

## **INNO-FOOD SEE**

**Setting up the innovation support mechanism and increasing awareness on the potential of Food Innovation and RTD in the South-East Europe area  
SEE/B/0028/1.3/X**

**Изграждане на механизми в подкрепа на иновациите и повишаване на информираността относно потенциала на иновациите и научно-техническото развитие в хранителната промишленост в Югоизточна Европа**

# **Seminar: Application of Recombinant DNA Technology**

**Упражнение-семинар на тема: Приложение на рекомбинантните ДНК технологии**

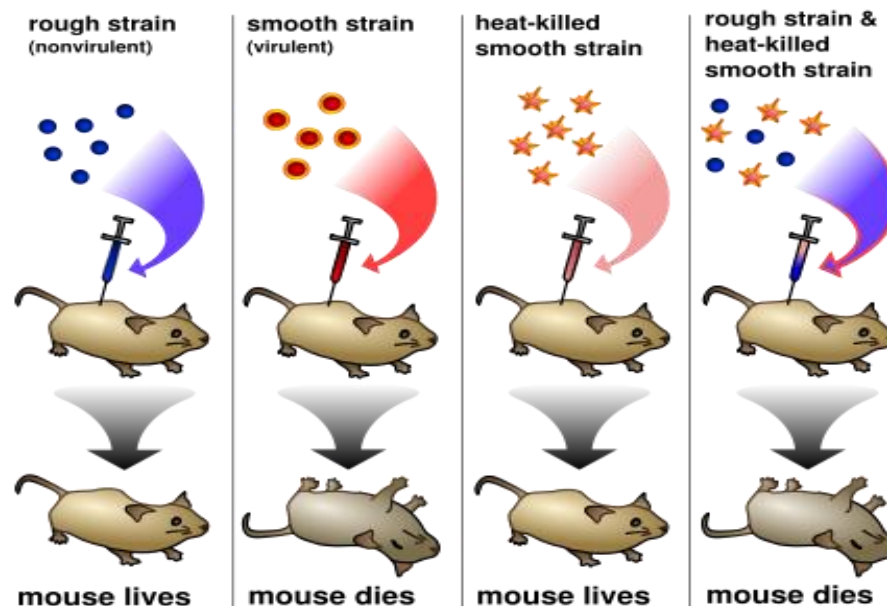
**Аграрен Университет-Пловдив  
Факултет по Агрономство  
Катедра “Генетика и селекция”**

# Генетична трансформация

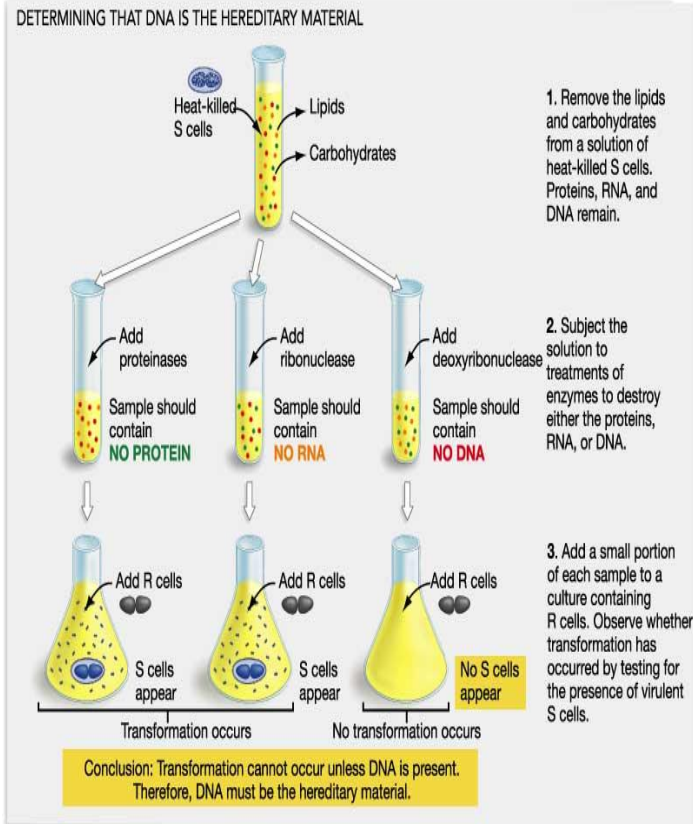
# Експериментални доказателства за ролята на ДНК като генетичен материал

## Опит на Фредерик Грифит 1928

- Първата демонстрация за генетична трансформация
- Грифит доказва, че непатогенни бактерии *Streptococcus pneumoniae* се трансформират в патогенни след смесването им с убити пневмококи от виролентен щам
- Доказва, че субстанцията причиняваща трансформацията е ДНК



# Опит на Ейвъри, МакЛеод и МакКарти



Въпреки големите успехи на тези класически генетични изследвания, молекулярната природа на гена остава неразбрана до 1940 г. или по-точно, до експериментите на Ейвъри, МакЛеод и МакКарти през 1944 г., които доказват, че гените са изградени от ДНК. Учените обработват безвредния щам с пречистени съставки от болестотворния щам, за да разберат коя от тях предава вирулентността. Трансформация настъпва при добавяне на ДНК, но не и на белтъци, липиди, полизахариди или РНК.

- Откритието на ролята, която изпълнява ДНК дава силен тласък на редица нови генетични изследвания. За период от 14 години между 1952 и 1966 е изяснена структурата на ДНК, разгадан е генетичния код и са описани основните процеси свързани със съхранението, преноса и реализирането на генетичната информация - репликация, транскрипция и транслация.
- Периодът между 1971-1973 г. бележи зората на напълно нова методология, позволяваща планиране и провеждане, ако не винаги с лекота, то поне с успех, експерименти, смятани доскоро за невъзможни. Тези методи са наречени **рекомбинантни ДНК технологии или генно инженерство.**

# Генно инженерство

## Определение:

Създаване на рекомбинантни ДНК молекули чрез съединяване *IN VITRO* на генетичен материал с различен произход и въвеждането им в клетки-гостоприемници. При това не се получават нови видове, а се получават форми с нови свойства.

Генното инженерство се означава като молекулно клонирание на ДНК, технология за рекомбинантна ДНК, генни манипулации, генна инженерия, молекулна инженерия и др.

# Методи на генетичното инженерство

- 1. Трансгеноза** - техника за експериментално пренасяне на изолирани от генома или изкуствено синтезирани гени в друг геном.  
**цисгенни** – получават ген от близкородствен организъм  
  
**трансгенни** – получават ген от неблизкородствен организъм
- 2. Генетично инженерство на хромозомно ниво.**
- 3. Клетъчно инженерство.** То обхваща манипулациите, свързани със соматично клетъчната хибридизация (парасексуална хибридизация), трансплантацията на клетъчни ядра, въвеждането на ДНК или отделни хромозоми в генома на чужда клетка.



# Основни етапи в генно клониране?

- 1. Фрагмент от ДНК, съдържащ ген, който трябва да бъде клониран се въвежда в пръстеновидна молекула ДНК, наречена **вектор**, при което се получава **химера** или **рекомбинантна ДНК молекула**.
- 2. **Векторът** пренася (трансферира) гена в клетка гостоприемник. Най-често това е бактерия, но могат да бъдат използвани и други видове живи клетки.
- 3. В клетката гостоприемник векторът се реплицира, произвеждайки множество идентични копия , носещи клонирания в него ген.
- 4. При делене на клетката гостоприемник, копията от рекомбинантната ДНК молекула се разпределят между дъщерните клетки, в които векторът продължава да се реплицира.
- 5. След достатъчно голям брой клетъчни деления се получава колония или **клон** от идентични клетки. Всяка клетка от този клон съдържа едно или повече копия от рекомбинантната ДНК молекула - желаният от нас ген е клониран във вектора.

ДНК → РНК → ПРОТЕИН

# Получаване на фрагменти от чужда (външна) ДНК

Използват се универсални методи, в основата на които лежи отделянето на сегмент от ДНК, носещ определени гени, които трябва на бъдат пренесени и вградени във вектор, с помощта на който е възможно получаването на голям брой копия на този участък с последващо въвеждане в реципиента (извънхромозомна молекула ДНК на чревната бактерия *Escherichia coli*).

Нарязването се извършва с помощта на ензими- “молекулни скалпели”, наречени рестриктази\*. Чрез използването на определени рестриктази се получават линейни фрагменти от ДНК, които са носители на определени гени.

\* Рестриктази – бактериалните ензими, които защитават клетката от фаги, като хидролизират проникналата чужда ДНК. Те срязват ДНК точно в палиндрома.

# Видове рестриктази

Примери за рестриктази (опростено по Уотсън и сътр., 1989)

Източник	Означение	Прицелна последователност
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>Bam</i> HI	Г:ГАТЦЦ 5' – 3' ЦЦТАГ:Г 3' – 5'
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>Eco</i> RI	Г:ААТТЦ ЦТТАА:Г
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>Hind</i> III	А:АГЦТТ ТТЦГА:А
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> I	ГТТ:ААЦ ЦАА:ТТГ
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> II	Ц:ЦГГ ГГЦ:Ц
<i>Streptomyces albus</i> G	<i>Sa</i> I	Г:ТЦГАЦ ЦАГЦТ:Г

При ензимното разкъсване на ДНК се получават фрагменти с два типа краища-лепкави и слепи.

## Присъединяване на гени към вектори (преносители)

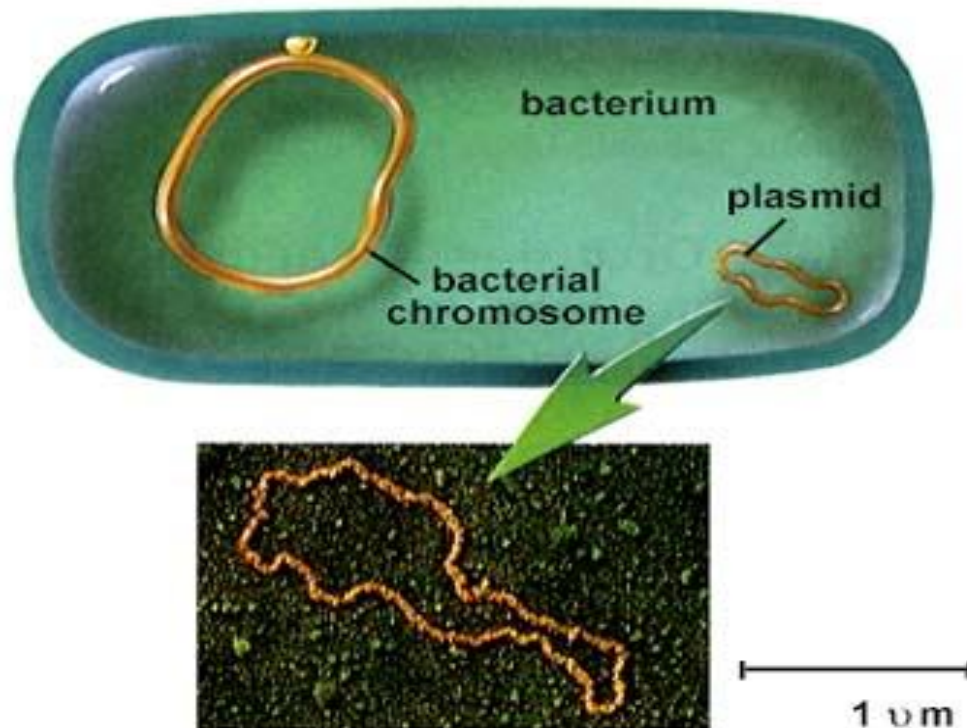
След рестриктазната обработка ДНК-фрагментите са готови да се настанят на новото си място, а именно в малка молекула ДНК, способна да ги вкара в клетката и да им осигури трайно съществуване и възпроизвеждане. Тази малка молекула се нарича **вектор** (от лат. vector – водещ). За вектори (преносители) на фрагменти на чужда ДНК се използват бактериийни **плазмиди** или умерени **фаги**. Присъединяването на чуждата ДНК към плазмидите или фагите се осъществява с помощта на специфични ензими, наречени ДНК-лигази. Свързването се извършва комплементарно с лепливите краища на фрагментите на чуждата ДНК. В генома на вектора на две места в средата е вмъкнат малък олигонуклеотид с нагъсто събрани места за редица рестриктази. Такива последователности, наречени полилинкери (англ. – пригл. значение "за много връзки").

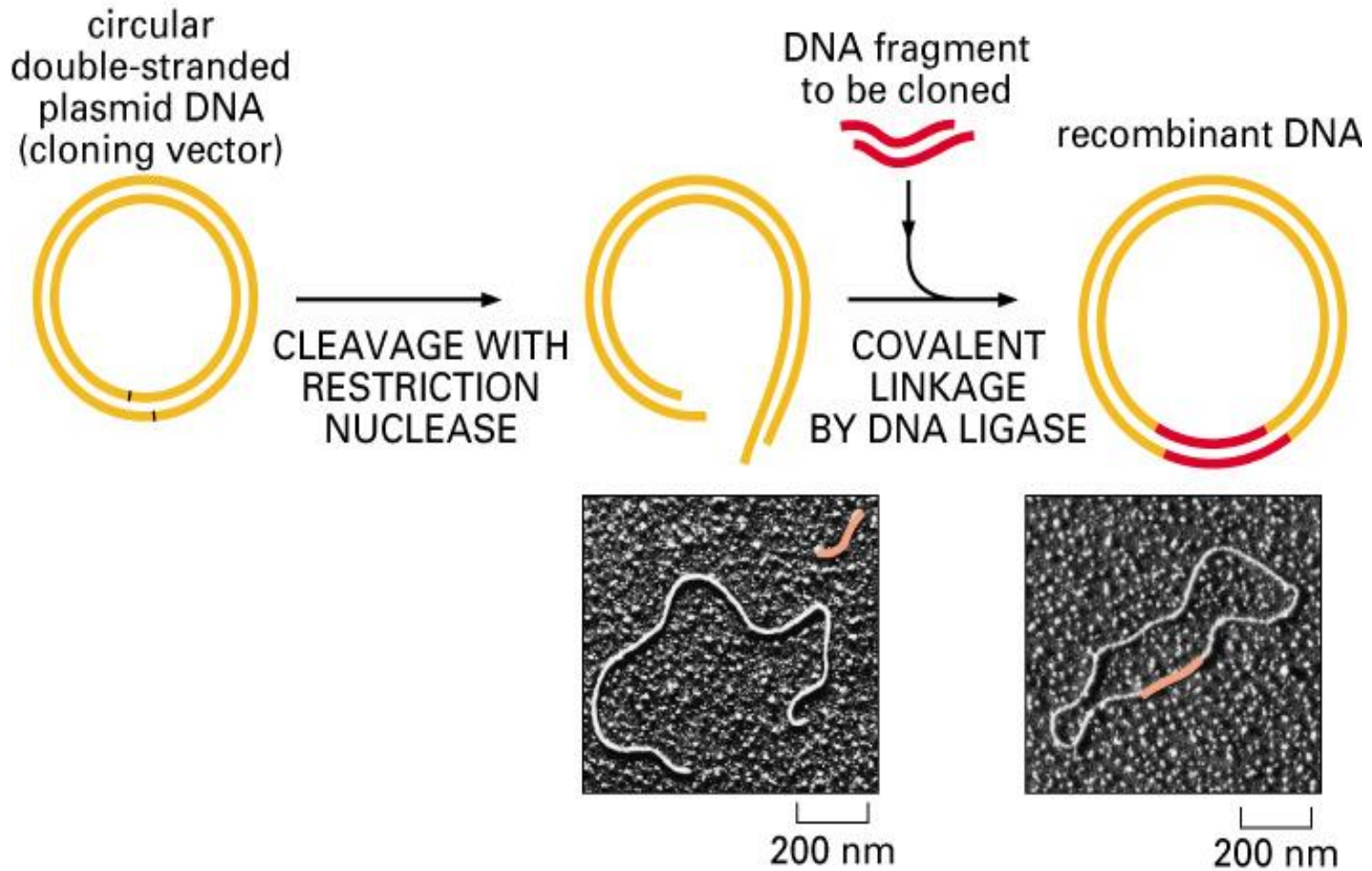


# Видове вектори

Вид	размер на клонираната ДНК (kb)
Плазмид	20
Бактерио-фаг	25
Козмид	45
P1 фаг	100
BAC	300
YAC	1000

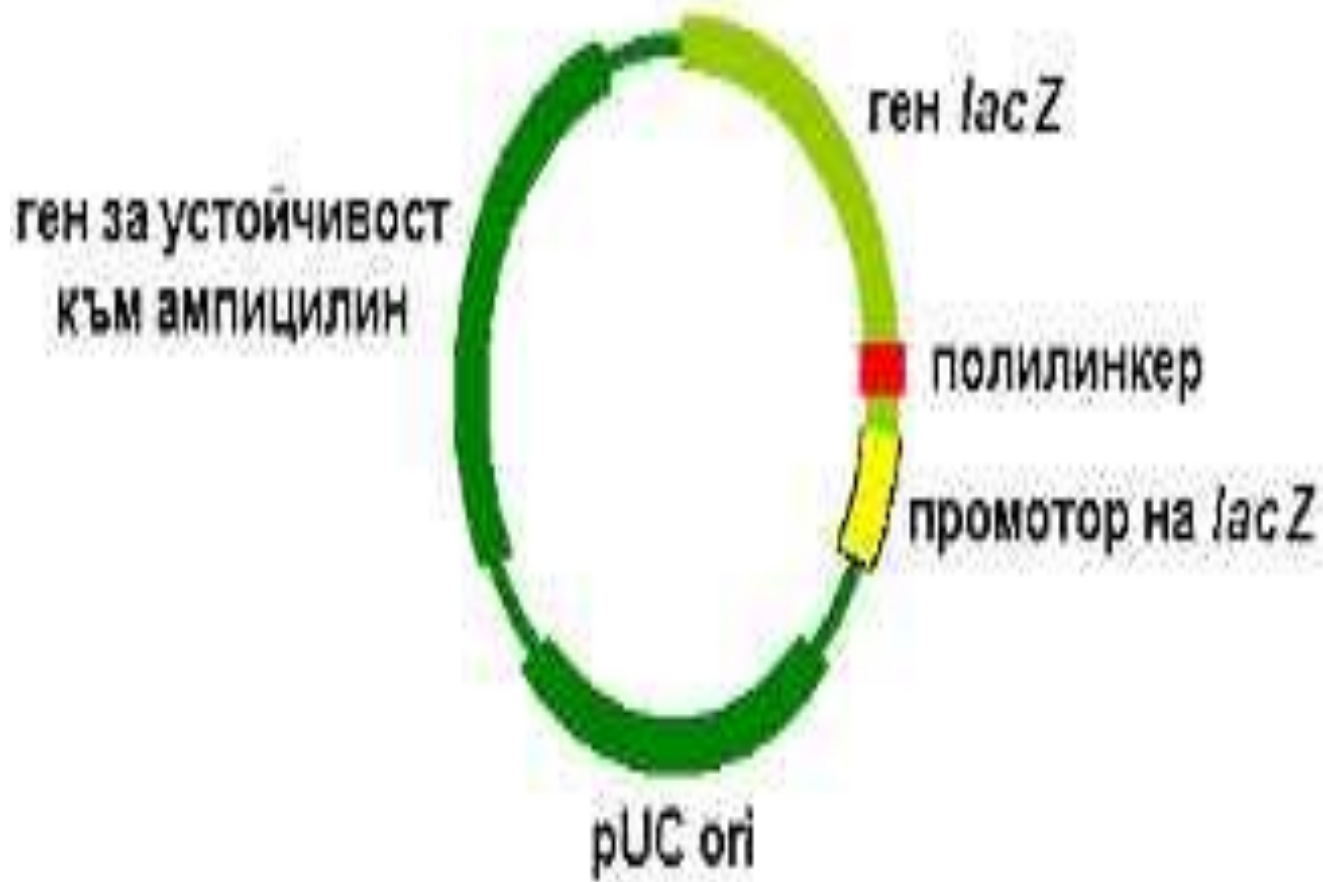
# Плазмидна ДНК







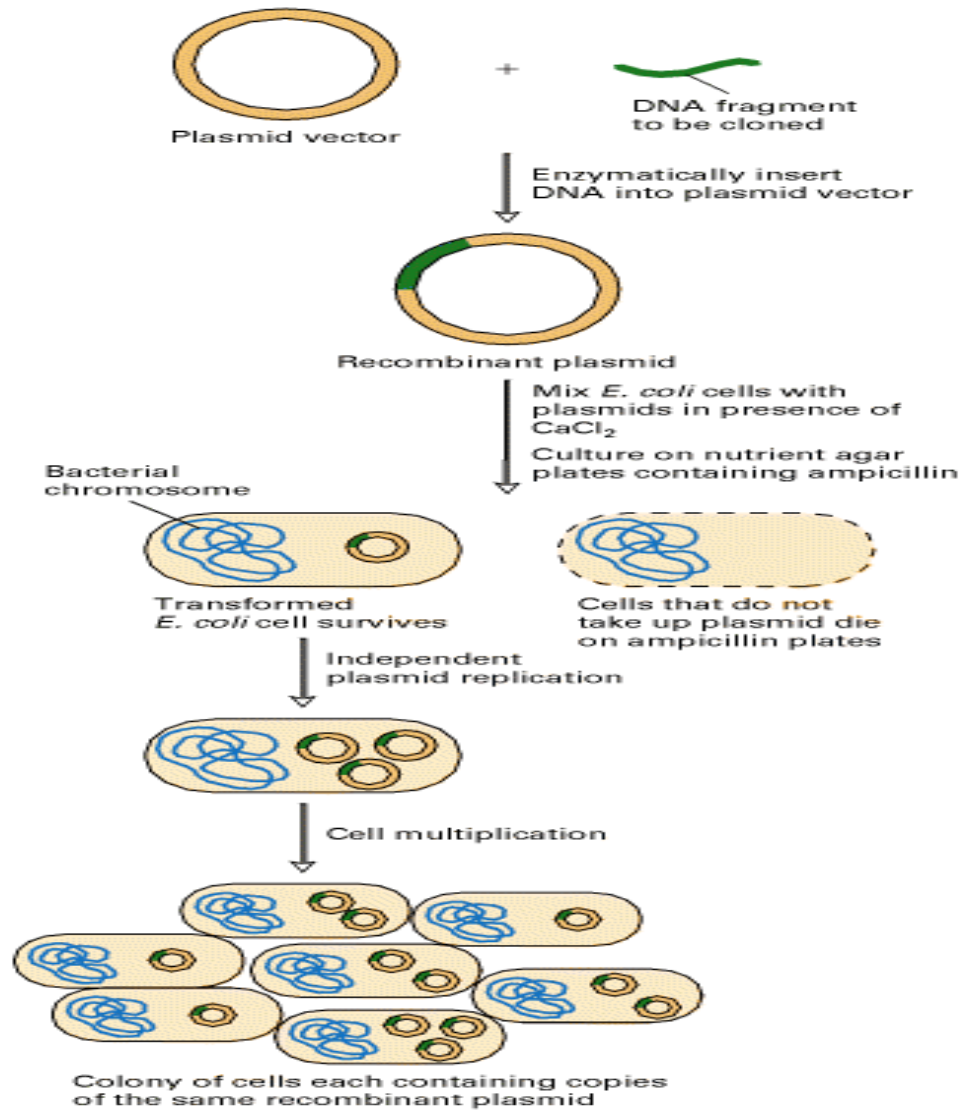
## Опростена карта на вектора pBluescript





## Начални етапи на клониране във вектор

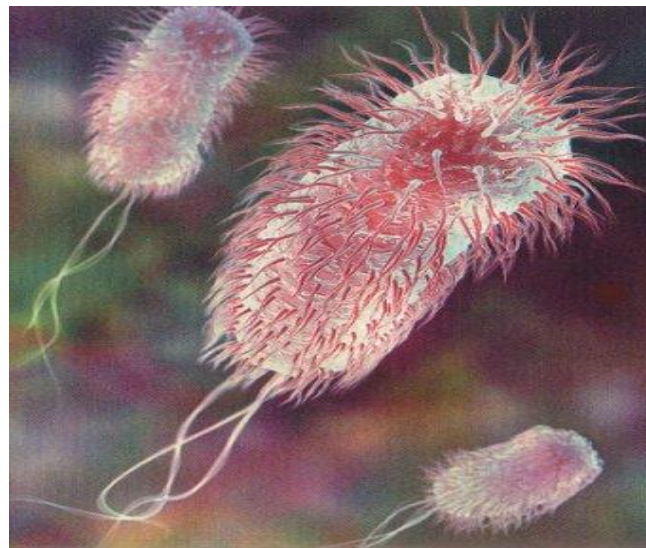
Предварително плазмидната молекула на ДНК се нарязва със същите рестриктази, с които е нарязана и чуждата ДНК. По такъв начин се получават краища, които комплементарно съвпадат с краищата на линейните фрагменти на чуждата ДНК. В резултат на това, линейните фрагменти на чуждата ДНК се свързват, “съшиват” към молекулата на ДНК на плазмидите с помощта на ДНК-лигазиза и се образуват ковалентни връзки. Получават се хибридни плазмиди. Тяхната ДНК е рекомбинантна ДНК. След лигазната реакция ДНК се смесва с фагови белтъци. Получават се вириони, както би станало в заразена с ламбда-фаг бактерия.



# Внасяне на рекомбинантна ДНК в клетката w prokarioti

Получените плазмиди или фаги с рекомбинантна ДНК се внасят в реципиентната клетка чрез трансформация или трансфекция. Като реципиенти се използват най- често клетки на *E. coli*, които могат да приемат голям брой плазмиди или фаги. Получава се нова бактерийна популация, която се нарича клон.

***Escherichia coli***



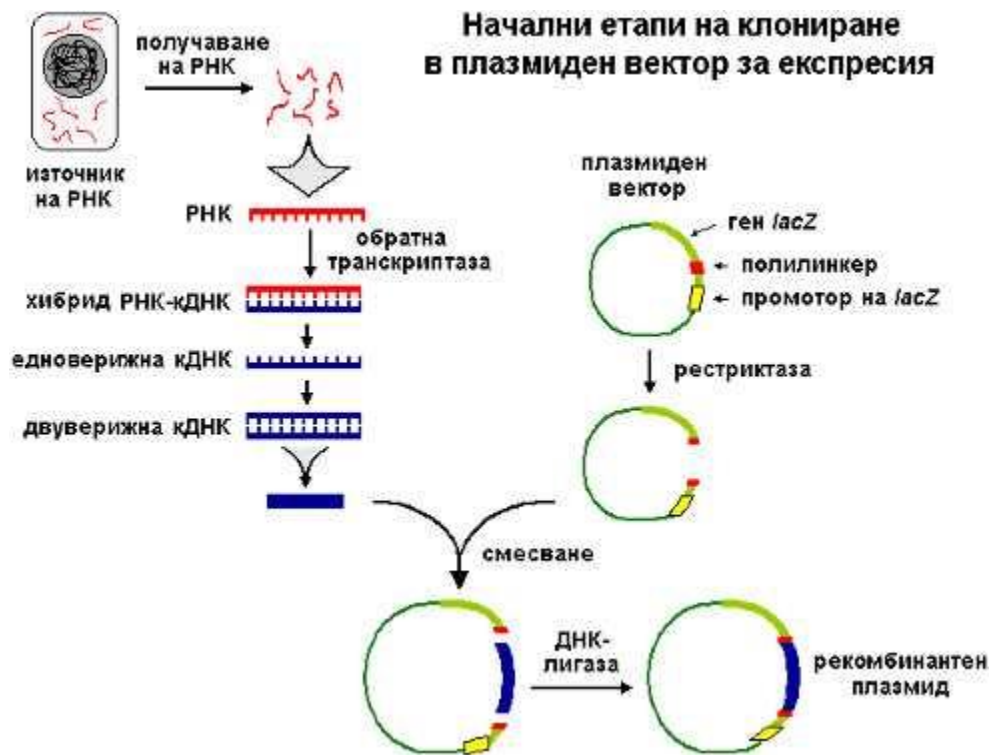
- Чрез бактерии: Трасформация
- *Чрез вируси: Трансдукция*
- Между бактерии: Бактериална Конюгация
- В еукариотни клетки: Трасфекция

Еукариотни гени са накъсани. Те няма да работят в *E. coli*, защото бактерията не може да им изреже интроните. Освен това еукариотната мРНК не би се приела от прокариотни рибозоми, защото няма Шайн-Далгарнова последователност. В действителност обаче няма да се стигне до такива проблеми, защото транскрипцията изобщо няма да започне: *E. coli* не може да работи с еукариотни промотори.

Трябва да изчистим гена от собствения му промотор и регулаторни последователности. Трябва да закачим отпред подходящ промотор. Ако пробутваме еукариотен ген на бактерия, трябва да му изрежем интроните. Трябва да се погрижим мРНК на гена да е съвместима с рибозомите на клетката-гостоприемник.

## Синтеза на кДНК от мРНК с обратна транскриптаза

За да клонираме ген трябва да изолираме не самия него, а презаписана от него зряла мРНК. Тя по-добре подхожда на целите ни от изходния ген, защото в нея интроните и повечето регулаторни последователности липсват.



# Биологична активност на рекомбинантните белтъци

- Ако рекомбинантният белтък е получен със замисъл да се използва в медицината или стопанството, той се подлага на още редица изследвания. Трябва да се провери например дали физичните и биохимичните му свойства съвпадат с тези на "първообраза", пречистен от изходния организъм. Най-важен обаче е тестът, който сравнява изходния и рекомбинантния белтък по биологична активност. Ако сме искали да получим хормон, инжектираме рекомбинантния белтък в опитно животно; ако става дума за ензим, смесваме го със субстрата му.
- Понякога се оказва, че нужната кДНК е клонирана и се експресира, но белтъкът не е като истинския – различава се по някои свойства и няма биологична активност. Най-честата причина за това са особености в нагъването и посттранслационни модификации. Те са обичайни за еукариотните белтъци, но са много по-слабо застъпени в прокариотната клетка. Затова произведените от *E. coli* чужди белтъци ще се трупат във вида, в който слизат от рибозомата. Лишени от посттранслационната обработка, много белтъци не страдат забележимо, но някои губят активността си.



INNO-FOOD  
SEE

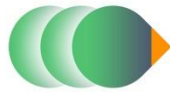
# Metodi za analiz na proteina





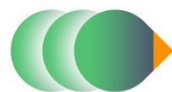
# Генно инженерство при дрожди

- Ако търсим подходящ еукариотен гостоприемник за клониране и експресия на кДНК, често най-подходящи са хлебните дрожди *Saccharomyces cerevisiae*. Те растат и се размножават бързо почти като чревните бактерии. Отглеждането им е евтино и не буди опасения от практическо или морално естество. Поради твърде далечното си родство с бозайниците дрождите не могат да съдържат вируси или приони, опасни за човека, така че произведените от дрожди рекомбинантни белтъци са чисти от такива патогени. Същевременно дрождите разпознават и обработват правилно много от сигналните последователности на човешките белтъци и така им осигуряват структурата, нужна за биологичната им активност.



INNO-FOOD  
SEE

# Shema na vector pBR322



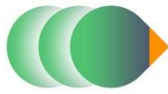
INNO-FOOD  
SEE

# Трансгенни (генетично модифицирани) растения

- Предимствата на трансгенните растения пред класическите сортове могат да бъдат различни: подобрени хранителни качества (например обогатяване на ориза с каротин – предшественика на витамин А); устойчивост към насекоми-вредители; устойчивост към вируси; устойчивост към хербициди; поносимост към солена почва. Да видим втория пример, т.е. как се постига устойчивост към насекоми-вредители. Бацилът *Bacillus thuringiensis* е патоген за ларвите на редица насекоми. Той притежава ген за инсектициден белтък – токсин, който при попадане в храносмилателната система на ларвата лизира чревните й епителни клетки и така я убива. Белтъкът е безвреден за останалите животни; *B. thuringiensis* се използва за биологична защита на растенията от много години без забележима вреда върху екосистемите. Ако накараме селскостопански растения да експресират съответния ген, ларвите-вредители ще платят с живота си всеки опит да се хранят с техните тъкани.

# Methods of Plant Transformation

- *Agrobacterium*
  - Easiest and most simple
  - Cut plant tissue in small pieces, soak in *Agrobacterium* suspension
  - Some cells will be transformed by the bacterium
  - Grow on selection medium (rooting or shooting)
  - Some plants will not transform with the method
- Particle Bombardment
  - DNA is coated onto gold or tungsten particles
  - Particles are shot into young plant cells
  - Low efficiency
  - Most plants can be transformed
- Electroporation
  - Electric shock induces transient holes in cell membranes
  - DNA enters cells
- Viral transformation
  - Use plant virus as vector to introduce DNA
  - Not always integrated into plant genome



INNO-FOOD  
SEE

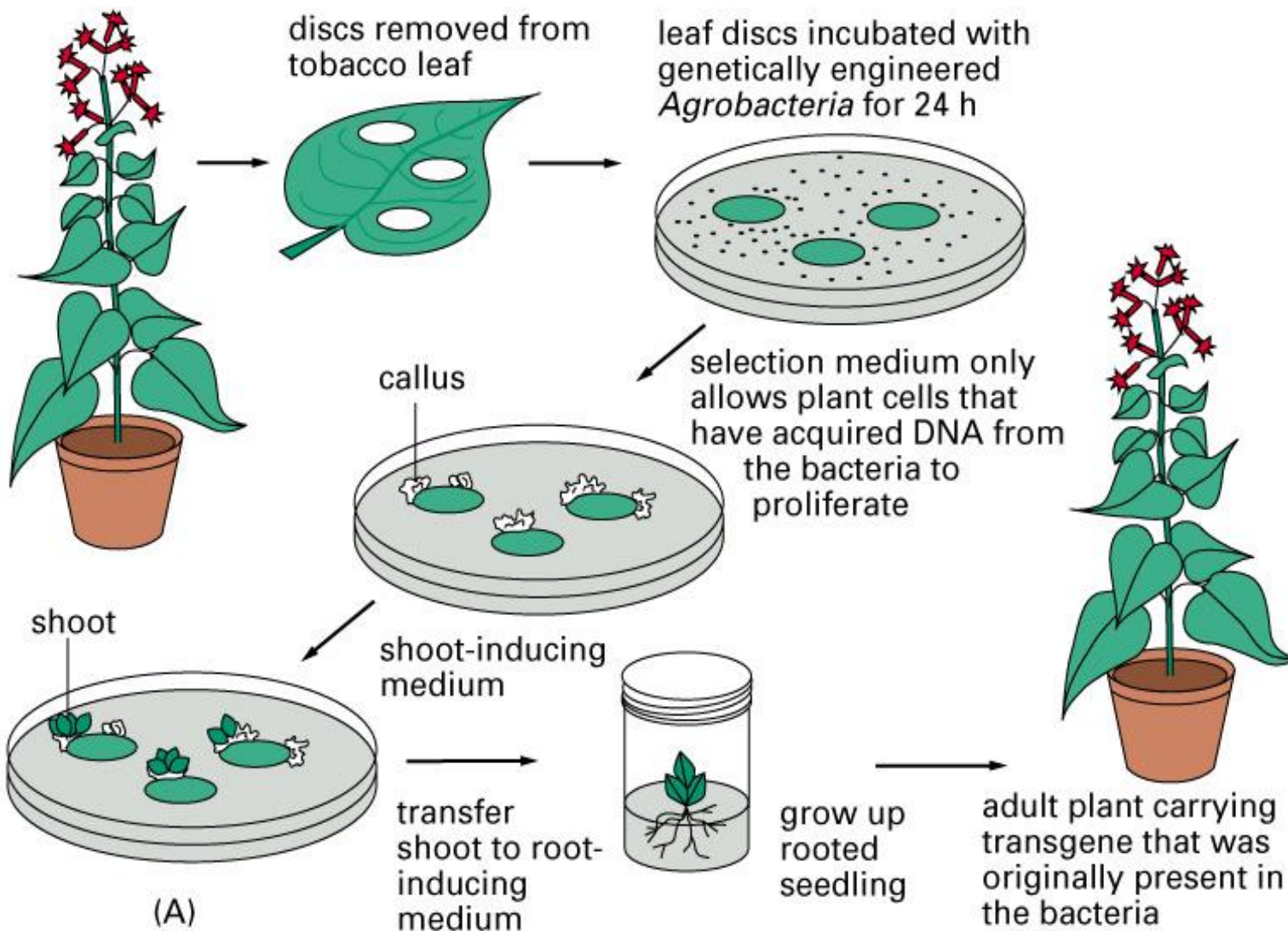
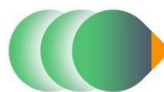
# *Agrobacterium tumefaciens*

- Natural tool for plant transformation
- How it works – tumor induction
- Transfer of DNA to plant

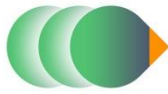


Photo 143: A. L. Jones and T. B. Sutton





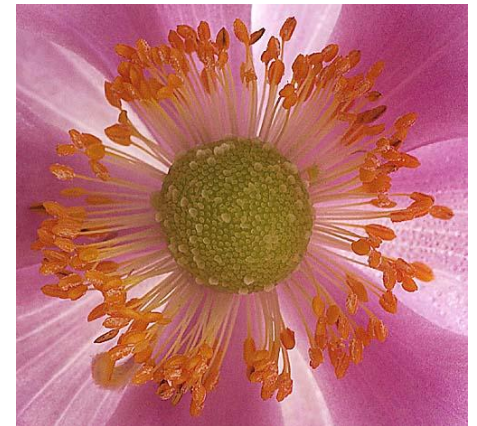




INNO-FOOD  
SEE

# Applications and Potential

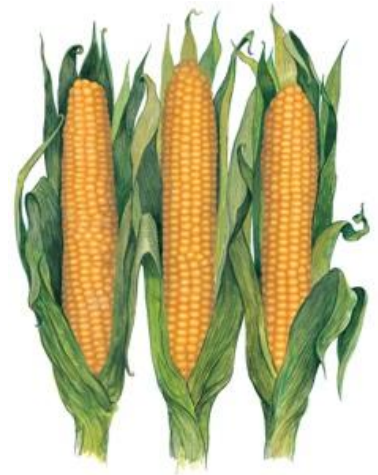
- Genetically Modified Organisms
- Agriculture
- Health and Medicine
- Biotechnology
- Scientific Research
- Industry and Environment
- Gene therapy



# Genetically Modified Organisms (GMOs)



- GMOs
  - Express traits not normally found in nature
  - Result of introducing foreign DNA
  - Highly controversial
    - Safety concerns
    - Environmental implications
    - Can we blindly trust profit-driven industry?





# Agriculture

- Herbicide resistant crops
  - Soybean, corn canola, lettuce, strawberry, potato, wheat
- Virus resistance
  - Papaya resistance to papaya ringspot virus
- Golden rice
  - Engineering rice to produce Vitamin A
- Edible vaccines in development
  - Plant containing pathogen protein is ingested
  - Body produces antibodies against protein
  - Conferring resistance (ex diarrhea, hepatitis B, measles)
  - Bananas, potato, tomato





INNO-FOOD  
SEE

# Health and Medicine

- Biotherapeutics
  - Antibodies
  - Hormone
  - Enzymes
- Disease Indications
  - Liver disease
  - Genetic diseases
  - Kidney disorders
  - Digestive disorders
  - Cancer
  - Infectious disease



# Biotechnology

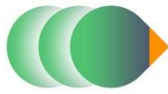
- Chymosin:
  - Genetically engineered enzyme
  - Used for curdling milk products in cheese production
  - Revolutionized cheese production
    - Previously rennin was isolated from newborn calf intestine (expensive, inhumane)
    - Inexpensive, readily available
- Bovine somatotropin (bST):
  - increased milk production in cows
- Other examples:
  - Insulin
  - Interleukin
  - Human growth hormone
  - Interferon



# Scientific Research

- Protein production using genetic transformation
- Objectives:
  - Generate antibodies
  - Assay development
  - Structure determination
  - Protein-protein interaction





INNO-FOOD  
SEE

# Industry and Environment

- Bioremediation: Using bioengineered microbes to clean up pollution and contaminated sites
- Indicator bacteria: Detecting pollution and contamination in the environment
- Waste management
  - Sewage
  - Petroleum products



# Gene Therapy Overview

- Viral vector is used to deliver genetic material to target cells (ex. liver, lung)
- The viral vector then injects the gene for a defective or missing protein
- The cell then produces the functional protein and restores the target cell to a normal state
- Viruses used for gene therapy
  - Retroviruses
  - Adenoviruses
  - Adeno-associated viruses
  - Herpes simplex viruses
- Gene therapy is experimental with poor success in clinical trials
- There are no FDA-approved gene therapy products on the market

