (кормового белка, аминокислот, витаминов, ферментов, способствующих повышению усвояемости кормов, и т. п.);

- новых биоинженерных методов для получения высокоэффективных препаратов различного назначения, используемых в сельском хозяйстве и ветеринарии;
- новых технологий создания и получения хозяйственно ценных продуктов для пищевой, химической и микробиологической промышленности;
- эффективных технологий переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов для получения продуктов, которые могут использоваться в других отраслях хозяйственной деятельности человека (например, биогаза, удобрений, топлива для автомобилей и т. п.).

Само собой разумеется, что такие комплексные задачи требуют интеграции различных отраслей научных и технических знаний и характеризуют биотехнологию как ряд перспективных технологий, которые найдут применение в самых разнообразных индустриальных направлениях. Интеграция биологии, химии и инженерных приемов в биотехнологии осуществляется таким путем, чтобы обеспечить максимальное использование потенциальных возможностей всех входящих в нее областей знаний. И все же, несмотря на комплексность биотехнологии, ее нельзя рассматривать как нечто единое целое, наподобие микроэлектроники. Скорее она должна рассматриваться как ряд перспективных технологий, сочетания которых будут постоянно варьировать в зависимости от конкретных практических задач.

Биотехнология – междисциплинарная область научно-технического прогресса, возникшая на стыке биологических, химических и технических знаний и призванная к созданию новых биотехнологических процессов, которые в большинстве случаев будут осуществляться при низких температурах, требовать небольшого (меньшего) количества энергии и будут базироваться преимущественно на дешевых субстратах, используемых в качестве первичного сырья.

Однако следует отдавать себе отчет в том, что биотехнология не является чем-то новым, ранее не известным, а представляет собой развитие и расширение набора технологических приемов, корни которых появились тысячи лет тому назад.

Отрасли промышленности, с которыми будет конкурировать биотехнология, включают изготовление пищи для людей и животных, создание и производство новых материалов, призванных заменить изготавливаемые с помощью нефтехимии, создание альтернативных источников энергии, разработку технологии безотходных производств, контроль и устранение загрязнений и сельское хозяйство. Конечно, биотехнология революционизирует и многие разделы медицины, ветеринарии и фармацевтической промышленности.

Вышеизложенное однозначно предполагает рассмотрение биотехнологии как межотраслевой дисциплины, основанной на применении многопрофильной стратегии (различных подходов) для решения различных проблем.

2. Живые организмы и их клетки

Большинство живых организмов имеет клеточное строение. Клетка – это структурная и функциональная единица живого. Для нее характерны все признаки и функции живых организмов: обмен веществ и энергии, рост, размножение, саморегуляция. Клетки различны по форме, размеру, функциям, типу обмена веществ (рис. 47).

Размеры клеток варьируют от 3-10 до 100 мкм (1 мкм = 0,001 м). Реже встречаются клетки размером менее 1–3 мкм. Существуют также и клетки-гиганты, размеры которых достигают нескольких сантиметров. По форме клетки также весьма разнообразны: шаровидные, цилиндрические, овальные, веретеновидные, звездчатые и т. д. Однако между всеми клетками много общего. Они имеют одинаковый химический состав и общий план строения.

Химический состав клетки. Из всех известных химических элементов в живых организмах встречаются около 20, причем на долю 4 из них: кислорода, углерода, водорода и азота – приходится до 95 %. Эти элементы называют элементами-биогенами. Из неорганических веществ, входящих в состав живых организмов, наибольшее значение имеет вода. Ее содержание в клетке колеблется от 60 до 98 %. Кроме воды в клетке находятся и минеральные

вещества, в основном в виде ионов. Это соединения железа, иода, хлора, фосфора, кальция, натрия, калия и т. д.

Кроме неорганических веществ в клетке присутствуют и органические вещества: белки, липиды (жиры), углеводы (сахара), нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК). Они составляют основную массу клетки. Наиболее важными органическими веществами являются нуклеиновые кислоты и белки. Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) участвуют в передаче наследственной информации, синтезе белков, регуляции всех процессов жизнедеятельности клетки.

Белки выполняют целый ряд функций: строительную, регуляторную, транспортную, сократительную, защитную, энергетическую. Но самой важной является ферментативная функция белков.

Ферменты – это биологические катализаторы, ускоряющие и регулирующие все многообразие химических реакций, протекающих в живых организмах. Ни одна реакция в живой клетке не протекает без участия ферментов.

Липиды и углеводы выполняют в основном строительную и энергетическую функции, являются запасными питательными веществами организма.

Так, фосфолипиды вместе с белками строят все мембранные структуры клетки. Высокомолекулярный углевод – целлюлоза образует клеточную оболочку растений и грибов.

Жиры, крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами клетки и организма в целом. Глюкоза, фруктоза, сахароза и другие сахара входят в состав корней и листьев, плодов растений. Глюкоза является обязательным компонентом плазмы крови человека и многих животных. При расщеплении углеводов и жиров в организме выделяется большое количество энергии, необходимой для процессов жизнедеятельности.

Наружная клеточная мембрана – это одномонобрана клеточная структура, которая ограничивает живое содержимое клетки всех организмов. Обладая избирательной проницаемостью, она защищает клетку, регулирует поступление веществ и обмен с внешней средой, поддерживает определенную форму клетки. Клетки растительных организмов, грибов, кроме мембраны снаружи имеют еще и оболочку. Эта неживая клеточная структура состоит из целлюлозы у растений и хитина – у грибов, придает прочность клетке, защищает ее, является «скелетом» растений и грибов.

В цитоплазме, полужидком содержимом клетки, находятся все органоиды.

Эндоплазматическая сеть пронизывает цитоплазму, обеспечивая сообщение между отдельными частями клетки и транспорт веществ. Различают гладкую и гранулярную ЭПС. На гранулярной ЭПС находятся рибосомы.

Рибосомы – это мелкие тельца грибовидной формы, на которых идет синтез белка в клетке.

Аппарат Гольджи обеспечивает упаковку и вынос синтезируемых веществ из клетки. Кроме того, из его структур образуются лизосомы. Эти шарообразные тельца содержат ферменты, которые расщепляют поступающие в клетку питательные вещества, обеспечивая внутриклеточное переваривание.

Митохондрии – это полуавтономные мембранные структуры продолговатой формы. Их число в клетках различно и увеличивается в результате деления. Митохондрии – это энергетические станции клетки. В процессе дыхания в них происходит окончательное окисление веществ кислородом воздуха. При этом выделяющаяся энергия запасается в молекулах АТФ, синтез которых происходит в этих структурах.

Хлоропласты, полуавтономные мембранные органеллы, характерны только для растительных клеток. Хлоропласты имеют зеленую окраску за счет пигмента хлорофилла, они обеспечивают процесс фотосинтеза.

Кроме хлоропластов растительные клетки имеют и вакуоли, заполненные клеточным соком.

Клеточный центр участвует в процессе деления клетки. Он состоит из двух центриолей и центросферы. Во время деления они образуют нити веретена деления и обеспечивают равномерное распределение хромосом в клетке.

Ядро – это центр регуляции жизнедеятельности клетки. Ядро отделено от цитоплазмы ядерной мембраной, в которой имеются поры. Внутри оно заполнено кариоплазмой, в которой

находятся молекулы ДНК, обеспечивающие передачу наследственной информации. Здесь происходит синтез ДНК, РНК, рибосом. Часто в ядре можно увидеть одно или несколько темных округлых образований – это ядрышки. Здесь образуются и скапливаются рибосомы. В ядре молекулы ДНК не видны, так как находятся в виде тонких нитей хроматина. Перед делением ДНК спирализуются, утолщаются, образуют комплексы с белком и превращаются в хорошо заметные структуры – хромосомы (рис. 49). Обычно хромосомы в клетке парные, одинаковые по форме, величине и наследственной информации. Парные хромосомы называются гомологичными. Двойной парный набор хромосом называется диплоидным. В некоторых клетках и организмах содержится одинарный, непарный набор, который называется гаплоидным.

Число хромосом для каждого вида организмов постоянно. Так, в клетках человека 46 хромосом (23 пары), в клетках пшеницы 28 (14 пар), голубя 80 (40 пар). Эти организмы содержат диплоидный набор хромосом. Некоторые организмы, такие, как водоросли, мхи, грибы, имеют гаплоидный набор хромосом. Половые клетки у всех организмов гаплоидны.

Кроме перечисленных, некоторые клетки имеют специфические органоиды – реснички и жгутики, обеспечивающие движение в основном у одноклеточных организмов, но имеются они и у некоторых клеток многоклеточных организмов. Например, жгутики имеются у эвглены зеленой, хламидомонады, некоторых бактерий, а реснички – у инфузорий, клеток ресничного эпителия животных

3. Генетика и генетическая информация

В хранении, передаче и преобразовании генетической информации центральное место занимают нуклеиновые кислоты. Решающим фактором при этом является способность нуклеиновых оснований к специфическому (комплементарному) спариванию

А. Реализация и передача генетической информации

Хранение информации. Генетическая информация закодирована в последовательности нуклеотидов ДНК (DNA), организованных в функциональные участки, называемые генами. [РНК (RNA) как носитель генетической информации используется только некоторыми вирусами.] Участки ДНК кодируют белки, т. е. они содержат информацию об аминокислотной последовательности белков. Каждый остаток представлен в ДНК своим кодовым словом (кодоном), состоящим из трех следующих друг за другом оснований. Так, ДНК-кодон для фенилаланина представлен тринуклеотидом TTC (2) На уровне ДНК кодоны образуют ее некодирующую цепь [последовательность нуклеотидов которой соответствует последовательности мРНК (mRNA)]

Репликация. Во время деления клеток генетическая информация должна перейти в дочерние клетки. Для достижения этого вся ДНК клетки копируется в процессе репликации во время S-фазы клеточного цикла, при этом каждая ее цепь служит матрицей для синтеза комплементарной последовательности.

Транскрипция. Для экспрессии гена, т.е. синтеза закодированных в нем белков, последовательность нуклеотидов кодирующей цепи ДНК должна быть трансформирована в аминокислотную последовательность. Поскольку ДНК не принимает непосредственного участия в синтезе белка, информация, хранящаяся в ядре, должна быть перенесена на рибосомы, где собственно и осуществляется биосинтез белков. Для этого соответствующий участок кодирующей цепи ДНК считывается (транскрибируется) с образованием гетерогенной ядерной РНК [гяРНК (hnRNA)], т. е. последовательность этой РНК комплементарна кодирующей цепи ДНК. Поскольку в РНК вместо тимина содержится урацил ААГ триплет ДНК трансформируется в UUC-кодон гяРНК.

Созревание РНК. У эукариот гяРНК, прежде, чем покинуть ядро в виде матричной РНК (мРНК, 4), претерпевает существенные изменения: из молекулы вырезаются избыточные (некодирующие) участки (интроны), а оба конца транскриптов модифицируются путем присоединения дополнительных нуклеотидов.

Трансляция. Зрелая мРНК попадает в цитоплазму и связывается с рибосомами, преобразуя полученную информацию в аминокислотную последовательность. Рибосомы — это рибонуклеопротеидные комплексы, включающие несколько десятков белков и несколько молекул рибосомной РНК (рРНК (rRNA)). Рибосомные РНК выполняют функцию структурного элемента рибосом, а также принимают участие в связывании мРНК и образовании пептидных связей.

Механизм преобразования генетической информации основан на взаимодействии кодонов мРНК транспортной РНК [тРНК (tRNA)], которая переносит на рибосому аминокислоты, связанные с 3'-концом тРНК, в соответствии с информацией, закодированной в мРНК. Примерно в середине цепи тРНК расположен триплет (например, GAA), называемый антикодоном и комплементарный соответствующему кодону а мРНК. Если транслируется кодон UUC, то с ним взаимодействует антикодон в составе Phe-тРНК (5), несущей на 3'-конце остаток фенилаланина. Таким образом, остаток аминокислоты занимает положение, в котором на него может быть перенесена растущая полипептидная цепь, связанная с соседней тРНК (6).

Активация аминокислот. Прежде чем связаться с рибосомой, транспортные РНК присоединяют соответствующую аминокислоту с помощью специфического «узнающего» фермента обеспечивающего точный перенос (трансляцию) генетической информации с уровня нуклеиновых кислот на уровень белка.

1. 2 Лекция №2(2 часа).

Тема: «Модифицированные организмы и биобезопасность. Состояние проблемы.»

1.2.1 Вопросы лекции:

Белки как основной инструмент клеточного строительства и ее функционирования

Молекулярные механизмы обеспечения функционирования белков

Общая схема реализации генетической информации

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Белки как основной инструмент клеточного строительства и ее функционирования.

В живых клетках происходит синтез множества органических молекул, среди которых главную роль играют полимерные макромолекулы - белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды.

Особая роль в жизнедеятельности живых организмов принадлежит белкам. От родителей детям передаётся генетическая информация о специфической структуре и функциях всех белков данного организма. Синтезированные белки выполняют многообразные функции: ускоряют химические реакции, выполняют транспортную, структурную, защитную функции, участвуют в передаче сигналов от одних клеток другим и таким образом реализуют наследственную информацию. Поэтому белки называют также протеинами (от греч. proteos - первый).

На долю белков внутри клетки приходится более половины их сухого вещества. В организме человека насчитывают около 50 000 индивидуальных белков. Видовая и индивидуальная специфичность набора белков в данном организме определяет особенности его строения и функционирования. Набор белков в дифференцирующихся клетках одного организма определяет морфологические и функциональные особенности каждого типа клеток.

Как и любой полимер, белок состоит из мономерных единиц, или «строительных блоков». В белках организма человека такими мономерами служат 20 из нескольких сотен известных в природе аминокислот. Аминокислоты, находящиеся в белках, связаны друг с другом пептидными связями. Линейная последовательность аминокислот в белке уникальна для каждого индивидуального белка; информация о ней содержится в участке молекулы ДНК, называемой геном.

Полипептидные цепи за счёт внутримолекулярных взаимодействий образуют пространственные структуры - конформации белков. На определённом участке белковой молекулы из радикалов аминокислот формируется активный центр, который может специфично (комплементарно) связываться с молекулами-лигандами.

Так же как и другие биологические макромолекулы (полисахариды, липиды и нуклеиновые кислоты), белки являются необходимыми компонентами всех живых организмов и играют важную роль в жизнедеятельности клетки. Белки осуществляют процессы обмена веществ. Они входят в состав внутриклеточных структур — органелл и цитоскелета, секретируются во внеклеточное пространство, где могут выступать в качестве сигнала, передаваемого между клетками, участвовать в гидролизе пищи и образовании межклеточного вещества.

Классификация белков по их функциям является достаточно условной, так как один и тот же белок может выполнять несколько функций. Хорошо изученным примером такой многофункциональности служит лизил-тРНК-синтетаза — фермент из класса аминоксил-тРНК-синтетаз, которая не только присоединяет остаток лизина к тРНК, но и регулирует транскрипцию нескольких генов. Многие функции белки выполняют благодаря своей ферментативной активности. Так, ферментами являются двигательный белок миозин, регуляторные белки протеинкиназы, транспортный белок натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза и др.

Каталитическая функция

Наиболее хорошо известная функция белков в организме — катализ различных химических реакций. Ферменты — это белки, обладающие специфическими каталитическими свойствами, то есть каждый фермент катализирует одну или несколько сходных реакций. Ферменты катализируют реакции расщепления сложных молекул (катаболизм) и их синтеза (анаболизм), в том числе репликацию и репарацию ДНК и матричный синтез РНК. К 2013 году было описано более 5000 тысяч ферментов. Ускорение реакции в результате ферментативного катализа может быть огромным: например, реакция, катализируемая ферментом оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазой, протекает в 1017 раз быстрее некатализируемой (период полуреакции декарбоксилирования оротовой кислоты составляет 78 миллионов лет без фермента и 18 миллисекунд с участием фермента). Молекулы, которые присоединяются к ферменту и изменяются в результате реакции, называются субстратами.

Хотя ферменты обычно состоят из сотен аминокислотных остатков, только небольшая часть из них взаимодействует с субстратом, и ещё меньшее количество — в среднем 3—4 аминокислотных остатка, часто расположенные далеко друг от друга в первичной структуре — напрямую участвуют в катализе. Часть молекулы фермента, которая обеспечивает связывание субстрата и катализ, называется активным центром.

Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1992 году предложил окончательный вариант иерархической номенклатуры ферментов, основанной на типе катализируемых ими реакций. Согласно этой номенклатуре названия ферментов всегда должны иметь окончание -аза и образовываться от названий катализируемых реакций и их субстратов. Каждому ферменту приписывается индивидуальный код, по которому легко определить его положение в иерархии ферментов. По типу катализируемых реакций все ферменты делят на 6 классов:

КФ 1: Оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции;

КФ 2: Трансферазы, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую;

КФ 3: Гидролазы, катализирующие гидролиз химических связей;

КФ 4: Лиазы, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов;

КФ 5: Изомеразы, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата;

КФ 6: Лигаза, катализирующие образование химических связей между субстратами за счёт гидролиза дифосфатной связи АТФ или сходного трифосфата.

Структурная функция

Структурные белки цитоскелета, как своего рода арматура, придают форму клеткам и многим органоидам и участвуют в изменении формы клеток. Большинство структурных белков являются филаментозными: например, мономеры актина и тубулина — это глобулярные, растворимые белки, но после полимеризации они формируют длинные нити, из которых состоит цитоскелет, позволяющий клетке поддерживать форму. Коллаген и эластин — основные компоненты межклеточного вещества соединительной ткани (например, хряща), а из другого структурного белка кератина состоят волосы, ногти, перья птиц и некоторые раковины.

Fab-фрагмент мышиного антитела в комплексе с антигеном (вверху)

Защитная функция

Существует несколько видов защитных функций белков:

Физическая защита. Физическую защиту организма обеспечивают коллаген — белок, образующий основу межклеточного вещества соединительных тканей (в том числе костей, хряща, сухожилий и глубоких слоёв кожи (дермы)); кератин, составляющий основу роговых щитков, волос, перьев, рогов и др. производных эпидермиса. Обычно такие белки рассматривают как белки со структурной функцией. Примерами белков этой группы служат фибриногены и тромбины, участвующие в свёртывании крови.

Химическая защита. Связывание токсинов белковыми молекулами может обеспечивать их детоксикацию. Особенно важную роль в детоксикации у человека играют ферменты печени, расщепляющие яды или переводящие их в растворимую форму, что способствует их быстрому выведению из организма.

Иммунная защита. Белки, входящие в состав крови и других биологических жидкостей, участвуют в защитном ответе организма как на повреждение, так и на атаку патогенов. Белки системы комплемента и антитела (иммуноглобулины) относятся к белкам второй группы; они нейтрализуют бактерии, вирусы или чужеродные белки. Антитела, входящие в состав адаптивной иммунной системы, присоединяются к чужеродным для данного организма веществам, антигенам, и тем самым нейтрализуют их, направляя к местам уничтожения. Антитела могут секретироваться в межклеточное пространство или закрепляться в мембранах специализированных В-лимфоцитов, которые называются плазмócитами

Регуляторная функция

Многие процессы внутри клеток регулируются белковыми молекулами, которые не служат ни источником энергии, ни строительным материалом для клетки. Эти белки регулируют продвижение клетки по клеточному циклу, транскрипцию, трансляцию, сплайсинг, активность других белков и многие другие процессы. Регуляторную функцию белки осуществляют либо за счёт ферментативной активности (например, протеинкиназы), либо за счёт специфического связывания с другими молекулами. Так, факторы транскрипции, белки-активаторы и белки-репрессоры, могут регулировать интенсивность транскрипции генов, связываясь с их регуляторными последовательностями. На уровне трансляции считывание многих мРНК также регулируется присоединением белковых факторов

Важнейшую роль в регуляции внутриклеточных процессов играют протеинкиназы и протеинфосфатазы — ферменты, которые активируют или подавляют активность других белков путём присоединения к ним или отщепления фосфатных групп.

Сигнальная функция

Сигнальная функция белков — способность белков служить сигнальными веществами, передавая сигналы между клетками, тканями, органами и организмами. Часто сигнальную функцию объединяют с регуляторной, так как многие внутриклеточные регуляторные белки тоже осуществляют передачу сигналов.

Сигнальную функцию выполняют белки-гормоны, цитокины, факторы роста и др.

Гормоны переносятся кровью. Большинство гормонов животных — это белки или пептиды. Связывание гормона с его рецептором является сигналом, запускающим ответную реакцию клетки. Гормоны регулируют концентрации веществ в крови и клетках, рост, размножение и

другие процессы. Примером таких белков служит инсулин, который регулирует концентрацию глюкозы в крови.

Клетки взаимодействуют друг с другом с помощью сигнальных белков, передаваемых через межклеточное вещество. К таким белкам относятся, например, цитокины и факторы роста.

Цитокины — пептидные сигнальные молекулы. Они регулируют взаимодействия между клетками, определяют их выживаемость, стимулируют или подавляют рост, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз, обеспечивают согласованность действий иммунной, эндокринной и нервной систем. Примером цитокинов может служить фактор некроза опухоли, который передаёт сигналы воспаления между клетками организма.

Транспортная функция

Растворимые белки, участвующие в транспорте малых молекул, должны иметь высокое сродство (аффинность) к субстрату, когда он присутствует в высокой концентрации, и легко его высвобождать в местах низкой концентрации субстрата. Примером транспортных белков можно назвать гемоглобин, который переносит кислород из лёгких к остальным тканям и углекислый газ от тканей к лёгким, а также гомологичные ему белки, найденные во всех царствах живых организмов.

Некоторые мембранные белки участвуют в транспорте малых молекул через мембрану клетки, изменяя её проницаемость. Липидный компонент мембраны водонепроницаем (гидрофобен), что предотвращает диффузию полярных или заряженных (ионы) молекул. Мембранные транспортные белки принято подразделять на белки-каналы и белки-переносчики. Белки-каналы содержат внутренние заполненные водой поры, которые позволяют ионам (через ионные каналы) или молекулам воды (через белки-аквапорины) перемещаться через мембрану. Многие ионные каналы специализируются на транспорте только одного иона; так, калиевые и натриевые каналы часто различают эти сходные ионы и пропускают только один из них. Белки-переносчики связывают, подобно ферментам, каждую переносимую молекулу или ион и, в отличие от каналов, могут осуществлять активный транспорт с использованием энергии АТФ. «Электростанция клетки» — АТФ-синтаза, которая осуществляет синтез АТФ за счёт протонного градиента, также может быть отнесена к мембранным транспортным белкам.

Запасная (резервная) функция

К таким белкам относятся так называемые резервные белки, которые запасаются в качестве источника энергии и вещества в семенах растений (например, глобулины 7S и 11S) и яйцеклетках животных. Ряд других белков используется в организме в качестве источника аминокислот, которые в свою очередь являются предшественниками биологически активных веществ, регулирующих процессы метаболизма.

Рецепторная функция

Белковые рецепторы могут находиться как в цитоплазме, так и встраиваться в клеточную мембрану. Одна часть молекулы рецептора воспринимает сигнал, которым чаще всего служит химическое вещество, а в некоторых случаях — свет, механическое воздействие (например, растяжение) и другие стимулы. При воздействии сигнала на определённый участок молекулы — белок-рецептор — происходят её конформационные изменения. В результате меняется конформация другой части молекулы, осуществляющей передачу сигнала на другие клеточные компоненты. Существует несколько механизмов передачи сигнала. Некоторые рецепторы катализируют определённую химическую реакцию; другие служат ионными каналами, которые при действии сигнала открываются или закрываются; третьи специфически связывают внутриклеточные молекулы-посредники. У мембранных рецепторов часть молекулы, связывающаяся с сигнальной молекулой, находится на поверхности клетки, а домен, передающий сигнал, — внутри.

Моторная (двигательная) функция

Миозин - моторный белок

Целый класс моторных белков обеспечивает движения организма, например, сокращение мышц, в том числе локомоцию (миозин), перемещение клеток внутри организма (например,

амебоидное движение лейкоцитов), движение ресничек и жгутиков, а также активный и направленный внутриклеточный транспорт. Динеины и кинезины проводят транспортировку молекул вдоль микротрубочек с использованием гидролиза АТФ в качестве источника энергии. Динеины переносят молекулы и органоиды из периферических частей клетки по направлению к centrosome, кинезины — в противоположном направлении. Динеины также отвечают за движение ресничек и жгутиков эукариот. Цитоплазматические варианты миозина могут принимать участие в транспорте молекул и органоидов по микрофиламентам.

Белки в обмене веществ

Большинство микроорганизмов и растений могут синтезировать 20 стандартных аминокислот, а также дополнительные (нестандартные) аминокислоты, например, цитруллин. Но если аминокислоты есть в окружающей среде, даже микроорганизмы сохраняют энергию путём транспорта аминокислот внутрь клеток и исключения их биосинтетических путей.

Аминокислоты, которые не могут быть синтезированы животными, называются незаменимыми. Основные ферменты в биосинтетических путях, например, аспараткиназа, которая катализирует первый этап в образовании лизина, метионина и треонина из аспартата, отсутствуют у животных.

Животные, в основном, получают аминокислоты из белков, содержащихся в пище. Белки разрушаются в процессе пищеварения, который обычно начинается с денатурации белка путём помещения его в кислотную среду и гидролиза с помощью ферментов, называемых протеазами. Некоторые аминокислоты, полученные в результате пищеварения, используются для синтеза белков организма, а остальные превращаются в глюкозу в процессе глюконеогенеза или используются в цикле Кребса. Использование белка в качестве источника энергии особенно важно в условиях голодания, когда собственные белки организма, в особенности мускулов, служат источником энергии. Аминокислоты также являются важным источником азота в питании организма.

2. Молекулярные механизмы обеспечения функционирования белков

Каждый индивидуальный белок, имеющий уникальную первичную структуру и конформацию, обладает и уникальной функцией, отличающей его от остальных белков. Набор индивидуальных белков выполняет в клетке множество разнообразных и сложных функций. Необходимое условие для функционирования белков - присоединение к нему другого вещества, которое называют "лиганд". Лигандами могут быть как низкомолекулярные вещества, так и макромолекулы. Взаимодействие белка с лигандом высокоспецифично и обратимо, что определяется строением участка белка, называемого центром связывания белка с лигандом или активным центром.

Активный центр белков - определённый участок белковой молекулы, как правило, находящийся в её углублении ("кармане"), сформированный радикалами аминокислот, собранных на определённом пространственном участке при формировании третичной структуры и способный комплементарно связываться с лигандом. В линейной последовательности полипептидной цепи радикалы, формирующие активный центр, могут находиться на значительном расстоянии друг от друга. Уникальные свойства активного центра зависят не только от химических свойств формирующих его аминокислот, но и от их точной взаимной ориентации в пространстве. Поэтому даже незначительные нарушения общей конформации белка в результате точечных изменений его первичной структуры или условий окружающей среды могут привести к изменению химических и функциональных свойств радикалов, формирующих активный центр, нарушать связывание белка с лигандом и его функцию. При денатурации активный центр белков разрушается, и происходит утрата их биологической активности.

утрата их биологической активности.

Под комплементарностью понимают пространственное и химическое соответствие взаимодействующих молекул. Лиганд должен обладать способностью входить и пространственно совпадать с конформацией активного центра. Это совпадение может быть неполным, но благодаря конформационной лабильности белка активный центр способен к

небольшим изменениям и "подгоняется" под лиганд. Кроме того, между функциональными группами лиганда и радикалами аминокислот, образующих активный центр, должны возникать связи, удерживающие лиганд в активном центре. Связи между лигандом и активным центром белка могут быть как нековалентными (ионными, водородными, гидрофобными), так и ковалентными.

3. Общая схема реализации генетической информации.

Синтез белка - сложный многоступенчатый процесс, в котором участвуют ДНК, иРНК, тРНК, рибосомы, АТФ и разнообразные ферменты. Вначале аминокислоты в цитоплазме активируются с помощью ферментов и присоединяются к тРНК (к участку, где расположен нуклеотид ЦЦА). На следующем этапе идет соединение аминокислот в таком порядке, в каком чередование нуклеотидов с ДНК передано на иРНК. Этот этап называется трансляцией. На нити иРНК размещается не одна рибосома, а группа их - такой комплекс называется полисома. Синтез белка состоит из двух этапов - транскрипции и трансляции.

I. Транскрипция (переписывание) - биосинтез молекул РНК, осуществляется в хромосомах на молекулах ДНК по принципу матричного синтеза. При помощи ферментов на соответствующих участках молекулы ДНК (генах) синтезируются все виды РНК (иРНК, рРНК, тРНК). Синтезируется 20 разновидностей тРНК, так как в биосинтезе белка принимают участие 20 аминокислот. Затем иРНК и тРНК выходят в цитоплазму, рРНК встраивается в субъединицы рибосом, которые также выходят в цитоплазму.

II. Трансляция (передача) - синтез полипептидных цепей белков, осуществляется в рибосомах. Она сопровождается следующими событиями:

1. Образование функционального центра рибосомы - ФЦР, состоящего из иРНК и двух субъединиц рибосом. В ФЦР всегда находятся два триплета (шесть нуклеотидов) иРНК, образующих два активных центра: А (аминокислотный) - центр узнавания аминокислоты и П (пептидный) - центр присоединения аминокислоты к пептидной цепочке.

2. Транспортировка аминокислот, присоединенных к тРНК, из цитоплазмы в ФЦР. В активном центре А осуществляется считывание антикодона тРНК с кодоном иРНК, в случае комплементарности возникает связь, которая служит сигналом для продвижения (скачок) вдоль иРНК рибосомы на один триплет. В результате этого комплекс "кодон рРНК и тРНК с аминокислотой" перемещается в активный центр П, где и происходит присоединение аминокислоты к пептидной цепочке (белковой молекуле). После чего тРНК покидает рибосому.

3. Пептидная цепочка удлиняется до тех пор, пока не закончится трансляция и рибосома не соскочит с иРНК. На одной иРНК может уместиться одновременно несколько рибосом (полисома). Полипептидная цепочка погружается в канал эндоплазматической сети и там приобретает вторичную, третичную или четвертичную структуру. Скорость сборки одной молекулы белка, состоящего из 200-300 аминокислот, составляет 1-2 мин. Формула биосинтеза белка: ДНК (транскрипция) --> РНК (трансляция) --> белок.

Завершив один цикл, полисомы могут принять участие в синтезе новых молекул белка.

Отделившаяся от рибосомы молекула белка имеет вид нити, которая биологически неактивна. Биологически функциональной она становится после того, как молекула приобретает вторичную, третичную и четвертичную структуру, т. е. определенную пространственную специфическую конфигурацию. Вторичная и последующие структуры белковой молекулы предопределены в информации, заложенной в чередовании аминокислот, т. е. в первичной

структуре белка. Иначе говоря, программа образования глобулы, ее уникальная конфигурация определяются первичной структурой молекулы, которая в свою очередь строится под контролем соответствующего гена.

1. 3 Лекция №3(2 часа).

Тема: «Генетический риск и биобезопасность при получении ГМО.»

1.3.1Вопросы лекции:

Механизмы реализации генетической информации.

Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот

1.3.2Краткое содержание вопросов:

1.Механизмы реализации генетической информации.

Результатом экспрессии генов, кодирующих белки или нуклеиновые кислоты, должно быть образование полноценных в функциональном отношении макромолекул, сопровождаемое формированием определенного фенотипа организма. В соответствии с основным постулатом молекулярной биологии генетическая информация передается однонаправленно от нуклеиновых кислот к белкам по схеме: ДНК \leftrightarrow РНК \rightarrow белок, т.е. в ряде случаев возможна передача генетической информации от РНК к ДНК с использованием механизма обратной транскрипции. Не обнаружена передача генетической информации от белков к нуклеиновым кислотам.

На первом этапе экспрессии генов происходит переписывание генетической информации на матричные (информационные) РНК (мРНК - messenger RNA, mRNA), которые являются местом промежуточного хранения информации. В некоторых случаях сами РНК являются конечным результатом экспрессии генов, и после ряда ферментативных модификаций они непосредственно используются в клеточных процессах. Это относится, прежде всего, к рибосомным и транспортным РНК (рРНК и тРНК). К таким РНК принадлежат и малые ядерные РНК (мяРНК), участвующие в процессинге предшественников мРНК эукариот, РНК, входящие в состав ферментов, и природные антисмысловые РНК.

Синтез РНК происходит в результате сложной последовательности биохимических реакций, называемой транскрипцией. На втором этапе реализации генетической информации, называемой трансляцией, последовательность нуклеотидов мРНК определяет последовательность аминокислотных остатков синтезируемых белков.

Таким образом, экспрессию генов определяют два глобальных молекулярно-генетических механизма: транскрипция генов и трансляция синтезированных мРНК рибосомами, которая завершается образованием полипептидных цепей, кодируемых генами. Однако процесс экспрессии генов не ограничивается их транскрипцией и трансляцией.

Существенными моментами экспрессии генов являются посттранскрипционные и посттрансляционные модификации мРНК и белков, которые включают процессинг их предшественников (удаление избыточных последовательностей и другие ковалентные модификации последовательностей РНК и белков). Посттранскрипционные модификации предшественников мРНК обеспечивают подготовку мРНК к трансляции рибосомами и определяют продолжительность ее существования в цитоплазме. Посттрансляционные модификации белков необходимы для их полноценного функционирования.

2. Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот.

Одной из особенностей трансляции у прокариот является включение в пептидную цепь в качестве первой аминокислоты модифицированного метионина - формилметионина, с которого начинаются все вновь синтезированные пептиды. Даже в том случае, когда роль стартового кодона выполняет кодон ГУГ, в обычных условиях шифрующий валин, в первом положении пептида оказывается формилметионин. Стартовый кодон АУГ или ГУГ следует за лидерным участком, который экранируется рибосомой в момент инициации трансляции.

Соединение рибосомы с мРНК обусловлено комплементарным взаимодействием нуклеотидов одной из рРНК с нуклеотидной последовательностью лидера мРНК.

Эта последовательность (Шайна-Дальгарно) располагается на расстоянии 4-7 оснований перед кодоном АУГ и обнаруживается повсеместно в лидерных участках у прокариот.

При соединении 5'-конца мРНК с малой субчастицей рибосомы стартовый кодон обычно оказывается почти в середине экранированного рибосомой фрагмента мРНК, в области, соответствующей ее П-участку.

У эукариот трансляция осуществляется в цитоплазме, куда попадает из ядра зрелая мРНК. Копированный конец мРНК распознается малой субчастицей рибосомы, затем лидирующая последовательность, содержащая до 100 нуклеотидов, взаимодействует с рРНК. При этом стартовый кодон АУГ оказывается в недостроенном П-участке рибосомы. После присоединения к стартовому кодону аминоацил-тРНК, несущей метионин, происходит воссоединение двух субчастиц рибосомы и формируются ее А - и П-участки. Синтез белка в эукариотической клетке, осуществляемый на моноцистронной мРНК, завершается после прохождения рибосомой по всей мРНК, вплоть до узнавания ею кодона-терминатора, прекращающего образование пептидных связей.

1. 4 Лекция №4(2 часа).

Тема: «Биобезопасность в кле-точных, тканевых и орга-ногенных технологиях получения ГМО.»

1.4.1 Вопросы лекции:

Проблемы биобезопасности в биотехнологии и биоинженерии при создании ГМО.

Биобезопасность в клеточных, тканевых и органных биотехнологиях.

Генетический риск и биобезопасность в биоинженерии.

Критерии, показатели и методы оценки биобезопасности ГМО.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Проблемы биобезопасности в биотехнологии и биоинженерии при создании ГМО.

Модификация генетических структур с целью направленного совершенствования биологических объектов затрагивает коренные механизмы формирования важнейших свойств живых организмов — наследственности, изменчивости, энерго- и массообмена, адаптации и устойчивости, продуктивности и качества. Серьезное беспокойство людей во многих странах Западной Европы и мира, в том числе и в России, вызывает то обстоятельство, что последствия такого вмешательства не всегда могут быть точно и своевременно выявлены и спрогнозированы. Движение защитников природы и человека против использования генетически модифицированных растений, животных, микроорганизмов и вирусов становится заметной общественной силой, которая может оказать отрицательное влияние на темпы развития биотехнологии и прежде всего ее стратегического ядра — биоинженерии как науки и резко уменьшить экономический эффект от использования результатов и достижений этих исследований (1-10).

Начало дискуссии по проблеме биобезопасности в науке и обществе положили основатели нового направления — биоинженерии. В 1974 году 11 ведущих молекулярных биологов мира во главе с отцом генной инженерии американцем П. Бергом, создавшим первую рекомбинантную молекулу ДНК, обратились к мировому сообществу с письмом через журнал «Science», в котором предложили отказаться от экспериментов с рекомбинантными ДНК до проведения международной конференции по этой проблеме. Однако уже в 1975 году на конференции в Асиломаре (США) ученые пришли к выводу о том, что эксперименты в области генной инженерии — новейшей биотехнологии — не более опасны, чем аналогичные работы в других отраслях, но при этом, как и везде, необходим строгий контроль за соблюдением мер безопасности (1). В 1976 году в США были приняты первые правила, регламентирующие

работу с рекомбинантными микроорганизмами, которые запрещалось выпускать за стены лабораторий. В конце 70-х годов в большинстве стран мира было разработано соответствующее законодательство. Постепенно эти правила корректировались в сторону смягчения жесткости требований, так как 30 лет интенсивных работ по генетической инженерии свидетельствуют о безопасности этих исследований. В лабораториях мира, осуществляющих генно-инженерные исследования и создание трансгенных организмов, не связанных с военными целями и другими, не нацеленными на получение биологических средств поражения людей и природы, не зарегистрировано случаев выявления генотипов растений и животных, опасных для здоровья и жизни человека, а также для окружающей среды. Микробиологи целенаправленно ведут работы по усилению или ослаблению вирулентных и других свойств бактерий, в целом решая ряд важных проблем медицинской биобезопасности и защиты государства от бактериологического оружия и агрессии. К сожалению, мировой терроризм не останавливается перед выбором средств для своих преступлений, используя крайне опасные для жизни людей биоресурсы. Мировому сообществу предстоит срочно выработать и осуществить систему самых эффективных мер по пресечению и недопущению использования в злобных целях достижений биологической науки.

Каковы же научные основы гарантии дальнейшего безопасного развития биотехнологии и биоинженерии?

О понятии безопасности. Природные, техногенные и другие факторы оказывают постоянное и значительное воздействие на человека и окружающую его среду обитания. Эти воздействия могут быть положительными и отрицательными. Наука, общество, государство должны разрабатывать и эффективно использовать системы мер по защите человека и окружающей среды от вредных воздействий любых опасных факторов. Из этого важнейшего положения вытекает общее понятие о безопасности человека, общества, государства, цивилизации, под которым понимается устойчивое состояние защищенности жизненно важных интересов личности и самой жизни человека, общества и государства от внешних и внутренних угроз (1-3).

Главнейшим объектом безопасности является человек с его потребностями, правами и здоровьем. Безопасность человека не может быть обеспечена без защиты безопасности среды его обитания и жизнедеятельности, а также общества, в котором он живет. Одним из основных принципов безопасности является взаимная ответственность человека, общества и государства. Достижение безопасности — это результат действия системы, предполагающей приведение в действие мер, адекватных угрозам жизненно важных интересов.

2. Биобезопасность в клеточных, тканевых и органных биотехнологиях.

Биобезопасность в клеточных, тканевых и органных биотехнологиях. Манипуляции с растительными и животными клетками и их органеллами, а также с одноклеточными микроорганизмами осуществляют в научных лабораториях медицинской, пищевой и других видов промышленности, и они основаны на фундаментальных исследованиях биологии и цитологии клеток и тканей, открытии явления тотипотентности клеток (способность регенерировать взрослые организмы), а также на выявлении способности соматических клеток к слиянию (соматическая гибридизация), обмену органеллами, дифференциации и дедифференциации. В клеточных технологиях для получения клеток с измененной наследственностью используют спонтанный и направленный мутагенез. Это главная причина генетической гетерогенности клеток одного и того же генотипа. Поэтому в клеточных биотехнологиях необходим постоянный мониторинг за спектром соматической вариабельности, появлением мутантов с положительными и отрицательными признаками. В большинстве случаев соматическая вариабельность не выходит за рамки положительных или слабых отрицательных изменений и позволяет получать материал для селекции растений с улучшенными или исходными свойствами в границах обеспечения биобезопасности.

Главное, чего добиваются клеточные биотехнологи, — получение комплексно устойчивых генотипов сельскохозяйственных растений. Распространение в производстве неустойчивых к вредным организмам и абиотическим факторам среды сортов и гибридов сельскохозяйственных

растений может привести к большим потерям урожая. В этой связи лабораторный и полевой контроль за полученными клеточными регенерантами растений является крайне важным с точки зрения экологической безопасности при использовании в производстве. Система государственного испытания и регистрации сортов и гибридов при строгом соблюдении утвержденных методов и критериев оценки позволяет значительно ограничить подобную опасность.

Технология получения продуктов вторичного метаболизма в биореакторах на основе культуры клеток и суспензий дает возможность непрерывно автоматически контролировать и своевременно выявлять различные отклонения от нормы по основным параметрам и качеству получаемой продукции, не допускать возникновения опасных нарушений в любом звене технологического процесса. Биотехнологи, работающие с клетками (их суспензиями) и тканями животных, отмечают случаи накопления токсичных веществ в последних при нарушении техники и технологии их хранения и использования.

Таким образом, в растениеводстве в целом складывается безопасная ситуация при использовании клеточных биотехнологий в селекции, получении продуктов вторичного метаболизма для фармацевтической и пищевой промышленности. В то же время в животноводстве требуется проводить более жесткий контроль за производством и качеством продукции, получаемой на основе клеточных и тканевых технологий.

3. Генетический риск и биобезопасность в биоинженерии

Встраивание в ДНК реципиентной клетки чужеродного донорского гена сопряжено с определенными трудностями, главными из которых являются обеспечение точной адресной вставки гена или группы генов, а также их нормального функционирования — экспрессии. Эта проблема существует постоянно и ее решение во многих случаях пока носит в значительной степени случайный характер (4, 5, 10-13). Еще более важной является проблема генетического риска, возможного получения мутантов с содержанием токсичных или аллергенных для человека белков или других опасных соединений. Реальный риск, связанный с проявлением чужеродного гена в реципиентной клетке, гипотетически всегда существует. Это прежде всего может быть обусловлено плеiotропным эффектом. По сообщению Газаряна, дестабилизация генома при трансгенозе может происходить не только за счет обогащения генома новыми генами или мутагенного эффекта вставки, а, возможно, в силу индуцирования эндогенных систем рекомбинации и активации «молчащих» генов (цит. по 14). Все это дает основание считать теоретически возможным возникновение при трансгенозе генотипов, опасных для здоровья и жизни человека. Риск получения таких мутантов значительно возрастает при использовании искусственных, синтетических генов для получения трансгенных растений, животных и микроорганизмов с улучшенными и принципиально новыми свойствами. Именно эти обстоятельства в определенной мере оправдывают тревогу многих людей и их настойчивое требование запретить создание и особенно использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и получаемых из них пищевых и других продуктов. К двум вышесказанным причинам можно добавить и третью — спонтанный перенос с пылью в другие растения генов-модификаторов, при взаимодействии которых возможно появление новых генотипов с опасными свойствами для человека и окружающей среды.

В то же время доказана многолетняя стабильная биобезопасность в биоинженерии, которая обусловлена следующими основными явлениями и закономерностями:

- использованием природных генов, которые на протяжении всей эволюции участвовали и участвуют в рекомбиногенезе, подвергаются отбору и элиминации, вследствие чего выработались механизмы на всех уровнях организации биологических объектов, обеспечивающие устойчивый характер репарации нарушенных процессов биосинтеза белков;
- разработкой и постоянным применением эффективных методов мониторинга за качеством получаемых трансгенных организмов и прежде всего за составом и свойствами белковых компонентов вновь созданных генотипов, что позволяет заблаговременно, на этапе создания

ГМО выявлять опасные для человека и окружающей среды генотипы и не допускать их выпуска из лаборатории для использования в производстве и продовольственном обороте; — отбором известных, проверенных природных генов и их регуляторных генетических структур и созданием на их основе векторов, обеспечивающих получение трансгенов с заданными свойствами.

В целом ситуация с генно-инженерными исследованиями и работами по трансгенезу должна находиться под строжайшим контролем ученых и государства (5, 6, 12, 15-17). По мнению большинства генных инженеров, методическая оснащенность мониторинга за качеством ГМО нуждается в дальнейшем совершенствовании. Должны быть разработаны новые методики для углубленного и своевременного выявления токсичных и аллергенных веществ у трансгенных объектов, охватывающие соответствующие группы и классы соединений. Мониторинг за использованием ГМО должен продолжаться и после их регистрации.

Критерии, показатели и методы оценки биобезопасности генетически модифицированных организмов (ГМО) и получаемых из них продуктов. Важным этапом оценки биобезопасности ГМО и полученных из них пищевых и других продуктов является санитарно-гигиеническая экспертиза, которую проводят в Институте питания РАМН по ряду показателей: химическому составу исходных и трансгенных растений; биологической ценности и усвояемости приготовленных из ГМО продуктов; выявлению токсичных, канцерогенных, мутагенных и аллергенных веществ в продуктах, полученных на основе использования ГМО; оценке влияния ГМО на репродуктивные функции животных и человека (16-18).

Испытания генетически измененных растений на биобезопасность проводятся также в Центре биоинженерии РАН, ВНИИ фитопатологии РАСХН и ВНИИ биологической защиты растений РАСХН по следующим направлениям: проверка генов, интегрированных в геном растений, на способность наследования в потомстве и их переноса в другие организмы; оценка влияния новых генов на устойчивость растений к болезням и вредителям; выявление и анализ характера изменчивости почвенной микрофлоры и других составляющих биоценоза под влиянием трансгенных растений.

4. Критерии, показатели и методы оценки биобезопасности ГМО.

Проблемы биобезопасности существуют в мире давно, так как и в природе, и в производстве в различных необходимых человеку и обществу веществах (продуктах питания, лечения, гигиены и др.) нередко встречаются опасные для здоровья и жизни соединения.

Во всех государствах мира разработаны и применяются различные методы контроля за технологическими процессами и качеством вновь вовлеченных в сферу использования человеком новых биологических объектов и веществ, их токсичностью, аллергенностью и общей безопасностью для здоровья людей и состояния окружающей среды. Большую опасность для здоровья и жизни людей до сих пор представляет употребление в пищу ядовитых грибов как следствие безграмотности и беспечности граждан. Наиболее опасными и часто трагичными являются проблемы алкогольной и наркотической токсикации людей.

1. 5 Лекция №5(2 часа).

Тема: «Методы оценки продуктов, содержащих ГМО на биобезопасность»

1.5.1. Вопросы лекции:

Государственный контроль и регулирование ГМО.

Стандартизация в биотехнологии и биоинженерии.

Способы преодоления отставания по биотехнологии

1.5.2. Краткое содержание вопросов:

1. Государственный контроль и регулирование ГМО.

Государственный контроль и регулирование генно-инженерной деятельности и использования генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов. Во всех государствах с развитой генно-инженерной инфраструктурой в науке и производстве в настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. В большинстве своем национальные законы различных государств адаптированы по главным принципиальным вопросам к международным требованиям и правилам в этой области науки и производства, что зафиксировано в документах ООН, ФАО, ЮНЕСКО и других международных организаций соответствующего профиля. В России Федеральный Закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят Государственной думой и подписан президентом РСФСР 5 июня 1996 года за № 86-ФЗ (16). Закон является рамочным, прямого и непрямого действия, и регулирует отношения в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности при генно-инженерной деятельности с биологическими объектами, за исключением человека, его клеток и тканей, которые регулируются специальным законодательством. В законе отражены задачи и основные направления государственного регулирования, а также системы безопасности в области генно-инженерной деятельности в России.

По этому закону государство обязано определять: основные направления деятельности федеральных органов государственной власти, органов государственной власти субъектов РФ, органов местного самоуправления, юридических лиц и граждан (физических лиц) в области генно-инженерной деятельности; основные положения правового регулирования отношений, возникающих в области генно-инженерной деятельности; механизмы, обеспечивающие безопасность граждан и окружающей среды в процессе осуществления генно-инженерной деятельности и использования ее результатов; правовые основы международного сотрудничества РФ в области генно-инженерной деятельности; а также создавать условия для развития приоритетных направлений в этой области исследований. Для реализации перечисленных задач закон предусматривает принятие федеральных и региональных программ в области развития генно-инженерной деятельности.

В законе четко сформулированы основные положения системы безопасности в области генно-инженерной деятельности и определены четыре уровня риска, соответствующие работам, которые представляют опасность для здоровья человека и сопоставимы с риском при следующих экспериментах: первый уровень риска — с непатогенными микроорганизмами; второй уровень риска — с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекции; третий и четвертый уровни риска — с возбудителями особо опасных инфекций (в условиях открытых систем).

Закон содержит требования к лицам, осуществляющим генно-инженерную деятельность, главными из которых являются: обязательная профессиональная подготовка и состояние здоровья исследователей; правила безопасности; наличие соответствующих помещений, отвечающих тем же правилам; обязательное получение разрешения (лицензий) при работах, соответствующих третьему и четвертому уровням риска. В законе определены требования по стандартизации и сертификации генно-инженерной продукции, которая должна соответствовать требованиям экологической безопасности, санитарным нормам, фармакопейным статьям, обязательным требованиям государственных стандартов Российской Федерации. Продукция и услуги, соответственно полученные и предоставленные с применением ГМО, должны иметь сертификат качества и знак соответствия. Закон определяет ответственность юридических лиц и граждан (физических лиц), осуществляющих генно-инженерную деятельность, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Финансирование генно-инженерной деятельности и ее безопасности, согласно закону, осуществляется в установленном порядке за счет средств соответствующих бюджетов, целевых средств организаций и фондов, а также иных источников, не запрещенных законодательством Российской Федерации. «Российская Федерация, — указано в законе, — заключает

международные договоры в целях дальнейшего развития и укрепления международного сотрудничества в области генно-инженерной деятельности.

На основании Федерального Закона «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» правительство Российской Федерации приняло ряд постановлений, обеспечивающих его реализацию (17, 18). При этом предусматривается создание Межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности для контроля за выполнением закона и постановлений правительства.

Правительство Российской Федерации постановлением № 120 от 16 февраля 2001 года утвердило положение «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов», предназначенных для первого на территории Российской Федерации выпуска в окружающую среду, промышленного использования или импорта (17). Регистрацию ГМО и ведение сводного государственного реестра правительство возложило на Министерство промышленности, науки и технологий (Минпромнауки) РФ. Биобезопасность, применительно к указанному положению, означает отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия на окружающую среду модифицированных организмов по сравнению с исходными немодифицированными формами. Срок действия свидетельства (5 лет со дня даты включения ГМО в реестр) может быть продлен по заявлению его владельца на следующие 5 лет. При появлении в период срока действия свидетельства новых научно обоснованных данных о биобезопасности ГМО Минпромнауки РФ может по представлению экспертного совета принять решение о перерегистрации без проведения экспертизы; в случае выявления негативного воздействия ГМО на окружающую среду, подтвержденного экспертизой, регистрация может быть аннулирована.

В соответствии с этим постановлением Минпромнауки РФ приказом № 264 от 10 июля 2001 года был создан Экспертный совет по вопросам биобезопасности и утверждено положение, согласно которому этот совет является постоянно действующим органом, обеспечивающим объективность и надлежащее качество проверки представляемых заявителями сведений о биобезопасности генно-инженерно-модифицированных организмов. Экспертный совет организует и проводит экспертизу представленных заявителями в Минпромнауки РФ сведений, дает, по согласованию с Межведомственной комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности, заключение о биобезопасности модифицированных организмов и возможности их государственной регистрации либо об отказе в такой регистрации или аннулировании государственной регистрации и представляет его в установленном порядке в Департамент науки о жизни и земле Минпромнауки РФ. Экспертный совет решает и другие важные вопросы, связанные с оценкой биобезопасности модифицированных организмов. Состав Экспертного совета формируется из числа ведущих ученых и высококвалифицированных специалистов в области генно-инженерной деятельности.

2. Стандартизация в биотехнологии и биоинженерии.

Стандартизация в биотехнологии и биоинженерии. Обязательным требованием для производства и реализации всех товаров в стране должна быть их стандартизация. Госстандарт России предложил создать федеральную программу «Проблемы производства и реализации продуктов питания, полученных из генно-модифицированных источников пищи», одной из главных задач которой будет нормативное и нормативно-методологическое обеспечение качества и генетической безопасности генно-модифицированных продуктов питания и продовольственного сырья. Для этого должны быть проведены соответствующие научные разработки и стандартизация документов, регламентирующих их производство, методы испытания, хранения и реализацию.

Основным приоритетным направлением научных исследований в области нормативного обеспечения Госстандарт России считает разработку «Концепции стандартизации генно-модифицированных продуктов». При этом необходимо внести изменения в действующие нормативные документы на пищевую продукцию, продовольственное сырье и методы испытания в части включения дополнительных требований по генетической чистоте, нормам

использования и методам испытания, идентификации и маркировке генно-модифицированных продуктов питания, а также на пороговые уровни потребления последних в качестве продуктов питания человека. Перед наукой ставятся также задачи по разработке и совершенствованию правил и порядка оценки соответствия генетически модифицированных продуктов питания требованиям генетической безопасности, а также нормативных документов по государственному контролю и надзору за производством, хранением, реализацией и обращением таких продуктов.

3. Способы преодоления отставания по биотехнологии.

Россия, к сожалению, очень отстала в развитии биотехнологии и биоинженерии. В нашей стране до сих пор не зарегистрировано ни одного отечественного генно-модифицированного сорта или гибрида какой-либо сельскохозяйственной культуры. Создалась реальная опасность длительного отставания России в XXI веке в области биоинженерии от мирового уровня (4-7). По этому поводу нами направлено специальное письмо президенту страны (7). С целью быстрого преодоления этого отставания в этом письме предложено Минпромнауки РФ разработать «Концепцию развития биотехнологии в России», реализация которой должна быть направлена на быстрое преодоление отставания России в этой важной области науки. В концепции необходимо предусмотреть решение следующих важнейших задач:

- создание и реализация утвержденной федеральным законом научной программы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- признание важнейшим приоритетом XXI века ядерной биологии, стратегической части биотехнологии;
- приоритетное финансовое обеспечение развития биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- восстановление деятельности ранее созданных в стране биотехнологических центров;
- оснащение биоинженерных научных учреждений и лабораторий современным научным оборудованием;
- привлечение для выполнения федеральной программы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности молодых талантливых исследователей, создание им оптимальных производственных, жилищных и финансовых условий;
- обеспечение постоянного объективного информирования всего населения страны о содержании и результатах исследований по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- совершенствование законодательной и другой нормативно-правовой базы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности;
- создание в стране специального Федерального совета по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности.

Наиболее острой и экономически важной для России является проблема вывода из глубокого экономического кризиса продовольственного цеха страны — сельского хозяйства, без чего практическое использование достижений биотехнологии невозможно. Вопросы биобезопасности могут и должны быть обеспечены на основе углубленных научных исследований и строжайшего выполнения законов, правительственных постановлений и высокой ответственности ученых и специалистов, а также практиков, работающих в области биотехнологии и биоинженерии. В решении этих задач очень важным является развитие международного сотрудничества на уровне государств, научных организаций и ученых. Выполнение совместных международных проектов позволит нашей стране преодолеть отставание и стать в этой области науки и производства в ряд с высокоразвитыми государствами мира.

1. 6 Лекция №6(2 часа).

Тема: «Контроль и регулирование деятельности при получении и использовании ГМО.»

1.6.1 Вопросы лекции:

Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги

Методы определения конкретных линий ГМО в пищевых продуктах

Методы количественного определения генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в продуктах питания

1.6.2. Краткое содержание вопросов:

1.Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги

7.При проведении Госсанэпиднадзора за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего ГМ аналоги, при производстве, хранении, транспортировании и реализации пищевой продукции проверяется наличие санитарно-эпидемиологического заключения, оформленного в установленном порядке на конкретный вид продукции.

При проведении экспертизы пищевой продукции, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего ГМ аналоги, выборочно проводится отбор проб на лабораторные исследования с целью выявления наличия или отсутствия ГМИ пищи.

Лабораторный контроль проводится только в отношении пищевой продукции, содержащей белок или ДНК.

В случае, когда пищевая продукция не содержит белок или ДНК-экспертиза на наличие ГМИ пищи проводится на основе представленной документации.

В случае обнаружения в исследуемом образце пищевой продукции ГМИ пищи незарегистрированного в Федеральном Реестре Российской Федерации, а также нарушений правил маркировки пищевой продукции, полученной из/или с использованием ГМИ пищи - органы и учреждения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека осуществляют внеплановые проверки по контролю данного вида пищевой продукции в соответствии с законодательством Российской Федерации (Федеральные законы: № 134-ФЗ от 08.08.01, № 52-ФЗ от 30.03.99, № 29-ФЗ от 02.01.00).

2.Методы определения конкретных линий ГМО в пищевых продуктах

Применение биотехнологий в сфере производства пищи при условии контроллинге генно-инженерной деятельности является исключительно перспективным направлением. Мировое производство генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения, начатое в 1996 г., выросло к 2013 г. в 100 раз, суммарная стоимость рынка семян ГМО с учетом стоимости конечных продуктов составила 160 млрд долларов США . С целью реализации прав потребителей на объективную информацию о производстве и ингредиентном составе продукта в большинстве стран мирового сообщества пищевые продукты из ГМО подлежат государственному контролю и обязательной маркировке. В связи с этим возникла необходимость разработки соответствующих методов контроля, которая началась одновременно с выходом на мировой продовольственный рынок первого продукта, полученного с помощью методов генной инженерии.

В качестве мишени для выявления продукции, произведенной из ГМО, могут служить рекомбинантная ДНК, экспрессированный белок, определяющий заданный признак, и вещества, синтезированные в растении *de novo* или количество которых изменено в результате генетической трансформации . В последнем случае для выявления генетических модификаций могут применяться химические методы анализа: хроматография, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия. В качестве примера можно привести генетически модифицированные линии сои G94-1, G94-19, G168, сравнительный анализ жирнокислотного состава которых показал увеличение содержания олеиновой кислоты до 83,8% по сравнению с традиционным аналогом, содержащим 23,1%. Применение в данном случае хроматографических методов

позволяет выявить генетическую модификацию даже в таких продуктах, где ДНК и белок отсутствуют, например, в рафинированном соевом масле.

Методы определения экспрессированного белка (иммуоферментный анализ) имеют целый ряд преимуществ, которые связаны с достаточно простым форматом и относительно низкой стоимостью анализа по сравнению с другими методами. В то же время они имеют ограничения для широкого использования при проведении мониторинга за оборотом пищевой продукции, произведенной из ГМО. Так, в случае анализа пищевых продуктов, при производстве которых исходное сырье подвергается значительной технологической обработке (высокая температура, кислая среда, ферментативная обработка и др.), иммунологический анализ может давать нестабильные или плохо воспроизводимые результаты из-за денатурации белка. При исследовании колбасных и кондитерских изделий, продуктов детского питания, пищевых и биологически активных добавок к пище иммуоферментный анализ не приемлем. Следует также подчеркнуть, что возможность определения в продуктах модифицированного белка лимитируется уровнем его экспрессии в растении. В большинстве генетически модифицированных культур, представленных на мировом продовольственном рынке, в частях растений, употребляемых в пищу, уровень модифицированного белка ниже 0,06%. Кроме того, тесты, основанные на идентификации модифицированного белка, не являются специфичными для конкретных трансформационных событий.

В качестве наиболее предпочтительных для контроля оборота пищевой продукции из ГМО рассматриваются методы определения рекомбинантной ДНК. Первичная структура ДНК одинакова во всех клетках организма, поэтому любая часть растения может быть использована для идентификации ГМО. Методы, основанные на определении рекомбинантной ДНК, более чувствительны, чем методы, основанные на определении белка, они применимы как для скрининговых анализов, так и для определения конкретного трансформационного события, и легко переводятся в количественный формат.

Для идентификации и количественного определения рекомбинантной ДНК наиболее широко применяются методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Критическим и во многом определяющим исход анализа этапом ПЦР является выделение ДНК. При переходе от сырого необработанного сырья к пищевой продукции, подвергшейся технологической или кулинарной обработке возникает проблема выделения ДНК соответствующего качества в необходимом для проведения анализа количестве. Хотя ДНК более стабильна по сравнению с белком, она также может разрушаться под действием высоких температур, облучения ультрафиолетовым светом, обработки кислотами и ферментами, специфично оказывающими воздействие на ДНК. Так, даже в случае выделения достаточно большого количества ДНК амплификация может не пройти из-за присутствия в продукте только очень коротких нитей ДНК. Критический размер ДНК-фрагментов для выявления методом ПЦР составляет 400 пар нуклеотидов. Установлено, что ДНК не определяется в пищевых продуктах, подвергшихся значительной технологической обработке: гидролизованные растительные белки, рафинированные масла, крахмалы высокой степени очистки, соусы, сахар и этиловый спирт, которые потенциально могут быть произведены из генно-инженерно-модифицированных растений. Кроме того, при выборе метода выделения ДНК следует учитывать, что вместе с ДНК из пищевых продуктов могут выделяться вещества (белок, жиры, полисахариды, полифенолы и др.), способные ингибировать ПЦР, что создает трудности для проведения анализа.

В настоящее время в исследованиях по определению рекомбинантной ДНК в пищевых продуктах и кормах наиболее широко используются два метода выделения ДНК: основанный на классическом протоколе для растительных тканей метод "СТАВ", и сорбционный метод, включающий стадию осаждения на сорбент, чаще всего диоксид кремния или магниты. Эти методы сопоставимы и стандартизованы (валидированы) для проведения исследований на наличие и количественное определение рекомбинантной ДНК.

Типичная генетическая конструкция, используемая в биотехнологии растений, содержит смысловой, или целевой, ген, определяющий новый признак растения, а также регуляторные

элементы функционирования этого гена, причем основными среди них являются промотор и терминатор. Часто используются маркерные гены, которые в большинстве случаев удаляются в ходе трансформации и отсутствуют в геноме генетически модифицированного растения. Применение при создании трансгенных растений одних и тех же регуляторных последовательностей и маркерных генов дает возможность проведения скрининговых анализов. Так, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты и терминатор NOS из *Agrobacterium tumefaciens* использованы одновременно или по отдельности при создании всех трансгенных культур, присутствующих на мировом продовольственном рынке в настоящее время. Исключение составляют несколько линий ГМО с измененным жирнокислотным составом, которые идентифицируются при помощи химических и биохимических методов. Среди ГМО, композиционно эквивалентных традиционному аналогу, соя, устойчивая к глифосату, трансформационное событие MON 89788, впервые вышедшая на рынок в 2007 г. в США, также не содержит вышеупомянутых генетических регуляторных последовательностей [30]. Для определения этой линии сои разработаны методы, выявляющие промотор 35S вируса мозаики норики, который был использован при данной трансформации растения. Возможность проведения скрининговых анализов является одним из наиболее убедительных преимуществ методов, основанных на определении рекомбинантной ДНК по сравнению с методами, основанными на определении экспрессированного белка. Методы, позволяющие идентифицировать промотор 35S и терминатор NOS, унифицированы и признаны в качестве стандартных в странах с обязательной маркировкой пищевой продукции из ГМО, в том числе в Российской Федерации [1-3, 5]. Для идентификации целевого гена в продукте используются праймеры, комплементарные участку этого гена. Данная категория методов более специфична, чем скрининговые. Один и тот же ген может применяться для создания целой серии ГМ культур, например, ген *pat*, кодирующий синтез фермента фосфинотрицинацетилтрансферазы, который ацетирует свободную NH₂-группу глюфосината аммония и тем самым препятствует накоплению аммиака, присутствует в геноме всех ГМ растений, устойчивых к глюфосинату аммония [14]. Другой ген *Cry1A(b)* из *B. thuringiensis*, кодирующий синтез инсектицида, был применен при создании нескольких десятков видов генетически модифицированной кукурузы, в том числе линий MON 810 и Bt 11, устойчивых к стеблевому мотыльку и разрешенных для использования в пищевой промышленности и реализации населению в Российской Федерации. Для идентификации встроенной в геном растения генетической конструкции используются праймеры, специфичные для этой конструкции. Выявление рекомбинантной ДНК этими методами однозначно говорит об использовании генно-инженерных технологий при производстве продукта. Однако следует учитывать, что одна и та же конструкция может быть использована для трансформации разных растений. Так, генетические конструкции *pV-ZMVKO7* и *pVZMGT 10* присутствуют в геноме кукурузы линии MON 809 (каждая по одной копии), MON 810 (1 копия первой конструкции), MON 832 (1 копия второй конструкции).

Выявление конкретного трансформационного события предполагает амплификацию последовательности ДНК на пограничных участках генетической конструкции и генома растения, данный анализ наиболее специфичен, он однозначно определяет линию генетически модифицированного растения.

Визуализация результатов амплификации целевой ДНК при анализе пищевой продукции на наличие ГМО чаще всего осуществляется при помощи электрофоретического разделения ампликонов в агарозном геле.

Весьма перспективно использование ДНК-технологий с применением биологических микрочипов. Эти технологии обладают большим потенциалом для скрининга значительного количества ГМО растительного происхождения в одном анализе.

В основе методов лежит принцип комплементарности и специфичности между нитями ДНК. Короткие последовательности одиночной ДНК (зонды), комплементарные целевой ДНК, фиксируются на очень маленькой поверхности стекла. В случае присутствия в анализируемой пробе продукта целевой ДНК при нанесении на стекло ДНК из этой пробы идет связывание ее с фиксированными на стекле зондами. Этот процесс проходит на микроскопическом уровне с

многими тысячами целевых ДНК на каждом стекле. Зондовые ДНК могут быть комплементарны участкам ДНК в области регуляторных последовательностей (промотор 35S или терминатор NOS), маркерных генов, целевых генов и пограничных участков между встроенной генетической конструкцией и геномом растения. Все это потенциально позволяет проводить как скрининговые анализы, так и идентификацию конкретных трансформационных событий.

Для увеличения чувствительности метода целевая ДНК может быть амплифицирована с применением мультиплексной ПЦР до связывания с зондом. Результаты считывали с помощью специальных устройств. К преимуществам этого метода следует отнести возможность качественного анализа большого числа ГМО одновременно, высокую чувствительность в случае предварительного проведения ПЦР, потенциальное снижение стоимости из-за мультиплексности одного анализа, потенциальной возможности автоматизации.

В настоящее время предложено несколько различных протоколов ген-чип-технологий для определения ГМО растительного происхождения.

В Российской Федерации разработан, доведен до уровня национального стандарта и применяется на практике метод идентификации ГМО растительного происхождения с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе, включающий проведение асимметричной мультипраймерной ПЦР, гибридизацию и ферментный анализ продуктов амплификации на биологическом микрочипе с последующей детекцией на аппаратнопрограммном комплексе "Дегмиген-001". Высокая чувствительность метода позволяет улавливать содержание ГМО растительного происхождения в исследуемых пищевых продуктах от 0,1%.

Количественное определение ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах в большинстве стран мира осуществляется с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Данный метод в настоящее время является признанным стандартом для проведения такого рода анализов. Для выявления продуктов амплификации применяют TagMan-зонды, в состав которых входит флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции. В ходе ПЦР происходит разъединение флуоресцентной метки (красителя) и гасителя, что приводит к появлению свечения, интенсивность которого пропорциональна количеству рекомбинантной ДНК в продукте и измеряется в виде графика зависимости флуоресценции от количества циклов. В качестве красителей обычно используют карбоксифлуоресцеин (FAM), карбокси-X-родамин (ROX), а в качестве гасителя - тетраметилкарбоксиродамин (TAMRA), максимум поглощения для которых составляет соответственно 492, 580 и 545 нм, а максимум флуоресценции - 520, 605, 576 нм.

Количественный анализ ГМО предполагает проведение двух амплификаций одновременно: для рекомбинантной ДНК и ДНК, характерной для конкретного растения. Возможность проведения мультиплексной ПЦР с применением TagManзондов обусловлена различием длин волн максимума эмиссии красителей. Результат анализа выражается соотношением (в %) количества двух целевых последовательностей: рекомбинантной ДНК и эндогенной ДНК, присущей растению. Количество рекомбинантной ДНК рассчитывают с использованием калибровочной прямой, построенной в логарифмических координатах, при помощи сертифицированных стандартных образцов состава.

Особенностью этого метода является определение продуктов ПЦР непосредственно в ходе реакции. Метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью, отсутствием контаминации продуктами ПЦР (анализ идет в закрытой пробирке, отсутствует стадия электрофореза), значительной экономией лабораторной площади и меньшей продолжительностью анализа.

Предел количественного определения, относительное стандартное отклонение и погрешность метода определяются в межлабораторных испытаниях для каждого трансформационного события при выходе ГМО на продовольственный рынок.

В Российской Федерации в соответствии с Федеральным законом от 25.10.2007 г. № 234-ФЗ пищевая продукция, содержащая более 0,9% ГМО, подлежит обязательному этикетированию.

Это послужило основанием для внедрения в практику государственного надзора и производственного контроля методов количественного определения рекомбинантной ДНК для всех разрешенных в Российской Федерации линий ГМО. Результаты межлабораторных испытаний, проведенных в аккредитованных в установленном порядке лабораториях Европейского союза и Роспотребнадзора, показали, что предел количественного определения этих методов равен 0,1%, а погрешность и относительное стандартное отклонение не превышают 25% для каждого разрешенного для применения в пищевой промышленности и реализации населению в Российской Федерации ГМО растительного происхождения. Эти результаты свидетельствуют о соответствии требованиям, предъявляемым к методам количественного определения рекомбинантной ДНК в пищевых продуктах. В качестве примера представлены результаты испытаний 4 линий генетически модифицированной кукурузы, проведенные в условиях повторяемости (см. таблицу). Значение систематической погрешности, относительного стандартного отклонения и стандартного отклонения повторяемости соответствует требованиям ГОСТ Р ИСО 5725-4-2002.

3. Методы количественного определения генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в продуктах питания

Методы определения количественного содержания ГМИ растительного происхождения в пищевых продуктах, основанных на идентификации рекомбинантной ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (RealTime PCR).

Окончательное количественное определение ГМИ в пищевой продукции, разрешенных для реализации населению и использованию в пищевой промышленности в Российской Федерации, проводится с применением методов исследований для конкретных трансформационных событий, описание которых представляется разработчиком в Минздрав России.

В методических указаниях представлены методы определения генетических конструкций для наиболее часто встречаемых на мировом и внутреннем продовольственном рынках генетически модифицированных растений.

Представленные методы состоят из следующих этапов: выделение ДНК из пищевого продукта, проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени с использованием специального оборудования, проведение анализа результатов амплификации, расчет процентного содержания генетически модифицированных источников и оформление результатов в документах.

Метод количественного определения сои линии 40-3-2, являющейся доминирующей генетически модифицированной культурой на мировом и внутреннем продовольственном рынках, основан на количественном иммуноферментном анализе модифицированного белка, определяющего устойчивость к глифосату.

Анализ пищевого продукта на содержание ГМИ включает на первом этапе качественное определение ГМИ методом полимеразной цепной реакции (идентификация рекомбинантной ДНК: промотор 35S и/или терминатор NOS). При получении положительного результата проводится определение конкретного ГМИ, который был использован при производстве исследуемого продукта, с целью выявления разрешенных и неразрешенных для реализации в Российской Федерации. В случае решения вопроса о маркировке продукта проводится количественное определение ГМИ.

1. 7 Лекция №7(4 часа).

Тема: «Методы генной инженерии»

1.7.1. Вопросы лекции:

Основы технологии рекомбинантных ДНК
Системы экспрессии для получения белков.

Получение животных и растительных трансгенных организмов.
Основные направления развития молекулярной биотехнологии
Геномика и генная терапия

1.7.2. Краткое содержание вопросов:

1. Основы технологии рекомбинантных ДНК

В конце 70-х годов в биохимии был разработан ряд новых методологических подходов, ознаменовавших начало эры генетической инженерии. Методы рекомбинантных ДНК, перевернувшие наши представления о возможностях биотехнологии в сфере удовлетворения потребностей человека, позволяют направленно конструировать генетический материал, вводить его в живые клетки и с помощью последних реализовать эту генетическую информацию. Кроме того, благодаря технологии рекомбинантных ДНК значительно ускорились темпы расширения и развития наших знаний о функциях ДНК, организации генов, регуляции их экспрессии, первичной структуре белков, что в свою очередь создает основу для понимания природы различных заболеваний и борьбы с ними. Возможность введения любых сегментов ДНК в клетки позволяет создавать промышленные микроорганизмы, способные синтезировать ценнейшие белки. В этом разделе мы уделим основное внимание применению генетической инженерии в промышленности и использованию в качестве организма-хозяина бактерии *Escherichia coli*.

2. Системы экспрессии для получения белков

Выделение нового рекомбинантного гена заканчивается попытками получения его полноценной экспрессии в искусственных генетических системах. Экспрессия эукариотических генов в бактериях происходит неэффективно из-за образования телец включения и отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных полипептидных цепей. Поэтому используются культивируемые клетки животных и растений, в геном которых рекомбинантные гены вводятся с помощью трансфекции.

Эффективный синтез рекомбинантных белков зависит не только от используемых клеточных линий, но и от конструкции экспрессирующего вектора, и от метода введения рекомбинантных ДНК в эукариотические клетки. Для повышения уровня экспрессии рекомбинантных генов, стабильно интегрированных в геном культивируемых клеток, разработаны методы их селективной амплификации. С использованием одного из таких методов получены мутантные сублинии клеток яичников китайских хомячков СНО, в которых амплификация происходит в присутствии селектирующего агента, например, метотрексата. Другие системы амплификации основаны на подавлении экспрессии жизненно важных ферментов, например, глутаминсинтетазы или аденозиндезаминазы, под действием специфических ингибиторов: метионинсульфоксимины или 2'- дезоксигоформина соответственно.

Для получения рекомбинантных белков, кроме метода стабильно трансфицированных линий клеток, используют еще два подхода. С целью наработки небольшого количества рекомбинантных белков и контроля функциональной целостности генно-инженерных конструкций применяют временно экспрессирующиеся векторы, которые обладают способностью к репликации в культивируемых клетках COS во внехромосомном состоянии. В этом случае источником рекомбинантных белков являются супернатанты клеток. При другом подходе рекомбинантные белки синтезируют в культивируемых клетках насекомых после их заражения векторами на основе генома бакуловирусов. Последний подход допускает стабильную экспрессию многих рекомбинантных генов, продукты которых могут находиться как внутри клеток, так и в ассоциированном с поверхностью клеток состоянии, или они могут секретироваться в культуральную жидкость.

Швейцарскими исследователями (С. Гайссе с соавт., 1996 г.) было проведено сравнительное изучение эффективности экспрессии гена цитокина человека - фактора, ингибирующего лейкозы (huLIF - leukemia inhibitory factor) в разных эукариотических системах.

Фактор huLIF представляет собой белок среднего размера, полипептидная цепь которого содержит несколько потенциальных сайтов N-гликозилирования и в процессе фолдинга образует три дисульфидные связи.

3. Получение животных и растительных трансгенных организмов.

Если вводить ДНК в клетки многоклеточного организма, то результатом трансформации будет изменение свойств лишь небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген или гены. Следовательно, для изменения свойств всего организма следует изменять геном половых клеток, которые перенесут новые свойства потомкам. У растений и животных целесообразно изменять такие свойства, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям, способность адаптироваться к новым внешним условиям. В качестве маркеров в этом случае можно использовать полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (AFLP), анализ минисателлитов, анализ микросателлитной ДНК (SSR), гибридизацию и т.д.

Разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений. От работы с довольно крупными яйцами амфибий перешли к изучению яйцеклеток и эмбрионов мыши, которая представляет наиболее изученное в генетическом отношении млекопитающее.

Микроинъекцию клонированных генов производят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. Чаще выбирают мужской пронуклеус, принесенный сперматозоидом, так как его размеры больше. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери, или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку.

Можно вводить ген в сперматозоиды и затем проводить ими оплодотворение. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген β -глобина кролика, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Число молекул, вводимое за одну инъекцию, колеблется от 100 до 300 000, а их размер - от 5 до 50 кб. Выживает обычно 10 - 30% яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток варьирует от нескольких до 40%. Таким образом, реальная эффективность составляет около 10%.

Интеграция чужеродных генов неспецифична по отношению к хромосомам, а число копий чужеродного гена может различаться от нескольких штук до 100 и более. Эти гены образуют группу тандемных повторов, объединенных по типу "голова к хвосту". Чужеродная ДНК после инъекции была обнаружена как в соматических, так и в половых клетках. Это означает, что интеграция проходит на самых ранних стадиях развития зиготы.

В нескольких случаях гетерологичная ДНК наследовалась в трех поколениях мышей, что свидетельствует о стабильной интеграции. Интегрировавшая в половые клетки ДНК передается как менделевский ген. Установлено, что уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами и от степени ее метилирования, а также от дифференцировки тканей. В некоторых случаях удалось получить тканеспецифическую экспрессию. Важно отметить что специфические чужеродные гены можно встраивать в геном клетки таким образом, что они подчиняются нормальным регуляторным сигналам.

В 1981 году Константины и Лэси (Оксфорд) провели инъекцию в яйцеклетки мыши фрагменты хромосомной ДНК кролика длиной 19 килобаз. Эти фрагменты содержали ген β -глобина кролика. Яйцеклетки культивировали до стадии бластоцисты и имплантировали в матку. У 24 мышей, родившихся в результате развития имплантированных яйцеклеток, проведены частичная гепатэктомия. Анализ ДНК из клеток печени показал, что у 9 мышей встречается от 1 до 20 копий на клетку гена β -глобина. После спаривания 4 трансформированных самцов с нормальными самками получили потомство из 18 животных. 6 из них также имели ген β -глобина. Установлено, что интеграция гена в клетки млекопитающих происходит случайным образом и не связана с конкретными областями хромосомы. Ген нестабилен, может быть утрачен или стать неактивным. Вместе с геном необходимо вводить регуляторные последовательности.

Метод введения генов в эмбриональные клетки имеет ограничения. Не всегда удастся встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы. Разработанные методические примы пока не позволяют заменить имеющийся в геноме ген, вытесняя его, не всегда удастся подчинить новый ген системе регуляции организма.

4. Основные направления развития молекулярной биотехнологии

Биотехнология — область науки и практической деятельности, связанная с производством различных продуктов при помощи живых организмов, культивируемых клеток и биологических процессов.

Термин «биотехнология» получил широкое распространение сравнительно недавно, хотя многие технологии производства, основанные на биологических процессах (хлебопечение, виноделие, получение кисломолочных продуктов, обработка кожи и др.), существуют с давних времен.

Теоретическую основу для развития биотехнологии в XX в. обеспечили генетика, микробиология и биохимия. Практической базой стала микробиологическая промышленность, бурное развитие которой связано с открытием и началом производства антибиотиков. Методы и достижения биотехнологии используются в пищевой, химической, фармацевтической промышленности, медицине, энергетике, селекции, сельском хозяйстве, в области охраны окружающей среды и т. д.

Объектами биотехнологии являются вирусы, бактерии, протисты, грибы, растения, животные, а также изолированные клетки и органоиды.

Основные направления биотехнологии:

- производство с помощью микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток биологически активных соединений и лекарственных препаратов (ферментов, витаминов, гормонов, антибиотиков, иммуноглобулинов и др.);
- производство пищевых продуктов и кормов для животных;
- создание новых полезных штаммов микроорганизмов, сортов растений и пород животных;
- разработка и использование биологических методов защиты растений от вредителей и болезней;
- создание и использование биотехнологических методов защиты окружающей среды и т. д.

Основой современной биотехнологии является генетическая и клеточная инженерия в сочетании с широким набором методов биохимии.

Клеточная инженерия — это культивирование в специальных условиях клеток растений, животных и микроорганизмов, включая различные манипуляции с ними (слияние клеток, удаление или пересадка органоидов и т. д.).

Наиболее успешно развивается клеточная инженерия растений. Используя методы генетики, ученые создают линии клеток, продуцирующих ценные вещества. Такие клетки способны расти на простых питательных средах, синтезируя при этом большое количество необходимого продукта. Их культивирование уже используется в промышленных масштабах для получения ряда биологически активных веществ. Например, налажено производство биомассы женьшеня для нужд медицинской и парфюмерной промышленности.

1. 8 Лекция №8(4 часа).

Тема: «Задачи молекулярной биологии в XXI веке»

1.8.1. Вопросы лекции:

Молекулярная биология и возникновение жизни.

Молекулярная биология и происхождение человека.

Молекулярно-биотехнологическая революция.

1.8.2. Краткое содержание вопросов:

1. Молекулярная биология и возникновение жизни.

Гипотезы возникновения жизни

Панспермия - жизнь витает в космосе и разносится по планетам.
Жизнь зародилась абиогенно или нет?

Биогенез - живое только от живого.

Абиогенез - живое от неживого.

Луи Пастеру принадлежит первое прямое доказательство происхождения живого только от живого. В 1862 году он получил премию Французской академии наук за эту работу.

Суть опыта: в колбе с изогнутой трубкой находился прокипяченный сenny настой. В течение нескольких недель он стоял совершенно прозрачный. Как только колбу наклонили (сквозь трубку в колбу попали микроорганизмы) - настой забродил.

Эксперимент правильный. Вывод - живое только от живого.

Авторитет Пастера был столь велик, что к теории абиогенеза пришли лишь через 60 лет.

В 1924 году Александр Опарин высказал предположение, что ~4 млрд. лет назад жизнь могла возникнуть абиогенно, в силу тех условий, которые существовали тогда на Земле.

Джон Холдейн рассчитал, какие условия и как долго должны были существовать, чтобы зародилась жизнь, каковы необходимые источники энергии для зарождения жизни.

Теория биопоза

Джон Бернал создал теорию биопоза, включающую три стадии.

1. Образование биомономеров.
2. Образование биополимеров и их эволюция. Образование систем с обратной связью.
3. Образование мембранных структур и пробионтов (первых клеток).

Экспериментальное доказательство первой стадии - опыты Стенли Миллера.

Суть опыта: в колбе находилась смесь газов (H_2 , N_2 , NH_3 , CH_4 , CO , CO_2) при температуре ~100 °C. Кипящая вода служила источником водяного пара, а с помощью обратного холодильника поддерживалась циркуляция газовой смеси через сосуд. Давали искровой разряд в 60 тыс. вольт, что энергетически эквивалентно 50-и млн. лет на примитивной Земле. Результат был ошеломляющий: в колбе появились HCN , $HCHO$, $HCOOH$, несколько аминокислот, несколько азотистых оснований жирные кислоты, пириты, моносахара. Эксперимент повторяли много раз. Непременное условие успеха - отсутствие в колбе свободного кислорода. В зависимости от pH раствора и соотношения газов были получены разные наборы соединений. Если была H_3PO_4 , то образовывались даже нуклеотиды, а это уже гетерополимеры.

Таким образом была доказана первая стадия возникновения жизни. 4 млрд. лет тому назад с неизбежностью должны были возникнуть биомомеры.

Первичная атмосфера образующейся Земли кислород содержала, но он весь пошел на окисление. Свободного кислорода не было. Таким образом, возникновение биомономеров и биополимеров происходило во вторичной бескислородной среде.

У стадии 3 в принципе есть доказательства. Самая сложная и неочевидная - стадия 2.

2 стадия биопоза.

Помимо 4-х основных классов биополимеров, могли образовываться и не дошедшие до нас гетерополимеры. Видимо, эволюция химических соединений шла по принципу минимума свободной энергии.

Остановимся пока на белках и нуклеиновых кислотах.

Из разных комплексов белок-нуклеиновая кислота рассмотрим только те, в которых нуклеиновая кислота сохраняется благодаря защите белком от ультрафиолетового излучения.

Накопим такие комплексы. Из их множества рассмотрим те, в которых белки способствуют увеличению количества защищенной нуклеиновой кислоты. То есть эти белки - ферменты. Из этих комплексов рассмотрим те, где нуклеиновые кислоты, количество которых возрастает под действием белков, способствуют увеличению количества белков благодаря, например, прямому

кодированию. Возникают системы с обратной связью. Такие системы обладают некоторыми признаками живого.

Другой вариант.

Первыми молекулами были РНК.

Они имеют третичную структуру и обладают каталитической активностью. Позже появились белки, поддерживающие "выгодные" конформации РНК и защищающие их от расщепления. Уже потом возникает ДНК, как более надежный хранитель генетической информации. Она имеет две цепи, что обеспечивает репарацию, репликация осуществляется за один шаг. Отсутствие ОН-группы в 2'-положении пентозы делает ДНК устойчивой в слабощелочных условиях, губительных для РНК.

Стадия 3.

Представим, что лужа покрыта жирной пленкой, а под ней - белки. Если оторвать каплю, то могут получиться пузырьки, содержащие нуклеопротеидные системы с обратной связью. Когда они падают на поверхность водоема, то покрываются вторым липидно-белковым слоем - и образуется современная биологическая мембрана. В мембранной капле диффузия уже не очень существенна.

Далее образуются пробионты - первые организмы, имеющие мембрану.

Пробионты были первичными гетеротрофами. Они получали энергию при расщеплении органических веществ абиогенного происхождения, в изобилии имевшихся в окружающей среде. Примером древнего способа обмена веществ, дошедшего до наших дней, является гликолиз - ферментативное бескислородное расщепление глюкозы.

По мере истощения запаса органического материала (а новый не образовывался из-за изменения условий на Земле) возникала жесткая конкурентная борьба за него, что ускорило процесс эволюции первичных гетеротрофов.

Исключительным событием стало возникновение бактериального фотосинтеза, освободившего клетки от зависимости от доступности органики абиогенного происхождения. Скорее всего, фотосинтез возник у анаэробных бактерий, способных к азотификации. Побочным продуктом фотосинтеза является кислород. Его накопление в атмосфере привело к коренному изменению хода эволюции. Появление озонового экрана защитило первичные организмы от смертельного УФ-облучения и положило конец абиогенному синтезу органики.

Первые аэробные бактерии появились благодаря приобретению аппарата окислительного фосфорилирования. Продукты брожения подвергались дальнейшему окислению до CO_2 и H_2O . Аэробные (вторичные) гетеротрофы могли более эффективно, чем анаэробные (первичные) гетеротрофы, расщеплять органические вещества, образующиеся в результате фотосинтеза.

По-видимому, с ростом концентрации кислорода в атмосфере усложнялась жизнь первичных анаэробных гетеротрофов. Некоторые из них вымерли, другие нашли бескислородную среду. Примером могут служить дошедшие до наших дней метанобразующие бактерии или серные бактерии, живущие в горячих подземных источниках.

Некоторые первичные гетеротрофы пошли по пути, приведшему к образованию эукариотических клеток. Часть из них вступила в симбиоз с аэробными бактериями, способными к окислительному фосфорилированию. Поглотив вторичных гетеротрофов, первичные не расщепили их на молекулы, а сохранили в качестве энергетических станций, называемых сегодня митохондриями.

Такие симбионты дали начало царствам животных и грибов.

Другая часть первичных гетеротрофов "заключила союз" не только с аэробными гетеротрофами, но и с первичными фотосинтетиками, сохранив последних в качестве хлоропластов. Такие симбионты дали начало царству растений.

В пользу симбиотической теории образования эукариот говорят следующие факты:

- У митохондрий и хлоропластов две мембраны. Внутренняя - своя, наружная образована клеткой-захватчиком.
- Генетический код митохондрий идеален. Универсальный генетический код имеет два существенных отличия, касающихся инициации и терминации синтеза белка.

Таким образом эукариоты отстранились от чужой генетической информации.

Кроме того, они линеаризовали свою ДНК. Митохондрии и хлоропласты имеют кольцевую ДНК, хотя не очень понятно, для чего им нужна кольцевая ДНК, и бактериальные рибосомы. Однако понятно, почему у них такая ДНК и такие рибосомы. Потому, что их предки были бактериями. Сегодня часть генов митохондриальных белков и белков хлоропластов, в том числе их РНК- и ДНК-полимераз, находятся в ядре. Вероятно, попали они туда с помощью мобильных элементов.

Все бактерии делятся на эубактерии (в том числе *E.coli*) и археобактерии. Принципиальное отличие между ними в том, что гены археобактерий имеют экзон - интронное строение и сплайсинг. Эубактерии - результат эволюции ана- и аэробных гетеротрофов. Их эволюция шла в благоприятных условиях и они сменили больше поколений, избавившись от интронов. Археобактерии живут в экстремальных условиях: горячие, кислые, высокосолесные подземные воды. Эукариоты и археобактерии сохранили экзон-интронную структуру, что говорит о древнем происхождении экзонов и интронов.

2. Молекулярная биология и происхождение человека.

Антропогенез — процесс историко-эволюционного формирования человека, становление его как биологического вида в процессе формирования общества, т.е. социогенеза. Теория происхождения человека базируется на данных ряда биологических и гуманитарных наук. Палеоантропология, палеодемография, палеонтология и сравнительная биология позволяют выявить направление изменчивости морфологических особенностей у представителей эволюционирующего вида в условиях меняющейся среды, установить их численность и возрастную структуру. Эволюционная генетика накопила прямые доказательства существования естественного отбора в природе и разработала методы его математического моделирования. Психология, эволюционная морфология мозга прослеживают возникновение мышления и речи в процессе антропогенеза. Этнография позволяет проанализировать общественные отношения древнейших людей. Данные многих наук, особенно молекулярной биологии, уточняя отдельные моменты эволюции и формируя ее теоретическую основу, составляют понятие «синтетическая теория эволюции» (СТЭ), или современный синтез. Согласно эволюционному учению, проблема антропогенеза рассматривается как частный филогенетический вопрос в общей картине биологической эволюции — направленного исторического развития живой природы, включающего изменения генетического состава популяций, формирование адаптаций, образование и вымирание видов, преобразование биогеоценозов и биосферы в целом. Эти изменения происходят сотни миллионов лет, с момента возникновения жизни. Их результат — разнообразие форм жизни, которые являются продуктом и объектом эволюции, представляющим собой основу изучения эволюции любого масштаба.[^] Движущей силой биологической эволюции является достижение соответствия развивающейся живой системы условиям ее существования, что сопряжено с преимущественным распространением одних и гибелью других дискретных биологических систем. Подтвердить родственные связи человека и животных и в первую очередь высокую степень родства человека с человекообразными обезьянами можно с помощью прямых и косвенных доказательств.

Прямые доказательства — это костные останки ископаемого человека, ближайших его предков и родственных им форм. Научная интерпретация ископаемых материалов основана на сравнении их анатомических особенностей с существующими формами с учетом экологических влияний.

Косвенные доказательства наиболее многочисленны. К ним относятся сравнительно-анатомические, физиологические, биохимические, генетические и другие группы факторов, а также данные сравнительной эмбриологии, учение о рудиментарных органах и атавизмах. Сравнительно-анатомические данные свидетельствуют о родстве живых организмов и человека по общему плану строения и аналогии органов и тканей. Все живые организмы, за исключением вирусов, имеют клеточное строение. В основе жизнедеятельности всех живых

существ лежит непрерывный обмен веществ между ними и окружающей средой. Процессы обмена, распад и синтез различных органических соединений в организмах управляются ферментными системами. Организмы синтезируют свои видоспецифические белки, отличающиеся от белков других видов характером чередования аминокислот. Можно проследить общие черты и в зародышевом развитии всех организмов. Еще в XIX в. К.М. Бэр сформулировал закон «зародышевого сходства», который гласит: чем более ранние стадии эмбриогенеза исследуются, тем более сходства обнаруживается между организмами — представителями различных видов позвоночных. Э. Геккель (1863, 1868), А.О. Ковалевский, А.Н. Северцев (1939) обратили внимание, что изучение развития эмбрионов дает возможность понять преобразование организмов и отдельных органов в процессе филогенеза — их исторического развития.

3. Молекулярно-биотехнологическая революция.

В настоящее время идет этап молекулярно-биотехнологической революции. Формально началом можно считать 15 октября 1980 г.

15 октября 1980 г. на Нью-Йорской фондовой бирже произошло знаменательное событие: уже через 20 минут после начала торгов стоимость 1 акции биотехнологической компании Genentech поднялась с 35 до 89 \$. Это был рекордный для того времени скачек цен на акции коммерческого предприятия. К моменту закрытия торгов в этот день, цена одной акции Genentech составляла 71,25 \$, а стоимость всех 528 000 акций была столь баснословно высока, что мелкие инвесторы, собиравшиеся приобрести небольшой пакет акций, не имели никаких шансов.

По-видимому, это был 1-й случай в истории, когда о начале революции возвестил биржевой колокол. В 1980 г., когда фирма Genentech впервые предложила обществу свои акции, это была не большая компания в Калифорнии, в течение 4 лет успешно работавшая над проблемой получения рекомбинантных ДНК. Ученым компании удалось выделить фрагменты гена (последовательности ДНК), кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетические элементы (клонировующие векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*E. coli*). Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для больных диабетом, дающих аллергическую реакцию на свиной инсулин. Еще 10 лет назад такое развитие событий представлялось нереальным, но сегодня это стало вполне привычным.

Головокружительный взлет стоимости акций компании Genentech предопределялся как реальной оценкой потенциала технологии рекомбинантных ДНК, так и мечтами о будущих возможностях. Многие думали, что новая технология станет тем рогом изобилия 20 в., который напоит и накормит всех желающих.

Эти мечты подпитывались энтузиазмом газетных и журнальных публикаций и телевизионных репортажей. Воображение будоражили полчища удивительных микробов, растения и животные, созданные человеком. Энтузиасты предрекали, что генно-инженерные микробы вытеснят химические удобрения, будут уничтожать разливы нефти; появятся растения с передающимися по наследству устойчивостью к вредителям и исключительно высокой питательной ценностью; будут созданы сельскохозяйственные животные, более эффективно усваивающие пищу, быстро прибавляющие в весе и дающие не жирное мясо. Казалось, что коль скоро конкретные биологические свойства обуславливаются одним или несколькими генами (единицами наследственности), создание организмов с новым генетическим устройством не составит труда. И в самом деле, хотя шумиха, поднятая вокруг новой технологии, была не совсем адекватной, увлечение этой идеей имело основания. Прошло немногим более 15 лет, и многие наиболее разумные проекты стали реальностью.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Генетика и генетическая информация»

2.1.1 Цель работы: Ознакомится с понятием генетическая информация.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить процессы реализации и передачи генетической информации

2. Изучить процессы репликации и транскрипции.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Материал для исследований, мультимедиапроектор, интерактивная доска, компьютер.

2.1.4 Описание (ход) работы:

В хранении, передаче и преобразовании генетической информации центральное место занимают нуклеиновые кислоты. Решающим фактором при этом является способность нуклеиновых, оснований к специфическому (комплементарному) спариванию

А. Реализация и передача генетической информации

Хранение информации. Генетическая информация закодирована в последовательности нуклеотидов ДНК (DNA), организованных в функциональные участки, называемые генами. [РНК (RNA) как носитель генетической информации используется только некоторыми вирусами.] Участки ДНК кодируют белки, т. е. они содержат информацию об аминокислотной последовательности белков. Каждый остаток представлен в ДНК своим кодовым словом (кодоном), состоящим из трех следующих друг за другом оснований. Так, ДНК-кодон для фенилаланина представлен тринуклеотидом TTC (2) На уровне ДНК кодоны образуют ее некодирующую цепь [последовательность нуклеотидов которой соответствует последовательности мРНК (mRNA)]

Репликация. Во время деления клеток генетическая информация должна перейти в дочерние клетки. Для достижения этого вся ДНК клетки копируется в процессе репликации во время S-фазы клеточного цикла, при этом каждая ее цепь служит матрицей для синтеза комплементарной последовательности.

Транскрипция. Для экспрессии гена, т.е. синтеза закодированных в нем белков, последовательность нуклеотидов кодирующей цепи ДНК должна быть трансформирована в аминокислотную последовательность. Поскольку ДНК не принимает непосредственного участия в синтезе белка, информация, хранящаяся в ядре, должна быть перенесена на рибосомы, где собственно и осуществляется биосинтез белков. Для этого соответствующий участок кодирующей цепи ДНК считывается (транскрибируется) с образованием гетерогенной ядерной РНК [гяРНК (hnRNA)], т. е. последовательность этой РНК комплементарна кодирующей цепи ДНК. Поскольку в РНК вместо тимина содержится урацил ААG триплет ДНК трансформируется в UUC-кодон гяРНК.

Созревание РНК. У эукариот гяРНК, прежде, чем покинуть ядро в виде матричной РНК (мРНК, 4), претерпевает существенные изменения: из молекулы вырезаются избыточные (некодирующие) участки (интроны), а оба конца транскриптов модифицируются путем присоединения дополнительных нуклеотидов.

Трансляция. Зрелая мРНК попадает в цитоплазму и связывается с рибосомами, преобразуя полученную информацию в аминокислотную последовательность. Рибосомы — это рибонуклеопротеидные комплексы, включающие несколько десятков белков и несколько молекул рибосомной РНК (рРНК (rRNA)). Рибосомные РНК выполняют функцию структурного элемента рибосом, а также принимают участие в связывании мРНК и образовании пептидных связей.

Механизм преобразования генетической информации основан на взаимодействии кодонов мРНК транспортной РНК [тРНК (tRNA)], которая переносит на рибосому аминокислоты, связанные с 3'-концом тРНК, в соответствии с информацией, закодированной в мРНК. Примерно в середине цепи тРНК расположен триплет (например, GAA),

называемый антикодоном и комплементарный соответствующему кодону а мРНК. Если транслируется кодон UUC, то с ним взаимодействует антикодон в составе Phe-тРНК (5), несущей на 3'-конце остаток фенилаланина. Таким образом, остаток аминокислоты занимает положение, в котором на него может быть перенесена растущая полипептидная цепь, связанная с соседней тРНК (6).

Активация аминокислот. Прежде чем связаться с рибосомой, транспортные РНК присоединяют соответствующую аминокислоту с помощью специфического «узнающего» фермента обеспечивающего точный перенос (трансляцию) генетической информации с уровня нуклеиновых кислот на уровень белка.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания»

2.2.1 Цель работы: Ознакомится с генно-модифицированными источниками пищевой продукции.

2.2.2 Задачи работы:

1. Изучить генно-модифицированные источники пищевой продукции
2. Изучить проблемы биобезопасности в России.
3. Изучить основные виды биобезопасности.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор
2. Методические указания

2.2.4 Описание (ход) работы:

Обсуждаются проблемы биобезопасности в биотехнологии и биоинженерии при создании генетически модифицированных организмов (ГМО). Рассматриваются различные аспекты биобезопасности при работе на генетическом, клеточном, тканевом и организменном уровнях. Описаны возможные отрицательные последствия встраивания в ДНК реципиентной клетки донорского чужеродного гена. Большое внимание уделено критериям, показателям и методам оценки биобезопасности ГМО и качества получаемых из них продуктов. Освещены особенности государственного правового регулирования в России и США генно-инженерной деятельности при создании и использовании ГМО. Предложены способы преодоления отставания по биотехнологии, биоинженерии биобезопасности в России. Начало дискуссии по проблеме биобезопасности в науке и обществе положили основатели нового направления — биоинженерии. В 1974 году 11 ведущих молекулярных биологов мира во главе с отцом генной инженерии американцем П. Бергом, создавшим первую рекомбинантную молекулу ДНК, обратились к мировому сообществу с письмом через журнал «Science», в котором предложили отказаться от экспериментов с рекомбинантными ДНК до проведения международной конференции по этой проблеме. Однако уже в 1975 году на конференции в Асиломаре (США) ученые пришли к выводу о том, что эксперименты в области генной инженерии — новейшей биотехнологии — не более опасны, чем аналогичные работы в других отраслях, но при этом, как и везде, необходим строгий контроль за соблюдением мер безопасности (1). В 1976 году в США были приняты первые правила, регламентирующие работу с рекомбинантными микроорганизмами, которые запрещалось выпускать за стены лабораторий. В конце 70-х годов в большинстве стран мира было разработано соответствующее законодательство.

О понятии безопасности. Природные, техногенные и другие факторы оказывают постоянное и значительное воздействие на человека и окружающую его среду обитания. Эти воздействия могут быть положительными и отрицательными. Наука, общество, государство должны разрабатывать и эффективно использовать системы мер по защите человека и окружающей среды от вредных воздействий любых опасных факторов. Из этого важнейшего положения

вытекает общее понятие о безопасности человека, общества, государства, цивилизации, под которым понимается устойчивое состояние защищенности жизненно важных интересов личности и самой жизни человека, общества и государства от внешних и внутренних угроз (1-3).

Главнейшим объектом безопасности является человек с его потребностями, правами и здоровьем. Безопасность человека не может быть обеспечена без защиты безопасности среды его обитания и жизнедеятельности, а также общества, в котором он живет. Одним из основных принципов безопасности является взаимная ответственность человека, общества и государства. Достижение безопасности — это результат действия системы, предполагающей приведение в действие мер, адекватных угрозам жизненно важных интересов.

Безопасность может быть биологической, экологической, экономической, продовольственной, военной и другой в зависимости от внутренних и внешних факторов, масштабы, направленность и степень воздействия которых угрожают деятельности, существованию и самой жизни объектов (человека, общества, государства, цивилизации в целом). Общее представление о взаимосвязи между видами безопасности и влиянием на них биотехнологии отражено в схеме Поповой (рис., цит. по 1).

Биологически опасные" организмы и их продукты представляют собой угрозу для существования не только человека, но и растений, животных и полезных микроорганизмов, вызывая различную степень их поражения или полную гибель, лишая человека продовольственных и других источников и возможностей существования (1,2, 4-7)

Проблемы биобезопасности существуют в мире давно, так как и в природе, и в производстве в различных необходимых человеку и обществу веществах (продуктах питания, лечения, гигиены и др.) нередко встречаются опасные для здоровья и жизни соединения.

Во всех государствах мира разработаны и применяются различные методы контроля за технологическими процессами и качеством вновь вовлеченных в сферу использования человеком новых биологических объектов и веществ, их токсичностью, аллергенностью и общей безопасностью для здоровья людей и состояния окружающей среды. Большую опасность для здоровья и жизни людей до сих пор представляет употребление в пищу ядовитых грибов как следствие безграмотности и беспечности граждан. Наиболее опасными и часто трагичными являются проблемы алкогольной и наркотической токсикации людей.

2.3 Лабораторная работа №3(2 часа).

Тема: «Общая схема реализации генетической информации»

2.3.1 Цель работы: Ознакомится со схемой реализации генетической информации

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить процессы транскрипции, трансляции.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.3.4 Описание (ход) работы:

Синтез белка - сложный многоступенчатый процесс, в котором участвуют ДНК, иРНК, тРНК, рибосомы, АТФ и разнообразные ферменты. Вначале аминокислоты в цитоплазме активируются с помощью ферментов и присоединяются к тРНК (к участку, где расположен нуклеотид ЦЦА). На следующем этапе идет соединение аминокислот в таком порядке, в каком чередование нуклеотидов с ДНК передано на иРНК. Этот этап называется трансляцией. На нити иРНК размещается не одна рибосома, а группа их - такой комплекс называется полисома. Синтез белка состоит из двух этапов - транскрипции и трансляции.

I. Транскрипция (переписывание) - биосинтез молекул РНК, осуществляется в хромосомах на молекулах ДНК по принципу матричного синтеза. При помощи ферментов на соответствующих участках молекулы ДНК (генах) синтезируются все виды РНК (иРНК, рРНК, тРНК). Синтезируется 20 разновидностей тРНК, так как в биосинтезе белка принимают участие 20

аминокислот. Затем иРНК и тРНК выходят в цитоплазму, рРНК встраивается в субъединицы рибосом, которые также выходят в цитоплазму.

II. Трансляция (передача) - синтез полипептидных цепей белков, осуществляется в рибосомах. Она сопровождается следующими событиями:

1. Образование функционального центра рибосомы - ФЦР, состоящего из иРНК и двух субъединиц рибосом. В ФЦР всегда находятся два триплета (шесть нуклеотидов) иРНК, образующих два активных центра: А (аминокислотный) - центр узнавания аминокислоты и П (пептидный) - центр присоединения аминокислоты к пептидной цепочке.

2. Транспортировка аминокислот, присоединенных к тРНК, из цитоплазмы в ФЦР. В активном центре А осуществляется считывание антикодона тРНК с кодоном иРНК, в случае комплементарности возникает связь, которая служит сигналом для продвижения (скачок) вдоль иРНК рибосомы на один триплет. В результате этого комплекс "кодон рРНК и тРНК с аминокислотой" перемещается в активный центр П, где и происходит присоединение аминокислоты к пептидной цепочке (белковой молекуле). После чего тРНК покидает рибосому.

3. Пептидная цепочка удлиняется до тех пор, пока не закончится трансляция и рибосома не соскочит с иРНК. На одной иРНК может уместиться одновременно несколько рибосом (полисома). Полипептидная цепочка погружается в канал эндоплазматической сети и там приобретает вторичную, третичную или четвертичную структуру. Скорость сборки одной молекулы белка, состоящего из 200-300 аминокислот, составляет 1-2 мин. Формула биосинтеза белка: ДНК (транскрипция) --> РНК (трансляция) --> белок.

Завершив один цикл, полисома может принять участие в синтезе новых молекул белка.

Отделившаяся от рибосомы молекула белка имеет вид нити, которая биологически неактивна. Биологически функциональной она становится после того, как молекула приобретает вторичную, третичную и четвертичную структуру, т. е. определенную пространственную специфическую конфигурацию. Вторичная и последующие структуры белковой молекулы предопределены в информации, заложенной в чередовании аминокислот, т. е. в первичной структуре белка. Иначе говоря, программа образования глобулы, ее уникальная конфигурация определяются первичной структурой молекулы, которая в свою очередь строится под контролем соответствующего гена.

2.4 Лабораторная работа №4(2 часа).

Тема: «Механизмы реализации генетической информации»

2.4.1 Цель работы: Ознакомится с механизмами реализации генетической информации

2.4.2 Задачи работы:

1. Изучить основные этапы реализации наследственной информации

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.4.4 Описание (ход) работы:

Результатом экспрессии генов, кодирующих белки или нуклеиновые кислоты, должно быть образование полноценных в функциональном отношении макромолекул, сопровождаемое формированием определенного фенотипа организма. В соответствии с основным постулатом молекулярной биологии генетическая информация передается однонаправленно от нуклеиновых кислот к белкам по схеме: ДНК <-> РНК -> белок, т.е. в ряде случаев возможна передача генетической информации от РНК к ДНК с использованием механизма обратной

транскрипции. Не обнаружена передача генетической информации от белков к нуклеиновым кислотам.

На первом этапе экспрессии генов происходит переписывание генетической информации на матричные (информационные) РНК (мРНК - messenger RNA, mRNA), которые являются местом промежуточного хранения информации. В некоторых случаях сами РНК являются конечным результатом экспрессии генов, и после ряда ферментативных модификаций они непосредственно используются в клеточных процессах. Это относится, прежде всего, к рибосомным и транспортным РНК (рРНК и тРНК). К таким РНК принадлежат и малые ядерные РНК (мяРНК), участвующие в процессинге предшественников мРНК эукариот, РНК, входящие в состав ферментов, и природные антисмысловые РНК.

Синтез РНК происходит в результате сложной последовательности биохимических реакций, называемой транскрипцией. На втором этапе реализации генетической информации, называемой трансляцией, последовательность нуклеотидов мРНК определяет последовательность аминокислотных остатков синтезируемых белков.

Таким образом, экспрессию генов определяют два глобальных молекулярно-генетических механизма: транскрипция генов и трансляция синтезированных мРНК рибосомами, которая завершается образованием полипептидных цепей, кодируемых генами. Однако процесс экспрессии генов не ограничивается их транскрипцией и трансляцией.

Существенными моментами экспрессии генов являются посттранскрипционные и посттрансляционные модификации мРНК и белков, которые включают процессинг их предшественников (удаление избыточных последовательностей и другие ковалентные модификации последовательностей РНК и белков). Посттранскрипционные модификации предшественников мРНК обеспечивают подготовку мРНК к трансляции рибосомами и определяют продолжительность ее существования в цитоплазме. Посттрансляционные модификации белков необходимы для их полноценного функционирования.

2.5 Лабораторная работа №5(2 часа).

Тема: «Особенности механизмов трансляции у прокариот и эукариот»

2.5.1 Цель работы: Ознакомится с особенностями механизмов трансляции у прокариот и эукариот

2.5.2 Задачи работы:

- 1.Изучить особенности трансляции у прокариот
- 2.Изучить особенности трансляции у эукариот

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.5.4 Описание (ход) работы:

Одной из особенностей трансляции у прокариот является включение в пептидную цепь в качестве первой аминокислоты модифицированного метионина - формилметионина, с которого начинаются все вновь синтезированные пептиды. Даже в том случае, когда роль стартового кодона выполняет кодон ГУГ, в обычных условиях шифрующий валин, в первом положении пептида оказывается формилметионин. Стартовый кодон АУГ или ГУГ следует за лидерным участком, который экранируется рибосомой в момент инициации трансляции.

Соединение рибосомы с мРНК обусловлено комплементарным взаимодействием нуклеотидов одной из рРНК с нуклеотидной последовательностью лидера мРНК.

Эта последовательность (Шайна-Дальгарно) располагается на расстоянии 4-7 оснований перед кодоном АУГ и обнаруживается повсеместно в лидерных участках у прокариот.

При соединении 5'-конца мРНК с малой субчастицей рибосомы стартовый кодон обычно оказывается почти в середине экранированного рибосомой фрагмента мРНК, в области, соответствующей ее П-участку.

У эукариот трансляция осуществляется в цитоплазме, куда попадает из ядра зрелая мРНК. Копированный конец мРНК распознается малой субчастицей рибосомы, затем лидирующая

последовательность, содержащая до 100 нуклеотидов, взаимодействует с рРНК. При этом стартовый кодон АУГ оказывается в недостроенном П-участке рибосомы. После присоединения к стартовому кодону аминоацил-тРНК, несущей метионин, происходит воссоединение двух субчастиц рибосомы и формируются ее А - и П-участки. Синтез белка в эукариотической клетке, осуществляемый на моноцистронной мРНК, завершается после прохождения рибосомой по всей мРНК, вплоть до узнавания ею кодона-терминатора, прекращающего образование пептидных связей.

2.6 Лабораторная работа №6(2 часа).

Тема: «Хромосомы: строение и функционирование»

2.6.1 Цель работы: Ознакомится со строением и функциями хромосом

2.6.2 Задачи работы:

1. Изучить строение хромосом
2. Изучить основные функции хромосом

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.6.4 Описание (ход) работы:

Морфология хромосом лучше всего видна в клетке на стадии метафазы. Хромосома состоит из двух палочкообразных телец - хроматид. Обе хроматиды каждой хромосомы идентичны друг другу по генному составу.

Хромосомы дифференцированы по длине. Хромосомы имеют центромеру или первичную перетяжку, две теломеры и два плеча. На некоторых хромосомах выделяют вторичные перетяжки и спутники. Движение хромосомы определяет Центромера, которая имеет сложное строение.

ДНК центромеры отличается характерной последовательностью нуклеотидов и специфическими белками. В зависимости от расположения центромеры различают акроцентрические, субметацентрические и метацентрические хромосомы.

Как говорилось выше, некоторые хромосомы имеют вторичные перетяжки. Они, в отличие от первичной перетяжки (центромеры), не служат местом прикрепления нитей веретена и не играют никакой роли в движении хромосом. Некоторые вторичные перетяжки связаны с образованием ядрышек, в этом случае их называют ядрышковыми организаторами. В ядрышковых организаторах расположены гены, ответственные за синтез РНК. Функция других вторичных перетяжек еще не ясна.

У некоторых акроцентрических хромосом есть спутники — участки, соединенные с остальной частью хромосомы тонкой нитью хроматина. Форма и размеры спутника постоянны для данной хромосомы. У человека спутники имеются у пяти пар хромосом.

Концевые участки хромосом, богатые структурным гетерохроматином, называются теломерами. Теломеры препятствуют слипанию концов хромосом после редупликации и тем самым способствуют сохранению их целостности. Следовательно, теломеры ответственны за существование хромосом как индивидуальных образований.

Хромосомы, имеющие одинаковый порядок генов, называют гомологичными. Они имеют одинаковое строение (длина, расположение центромеры и т. д.). Негомологичные хромосомы имеют разный генный набор и разное строение.

Исследование тонкой структуры хромосом показало, что они состоят из ДНК, белка и

небольшого количества РНК. Молекула ДНК несет отрицательные заряды, распределенные по всей длине, а присоединенные к ней белки — гистоны заряжены положительно. Этот комплекс ДНК с белком называют хроматином. Хроматин может иметь разную степень конденсации. Конденсированный хроматин называют гетерохроматином, деконденсированный хроматин — эухроматином. Степень деконденсации хроматина отражает его функциональное состояние. Гетерохроматиновые участки функционально менее активны, чем эухроматиновые, в которых локализована большая часть генов. Различают структурный гетерохроматин, количество, которого различается в разных хромосомах, но располагается он постоянно в окоlocентромерных районах. Кроме структурного гетерохроматина существует факультативный гетерохроматин, который появляется в хромосоме при сверхспирализации эухроматических районов. Подтверждением существования этого явления в хромосомах человека служит факт генетической инактивации одной X-хромосомы в соматических клетках женщины. Его суть заключается в том, что существует эволюционно сформировавшийся механизм инактивации второй дозы генов, локализованных в X-хромосоме, вследствие чего, несмотря на разное число X-хромосом в мужском и женском организмах, число функционирующих в них генов уравнено. Максимально конденсирован хроматин во время митотического деления клеток, тогда его можно обнаружить в виде плотных хромосом

Размеры молекул ДНК хромосом огромны. Каждая хромосома представлена одной молекулой ДНК. Они могут достигать сотен микрометров и даже сантиметров. Из хромосом человека самая большая — первая; ее ДНК имеет общую длину до 7 см. Суммарная длина молекул ДНК всех хромосом одной клетки человека составляет 170 см.

Несмотря на гигантские размеры молекул ДНК, она достаточно плотно упакована в хромосомах. Такую специфическую укладку хромосомной ДНК обеспечивают белки гистоны. Гистоны располагаются по длине молекулы ДНК в виде блоков. В один блок входит 8 молекул гистонов, образуя нуклеосому (образование, состоящее из нити ДНК, намотанной вокруг октамера гистонов). Размер нуклеосомы около 10 нм. Нуклеосомы имеют вид нанизанных на нитку бусинок. Нуклеосомы и соединяющие их участки ДНК плотно упакованы в виде спирали, на каждый виток такой спирали приходится шесть нуклеосом. Так формируется структура хромосомы.

Наследственная информация организма строго упорядочена по отдельным хромосомам. Каждый организм характеризуется определенным набором хромосом (число, размеры и структура), который называется кариотипом. Кариотип человека представлен двадцатью четырьмя разными хромосомами (22 пары аутом, X- и Y-хромосомы). Кариотип — это паспорт вида. Анализ кариотипа позволяет выявлять нарушения, которые могут приводить к аномалиям развития, наследственным болезням или гибели плодов и эмбрионов на ранних стадиях развития.

Длительное время полагали, что кариотип человека состоит из 48 хромосом. Однако в начале 1956 г. было опубликовано сообщение, согласно которому число хромосом в кариотипе человека равно 46.

Хромосомы человека различаются по размеру, расположению центромеры и вторичных перетяжек. Впервые подразделение кариотипа на группы было проведено в 1960 г. на конференции в г. Денвере (США). В описание кариотипа человека первоначально были заложены два следующих принципа: расположение хромосом по их длине; группировка хромосом по расположению центромеры (метацентрические, субметацентрические, аacroцентрические).

Точное постоянство числа хромосом, их индивидуальность и сложность строения

свидетельствуют о важности выполняемой ими функции. Хромосомы выполняют функцию основного генетического аппарата клетки. В них в линейном порядке расположены гены, каждый из которых занимает строго определенное место (локус) в хромосоме. В каждой хромосоме много генов, но для нормального развития организма необходим набор генов полного хромосомного набора.

2.7 Лабораторная работа №7(4 часа).

Тема: «Переработка, передача и изменение генетической информации в ряду поколений»

2.7.1 Цель работы: Ознакомится с переработкой, передачей и изменением генетической информации в ряду поколений

2.7.2 Задачи работы:

1.Изучить процессы переработки, передачи и изменения генетической информации в ряду поколений

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.7.4 Описание (ход) работы:

Жизнь на Земле чрезвычайно разнообразна. С начала появления жизни на Земле, то есть с течением биологического времени (3,5–3,7 млрд лет) эволюция живых организмов насчитывает огромное количество видов. В настоящее время, по разным оценкам, на Земле существует около 500 тыс. видов растений, из которых 300 тыс. высших. Царство животного мира более разнообразно, чем царство растений. На сегодняшний день описано около 1,5 млн видов представителей животного мира, но очевидно, что это далеко не исчерпывающие сведения.

Все разнообразие видов на Земле классифицируют согласно категориям систематики: царство-тип-подтип-класс-отряд-семейство-род-вид-подвид-разновидность. Наиболее широкая и общая таксономическая единица – это царство. Современная биология выделяет пять царств. Это прокариоты, простейшие, грибы, растения, животные. Все эти таксономические единицы являются результатом исторического процесса в мире живой материи, его эволюции

Жизнь есть качественно новая форма организации материи, основное свойство которой состоит в способности усваивать энергию Солнца за счет процесса фотосинтеза и воспроизводить из неживого живое. Современная биологическая картина мира основывается на том, что мир живого – это колоссальная система высокоорганизованных систем.

Специфика жизненных процессов тесно связана с особым типом их субстрата – чрезвычайно сложными органическими соединениями: белками и нуклеиновыми кислотами. Любой живой организм представляет собой открытую органически целостную систему, в которой происходят сложные взаимодействия и имеют место взаимозависимости отдельных структурных и функциональных компонентов. Последние определяют автономный и самопроизводный характер морфогенетических процессов живых систем и их способность к самоорганизации. Это обеспечивает самосохранение живых систем, их адаптацию к внешней среде. Взаимодействие с внешней средой осуществляется через обменные процессы, в ходе которых происходит сложный синтез и деструкция поступающих в организм веществ. Молекулярная биология нашего времени выявила поразительное единство живой материи на всех уровнях ее развития – от простейших микроорганизмов до человека. Это единство представлено двумя основными классами молекул – нуклеиновыми кислотами и белками. Именно их взаимодействие и составляет основу жизни.

Почти все живые организмы состоят из клеток (кроме вирусов и фагов). По этому признаку организмы делятся на доклеточные и клеточные.

Доклеточные формы жизни – вирусы – занимают промежуточное положение между живым и неживым. Они сочетают в себе свойства и живого, и неживого. Вирусы существуют в двух формах – в форме вириона (покоящийся, внеклеточный вирус, который в «спячке» ведет себя как неживое вещество) и в форме репродуцирующегося внутриклеточного вируса, который

ведет себя как живое вещество. Вирусы были открыты в 1982 г. русским микробиологом Д. И. Ивановским. Вирусы состоят из белковых молекул и нуклеиновых кислот и не имеют собственного обмена веществ. Они существенно отличаются от остальных форм жизни. Иногда их даже выделяют в отдельное царство живых организмов – Vira.

Все клеточные живые организмы делятся на одноклеточные и многоклеточные. Одноклеточные организмы (бактерии, простейшие, некоторые водоросли и грибы) состоят лишь из одной клетки. Одноклеточные в свою очередь делятся на прокариотов (клетка которых лишена ядра) и эукариотов (клетка которых имеет ядро). Многоклеточные организмы состоят из множества клеток. Так, например, организм человека состоит из 10¹⁴ клеток. Клетки многоклеточного организма выполняют различные функции – как специализированные, так и обще клеточные. Многоклеточный живой организм обладает функциями и свойствами, которые не сводятся к функциям отдельных клеток и даже их суммы.

Современная наука о клетке – цитология – представляет клетку как чрезвычайно сложноорганизованную биологическую систему. Клетка состоит из оболочки (мембраны), наполненной протоплазмой. В протоплазме находятся органоиды, выполняющие определенные специализированные функции (обмен веществ, дыхание, синтез белка и т. д.), и ядро (или нуклеотид) с генетическим аппаратом.

Элементы и компоненты биологических систем выражают дискретную составляющую живого. Живые объекты в общей системе живых организмов в природе относительно обособлены один от другого (особи, популяции, виды). Каждая особь одноклеточного или многоклеточного организма состоит из клеток. Клетка состоит из оргanelл. Оргanelлы в свою очередь представлены отдельными высокомолекулярными органическими веществами. Вследствие такой чрезвычайной сложности живых систем в природе не может быть двух одинаковых особей, популяций или видов, хотя в целом они могут быть очень близкими.

Биологические системы отличаются высоким уровнем целостности, основанной на структурах и типах связей между ее элементами. Это открытые системы, которым свойствен обмен веществом и энергией с окружающей средой. В процессе органической эволюции биологическим системам свойственны усложнение, снижение энтропии и рост самоорганизации.

Характерными особенностями живых систем кроме обмена веществом и энергией являются саморегуляция, раздражимость, синтез органических веществ, рост, размножение, адаптация к окружающей среде и передача наследственных признаков. В живых системах саморегуляция осуществляется на уровне интенсивного обмена веществом, энергией и информацией с окружающей природной средой.

Фундаментальным свойством живого является опережающее возбуждение, которое лежит в основе формирования адаптивных признаков. Вследствие этого многие действия живых организмов имеют опережающий характер по отношению к окружающей природной среде. Это так называемое опережающее отражение. Живое заранее готовится, например, к смене времен года. Так, рыба средних широт уже с осени накапливает жир, готовясь к зиме; деревья задолго сбрасывают листву, многолетние растения для лучшей перезимовки накапливают в клетках углеводы. Проявление опережения может быть не только на биохимическом уровне, но и на социальном, что выражается в различного рода планированиях.

Уникальной особенностью живого является его самовоспроизведение, которое осуществляется на основе матричного принципа синтеза макромолекул. ДНК, хромосомы и гены как главные управляющие системы живых организмов обладают высокой стабильностью к идентичному самовоспроизведению, что обеспечивает передачу наследственных признаков ряду поколений. В изменяющихся условиях среды достаточно стабильное генное управление претерпевает некоторые структурные изменения. Эти изменения, мутации в выжившем и изменившемся в соответствии с условиями среды организме передаются по наследству по матричному принципу. Это приводит к разнообразию живой материи.

Концепция системно-структурных уровней организации живой материи позволяет не только представить многообразие живых организмов по уровням их сложности и специфики

функционирования, но и расположить их в иерархическом порядке, где каждый предыдущий уровень входит в последующий, образуя единое целое живой системы. Критерием выделения тех или иных уровней являются специфические дискретные структуры, а также фундаментальные биологические взаимодействия.

Существуют различные градации структурных уровней организации живой материи, которые довольно многочисленны. Среди них: самоорганизующиеся комплексы, биомакромолекулы, клетки, многоклеточные организмы. Имеют место и такие классификации: 1) молекулярно-генетический, клеточный, организменный, популяционно-видовой, биогеоценозный; 2) молекулярный, клеточный, тканевый, органный, организменный (онтогенетический), популяционно-видовой, биогеоценозический, биосферный. Определены и некоторые другие уровни организации живой материи. Однако классическими уровнями в современной биологии являются следующие: молекулярно-генетический, клеточный, онтогенетический, популяционно-видовой, био-геоценозический (биосферный).

Молекулярно-генетический уровень биологических структур

Молекулярно-генетический уровень является тем уровнем организации живой материи, на котором совершался переход от атомно-молекулярного уровня неживой материи к макромолекулам живой. Знание этого уровня организации живого необходимо для понимания жизненных явлений, происходящих на всех других уровнях организации жизни. Это уровень функционирования биополимеров, таких как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и другие важнейшие органические соединения, положившие начало основным процессам жизнедеятельности. На этом уровне организации живой материи элементарными структурными единицами являются гены. Вся наследственная информация у живых организмов заложена в молекулах ДНК (дезоксирибонуклеиновые кислоты). Реализация этой информации связана с участием молекул РНК (рибонуклеиновые кислоты). С молекулярными структурами связаны хранение, изменение и реализация наследственной информации, то есть передача ее из поколения в поколение. Поэтому этот уровень и называют молекулярно-генетическим. РНК и ДНК были выделены из ядер клеток и поэтому получили название нуклеиновых, то есть ядерных, кислот.

В этих кислотах имеются углеводные компоненты: Д-дезоксирибоза в ДНК и Д-рибоза в РНК, отсюда и название этих нуклеиновых кислот.

Роль нуклеиновых кислот в хранении и передаче наследственности, а также участие их в синтезе белка и обмене веществ были окончательно выяснены лишь в середине XX столетия. В 1953 г. американскими учеными Д. Уотсоном и Ф. Криком была предложена и экспериментально подтверждена гипотеза о структуре молекулы ДНК как материального носителя генетической информации. В 1960-е гг. французскими учеными Ж. Моно и Ф. Жакобом была решена одна из главных проблем генной активности, которая объясняла фундаментальную особенность функционирования живой природы на молекулярном уровне.

На молекулярно-генетическом уровне важнейшей задачей современной биологии является исследование механизмов передачи генной информации, наследственности, а также изменчивости.

Одним из важнейших механизмов изменчивости на молекулярном уровне является механизм мутации генов, то есть их непосредственное преобразование под воздействием внешних факторов, вызывающих мутации (появление мутагенов), это – вирусы, радиация, токсические химические соединения.

Механизмом изменчивости может быть и рекомбинация генов, то есть создание новых их комбинаций. Этот процесс свойствен половому размножению у высших организмов. При нем не происходит изменения общего объема генетической информации. Этот механизм называется классическим.

В других так называемых неклассических случаях рекомбинация может сопровождаться увеличением информации генома клетки. В этом случае фрагменты хромосомы клетки-донора включаются в хромосому принимающей клетки. Они могут оставаться в скрытом, латентном,

состоянии некоторое время, а также соединяться с принимающей клеткой (клеткой-реципиентом), когда под действием внешних факторов они становятся активными.

2.8 Лабораторная работа №8(2 часа).

Тема: «Сохранение и защита генетической информации»

2.8.1 Цель работы: Ознакомится с методами Сохранение и защита генетической информации

2.8.2 Задачи работы:

1.Изучить способы сохранения генетической информации

2.Изучить способы защиты генетической информации

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимидийный проектор

2.8.4 Описание (ход) работы:

Существование биологических видов зависит от точности передачи генетической информации от организмов-родителей потомкам и от одной соматической клетки к другой. Точность передачи потомкам генетической информации должна быть, с одной стороны, достаточно высокой для сохранения данного вида в ряду поколений, с другой стороны, достаточно низкой, чтобы обеспечить возможность эволюции вида и приспособления его к изменяющимся условиям внешней среды. Важную роль в обеспечении точности передачи потомкам генетической информации играет механизм системы репликации ДНК и система репарации (исправления) ошибок, случайно возникающих при репликации ДНК и после ее завершения.

Консервация генетической информации, заключенной в отдельных генетических локусах, может быть вредной для организма и вида. В частности, одним из механизмов, лежащих в основе возникновения разнообразия антител, являются запрограммированные изменения генов иммуноглобулинов, которые закрепляются в геноме лимфоцитов в результате их отбора в онтогенезе. Высокий темп изменений некоторых генетических локусов у паразитических организмов, например, трипаносом, в результате которых меняется структура антигенных детерминант на поверхности их клеток, необходим для их выживания, так как помогает этим организмам избежать нейтрализующего действия иммунной системы организма- хозяина. Другим примером является генетическая изменчивость вируса гриппа.

Абсолютный консерватизм в передаче генетической информации сделал бы невозможным филогенетическое развитие организмов. Эволюционно сложившиеся отношения между точностью функционирования генетических систем и частотой ошибок, возникающих при воспроизведении генетической информации отдельных генетических локусов, сбалансированы между собой, и в ряде случаев являются регулируемыми. Запрограммированные и случайные наследуемые изменения генома, называемые мутациями, могут сопровождаться колоссальными количественными и качественными изменениями в экспрессии генов.

2.9 Лабораторная работа №9(4 часа).

Тема: «Развитие многоклеточного организма»

2.9.1 Цель работы: Ознакомится с процессом развития многоклеточного организма

2.9.2 Задачи работы:

1.Изучить последовательность развития многоклеточного организма

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимидийный проектор

2. Методические указания

2.9.4 Описание (ход) работы:

Онтогенез, или процесс индивидуального развития особи, характерен для всех живых существ. Он означает закономерную и последовательную смену событий, определяющую развитие и существование организма от зарождения до конца жизни.

Обычно под онтогенезом понимают процесс развития многоклеточного организма (образующегося в результате полового размножения) от момента формирования зиготы до естественной смерти особи.

Понятие «онтогенез», безусловно, применимо и к одноклеточным организмам. Действительно, при делении, например, инфузории образуются дочерние клетки-особи, которые сначала существенно отличаются от материнского организма. Они мельче, лишены ряда органелл, формирующихся лишь течением времени, в процессе их индивидуального существования. Достигнув зрелого состояния, дочерние организмы дадут (пережив деление) начало новому поколению.

При такой смене поколений не происходит естественной смерти особей, однако можно говорить об их онтогенезе — от деления до деления этих одноклеточных организмов.

Применимо данное понятие и к организмам, размножающимся бесполым путем. Например, при почковании у гидры процесс индивидуального развития особи начинается с момента возникновения почки на материнском организме до естественной смерти дочерней особи.

Наиболее подробно изучен онтогенез у многоклеточных животных, на примере которых мы и рассмотрим основные этапы и закономерности индивидуального развития.

При половом размножении у животных онтогенез начинается с момента формирования зиготы - клетки, образующейся в результате слияния яйцеклетки и сперматозоида. За счет митотического деления зиготы и последующих поколений клеток образуется многоклеточный организм, состоящий из большого числа клеток разных типов, различных тканей и органов. На ранних этапах онтогенеза происходит интенсивный рост (увеличение размеров и массы) развивающейся особи, дифференцировка и морфогенез. Дифференцировка, (возникновение различий между однородными клетками и тканями) лежит в основе морфогенеза, т. е. процесса формирования различных структур в развивающемся организме.

2.10 Лабораторная работа №10(4 часа).

Тема: «Иммунитет. Некоторые отклонения в работе иммунной системы»

2.10.1 Цель работы: Ознакомиться с понятием иммунитета и некоторыми отклонениями в работе иммунной системы

2.10.2 Задачи работы:

1. Изучить виды иммунитета
2. Изучить некоторые отклонения в работе иммунной системы

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультиимидийный проектор
2. Методические указания

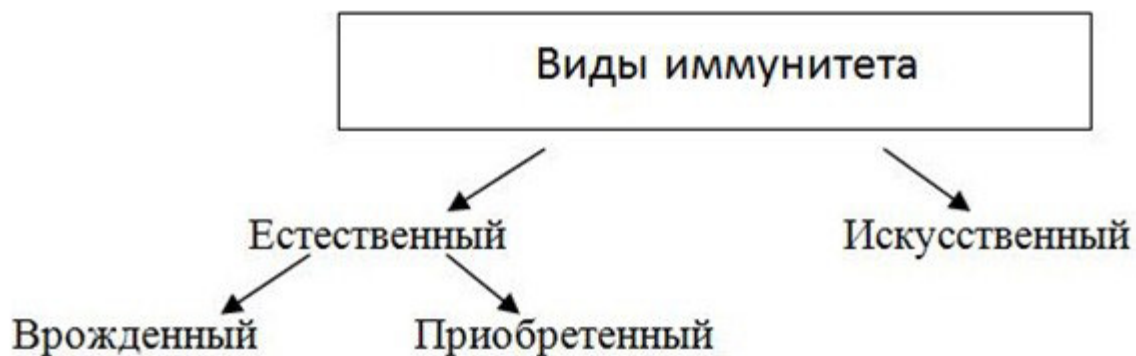
2.10.4 Описание (ход) работы:

Иммунитет — способность организма к невосприимчивости и сопротивлению чужеродным веществам различного происхождения. Эта сложная система защиты создавалась и менялась одновременно с развитием эволюции. Изменения эти продолжаются и сейчас, так как постоянно изменяются условия окружающей среды, а значит и условия проживания существующих организмов. Благодаря иммунитету, наш организм способен к распознаванию и уничтожению болезнетворных организмов, инородных тел, ядов и внутренних переродившихся клеток организма.

Понятие об иммунитете определяется общим состоянием организма, которое зависит от процесса обмена веществ, наследственности и изменений под действием внешней среды.

Естественно, организм будет отличаться крепким здоровьем, если сильным будет иммунитет. Виды иммунитета человека по своему происхождению делятся на врожденный и приобретенный, естественный и искусственный.

«Виды иммунитета» Схема



Врожденный иммунитет – это генотипический признак организма, передающийся по наследству. Работа этого вида иммунитета обеспечивается многими факторами на различных уровнях: клеточном и не клеточном (или гуморальном). В некоторых случаях естественная функция защиты организма может снижаться в результате совершенствования чужеродных микроорганизмов. При этом естественный иммунитет организма понижается. Это, как правило, происходит во время стрессовых ситуаций или при гиповитаминозе. Если чужеродный агент во время ослабленного состояния организма попадает в кровь, то в этом случае свою работу начинает приобретенный иммунитет. То есть разные виды иммунитета сменяют друг друга.

Приобретенный иммунитет – это фенотипический признак, сопротивляемость чужеродным агентам, которая формируется после вакцинирования или перенесенного организмом инфекционного заболевания. Поэтому стоит переболеть какой-либо болезнью, например, оспой, корью или ветрянкой, и тогда в организме формируются специальные средства защиты от этих болезней. Повторно уже человек ими заболеть не может.

Естественный иммунитет может быть, как врожденным, так и приобретенным после перенесенного инфекционного заболевания. Также этот иммунитет может создаваться с помощью антител матери, которые поступают к плоду во время беременности, а потом и при грудном вскармливании уже к ребенку. Искусственный иммунитет, в отличие от естественного обретается организмом после вакцинации или в результате введения особого вещества – лечебной сыворотки.

Если у организма наблюдается длительная устойчивость к повторному случаю инфекционного заболевания, то иммунитет можно назвать постоянным. При невосприимчивости организма к заболеваниям в течение некоторого времени, в результате введения сыворотки, иммунитет называют временным.

При условии выработки организмом антител самостоятельно – иммунитет активный. Если же антитела организм получает в готовом виде (через плаценту, из лечебной сыворотки или через грудное молоко), то говорят о пассивном иммунитете.

«Виды иммунитета» Таблица

Вид иммунитета	Способ проявления
Врожденный (естественный)	Сопrotивляемость к заболеваниям с рождения
Приобретенный (естественный)	Формирование антител после инфекционной болезни
Активный (искусственный)	Возникает после прививки
Пассивный (искусственный)	Появляется в результате введения сыворотки

Иммунодефицитные заболевания. Причиной возникновения заболеваний иммунной системы является ее медленная неэффективная работа, когда иммунитет или его отдельные звенья полностью отсутствуют или нарушены вследствие дисфункции принципов функционирования системы. Заболевания данного типа бывают двух категорий: первичные (врожденные) и вторичные (приобретенные). Развитие врожденного заболевания происходит в результате сбоя работы отдельных генов, дисфункция вызвана наследственными факторами. Врожденными

заболеваниями считаются синдром Вискотта-Олдрича, хронический гранулематоз, у больных от рождения детей отсутствуют стволовые лимфоидные клетки Т-ряда и В-ряда, в костном мозге отсутствуют пре-В-лимфоциты. К приобретенным заболеваниям относятся СПИД, гепатит, цирроз, диабет, уремия и т.д. При поражении клеток иммунной системы вирусным агентом иммунодефицит рассматривается как отдельное заболевание. Аутоиммунные заболевания проявляются, когда механизм разрушения направлен на собственные здоровые клетки. В ходе болезни здоровые ткани и органы разрушаются собственной иммунной системой, поражаются целые системы, именно поэтому заболевание относится к категории системных. Самые известные аутоиммунные заболевания: красная системная волчанка, болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит, множественный склероз и так далее. Узнайте о лечебном эффекте криосауны: показания и противопоказания холодной процедуры. А также ознакомьтесь с процедурой «жемчужные ванны». Аллергические заболевания возникают вследствие гипериммунной реакции организма на воздействие факторов окружающей среды (продукты питания, химические вещества, растения, микроорганизмы и т.д.), они еще называются аллергенами. Причиной возникновения аллергических реакций могут быть самые разные факторы (загрязнение окружающей среды, изделия химической промышленности, прием антибиотиков и медицинских препаратов, физическая пассивность, стрессы, плохое питание, злоупотребление алкоголем и курением). Аллергены могут возникать также в результате самых разных соединений, попадают в организм из внешней среды и образуются внутри организма (аутоаллергены / эндогенные аллергены). Часто встречаются такие заболевания, как крапивница, поллинозы, бронхиальная астма, контактные дерматиты.

2.11 Лабораторная работа №11(2 часа).

Тема: «Получение животных и растительных трансгенных организмов»

2.11.1 Цель работы: Ознакомиться с принципами получения животных и растительных трансгенных организмов

2.11.2 Задачи работы:

1. Изучить принципы получения животных и растительных трансгенных организмов

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2. Методические указания

2.11.4 Описание (ход) работы:

Мы выяснили, что смысл генно-инженерных манипуляций состоит в переносе целевого гена в геном клетки-мишени и его экспрессии в новом генном окружении. Логика проведения такой манипуляции мало меняется в зависимости от того, какой целевой ген будет использован и клетки какого организма подвергнутся изменению. Главное, что после получения трансформированной изменённой клетки из неё можно получить полноценный организм. При этом подходы к формированию организма зависят от того, какая клетка — бактериальная, растительная или животная — служила мишенью для трансформации. В случае бактериальной клетки либо клетки другого одноклеточного организма (например, дрожжей), получение трансгенного организма ограничивается непосредственным переносом гена в клетку-мишень. Клетка одноклеточных сама по себе — самостоятельный полноценный организм. Деление такой клетки приводит к появлению идентичных организмов с теми же свойствами, что были приобретены исходной трансгенной - материнской клеткой.

Для получения трансгенного животного в качестве клетки-мишени используют половую клетку — яйцеклетку. После трансформации в ходе естественных процессов развития яйцеклетка превращается в полноценный автономный организм. Передача новых признаков в поколениях невозможна, если процесс трансформации не затронул половые клетки.

Растения имеют важное преимущество перед животными, а именно — возможна их

регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных растений. Это свойство (тотипотентность) дает возможность получать генетически модифицированные (трансгенные) растения и изучать функционирование введенных в растения генов.

Вводить в геном растительных клеток гены, кодирующие нужный белок, пробовали разными способами, однако они все были малоэффективны. Удобный способ доставки чужих генов был подсказан самой природой — трансформация растений с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*. Как и у большинства других бактерий, I часть их генома находится не в основной хромосоме, а в плазмидах. Ti-плазмиды (tumorigenic, опухолеобразующие), найденные в *Agrobacterium tumefaciens* или Ri-плазмиды (root-inducing, корнеобразующие) в *Agrobacterium rhizogenes*, оказались лучшим инструментом для генной инженерии.

Агробактерии являются мезофильными обитателями почвы, среди них встречаются как сапрофитные (*A. radiobacter*), так и фитопатогенные (*A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. rhizogenes*, *A. vinis*) виды. Это короткие, подвижные грамотрицательные палочки с перитрихальными жгутиками.

Опухолевый рост у растений, индуцированный патогенными штаммами *Agrobacterium*, представляет собой особый случай паразитизма: паразит (агробактерия) изменяет обмен веществ в клетках хозяина, вводя свою генетическую информацию в его геном. Такое явление получило название «генетическая колонизация». Ферментативный механизм растения, отвечающий за транскрипцию собственной ДНК и синтез белка, распознает чужеродную ДНК из бактерии как свою собственную и транскрибирует ее вместе с обычными растительными генами.

В природе образование опухоли начинается с повреждения стебля растения у самой земли. Агробактерии могут трансформировать растение только при наличии пораненной растительной ткани, которая теряет различные вещества, входящие в состав клеточных стенок (глюкозу, глюкуроновую кислоту, галактозу, галактуроно-вую кислоту, арабинозу, маннозу, фукозу, целлобиозу и ксилозу), а взамен в ней начинают синтезироваться специальные вещества — предшественники лигнина, являющиеся сигнальными молекулами для начала инфекции — ацетосирингон и гидро-ацетосирингон, способствующие заживлению раны.

Патогены чувствительны к ним и начинают двигаться к поврежденному участку ткани по градиенту концентрации этих веществ со скоростью 60 мкм/сек, а затем прикрепляются к клеткам растения в местах повреждений. После прикрепления бактерий к поверхности клеток растения они начинают образовывать целлюлозные фибриллы, которые видны при микроскопировании уже через 90 мин после добавления бактерий и к 10 часам инкубации формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий, за счет чего увеличивается множественность заражения. В результате размножения образуются скопления бактерий на поверхности растения. Передача ДНК от бактерий в растительную клетку происходит при плотном контакте бактерий с плазмалеммой растительной клетки, который обеспечивается вследствие повреждения клеточных стенок ферментами, выделяемыми бактериями и растворяющими пектины клеточной стенки.

Для чего же нужно бактериям встраивать свои гены в клетки растения, изменяя их метаболизм?

В растениях со встроенных бактериальных генов начинается синтез фитогормонов

цитокининов и специфических, используемых только агробактериями, веществ — опинов. Синтез дополнительного количества гормонов в растительной клетке приводит к сдвигу баланса гормонов в клетке и, как следствие, к неуправляемому росту клеток, ведущему к образованию опухоли. Эти вещества — опины используются бактериями в качестве источника углерода и азота, что создаёт для них селективные преимущества, т.к. только агробактерии имеют гены, ответственные за деградацию этих соединений. Геном *A. tumefaciens* состоит из 2-х частей — из большой линейной хромосомы (2 млн пар оснований) и значительно меньшей кольцевой хромосомы (206479 пар оснований). Именно эта кольцевая хромосома и носит название Ti-плазмиды (см. выше).

Гены, вызывающие формирование галлов на растениях, локализованы по большей части на Ti-плазмиде. *Agrobacterium tumefaciens* имеет очень широкий круг растений-хозяев и может инфицировать практически все двудольные растения. Долгое время считалось, что однодольные растения не чувствительны к агробактериальной инфекции. В настоящее время показано, что при соблюдении определенных условий агробактерии могут инфицировать и однодольные растения, в частности представителей таких семейств, как *Amaryllidaceae*, *Liliaceae*, *Gramineae*, *Iridaceae* и некоторых других. Однако существуют определенные вариации круга хозяев для различных штаммов *Agrobacterium*: некоторые штаммы способны вызывать галлообразование на отдельных видах растений, но не инфицируют другие. Различные сорта одного и того же растения также могут иметь различную чувствительность к данному бактериальному штамму. В отличие от *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* фактически инфицируют все виды растений, как двудольные, так и однодольные.

Ti-плазида представляет собой кольцевую двунитевую ДНК, которая несет гены, участвующие в образовании опухоли. В растение переносится часть плазмиды, которая называется Т-ДНК (от англ. transferred DNA, т.е. «переносимая ДНК»), на которой локализованы гены синтеза ферментов, вызывающих формирование опухолей на растениях, а также гены синтеза опинов. Ti-плазида содержит также w'-гены, которые экспрессируются под воздействием сигнальных молекул и являются ответственными за синтез, вырезание и перенос Т-ДНК, но сами в геном растения не переносятся.

Индукция *vir* генов обратима, и каскад реакций может быть прерван, что очень важно для патогена, поскольку в том случае, если инфицируется больной и/или нежизнеспособный организм, то перенос Т-ДНК в его клетки не осуществляется. После активации w'-генов в оболочке бактерии образуется разрыв, через который Т-ДНК переносится в растительную клетку. Похожим образом у бактерий происходит половой процесс, когда микробы просто обмениваются копиями плазмид.

Т-ДНК, являясь фрагментом Ti-плазмиды, ограничена двумя прямыми повторами из 25 нуклеотидов, которые «обманывают» ферменты растительной клетки, заставляя их принять Т-ДНК за родную и встроить ее в собственный геном. Правый конец обозначается П (RB — right border), левый соответственно Л (LB — left border). Для нормального переноса в растительную клетку особенно важна ее правая граница, которая одна может определять встраивание Т-ДНК. Удаление правой границы из Ti-плазмид делает агробактерии полностью неинфекционными. В то же время замена правой границы как на искусственно синтезированную, так и на левую восстанавливает вирулентность бактерии. Любой фрагмент ДНК, помещенный между этими границами, может быть перенесен и встроен в ядро растительной клетки. Максимальный размер фрагмента ДНК, который может быть перенесен, пока не определен.

На рисунке приведена схема генетической трансформации клетки. Фенольные компоненты пораненной растительной клетки запускают экспрессию генов *vir*-области Ti-плазмиды. *vir*-белки вырезают Т-область из плазмиды, образуя Т-цепь. Затем Т-цепь и *vir*-белки нескольких типов переносятся в растительную клетку через транспортные каналы. Внутри клетки *vir*-белки взаимодействуют с Т-цепью, формируя Т-комплекс. Этот комплекс попадает в ядро, позволяя Т-ДНК интегрировать в геном растения и экспрессировать встроенные гены

После переноса в ядро растительной клетки Т-ДНК встраивается в геном в виде одной или нескольких копий. При этом одна из нитей плазмидной ДНК деградирует, а другая за счет рекомбинации с гомологичным участком ДНК клетки-хозяина может включиться в хромосому или внехромосомную единицу.

У Ri-плазмид имеются общие черты с Ti-плазмидой, в том числе гомологичная *vir*-область. Её Т-ДНК также содержит гены, кодирующие опины и два гена синтеза ауксина и, кроме того, ещё в ней присутствуют специальные гены, называемые гогенами, которые и способствуют образованию опухоли в виде пучка корней.

Ti- и Ri-плазмиды оказались прекрасным инструментом для переноса генов в хромосомы растений. В начале 80-х гг. XX в. различными группами исследователей Ti-плазмиды были модифицированы путем удаления онкогенов (генов синтеза фито-гормонов и опинов) из области Т-ДНК; также из агробактерий была удалена вся лишняя ДНК, не нужная при клонировании ДНК. Клонирование в биологии — это получение точных копий организма или другого объекта, например, клетки или гена. Первоначально слово клон (от греч. ветка, побег) применялось для группы растений (например, фруктовых деревьев), полученных вегетативным способом от одного растения-производителя. Эти растения в точности повторяли качества своего прародителя и могли стать основателями нового сорта. Позже клоном стали называть не только всю такую группу, но и каждое отдельное растение в ней, а получение таких потомков — клонированием.

Со временем значение термина расширилось, и его стали применять в микробиологии, для методики выращивания культур бактерий — потомков одной клетки. Кроме того, в Ti-плазмиду был также добавлен сайт инициации репликации, вырезанный из плазмиды кишечной палочки *E. coli*, чтобы можно было клонировать в ней плазмиды. После переноса с их помощью ДНК в ядро растительной клетки нормальный рост растения не нарушался. После этого оставалось вставить в Т-ДНК нужные гены: один или несколько целевых и не менее двух маркерных, которые позволяют отобрать сначала клетки кишечной палочки, а потом растительные, в которых перенос генов прошел удачно - ген устойчивости к определенному антибиотику или кодирующий светящийся белок, и т.п.

В растениях, трансформированных такими плазмидами, опухоли уже не образуются, и не происходит синтеза опинов. «Обманутая» человеком бактерия, внедряя свою ДНК в хромосому растения, в свою очередь «обманывает» геном растения, который после этого начинает синтезировать необходимые человеку продукты.

2.12 Лабораторная работа №12(2 часа).

Тема: «Геномика и генная терапия»

2.12.1 Цель работы: Ознакомиться с методами генотерапии

2.12.2 Задачи работы:

1. Изучить методы генной терапии.

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2. Методические указания

2.12.4 Описание (ход) работы:

Лечение заболеваний с помощью генов получило название генотерапии. Сейчас в мире насчитывается порядка 400 проектов, посвященных лечению с помощью генотерапии.

Разработке программы генной терапии предшествуют тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса. Все эти данные учитываются при составлении соответствующего медицинского протокола.

Апробацию процедуры генокоррекции наследственного заболевания проводят на первичных культурах клеток больного, в которых в норме функционально активен данный ген. На этих клеточных моделях оценивают эффективность выбранной системы переноса экзогенной ДНК, определяют экспрессию вводимой генетической конструкции, анализируют ее взаимодействие с геномом клетки, отрабатывают способы коррекции на биохимическом уровне. Используя культуры клеток, можно разработать систему адресной доставки рекомбинантных ДНК, однако проверка надежности работы этой системы может быть осуществлена только на уровне целого организма. Поэтому такое внимание в программах по генной терапии уделяется экспериментам *in vivo* на естественных или искусственно полученных моделях соответствующих наследственных болезней у животных.

Успешная коррекция генетических дефектов у таких животных и отсутствие нежелательных побочных эффектов генной терапии являются важнейшей предпосылкой для разрешения клинических испытаний. Таким образом, стандартная схема генокоррекции наследственного дефекта включает серию последовательных этапов. Она начинается созданием полноценно работающей (экспрессирующейся) генетической конструкции, содержащей смысловую (кодирующую белок) и регуляторную части гена. На следующем этапе решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени. Затем проводится трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени, оценивается эффективность трансфекции, степень коррегируемости первичного биохимического дефекта в условиях клеточных культур (*in vitro*) и, что особенно важно, *in vivo* на животных - биологических моделях. Только после этого можно приступить к программе клинических испытаний.

Существует два типа генотерапии: заместительная и корректирующая.

Заместительная генотерапия заключается во вводе в клетку неповрежденного гена. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК.

При корректирующей терапии предполагается замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Пока этот метод на стадии лабораторных испытаний, так как эффективность его еще очень низка, но последние исследования показывают успехи в лечении некоторых заболеваний.

Амавроз Лебера - врожденная слепота, редкая форма наследственного заболевания, которое проявляется уже в младенчестве. Из-за дефектного гена (Retinal Pigment Epithelium, 65 kDa) в сетчатке умирают и не восстанавливаются светочувствительные клетки. По статистике, от амавроза Лебера страдает один человек на 81 тысячу. Болезнь сопровождается ослаблением или полной потерей зрения без анатомического нарушения структуры органов. Повреждение гена RPE65 приводит к прекращению синтеза определенных ферментов, участвующих в выработке светочувствительного пигмента, и дегенерации фоторецепторов. Врожденный амавроз Лебера впервые был описан в 1869 году немецким ученым-офтальмологом Теодором Лебером, однако этиология и патогенез этой группы болезней до настоящего времени остаются не до конца изученными.

Клиническими критериями диагностики ВАЛ являются: значительное снижение остроты зрения (от отсутствия реакции на свет и светоощущения до сотых долей), у большинства детей отмечаются плавающие движения глаз, нистагм, окуло-пальцевой симптом, косоглазие, могут встречаться деструкция стекловидного тела и частичное врожденное помутнение хрусталиков. Характерным является резкое снижение скотопических и фотопических показателей суммарного потенциала фоторецепторов сетчатки на электроретинографии (ЭРГ), вплоть до ее отсутствия, при нормальной офтальмоскопической картине глазного дна. Кроме того, отмечаются нарушения цветоощущения от красно-зеленой дисхроматопсии до ахроматопсии, сужение полей зрения до 30-10 градусов, значительное повышение порога электрической чувствительности.

Традиционная лекарственная терапия бессильна в борьбе с этим заболеванием. На помощь

пришла генотерапия. Исследователи из США и Англии делали инъекцию вирусного вектора, содержащего исправленный ген в один глаз пациентов, страдающих амаврозом Лебея. Вектор содержал фермент, необходимый для продукции светочувствительного пигмента и вводился в эпителий пигментного слоя сетчатки. В первом исследовании у всех 12 пациентов светочувствительность в "пролеченном" глазу вернулась. У 4 детей зрение восстановилось до такой степени, что они могли заниматься спортом и нормально учиться в школе. Кроме того, были проведены исследования на саймири (белитчи обезьянки), страдающих дальтонизмом. Инъекция "исправленных" генов вернула им полное цветовое зрение.

В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*). Клеточная генная терапия или терапия *ex vivo* предполагает выделение и культивирование специфических типов клеток пациента, введение в них чужеродных генов, отбор трансфицированных клеток и реинфузию их тому же пациенту.

Примером может служить лечение комбинированного иммунодефицита. Комбинированный иммунодефицит может быть результатом дефекта гена аденозиндезаминазы. Это заболевание клинически и иммунологически характеризуется дефектом как Т-, так и В-лимфоцитов. Диагностируется заболевание обычно в раннем возрасте, а признаками служат тяжелые, потенциально смертельные инфекции, глубокое нарушение клеточного иммунитета и дефицит антител, лимфопения, в основном за счет Т-лимфоцитов. Клинические проявления обычно включают задержку и отсутствие прогресса физического и моторного развития, персистирующие, вяло текущие и необычно упорные инфекции, вызванные низковирулентными оппортунистическими микроорганизмами (например, *Candida*, *Pneumocystis carinii*, *cytomegalovirus*). Тяжелые комбинированные первичные иммунодефициты классифицируются далее в зависимости от патогенеза, когда он известен (например, дефекта фермента), типа наследования и уровня нарушения дифференцировки.

Одной из форм комбинированного иммунодефицита является тяжелая комбинированная иммунная недостаточность ТКИН, или англоязычное (*severe combined immunodeficiency* - SCID или "bubble boy" disease). Обнаружены как Х-сцепленная, так и аутосомно-рецессивная формы SCID. В случаях SCID с нормальным количеством В-лимфоцитов обычно наблюдается Х-сцепленное наследование. Впервые попытка лечения такого больного методами генотерапии была предпринята в США в 1990 г. У больного ребенка извлекли Т-лимфоциты, трансформировали ретровирусным вектором, введя нормальный ген аденозиндезаминазы и вернули клетки в организм. Введение приходилось повторять. Более эффективна аналогичная трансформация стволовых клеток костного мозга.

В январе 2009 года итальянские ученые опубликовали данные о полном излечении 8-ми летнего мальчика, страдающего этим заболеванием. Кроме того, 8 из 10 участвовавших в клиническом испытании не нуждаются более в ферментозаместительной терапии и живут теперь нормальной жизнью. Никаких серьезных побочных эффектов от применения генотерапии обнаружено не было.

Х-сцепленная адренолейко дистрофия (АДЛ) - дегенеративное заболевание белого вещества головного мозга. Поражает мальчиков с частотой примерно 1/17 000. Оно убивает их еще до того, как наступит подростковый возраст. Заболевание обусловлено дефектом обмена жирных кислот. В результате нарушается миелинизация нервных клеток. Клиническая картина выражается в интеллектуальной, поведенческой недостаточности, расстройстве памяти, нарушении походки, расстройстве зрения вплоть до атрофии зрительных нервов.

В экспериментах французских исследователей скорректированный ген вставляли в клетки крови 7-летнего мальчика, страдающего АДЛ, некоторые клетки начинали продуцировать необходимый для обмена жирных кислот протеин, а также, по видимому, мигрировали в мозг. По крайней мере, спустя 2 года прогрессирующее повреждение мозга, характерное для этой болезни, прекратилось. В этих экспериментах гены доставлялись в клетки с помощью инактивированного вируса иммунодефицита человека (HIV). Компания Genetix Pharmaceuticals, специализирующаяся на соматической генной терапии,

также сообщила в ноябре 2009 года о создании препарата для лечения АДЛ на основе собственных гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, «зараженных» модифицированным вирусом ВИЧ (лентивирусный вектор), несущим в себе ген, которого недостает в организме больного АДЛ. Такой препарат уже ввели двум юным пациентам (после миелоабляции), спустя 15 месяцев прогрессирование болезни прекратилось.

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани больного. В настоящее время не существует общедоступного метода культивирования клеток легких, поэтому при легочных заболеваниях единственный способ доставить чужеродный ген - это ввести его прямо в организм.

Муковисцидоз - весьма распространенное среди людей белой расы тяжелое наследственное заболевание легких, которое поражает, например, в семьях из Центральной Европы одного новорожденного из 2500 и для которого установлен дефектный ген, кодирующий белок-регулятор трансмембранной проводимости. Основное проявление дефектного гена - пневмония. Поражаются все эпителиальные клетки. Основная проблема - как доставить ген в клетки, покрытые слизью, которая препятствует трансформации. Неповрежденную копию "гена заболевания", включенную в аденовирусный вектор или липосому, вводят в форме аэрозоля в дыхательные пути больного.

Для коррекции нарушения при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна (заболевании мальчиков, связанном с дефектами X-хромосомы) нормальный ген, кодирующий белок дистрофии, пытались прямо вкалывать в мышечные волокна, используя либо "голую" ДНК, либо аденовирусный вектор. Другие исследователи трансплантировали больному миобласты после генетической коррекции. Ранее неподвижный ребенок приобретал способность двигаться! К сожалению, во всех этих опытах удается получить только временный терапевтический эффект, и процедура введения гена должна неоднократно повторяться.

Список наследственных заболеваний, которые пытаются или планируют лечить генами, велик. Это и ревматоидный артрит, и фенилкетонурия, и заболевания, связанные с недостатком гормонов (инсулина, эритропоэтина, гормона роста). В случае хронической анемии, связанной с дефицитом эритропоэтина, на основании опытов на животных предлагается принципиально новый подход к лечению. Так как каждая из наших клеток содержит один и тот же геном, можно заставить фибробласты кожи, которые в норме не производят эритропоэтина, синтезировать этот гормон. Для этого нужно ввести в геном новую контролируемую область и тем самым снять запрет со считывания (экспрессии) гена эритропоэтина, присутствующего, но "молчащего" в фибробластах.

Практически в любой области медицины либо начаты клинические испытания лечения наследственных заболеваний с помощью генотерапии, либо в опытах на животных разрабатываются подходы к такому лечению. По мере усовершенствования методов доставки генов и контроля их экспрессии список заболеваний, к которым можно применять генотерапию, будет безусловно расширяться.

Генотерапия применима не только к наследственным заболеваниям. Предстоит решить проблему лечения генами "чумы XX века" - синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), возникающего при заражении вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). ВИЧ представляет собой ретровирус, поражающий Т-лимфоциты и макрофаги. Болезнь удалось бы победить, если бы были найдены новые гены, введение которых в зараженные ВИЧ лимфоциты останавливало бы дальнейшее размножение вируса. Предложено множество хитроумных способов борьбы со СПИДом с помощью привнесенных генов. Все они основаны на новейших данных о строении и функционировании генома ретровируса. Например, вводя прямо в мышцы больного ретровирусные векторы, несущие отдельные гены ВИЧ, ученые рассчитывали на то, что гены ВИЧ после внедрения в ДНК хромосом хозяина смогут дать информацию для синтеза вирусных белков и произойдет "противоСПИДная" иммунизация больного этими белками. Однако еще не получено ощутимых результатов, которые сулили бы успех в борьбе с вирусом дикого типа, коварство которого заключается в его изменчивости.

Огромные перспективы открывает использование генотерапии для лечения онкологических заболеваний. Многолетние усилия ученых привели к пониманию того, что рак — это генетическое заболевание и его развитие происходит многостадийно, в результате серии генетических нарушений, накапливающихся в клетке. Следовательно, каждый из таких отдельных генетических эффектов может стать точкой приложения генотерапевтического подхода.

В настоящее время в мире около 400 проектов по генной терапии находятся на различных стадиях клинических испытаний: 261 из них проходит первую стадию (оценка токсичности), 133 - вторую (испытание на небольшой группе тяжелобольных пациентов) и только 3 проекта (два по лечению рака мозга и один по гемофилии) - на заключительной третьей стадии (масштабные клинические испытания). Пока генная терапия применяется в основном в онкологии (более 60% проектов). Примерно по 15% приходится на генную терапию инфекционных (СПИД, гепатит В, туберкулез) и моно генных заболеваний (муковисцидоз, семейная гиперхолестеринемия, мукополисахаридозы, гемофилия А и др.).

Методы генной терапии позволяют лечить различные генетические патологии в период внутриутробного развития.

Генная терапия успешно применяется для лечения не только наследственных, но и значительно более распространенных мультифакториальных болезней (диабет, остеопороз, ревматоидный артрит, различные опухоли). Для лечения таких заболеваний применяется не одна, а сразу много генетических конструкций, исправляющих дефекты различных стадий течения патологического процесса.

2.13 Лабораторная работа №13(2 часа).

Тема: «Молекулярная биология и возникновение жизни»

2.13.1 Цель работы: Ознакомиться с о взаимосвязью молекулярной биологии и возникновением жизни

2.13.2 Задачи работы:

1. Изучить гипотезы возникновения жизни
2. Изучить взаимосвязь молекулярной биологии и возникновении жизни

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор
2. Методические указания

2.13.4 Описание (ход) работы:

Гипотезы возникновения жизни

Панспермия - жизнь витает в космосе и разносится по планетам.

Жизнь зародилась абиогенно или нет?

Биогенез - живое только от живого.

Абиогенез - живое от неживого.

Луи Пастеру принадлежит первое прямое доказательство происхождения живого только от живого. В 1862 году он получил премию Французской академии наук за эту работу.

Суть опыта: в колбе с изогнутой трубкой находился прокипяченный сenny настой. В течение нескольких недель он стоял совершенно прозрачный. Как только колбу наклонили (сквозь трубку в колбу попали микроорганизмы) - настой забродил.

Эксперимент правильный. Вывод - живое только от живого.

Авторитет Пастера был столь велик, что к теории абиогенеза пришли лишь через 60 лет.

В 1924 году Александр Опарин высказал предположение, что ~4 млрд. лет назад жизнь могла возникнуть абиогенно, в силу тех условий, которые существовали тогда на Земле.

Джон Холдейн рассчитал, какие условия и как долго должны были существовать, чтобы зародилась жизнь, каковы необходимые источники энергии для зарождения жизни.

Теория биопозза

Джон Бернал создал теорию биопозза, включающую три стадии.

1. Образование биомономеров.
2. Образование биополимеров и их эволюция. Образование систем с обратной связью.
3. Образование мембранных структур и пробионтов (первых клеток).

Экспериментальное доказательство первой стадии - опыты Стенли Миллера.

Суть опыта: в колбе находилась смесь газов (H_2 , N_2 , NH_3 , CH_4 , CO , CO_2) при температуре $\sim 100^\circ C$. Кипящая вода служила источником водяного пара, а с помощью обратного холодильника поддерживалась циркуляция газовой смеси через сосуд. Давали искровой разряд в 60 тыс. вольт, что энергетически эквивалентно 50-и млн. лет на примитивной Земле. Результат был ошеломляющий: в колбе появились HCN , $HCHO$, $HCOOH$, несколько аминокислот, несколько азотистых оснований жирные кислоты, пириты, моносахара. Эксперимент повторяли много раз. Непременное условие успеха - отсутствие в колбе свободного кислорода. В зависимости от pH раствора и соотношения газов были получены разные наборы соединений. Если была H_3PO_4 , то образовывались даже нуклеотиды, а это уже гетерополимеры.

Таким образом была доказана первая стадия возникновения жизни. 4 млрд. лет тому назад с неизбежностью должны были возникнуть биомомеры.

Первичная атмосфера образующейся Земли кислород содержала, но он весь пошел на окисление. Свободного кислорода не было. Таким образом, возникновение биомономеров и биополимеров происходило во вторичной бескислородной среде.

У стадии 3 в принципе есть доказательства. Самая сложная и неочевидная - стадия 2.

2 стадия биопозза.

Помимо 4-х основных классов биополимеров, могли образовываться и не дошедшие до нас гетерополимеры. Видимо, эволюция химических соединений шла по принципу минимума свободной энергии.

Остановимся пока на белках и нуклеиновых кислотах.

Из разных комплексов белок-нуклеиновая кислота рассмотрим только те, в которых нуклеиновая кислота сохраняется благодаря защите белком от ультрафиолетового излучения.

Накопим такие комплексы. Из их множества рассмотрим те, в которых белки способствуют увеличению количества защищенной нуклеиновой кислоты. То есть эти белки - ферменты. Из этих комплексов рассмотрим те, где нуклеиновые кислоты, количество которых возрастает под действием белков, способствуют увеличению количества белков благодаря, например, прямому кодированию. Возникают системы с обратной связью. Такие системы обладают некоторыми признаками живого.

Другой вариант.

Первыми молекулами были РНК.

Они имеют третичную структуру и обладают каталитической активностью. Позже появились белки, поддерживающие "выгодные" конформации РНК и защищающие их от расщепления. Уже потом возникает ДНК, как более надежный хранитель генетической информации. Она имеет две цепи, что обеспечивает репарацию, репликация осуществляется за один шаг. Отсутствие ОН-группы в 2'-положении пентозы делает ДНК устойчивой в слабощелочных условиях, губительных для РНК.

Стадия 3.

Представим, что лужа покрыта жирной пленкой, а под ней - белки. Если оторвать каплю, то могут получиться пузырьки, содержащие нуклеопротеидные системы с обратной связью. Когда они падают на поверхность водоема, то покрываются вторым липидно-белковым слоем - и образуется современная биологическая мембрана. В мембранной капле диффузия уже не очень существенна.

Далее образуются пробионты - первые организмы, имеющие мембрану.

Пробионты были первичными гетеротрофами. Они получали энергию при расщеплении органических веществ абиогенного происхождения, в изобилии имевшихся в окружающей среде. Примером древнего способа обмена веществ, дошедшего до наших дней, является гликолиз - ферментативное бескислородное расщепление глюкозы.

По мере истощения запаса органического материала (а новый не образовывался из-за изменения условий на Земле) возникала жесткая конкурентная борьба за него, что ускорило процесс эволюции первичных гетеротрофов.

Исключительным событием стало возникновение бактериального фотосинтеза, освободившего клетки от зависимости от доступности органики абиогенного происхождения. Скорее всего, фотосинтез возник у анаэробных бактерий, способных к азотификации. Побочным продуктом фотосинтеза является кислород. Его накопление в атмосфере привело к коренному изменению хода эволюции. Появление озонового экрана защитило первичные организмы от смертельного УФ-облучения и положило конец абиогенному синтезу органики.

Первые аэробные бактерии появились благодаря приобретению аппарата окислительного фосфорилирования. Продукты брожения подвергались дальнейшему окислению до CO_2 и H_2O . Аэробные (вторичные) гетеротрофы могли более эффективно, чем анаэробные (первичные) гетеротрофы, расщеплять органические вещества, образующиеся в результате фотосинтеза.

По-видимому, с ростом концентрации кислорода в атмосфере усложнялась жизнь первичных анаэробных гетеротрофов. Некоторые из них вымерли, другие нашли бескислородную среду. Примером могут служить дошедшие до наших дней метанобразующие бактерии или серные бактерии, живущие в горячих подземных источниках.

Некоторые первичные гетеротрофы пошли по пути, приведшему к образованию эукариотических клеток. Часть из них вступила в симбиоз с аэробными бактериями, способными к окислительному фосфорилированию. Поглотив вторичных гетеротрофов, первичные не расщепили их на молекулы, а сохранили в качестве энергетических станций, называемых сегодня митохондриями.

Такие симбионты дали начало царствам животных и грибов.

Другая часть первичных гетеротрофов "заключила союз" не только с аэробными гетеротрофами, но и с первичными фотосинтетиками, сохранив последних в качестве хлоропластов. Такие симбионты дали начало царству растений.

В пользу симбиотической теории образования эукариот говорят следующие факты:

- У митохондрий и хлоропластов две мембраны. Внутренняя - своя, наружная образована клеткой-захватчиком.

- Генетический код митохондрий идеален. Универсальный генетический код имеет два существенных отличия, касающихся инициации и терминации синтеза белка.

Таким образом эукариоты отстранились от чужой генетической информации.

Кроме того, они линеаризовали свою ДНК. Митохондрии и хлоропласты имеют кольцевую ДНК, хотя не очень понятно, для чего им нужна кольцевая ДНК, и бактериальные рибосомы. Однако понятно, почему у них такая ДНК и такие рибосомы. Потому, что их предки были бактериями. Сегодня часть генов митохондриальных белков и белков хлоропластов, в том числе их РНК- и ДНК-полимераз, находятся в ядре. Вероятно, попали они туда с помощью мобильных элементов.

Все бактерии делятся на эубактерии (в том числе *E.coli*) и археобактерии. Принципиальное отличие между ними в том, что гены археобактерий имеют экзон - интронное строение и сплайсинг. Эубактерии - результат эволюции ана- и аэробных гетеротрофов. Их эволюция шла в благоприятных условиях и они сменили больше поколений, избавившись от интронов. Археобактерии живут в экстремальных условиях: горячие, кислые, высокосолесные подземные воды. Эукариоты и археобактерии сохранили экзон-интронную структуру, что говорит о древнем происхождении экзонов и интронов.

2.14 Лабораторная работа №14(4 часа).

Тема: «Молекулярная биология и происхождение человека»

2.14.1 Цель работы: Ознакомиться с ролью молекулярной биологии в происхождении человека

2.14.2 Задачи работы:

1. Изучить процесс историко-эволюционного формирования человека

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.14.4 Описание (ход) работы:

Антропогенез — процесс историко-эволюционного формирования человека, становление его как биологического вида в процессе формирования общества, т.е. социогенеза. Теория происхождения человека базируется на данных ряда биологических и гуманитарных наук. Палеоантропология, палеодемография, палеонтология и сравнительная биология позволяют выявить направление изменчивости морфологических особенностей у представителей эволюционирующего вида в условиях меняющейся среды, установить их численность и возрастную структуру. Эволюционная генетика накопила прямые доказательства существования естественного отбора в природе и разработала методы его математического моделирования. Психология, эволюционная морфология мозга прослеживают возникновение мышления и речи в процессе антропогенеза. Этнография позволяет проанализировать общественные отношения древнейших людей. Данные многих наук, особенно молекулярной биологии, уточняя отдельные моменты эволюции и формируя ее теоретическую основу, составляют понятие «синтетическая теория эволюции» (СТЭ), или современный синтез. Согласно эволюционному учению, проблема антропогенеза рассматривается как частный филогенетический вопрос в общей картине биологической эволюции — направленного исторического развития живой природы, включающего изменения генетического состава популяций, формирование адаптаций, образование и вымирание видов, преобразование биогеоценозов и биосферы в целом. Эти изменения происходят сотни миллионов лет, с момента возникновения жизни. Их результат — разнообразие форм жизни, которые являются продуктом и объектом эволюции, представляющим собой основу изучения эволюции любого масштаба.[^] Движущей силой биологической эволюции является достижение соответствия развивающейся живой системы условиям ее существования, что сопряжено с преимущественным распространением одних и гибелью других дискретных биологических систем. Подтвердить родственные связи человека и животных и в первую очередь высокую степень родства человека с человекообразными обезьянами можно с помощью прямых и косвенных доказательств.

Прямые доказательства — это костные останки ископаемого человека, ближайших его предков и родственных им форм. Научная интерпретация ископаемых материалов основана на сравнении их анатомических особенностей с существующими формами с учетом экологических влияний.

Косвенные доказательства наиболее многочисленные. К ним относятся сравнительно-анатомические, физиологические, биохимические, генетические и другие группы факторов, а также данные сравнительной эмбриологии, учение о рудиментарных органах и атавизмах. Сравнительно-анатомические данные свидетельствуют о родстве живых организмов и человека по общему плану строения и аналогии органов и тканей. Все живые организмы, за исключением вирусов, имеют клеточное строение. В основе жизнедеятельности всех живых существ лежит непрерывный обмен веществ между ними и окружающей средой. Процессы обмена, распад и синтез различных органических соединений в организмах управляются ферментными системами. Организмы синтезируют свои видоспецифические белки, отличающиеся от белков других видов характером чередования аминокислот. Можно проследить общие черты и в зародышевом развитии всех организмов. Еще в XIX в. К.М. Бэр сформулировал закон «зародышевого сходства», который гласит: чем более ранние стадии

эмбриогенеза исследуются, тем более сходства обнаруживается между организмами — представителями различных видов позвоночных. Э. Геккель (1863, 1868), А.О. Ковалевский, А.Н. Северцев (1939) обратили внимание, что изучение развития эмбрионов дает возможность понять преобразование организмов и отдельных органов в процессе филогенеза — их исторического развития.

2.15 Лабораторная работа №15(4 часа).

Тема: «Методологические основы разработки рецептур и технологий генетически модифицированных продуктов питания»

2.15.1 Цель работы: Ознакомиться с технологией генетически модифицированных продуктов питания

2.15.2 Задачи работы:

1. Изучить основы разработки рецептур и технологий генетически модифицированных продуктов питания.

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.15.4 Описание (ход) работы:

Генетически модифицированная пища — это продукты питания, полученные из генетически модифицированных организмов(ГМО) — растений, животных или микроорганизмов. Продукты, которые получены при помощи генетически модифицированных организмов или в состав которых входит хоть один компонент, полученный из продуктов, содержащих ГМО, также могут считаться генетически модифицированными, в зависимости от законодательства страны. Генетически модифицированные организмы получают некоторые новые свойства благодаря переносу в геном отдельных генов теоретически из любого организма (в случае трансгенеза) или из генома родственных видов (цисгенез).

На 2013 год, генно-модифицированные растения выращивались в 27 странах, на рынок было допущено 27 генно-модифицированных сельскохозяйственных культур (включая как пищевые, так и кормовые и технические).

В растительной клетчатке синтез определенных аминокислот прекращается, если их концентрация достигла определенного уровня. Генно-инженерными методами в растение кукурузы перенесли бактериальный ген *cordaA* из *Corynebacterium glutamicum* под контролем семенного промотора *Glb1*. Этот ген кодирует фермент лизин-нечувствительную дигидропиколинат синтазу, которая не распознается растительными системами обратного ингибирования. Кукурузы линии LY038, разработанная компанией Монсанто, содержит увеличенное количество аминокислоты лизина, и поэтому более питательная в качестве корма для животных. Линия кукурузы LY038 коммерческая и допущена к культивированию в Австралии, Канаде, Японии, Мексике, Филиппинах и США. В Европе запрос на культивирование был подан в Нидерландах, разрешение получено в 2007 году[, но в 2009 году разрешение было отозвано.

Впервые генномодифицированные продукты появились на рынке в начале 1990-х годов. В 1994 коммерциализирован генетически модифицированный томат (FlavrSavr), продукции компании Calgene с повышенной лёжкостью. Генетическая трансформация в этом случае не приводила к встраиванию какого-либо гена, а касалась исключительно удаления гена полигалактуроназы при помощи антисенс-технологии. В норме продукт этого гена способствует разрушению клеточных стенок плода в процессе хранения. FlavrSavr недолго просуществовал на рынке, поскольку существуют более дешевые конвенционные сорта с такими же свойствами. Большая часть современных генномодифицированных продуктов растительного происхождения.

По состоянию на 2009 год, было коммерциализировано и допущено к выращиванию как минимум в одной стране 33 вида трансгенных растений: соя — 1, кукуруза — 9, рапс — 4, хлопчатник — 12, сахарная свекла — 1, папайя — 2, тыква — 1, паприка — 1, томат — 1, рис — 1. На разных стадиях рассмотрения запросов на допуск находились ещё примерно 90 разных видов трансгенных растений в том числе картофель, слива, люцерна, фасоль, пшеница, земляной орех, горчица, цветная капуста, перец чили и другие.

В 2015 году генетически модифицированный атлантический лосось (AquAdvantage) был одобрен FDA для продажи в США..

К генетически модифицированной пище могут быть также отнесены сыры, производимые с использованием сычужного фермента от генномодифицированных бактерий (более 50% твердых сыров).

2.16 Лабораторная работа №16(4 часа).

Тема: «Степень безопасности трансгенных пищевых продуктов»

2.16.1 Цель работы: Ознакомиться с степенью безопасности трансгенных пищевых продуктов

2.16.2 Задачи работы:

1. Изучить проблемы безопасности трансгенных пищевых продуктов

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Мультимедийный проектор

2.16.4 Описание (ход) работы:

Безопасность продуктов, полученных с помощью генетической инженерии — весьма важная проблема, которая возникла перед обществом в связи с широким внедрением в сельскохозяйственное производство ГМ-культур растений, являющихся сырьем для получения пищевых продуктов.

Еще в 1973 г., когда объектом генно-инженерных исследований являлись преимущественно микроорганизмы, были высказаны серьезные сомнения по поводу безопасности технологий рекомбинантных ДНК. Первые директивы, регламентирующие проведение всех экспериментов с рекомбинантными ДНК, были чрезвычайно строгими. Например, в Директиве Национального института здравоохранения США 1976 г. жестко оговаривались условия работы с рекомбинантными ДНК и выдвигались требования, чтобы в качестве хозяев для чужеродных ДНК использовались микроорганизмы, неспособные размножаться вне стен лаборатории и передавать свою ДНК другим микроорганизмам. Со временем требования к мерам безопасности для большинства экспериментов были существенно смягчены, и технология рекомбинантных ДНК стала быстро развиваться.

В настоящее время существуют две важные проблемы:

1. Контроль за производством и потреблением пищевых продуктов, содержащих генетически измененные организмы, или полученных с их использованием.

2. Контроль за преднамеренным высвобождением ГМО в окружающую среду.

Несмотря на то что большинство созданных трансгенных растений отличаются от исходного родительского сорта наличием только модифицированной ДНК и экспрессированного белка, определяющего новый признак, пищевая продукция из ГМИ относится к категории «новой».

Присутствие в пищевых продуктах трансгенной ДНК само по себе не представляет опасности для здоровья человека. Однако функциональные способности трансгенной ДНК связаны с возможным проникновением участка ДНК в клетки микрофлоры кишечника, в частности перенос генов устойчивости к антибиотикам, которые, как указывалось выше, широко используются в качестве селективных маркерных генов при создании ГМ-растений. Можно предположить, что естественная микрофлора кишечника в этом случае будет либо подавляться,

либо, наоборот, расти. Однако вряд ли это опасение следует рассматривать как серьезную проблему, поскольку поступающая с пищей ДНК подвергается разрушению в пищеварительном тракте, и маловероятно сохранение целостной генетической конструкции (включающей и целевой ген, и регуляторные компоненты), способной к самостоятельному функционированию в кишечнике.

Гораздо большие опасения связаны с возможным изменением экспрессии генов модифицированной ДНК и соответственно новыми белками, которые могут оказать влияние на качество и безопасность пищевых продуктов. Не исключено, что введенные в ДНК растений гены могут вызвать неожиданные побочные эффекты:

- ♦ изменение потребительских свойств продукта (снижение пищевой ценности, изменение химического состава и т.п.);

- ♦ синтез компонентов, вызывающих аллергические реакции или обладающих токсическими, мутаген

ными, канцерогенными эффектами, оказывающих воздействие на человека, непосредственно употребляющего трансгенную пищу, а также на его последующие поколения.

Так, сообщалось о появлении аллергических реакций у людей, употреблявших трансгенную пищу. Широко обсуждался случай с трансгенной соей — продукцией биотехнологической компании «Pioneer Hi-bred International». Продукты переработки этих бобов вызывали аллергические реакции. Использование этих бобов было прекращено.

Сообщалось также о трансгенном картофеле, содержащем ген лектина, взятый от другого растения. В экспериментах на крысах было показано, что такой картофель вызывал токсический эффект, что приводило к ослаблению иммунной системы и уменьшению массы внутренних органов (мозга, легких, печени) у подопытных животных.

Что касается проблем, связанных с воздействием ГМО на окружающую среду, то здесь также имеются негативные примеры. Исследователями предполагалось, что пыльца с ГМ-растений, устойчивых к гербицидам, может попасть на другие растения, и это вызовет появление «суперсорняков». В настоящее время установлено, что ген устойчивости к гербициду ГМ-горчицы действительно передается дикой горчице и сорнякам. Не исключена также возможность попадания гена стерильности ГМ-культур в растения дикой флоры. Уже выведены сорта стерильных томатов, кукурузы, хлопка и других растений. Экспрессия гена стерильности вызывает синтез веществ, подавляющих развитие зародыша во втором поколении. Возможные последствия утечки таких генов в природную среду катастрофичны.

Особо следует сказать о проблеме безопасности применения генетически модифицированных микроорганизмов.

Существуют серьезные опасения, что ГММ, созданные без учета их вероятного воздействия на природные экосистемы, смогут бесконтрольно и неограниченно размножиться в окружающей среде, что приведет к самым нежелательным последствиям:

- ♦ вытеснению аборигенных природных организмов из их экологических ниш и последующей цепной реакции нарушений экологического равновесия;

- ♦ уменьшению биоразнообразия;

- ♦ бесконтрольному переносу чужеродных генов из ГММ в природные, что сможет привести к активации как ранее известных, так и активации и/или образованию ранее неизвестных патогенов животных и растений.

Именно поэтому необходимы разработки подходов и методов оценки риска потенциальных опасностей, которые могут возникнуть после внедрения (интродукции) ГММ.