

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ
Б2.В.ДВ.2.2 Генетически модифицированные продукты питания**

Направление подготовки «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Профиль подготовки «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Квалификация (степень) выпускника бакалавр

Нормативный срок обучения 5 лет

Форма обучения заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
Лекция № 1 Введение.....	3
1.2.Лекция№2Модифицированные организмы и биобезопасность. Состояние проблемы	8
1.3 Лекция№3Генетический риск и биобезопасность при получении ГМО.....	15
1.4 Лекция № 4 . Биобезопасность в клеточных, тканевых и органогенных технологиях получения ГМО.....	19
 2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	19
2.1Лабораторная работа № ЛР-1 Генетика и генетическая информация	19
2.2Лабораторная работа № ЛР-2 Генно-модифицированные источники пищевой продукции. Концепция биобезопасности пищевой продукции и питания	20
2.3Лабораторная работа № ЛР-3 Общая схема реализации генетической информации	22
2.4Лабораторная работа № ЛР-4 Механизмы реализации генетической информации.....	23

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1(4 часа).

Тема: Введение

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Молекулярная биология как фундаментальная основа для разработки высокоэффективных биотехнологических методов.
2. Живые организмы и их клетки
3. Генетика и генетическая информация

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. 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 [яРНК (hnRNA)], т. е. последовательность этой РНК комплементарна кодирующей цепи ДНК. Поскольку в РНК вместо тимина содержится урацил ААГ триплет ДНК трансформируется в UUC-кодон яРНК.

Созревание РНК. У эукариот яРНК, 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:

1. Белки как основной инструмент клеточного строительства и ее функционирования
2. Молекулярные механизмы обеспечения функционирования белков
3. 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-синтаза — фермент из класса аминоксил-тРНК-синтаз, 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 присписывается 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: Лигазы, 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 мышинового 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, амёбоидное 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 центросоме, 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, 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 пространственно 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:

1. Механизмы реализации генетической информации.
2. 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 кодом 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:

1. Проблемы биобезопасности в биотехнологии и биоинженерии при создании ГМО.
2. Биобезопасность в клеточных, тканевых и органных биотехнологиях.
3. Генетический риск и биобезопасность в биоинженерии.
4. 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 зловещих 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 variability, появлением мутантов с положительными и отрицательными признаками. В большинстве случаев соматическая variability 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 рекомбинации, 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.

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 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 с 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: Ознакомиться 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, 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.

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. Мультиимидийный 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.