



# Inżynieria genetyczna i jej techniki

Emilia Marchewka IB



# Czym jest biotechnologia?

Biotechnologia jest dziedziną nauki zajmującą się możliwością wykorzystania organizmów i wirusów do celów użytkowych.



# Biotechnologia tradycyjna i molekularna

Biotechnologię dzielimy na **tradycyjną**, która wykorzystuje naturalnie występujące w przyrodzie organizmy i substancje oraz **molekularną** umożliwiającą modyfikowanie genomów w celu uzyskania organizmu o pożądanych cechach.

**W badaniach zakresu biotechnologii molekularnej wykorzystujemy tzw. techniki inżynierii genetycznej.**

# Czym jest inżynieria genetyczna?

Inżynieria genetyczna to świadoma, celowa i kontrolowana przez człowieka ingerencja w materiał genetyczny organizmów, w celu zmiany ich właściwości dziedzicznych.

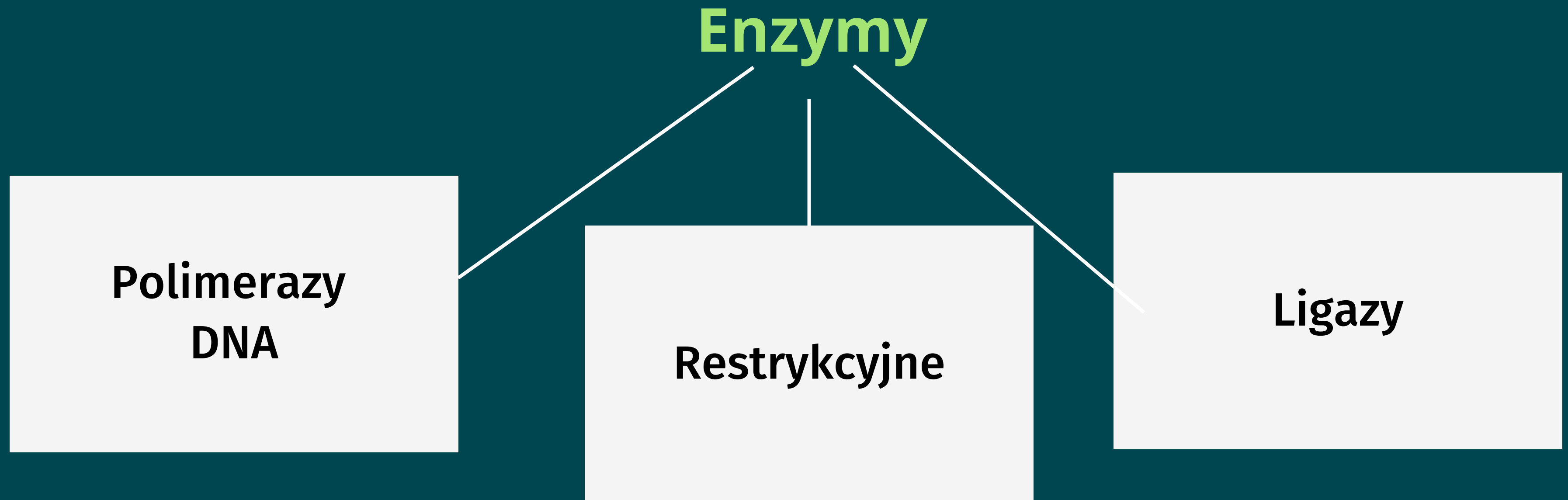
Proces ten zmienia materiał genetyczny organizmu poprzez modyfikację, usunięcie lub wprowadzenie nowego DNA do jego genomu.



# Enzymy w biotechnologii molekularnej

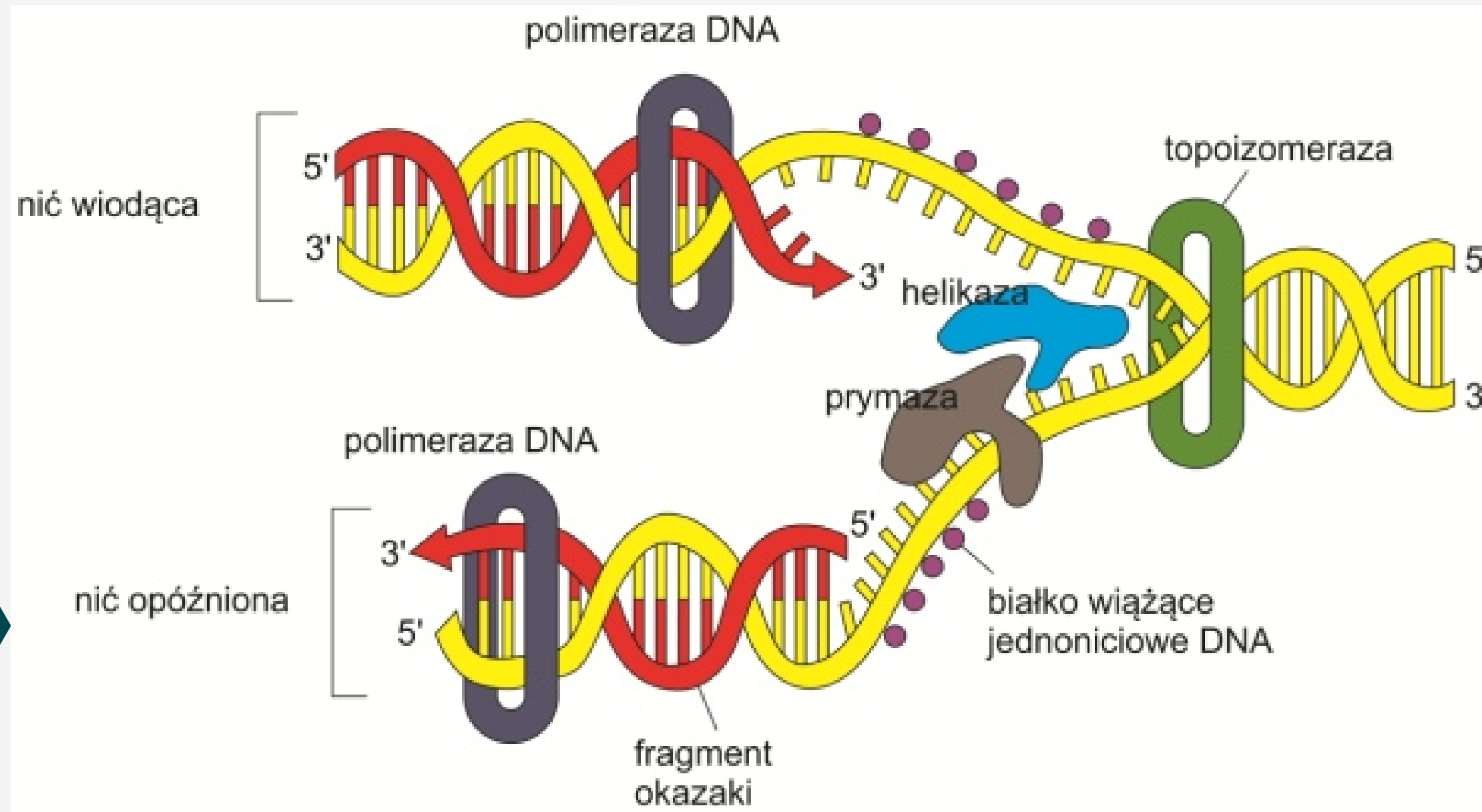
Działanie poszczególnych enzymów umożliwia wprowadzanie zmian w DNA komórki w celu uzyskania określonych cech.

Do najczęściej wykorzystywanych enzymów zaliczamy:



# Enzymy Polimerazy DNA

Stosowane są do powielania fragmentów DNA. Wytwarzają one komplementarną do matrycy nić DNA rozpoczynając od startera.



Niektóre polimerazy DNA nie tracą aktywności w wysokiej temperaturze ponieważ są stabilne w szerokim zakresie temperatury. Taką polimerazą jest m.in. polimeraza Taq.

# Enzymy Restrykcyjne

Ich zadaniem jest rozpoznawanie oraz rozcinanie cząsteczki DNA składającej się z 4-8 par zasad. są to **sekwencje palindromowe** czyli takie, które odczytując w tym samym kierunku na obu niciach są identyczne np.

5' A G G C C T 3'

3' T C C G G A 5'

Określony enzym restrykcyjny rozcina daną cząsteczkę DNA zawsze w tych samych miejscach oraz daje stałą liczbę fragmentów. Przykładem enzymu restrykcyjnego jest enzym EcoRI

# Działanie enzymów ligazy

Niektóre enzymy przecinają dwuniciowy DNA asymetrycznie, dając fragmenty DNA z identycznymi komplementarnymi jednoniciowymi końcami. Takie zakończenia nazwano **lepki końcami** i mogą wiązać się wiązaniami wodorowymi z komplementarnymi jednoniciowymi końcami innych cząsteczek DNA przeciętych przez ten sam enzym.

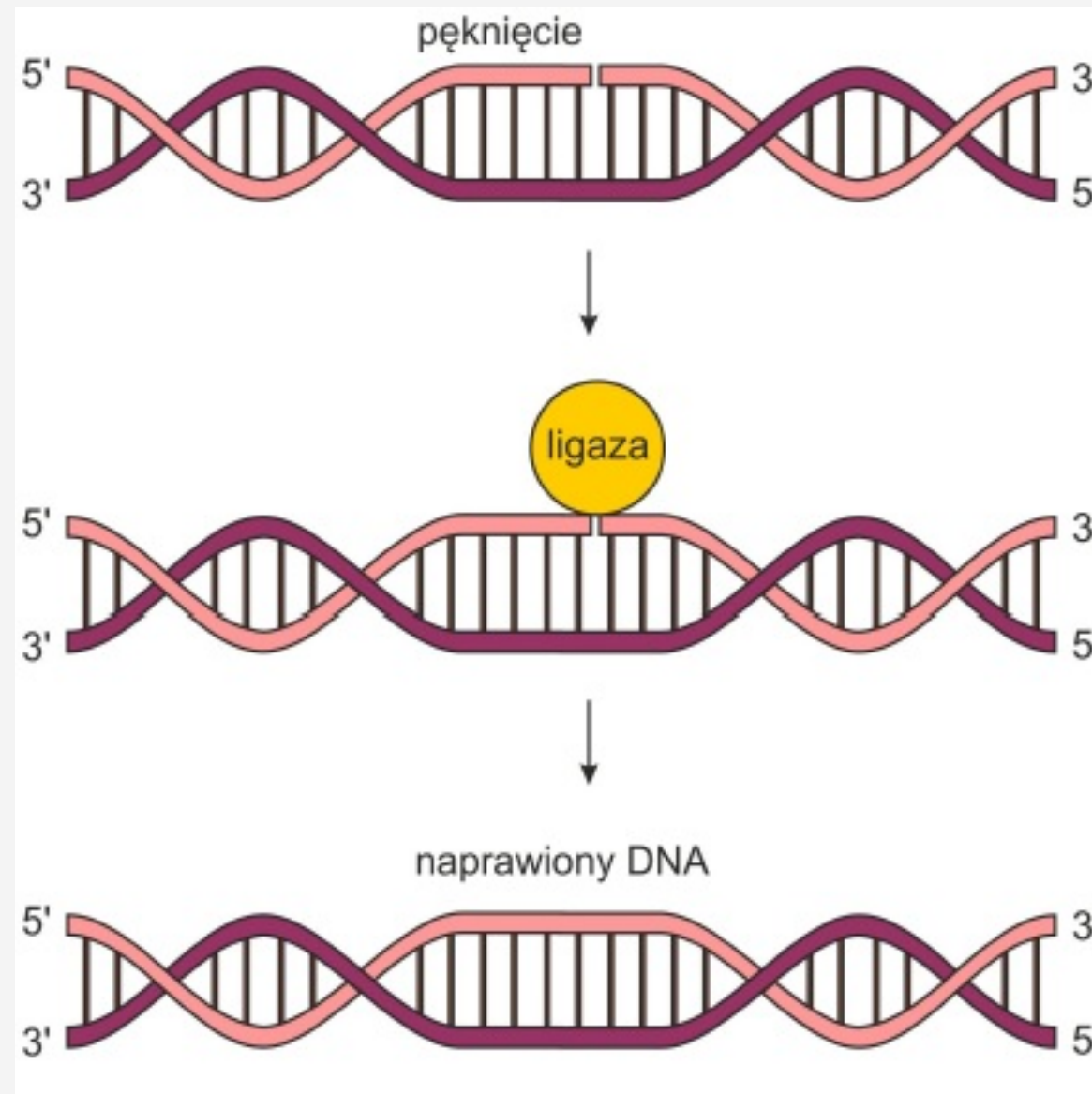
Lepkie końce dwóch fragmentów DNA łączą się w ten sposób a następnie zostają poddane działaniu ligazy DNA.

**Enzymy ligazy** odpowiadają za łączenie fragmentów DNA, które np. zostały wcześniej przecięte enzymami restrykcyjnymi.



# Działanie enzymów ligazy

**Enzymy te łączą fragmenty DNA np. które wcześniej zostały przecięte enzymami restrykcyjnymi**



# techniki inżynierii genetycznej



Istnieje wiele metod , które pozwalają na wyizolowanie z organizmów i wirusów genów oraz ich zmianę i wprowadzanie ich genomów do innych organizmów

## Techniki inżynierii genetycznej

### Do podstawowych zaliczamy:

- klonowanie
- analiza i elektroforeza żelowa
- łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)
- sekwencjonowanie DNA
- hybrydyzacja z sondą molekularną
- transformacja genetyczna
- CRISPR

# Klonowanie

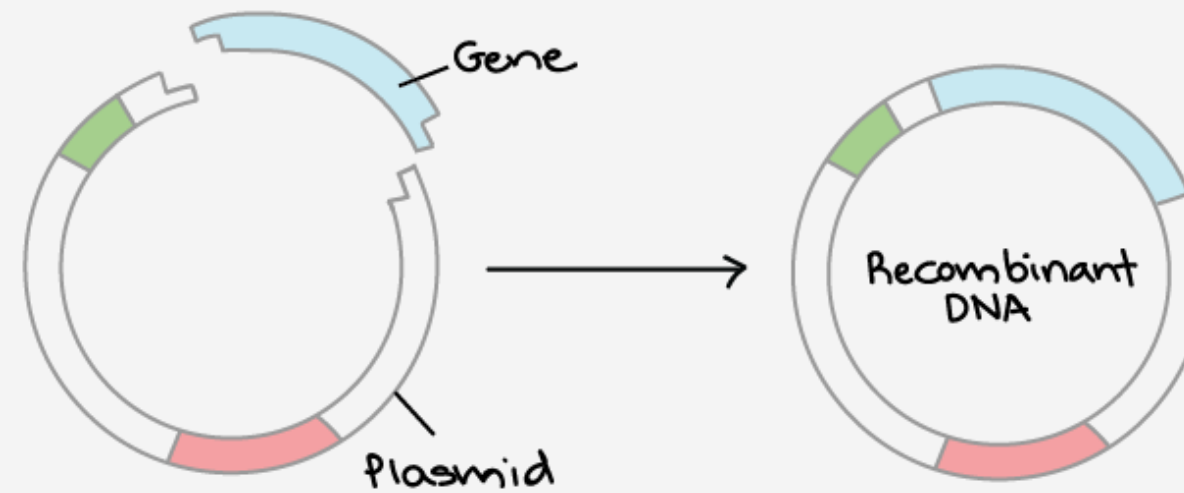
Klonowanie wymaga udziału enzymów restrykcyjnych oraz ligazy, które umożliwiają wstawienie obcego DNA do wektora, którym może być np. plazmid. Plazmidy i inne struktury DNA mogą być wprowadzane do komórek bakteryjnych w procesie zwanym **transformacją**. Podczas transformacji, odpowiednio przygotowane bakterie zostają wystawione na szok cieplny (wysoka temperatura), co podnosi prawdopodobieństwo, że przyjmą materiał DNA z otoczenia.

Klonowanie DNA jest techniką pozwalającą na powielanie cząsteczek DNA lub ich fragmentów w komórkach.



# Klonowanie

## Biblioteka genomowa i chromosomowa



**Biblioteka genomowa jest zbiorem tysięcy fragmentów DNA, które stanowią cały DNA zawarty w danym genomie. Służy do izolowania i badania określonych genów, a także sekwencji niekodujących białek.**

**Biblioteka chromosomowa zawiera wszystkie fragmenty DNA określonego chromosomu. Znajomość przynależności danego genu do chromosomu pozwala wyizolować go łatwiej z biblioteki chromosomowej niż z genomowej.**

# Zastosowanie klonowania DNA



## Biofarmacja

Klonowanie DNA może zostać wykorzystane aby produkować ludzkie białka np. insulinę czy hormony wzrostu.

Zrekombinowane białka są często produkowane w komórkach bakteryjnych.

## Terapia genowa

W niektórych chorobach genetycznych, pacjentom brakuje funkcjonalnych fragmentów DNA. Na drodze terapii genowej możemy próbować dostarczyć brakującego fragmentu DNA do komórek ich ciała np dostarczenie prawidłowych wersji genów pacjentom z mukowiscydozą.

## Analiza genowa

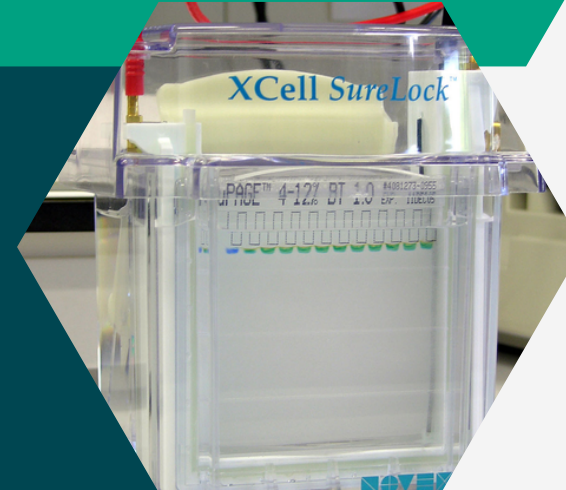
W laboratoriach badawczych, naukowcy często używają klonowania DNA do produkcji sztucznych, zrekombinowanych wersji genów, które pomagają im zrozumieć jak normalne geny funkcjonują w organizmie.

Na przykład, naukowcy zajmujący się neuronami u muszek owocówek stosują klonowanie DNA by uzyskać informacje o budowie genu.



# Elektroforeza

Elektroforeza – zjawisko elektrokinetyczne polegające na ruchu cząstek fazy rozproszonej w nieruchomej fazie rozpraszającej, pod wpływem pola elektrycznego.



Elektroforeza jest szeroko wykorzystywana jako technika analityczna, rzadziej preparatywna, w chemii i biologii molekularnej, zwłaszcza w genetyce. Jej istotą jest rozdzielenie mieszaniny związków chemicznych na możliwie jednorodne frakcje przez wymuszanie wędrówki ich cząsteczek w polu elektrycznym.

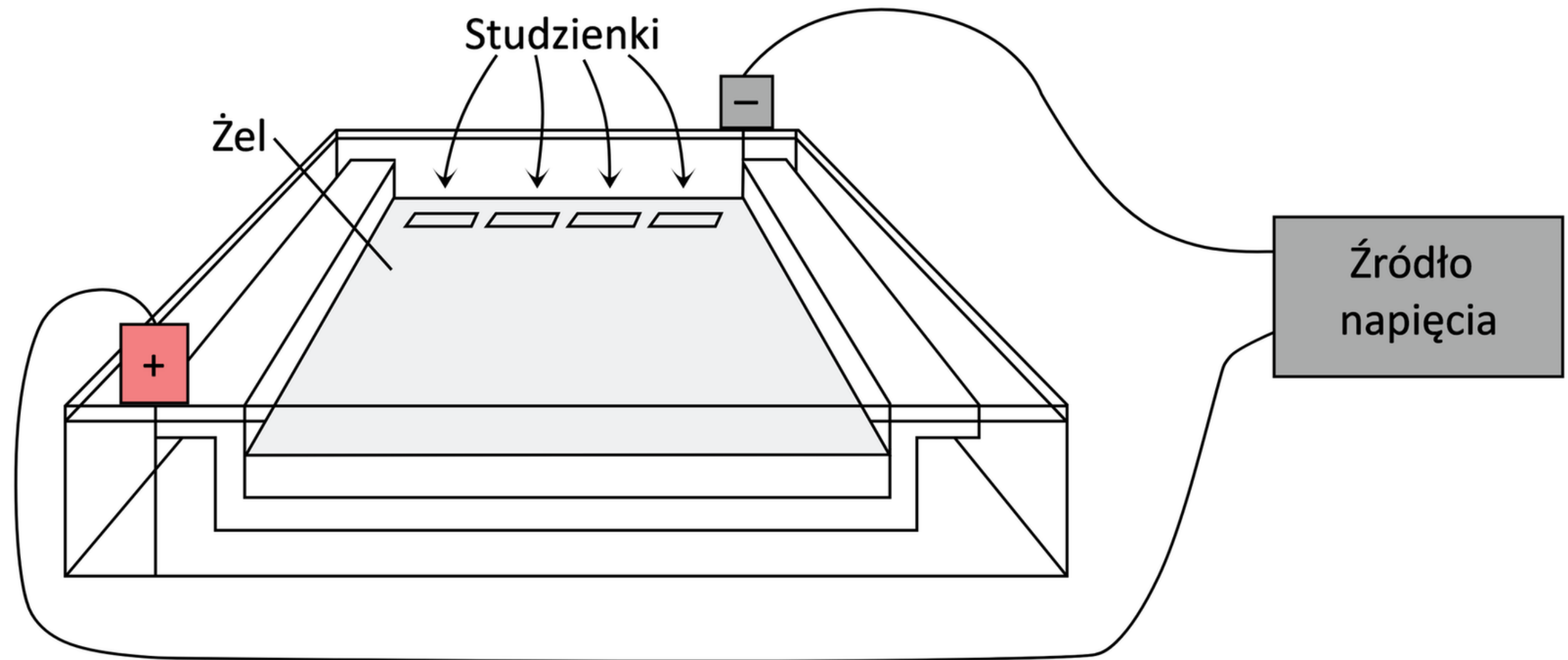
# Elektroforeza żelowa

**W inżynierii genetycznej elektroforeza DNA jest to technika rozdzielania DNA w specjalnym porowatym żelu pod wpływem działania pola elektrycznego. DNA przemieszcza się w żelu w kierunku elektrody dodatniej, a szybkość jego poruszania się cząsteczek zależy od ich masy. Aby zobaczyć wynik elektroforezy należy dodać do żelu przykładowo bromek etydyny, który pod wpływem światła UV wykazuje różową fluorescencję**





# Elektroforeza żelowa



DNA przemieszcza się w kierunku el.(+) ponieważ ma ładunek ujemny nadany przez reszty fosforanowe(V)

# Metody odwzorowania DNA, RNA i białek

Metody odwzorowania DNA, RNA i białek  
pozwalają wykrywać określone fragmenty tych  
cząsteczek

Na chwilę obecną wyróżniamy trzy  
metody odwzorowania

**Southern**

**Western**

**Northern**



# Odwzorowania Southern, Northern i Western

**Odwzorowanie Southern** - metoda wykrywania fragmentów DNA - ich rozdzielenie przez elektroforezę żelową, a następnie przeniesienie na nylonową błonę. Używana jest do diagnozowania niektórych chorób genetycznych

**Odwzorowanie Northern** służy do badań RNA i białek, których rozdzielone przez elektroforezę cząsteczki przenosi się na błonę i wykrywa za pomocą odpowiedniej sondy.

**Odwzorowanie Western** to przeniesienie na błonę elektroforetycznie rozdzielonych białek/polipeptydów. Swoje zastosowanie znalazła w diagnostyce medycznej do wykrywania obecności w organizmie białka HIV-1 oraz wirusa AIDS.

# Analiza restrykcyjna

**Analiza restrykcyjna** to rozcinanie, za pomocą określonych enzymów restrykcyjnych, długich cząsteczek DNA na fragmenty nadające się do różnego rodzaju manipulacji technikami inżynierii genetycznej.

# Przeprowadzanie analizy restrykcyjnej

**Analizę restrykcyjną przeprowadza się poprzez poddanie plazmidów trawieniu restrykcyjnemu.**

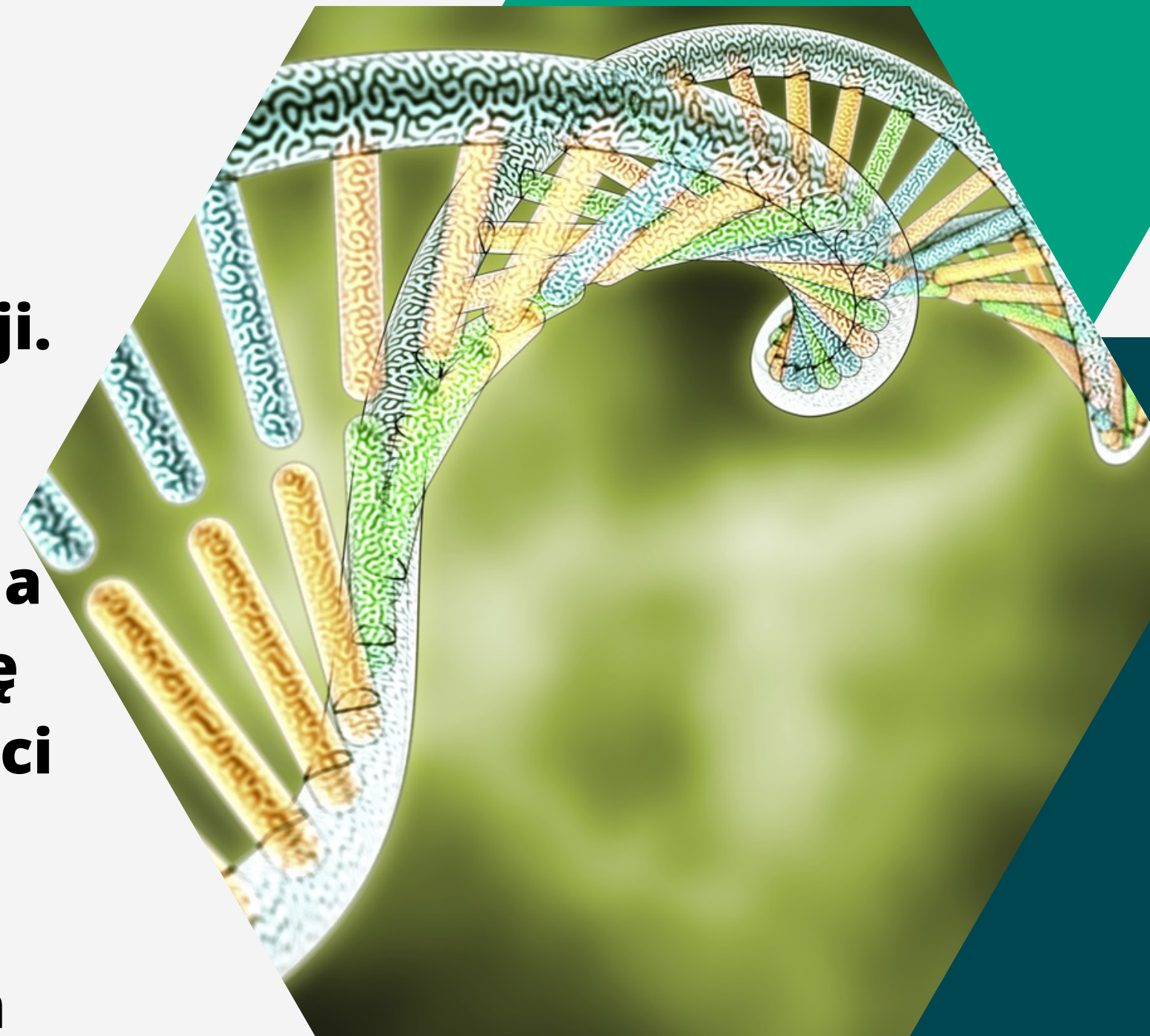
**Trawienie zachodzi w środowisku wodnym z buforem zapewniającym niezbędne warunki reakcji.**

**Czas reakcji zależy od rodzaju enzymu i wielkości materiału poddawanego trawieniu.**

**Użyte w reakcji enzymy powinny trawić wstawkę, a następnie plazmid. Po trawieniu przeprowadza się ligację wstawkę z plazmidem. Na podstawie długości**

**powstałych po trawieniu fragmentów można odróżnić plazmid zawierający wstawkę od tego, który nie został połączony z żadnym fragmentem**

**DNA.**



# Zastosowanie analizy restrykcyjnej

**Analiza restrykcyjna jest wykorzystywana do**

- **badania struktury chromosomów**
- **izolowania genów**
- **sekwencjonowania długich cząsteczek DNA.**



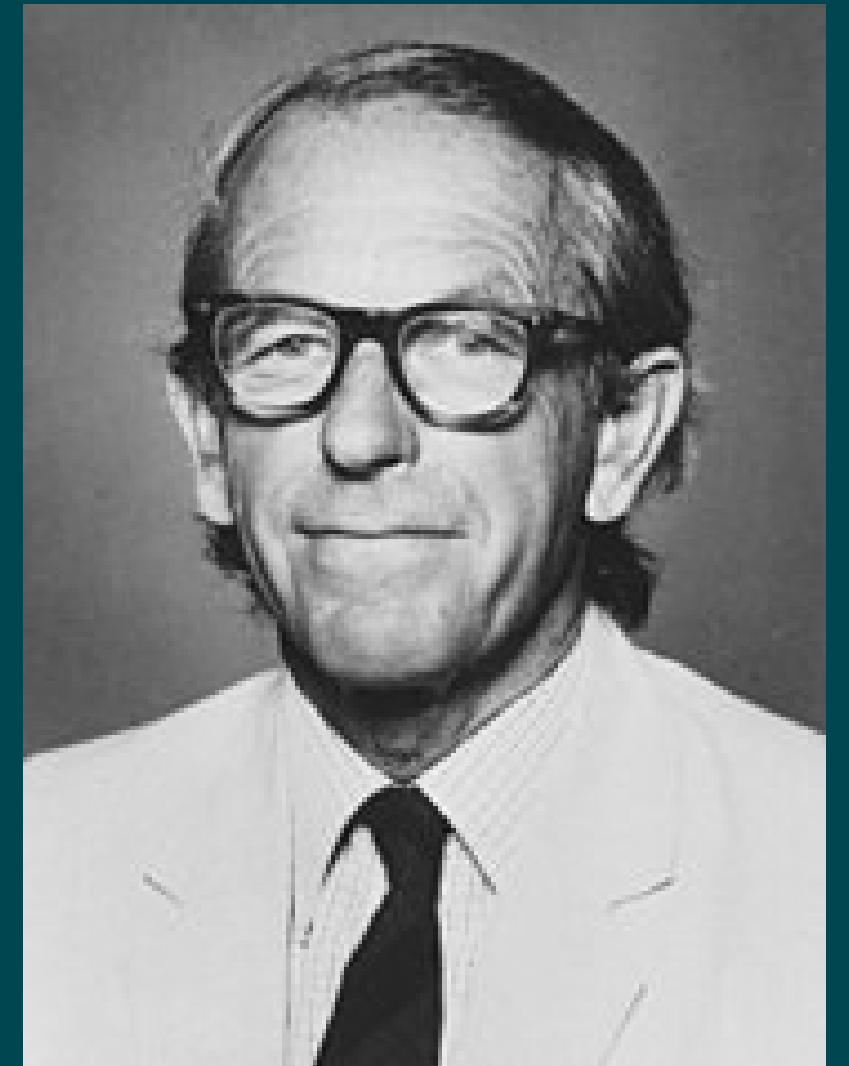
# Sekwencjonowanie DNA

**Sekwencjonowanie to  
ustalenie kolejności  
nukleotydów wybranego  
odcinka DNA**

# Sekwencjonowanie DNA

## Fred Sanger

**Automatyczne sekwencjowanie DNA opiera się na metodzie terminacji łańcucha, która została opracowana w 1974r. przez brytyjskiego biochemika Freda Sangera**



Fred Sanger- angielski biochemik. Dwukrotnie otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii.



# Metoda Sangera

**Reakcja przeprowadzana jest zawsze w czterech wersjach, w każdej z nich przy wykorzystaniu próbki tego samego badanego DNA, ale różnych odczynników. W jednym z wariantów reakcja przeprowadzana jest tak, że wszystkie jej produkty zakończone są nukleotydem adeninowym. W wyniku powstają cząsteczki DNA, które są komplementarnymi kopiami pewnych fragmentów badanego DNA, a ich ostatnim nukleotydem jest nukleotyd adeninowy.**





# Metoda Sangera

Przebieg reakcji można podzielić na pięć etapów:

- 1. preparatywny PCR – otrzymanie homogennego DNA**
- 2. denaturacja – otrzymanie jednoniciowej matrycy**
- 3. synteza nowych nici z użyciem dNTP i ddNTP oraz startera**
- 4. elektroforeza na żelu poliakrylamidowym ze stałym stężeniem środka denaturującego**
- 5. analiza prążków.**

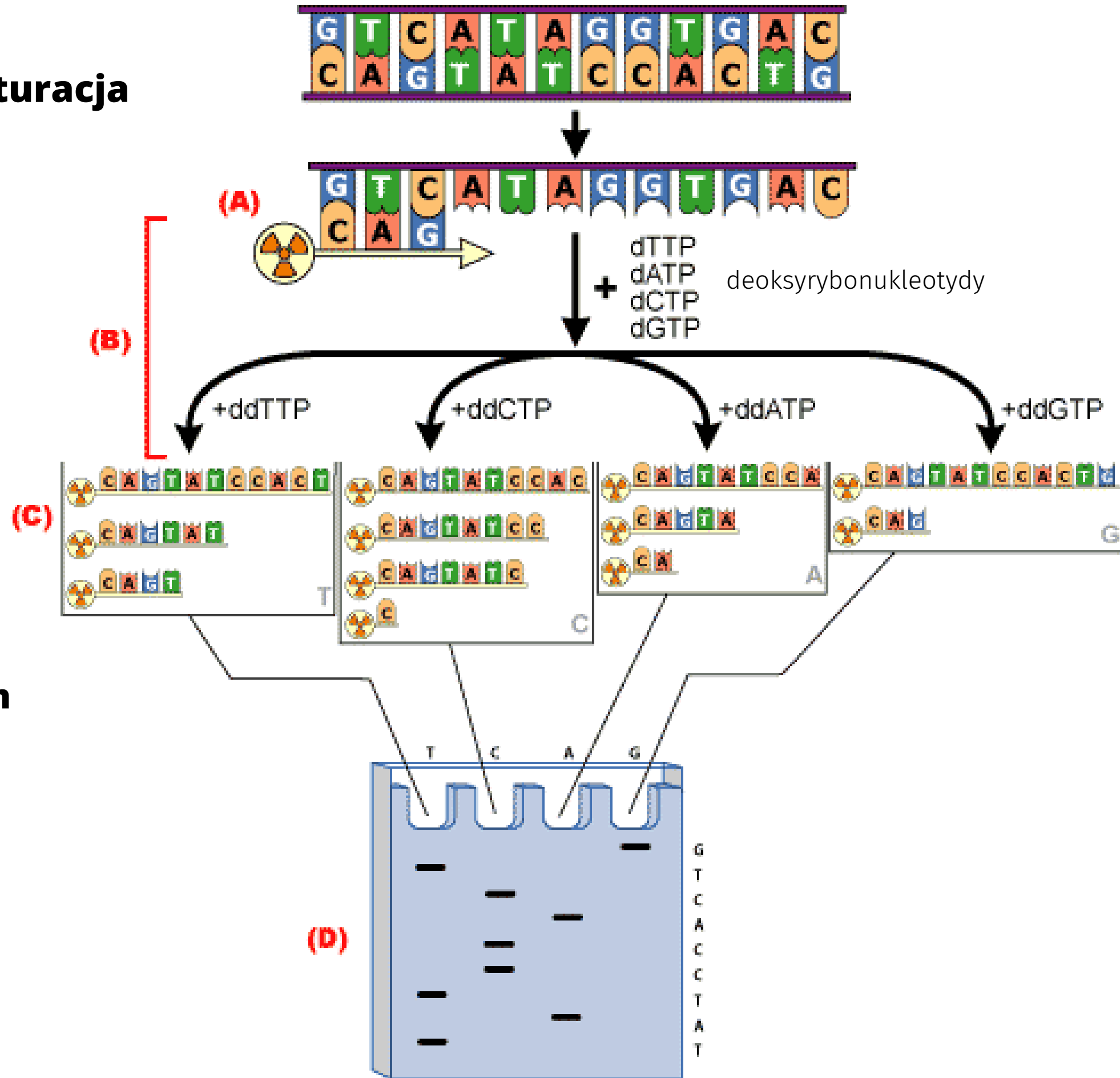
dNTP- trójfosforany deoksynukleotydów

ddNTP-2',3' didoksynuklotydy

**otrzymanie homogennego DNA i denaturacja**

**synteza nowych nici z użyciem dNTP i ddNTP oraz startera**

**elektroforeza na żelu poliakrylamidowym ze stałym stężeniem środka denaturującego i analiza prążków**



# łańcuchowa reakcja polimerazy - PCR

technika polegająca na powielaniu wybranego odcinka DNA za pomocą polimerazy DNA, bez udziału komórek (w probówce)



Technika ta została opracowana w roku 1983 przez Kary'ego Mullisa za co otrzymał Nagrodę Nobla.

# Przebieg PCR

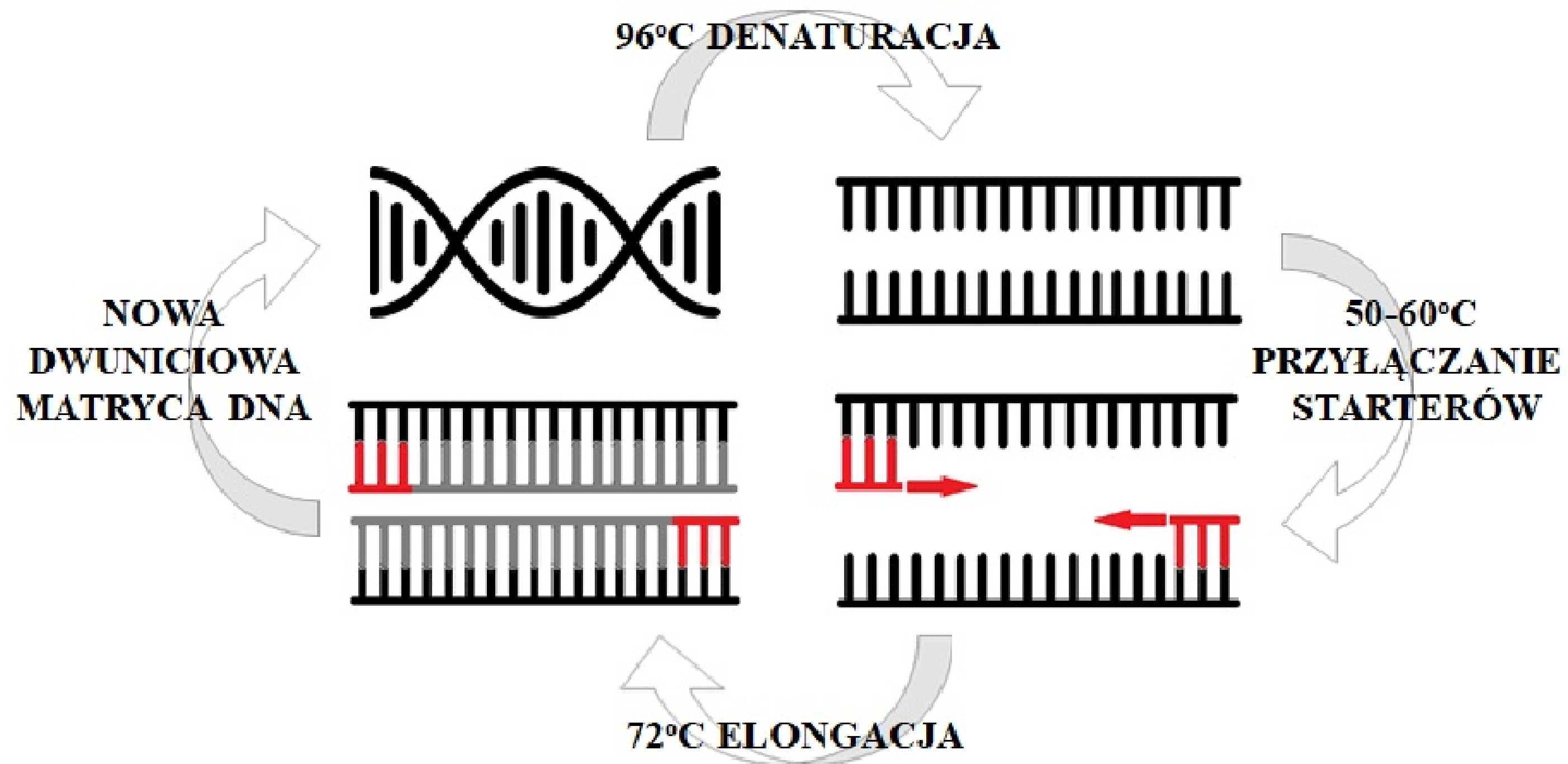
**Łańcuchowa reakcja polimerazy zachodzi w cyklach, z których każdy obejmuje 3 etapy:**

**Denaturację DNA** - polega na swoistym rozdzieleniu się dwuniciowego DNA na pojedyncze nici dzięki podniesieniu temperatury mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 96\*

**Przyłączenie starterów (hybrydyzacja)** - tworzenie odcinków dwuniciowych składających się z przygotowanych starterów i matrycowej cząsteczki DNA. Etap ten przebiega w niższej temperaturze, ściśle określonej dla danej pary starterów (45–60 °C), które przyłączają się do matrycy DNA.

**Synteza komplementarnych nici DNA (elongacja)** - podczas tego etapu temperatura ponownie zostaje podwyższona - do ok. 70' dzięki czemu polimeraza syntezuje nową nić DNA, rozpoczynając od startera.

# Przebieg PCR



# Przykładowe modyfikacje PCR

**PCR emulsyjny** -służy do ilościowej oceny produktu reakcji.

**RT-PCR (reverse transcription)** modyfikacja polegająca na użyciu mRNA jako matrycy.

**Real time PCR (qPCR)** – do środowiska reakcji wprowadzane są znakowane nukleotydy/ sondy, które pozwalają określić ilość matrycy użytej do reakcji oraz śledzić ilość powstającego produktu.



# Wady i zalety PCR



## Zalety

szybki i tani przebieg

umożliwia powielenie małej ilości DNA matrycowego, a do jej przeprowadzenia nie trzeba znać sekwencji całego genomu

## Wady

Długość powielanych fragmentów jest ograniczona

Próbki mogą w łatwy sposób zostać zanieczyszczone obcym DNA



# Zastosowanie PCR



## **Diagnostyka chorób zakaźnych**

PCR pozwala na wykrycie materiału genetycznego patogenu oraz jego cech.



## **Diagnostyka chorób genetycznych**

za pomocą PCR wykrywa się mutacje genowe oraz chromosomowe.



## **Medycyna sądowa**

ustalanie pokrewieństwa osób głównie ojcostwa.



## **Paleontologia**

badanie podobieństwa sekwencji DNA u różnych gatunków żywych oraz wymarłych.

# Czym różni się PCR od klonowania?

Do kierowania replikacją sekwencji DNA można zastosować zarówno PCR, jak i klonowanie. Istnieje kilka podstawowych różnic między tymi dwiema metodami.

- Klonowanie molekularne replikuje DNA w żywej komórce, podczas gdy PCR replikuje DNA w roztworze in vitro, wolnym od żywych komórek
- Klonowanie molekularne obejmuje wycinanie i wklejanie sekwencji, podczas gdy PCR wzmacnia DNA poprzez kopiowanie istniejącej sekwencji.
- DNA sklonowane przez klonowanie molekularne jest zwykle wiernie kopiowane i w pełni funkcjonalne, podczas gdy PCR wprowadza błędy w sekwencji, co skutkuje mutacjami.

# CRISPR

**Metoda CRISPR (CRISPR/Cas9) jest oparta na technice stosowanej przez bakterie w obronie przed wirusami i działa podobnie do ludzkiego systemu odpornościowego. Działanie systemu zaangażowane są dwa elementy; cząsteczka RNA oraz enzym (białko) Cas 9.**

# Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne

**W skład CRISPR wchodzi tzw. zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne, obecne w materiale genetycznym bakterii, pozwalające na przechowywanie fragmentów obcego DNA.**



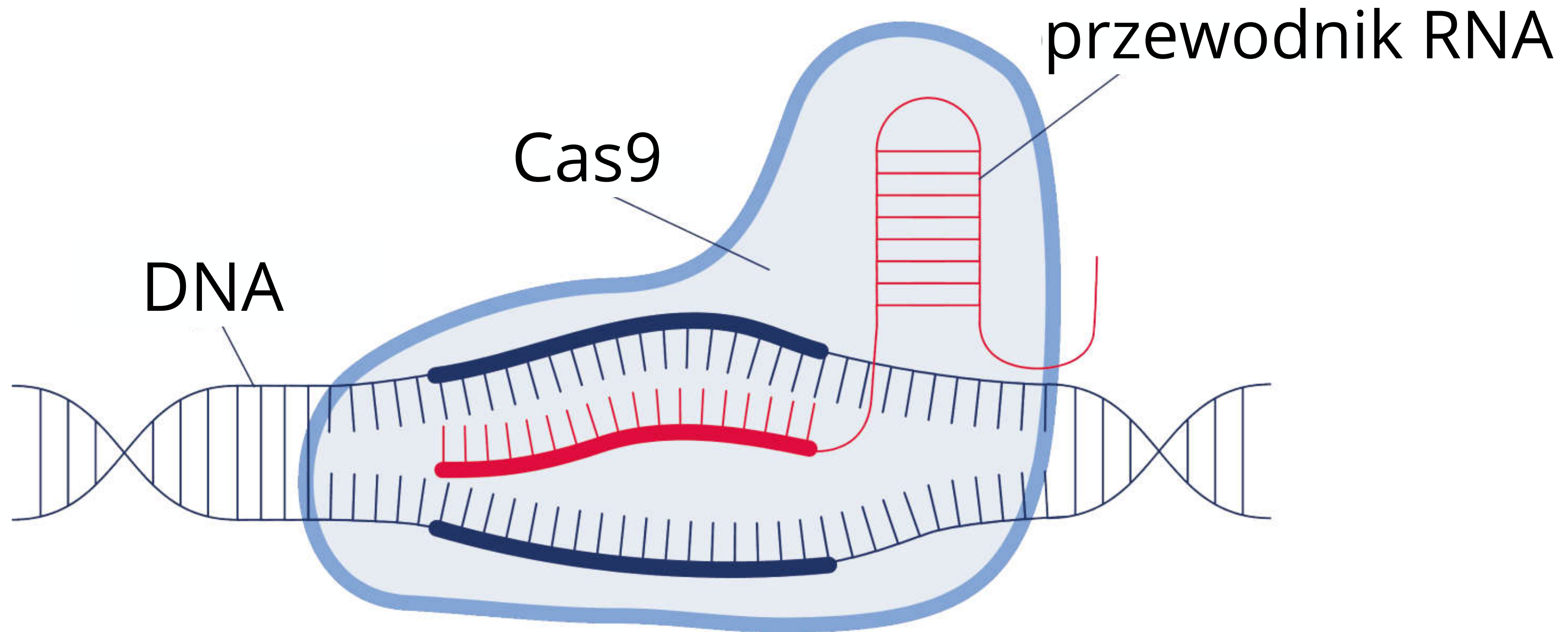
# CRISPR działanie

**W momencie, gdy bakteria zostaje zaatakowana przez wirusa i uda jej się pokonać to zagrożenie, wycina sobie kawałek jego DNA i wbudowuje go w swój materiał genetyczny, tworząc w ten sposób bazę DNA potencjalnych wrogów.**

**Dzięki temu, jeśli po raz kolejny dojdzie do kontaktu z tym samym wirusem, komórka bakterii będzie miała szansę szybciej zareagować – wykryje i rozpozna obcą informację genetyczną i zniszczy ją za pomocą specjalnego enzymu rozszczepiającego nić DNA, nazywanego też białkiem Cas9. Enzym ten jest w stanie precyzyjnie rozpoznawać i przecinać określony fragment kwasu nukleinowego wirusa.**



# Budowa białka Cas9



# CRISPR

**Technika CRISPR pozwala także na wbudowanie innego, zaprojektowanego kawałka DNA we wskazane miejsce. W ten sposób, dzięki metodzie CRISPR możliwe jest leczenie tych chorób, które są wynikiem obecności nieprawidłowej wersji genu, prowadzącej do produkcji wadliwego białka, ale także tych, w których brakuje białka, niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania organizmu.**

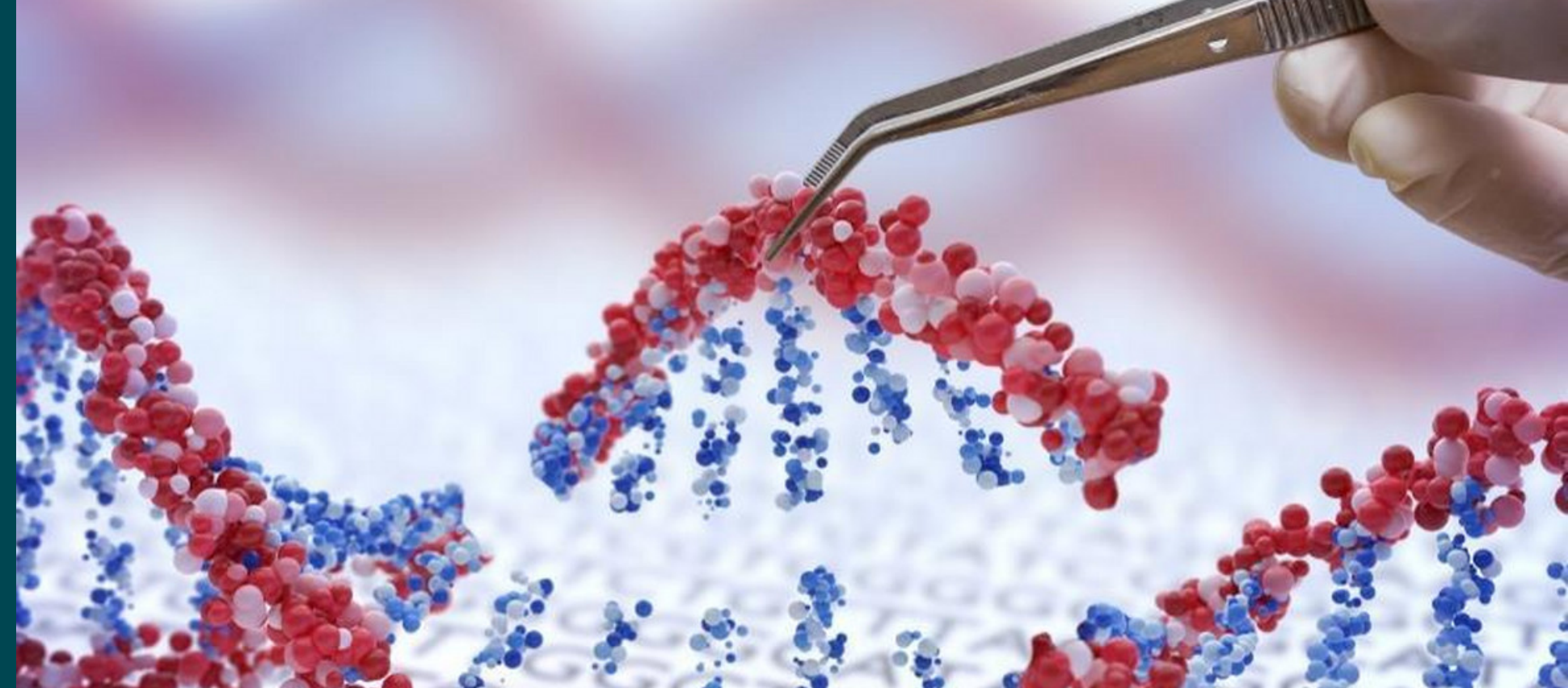
**W 2020 roku dwie badaczki - Emmanuelle Charpentier i Jennifer A. Doudna otrzymały Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za stworzenie precyzyjnych "nożyczek do genów".**





# Pzyszłość nowej techniki

Naukowcy mają nadzieję, że już wkrótce dzięki „nożyczkom genowym” zostaną opracowane nowe terapie przeciwnowotworowe, a być może metody leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie.



Skuteczność nagrodzonej metody jest badana również w przypadku mukowiscydozy, hemofilii i niedokrwistości sierpowatej oraz bardziej złożonych chorób, jak np: choroby psychiczne i zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV). Zgłoszono też tysiące patentów na inne jej zastosowania. Dzięki niej badaczom roślin udało się opracować uprawy odporne na pleśń, szkodniki i suszę.

**Dziękuję za uwagę!**