

Г. А. Журавлева

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебник для вузов

2-е издание, переработанное и дополненное

*Под редакцией академика РАН
С. Г. Инге-Вечтомова*



ЭКО • ВЕКТОР
Санкт-Петербург
2019

УДК 575
ББК 28.54
Ж91

Рекомендовано ученым советом биологического факультета СПбГУ

Рецензенты: академик РАН, проф. И. А. Тихонович, чл.-корр. РАН проф. В. С. Баранов

Журавлева Г. А.

Ж91 Генная инженерия в биотехнологии / Г. А. Журавлева; ред. С. Г. Инге-Вечтомов. — 2-е изд., испр. и доп. — СПб.: Эко-Вектор, 2019. — 342 с.: ил.

ISBN 978-5-906648-97-6

Учебник «Генная инженерия в биотехнологии» подготовлен в соответствии с ФГОС ВПО по специальности 020400 «Биология» и основан на лекциях, читаемых уже более 10 лет на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета в начале 4-го курса бакалавриата. Автором подробно рассмотрены основные приемы генной инженерии; использование одноклеточных организмов (бактерий и дрожжей), клеток насекомых и культур клеток млекопитающих в качестве продуцентов чужеродных белков; млекопитающие как объект генной инженерии и биотехнологии (включая получение трансгенных животных, генную терапию, клонирование животных); геномные и постгеномные методы. Книга проиллюстрирована цветными высококачественными рисунками, отражающими и дополняющими текст. Учебник является актуальным, т. к. подобная литература на русском языке практически отсутствует. Издание предназначено для студентов и аспирантов биологических факультетов университетов, педагогических и сельскохозяйственных вузов, а также для научных сотрудников, работающих с использованием методов генной инженерии и биотехнологии.

УДК 575
ББК 28.54

ISBN 978-5-906648-97-6

© ООО «Эко-Вектор», 2016, 2019

© Журавлева Г.А., 2016, 2019

© Инге-Вечтомов С.Г., ред., 2016, 2019

Содержание

Предисловие.....	8
Раздел 1. Основные приемы генной инженерии	9
Глава 1. Введение	9
Основные определения	9
Методы, применяемые в генной инженерии и биотехнологии ...	10
Основные события в истории молекулярной биотехнологии	10
Открытие рестрикции.....	11
Проблемы биологической безопасности, связанные с работой с рекомбинантной ДНК	13
Глава 2. Ферменты, используемые в генной инженерии	17
Нуклеазы	17
Лигазы	27
Полимеразы	28
Ферменты, модифицирующие ДНК и РНК.....	30
Соединение фрагментов ДНК, разрезанных рестриктазами	30
Превращение тупых концов в липкие	31
Глава 3. Электрофорез и секвенирование	33
Разделение фрагментов ДНК	33
Использование электрофореза в агарозном геле	36
Пульс-электрофорез как метод разделения крупных фрагментов ДНК	37
Капиллярный электрофорез.....	38
Физическое картирование с помощью рестриктаз	39
Методы переноса молекул на мембраны.....	41
Получение зондов для гибридизации.....	44
Секвенирование ДНК	46
Роль секвенирования	50
Химический синтез олигонуклеотидов	51
Глава 4. Полимеразная цепная реакция	53
Основные этапы ПЦР.....	54
ДНК-полимеразы и ПЦР	56
Дизайн праймеров для ПЦР	57
Анализ ПЦР-продуктов	60

Клонирование продуктов ПЦР	61
Варианты ПЦР	64
Использование ПЦР	67
Достоинства и недостатки ПЦР	69
Глава 5. Молекулярно-генетические маркеры и их практическое использование	71
ДНК-маркеры	71
История ДНК-типирования	72
Использование протяженных последовательностей в качестве генетических маркеров (ДНК-фингерпринтинг)	73
Использование ПЦР в ДНК-тестировании (STR-маркеры)	79
Использование однонуклеотидных замен (SNP-маркеры)	84
Использование коротких стандартных последовательностей ДНК для идентификации видов (ДНК-штрихкод, или ДНК-баркодинг)	84
Репортерные гены	85
Глава 6. Изменение и анализ последовательностей ДНК с помощью мутагенеза	89
Общая схема мутагенеза <i>in vitro</i>	89
Мутагенез регуляторных областей	91
Мутагенез кодирующих последовательностей	94
Замещение гена и добавление гена	99
Направленный мутагенез с использованием системы Cre/LoxP «Редактирование» генома с помощью нуклеаз ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9	100
Применение антисмысловых (антисенс) олигонуклеотидов	104
Транспозоновый «мутагенез»	106
Глава 7. Способы введения чужеродной ДНК в клетки	109
Основные требования к вектору	109
История создания векторов	112
Некоторые векторы, используемые для клонирования генов ...	114
Технология клонирования «gateway»	117
Разработка улучшенных бактериальных штаммов	121
Способы введения плазмидной ДНК в клетки	121
Глава 8. Создание библиотек генов и их скрининг	124
Основные этапы клонирования	124
Выбор источника ДНК для клонирования	125

Создание библиотек на основе кДНК	126
Клонирование геномной ДНК	130
Скрининг библиотек генов	136
Значение клонирования	146
Глава 9. Получение рекомбинантных белков	148
Рекомбинантные белки, определение	148
Применение очищенных рекомбинантных белков	149
История получения первых рекомбинантных белков	151
Этапы получения определенного белка	152
Основные способы получения белков в биотехнологии	154
Раздел 2. Использование одноклеточных организмов и клеток насекомых в качестве продуцентов чужеродных белков	159
Глава 10. Экспрессия генов в клетках прокариот	159
Оптимизация экспрессии чужеродных генов в клетках бактерий	160
Эффективная транскрипция чужеродного гена	161
Эффективная трансляция чужеродного гена	164
Посттрансляционные события	167
Использование химерных белков	168
Использование различных видов бактерий в качестве продуцентов чужеродных белков	170
Глава 11. Использование дрожжей в генной инженерии и биотехнологии	172
Достоинства и недостатки дрожжей в качестве продуцентов чужеродных белков	172
Синтез чужеродных белков в <i>Pichia pastoris</i>	173
Системы экспрессии <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	176
Дрожжи <i>S. cerevisiae</i> в биотехнологии	178
Дрожжевая двугибридная система (two-hybrid system)	179
Глава 12. Бакуловирусы как одни из наиболее перспективных объектов для синтеза гетерологичных белков	186
Жизненный цикл бакуловирусов	187
Бакуловирусы как природные инсектициды	190
Культуры клеток насекомых	192
Бакуловирусы в качестве векторов для переноса чужеродных генов	192

Усовершенствование «инсектицидных» свойств бакуловирусов	195
Достоинства и недостатки бакуловирусной системы экспрессии	197
Раздел 3. Млекопитающие как объект генной инженерии и биотехнологии	199
Глава 13. Экспрессия трансгенов в клетках млекопитающих	199
Способы введения чужеродной ДНК в клетки млекопитающих	200
Временная и стабильная экспрессия трансгенов	201
Использование временной экспрессии	201
Селективные маркеры	203
Получение клеток с направленной интеграцией трансгена	207
Способы доставки генов в клетки млекопитающих	208
Основные векторные системы клеток животных, основанные на использовании вирусов	210
Подходы, позволяющие увеличить экспрессию трансгена	221
Ограничения современных методов переноса генов в клетки млекопитающих	224
Глава 14. Трансгенные животные и их использование	225
Общая схема получения трансгенных животных	225
Основные методы получения трансгенных животных	227
Трансгенные животные. Мыши	232
Использование трансгенных мышей	237
Трансгенные коровы, козы, овцы	239
Использование трансгенных свиней и ксенотрансплантация	241
Получение трансгенных рыб	246
Трансгенные птицы	249
Достоинства и недостатки трансгенных животных	250
Глава 15. Генная терапия	251
Понятие, генной или генетической, терапии	251
Стратегии генной терапии	254
Этапы генной терапии	254
Системы переноса трансгенов	257
Основные фазы клинических испытаний	271
Успехи генотерапии	272
Генная терапия в будущем	273

Глава 16. Клонирование животных	274
Основные стадии клонирования	276
Клонирование овцы Долли	278
Дефекты клонов	280
Использование клонирования и его ограничения	280
Раздел 4. Методы геномики и транскриптомики	288
Глава 17. Геномные и постгеномные методы	288
Секвенирование геномов	288
Геномные проекты	291
Геномика и метагеномика	295
Массовый анализ экспрессии генов	296
Синтетическая биология	306
Заключение	312
Рекомендуемая литература	316
Общая литература	306
Дополнительная литература и полезные сайты Интернета	306
Именной указатель	315
Предметный указатель	316
Указатель латинских названий	323
Список использованной литературы	324

Учебник для вузов

Журавлева Галина Анатольевна

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

ООО «Эко-Вектор»

Генеральный директор П. А. Наумов
Выпускающий редактор Н. Н. Репьева
Корректор О. Е. Ларионова
Верстка В. А. Еленин

Подписано в печать 27.05.2019.

Формат 60×90/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 21,5. Тираж 750 экз. Заказ № 4741

Отпечатано в АО «Первая Образцовая типография»

Филиал «Чеховский Печатный Двор»

142300, Московская область, г. Чехов, ул. Полиграфистов, д. 1
Сайт: www.chpd.ru. E-mail: sales@chpd.ru. Тел.: 8(499)270-73-59

По вопросам приобретения издания обращаться в ООО «Эко-Вектор»
191186, Санкт-Петербург, Аптекарский переулок, д. 3, литера А,
помещение 1Н, тел. (812) 648-83-66. E-mail: info@eco-vector.com

ISBN 978-5-906648-97-6



9 785906 648976 >