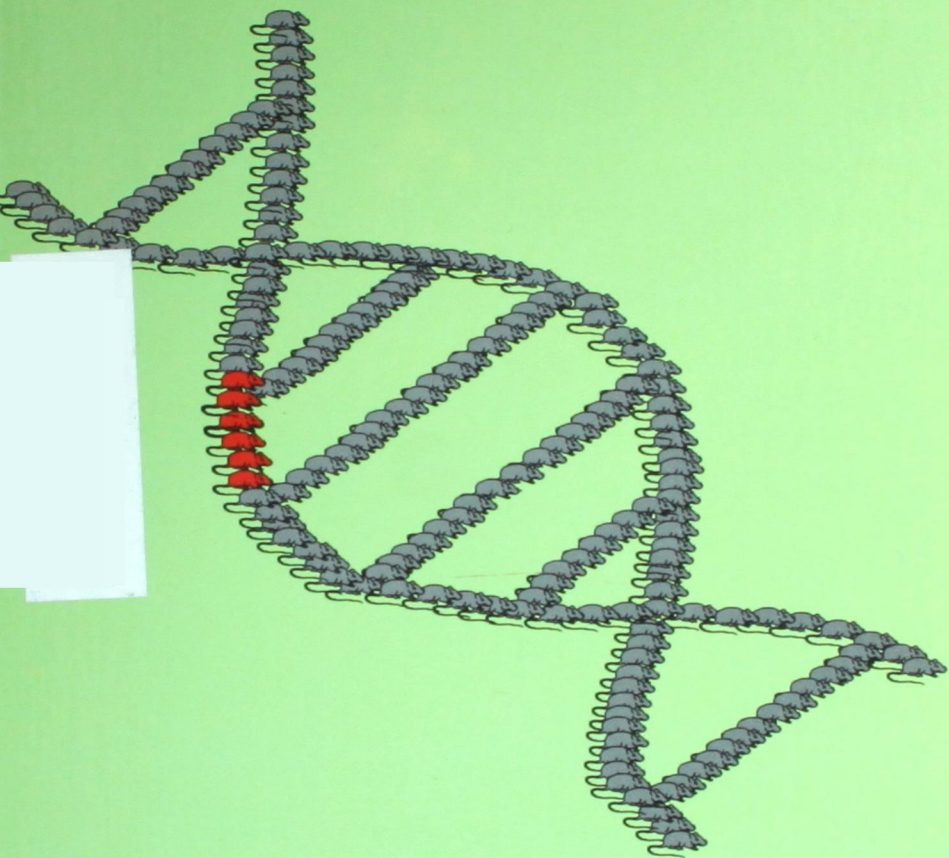


Г. А. Журавлева

# ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

*Учебник для высших учебных заведений*



Г. А. Журавлева

# ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебник для вузов

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



ЭКО • ВЕКТОР  
Санкт-Петербург  
2016

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. — СПб.: Эко-Вектор, 2016. — 328 с.: ил.

ISBN 978-5-906648-12-9

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 978-5-906648-12-9

© ООО «Эко-Вектор», 2016  
© Журавлева Г. А., 2016  
© Инге-Вечтомов С. Г., ред., 2016

# Содержание

---

Предисловие.....	8
<b>Раздел 1. Основные приемы генной инженерии .....</b>	<b>9</b>
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 ....	100
«Редактирование» генома с помощью нуклеаз ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9 .....	102
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
Разработка улучшенных бактериальных штаммов .....	116
Способы введения плазмидной ДНК в клетки .....	117
Глава 8. Создание библиотек генов и их скрининг .....	120
Основные этапы клонирования .....	120
Выбор источника ДНК для клонирования .....	121
Создание библиотек на основе кДНК .....	122

Клонирование геномной ДНК.....	126
Скрининг библиотек генов.....	132
Значение клонирования.....	142
<b>Глава 9. Получение рекомбинантных белков.....</b>	<b>144</b>
Рекомбинантные белки, определение.....	144
Применение очищенных рекомбинантных белков.....	145
История получения первых рекомбинантных белков.....	147
Этапы получения определенного белка.....	148
Основные способы получения белков в биотехнологии.....	150
<b>Раздел 2. Использование одноклеточных организмов и клеток насекомых в качестве продуцентов чужеродных белков .....</b>	<b>155</b>
<b>Глава 10. Экспрессия генов в клетках прокариот.....</b>	<b>155</b>
Оптимизация экспрессии чужеродных генов в клетках бактерий.....	156
Эффективная транскрипция чужеродного гена.....	157
Эффективная трансляция чужеродного гена.....	160
Посттрансляционные события.....	163
Использование химерных белков.....	164
Использование различных видов бактерий в качестве продуцентов чужеродных белков.....	166
<b>Глава 11. Использование дрожжей в геной инженерии и биотехнологии.....</b>	<b>168</b>
Достоинства и недостатки дрожжей в качестве продуцентов чужеродных белков.....	168
Синтез чужеродных белков в <i>Pichia pastoris</i> .....	169
Системы экспрессии <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	172
Дрожжи <i>S. cerevisiae</i> в биотехнологии.....	174
Дрожжевая двугибридная система (two-hybrid system).....	175
<b>Глава 12. Бакуловирусы как одни из наиболее перспективных объектов для синтеза гетерологичных белков.....</b>	<b>182</b>
Жизненный цикл бакуловирусов.....	183
Бакуловирусы как природные инсектициды.....	186
Культуры клеток насекомых.....	188
Бакуловирусы в качестве векторов для переноса чужеродных генов.....	188
Усовершенствование «инсектицидных» свойств бакуловирусов.....	191

Достоинства и недостатки бакуловирусной системы экспрессии .....	193
<b>Раздел 3. Млекопитающие как объект генной инженерии и биотехнологии .....</b>	<b>195</b>
Глава 13. Экспрессия трансгенов в клетках млекопитающих .....	195
Способы введения чужеродной ДНК в клетки млекопитающих .....	196
Временная и стабильная экспрессия трансгенов .....	197
Использование временной экспрессии .....	197
Селективные маркеры .....	199
Получение клеток с направленной интеграцией трансгена .....	203
Способы доставки генов в клетки млекопитающих .....	204
Основные векторные системы клеток животных, основанные на использовании вирусов .....	206
Подходы, позволяющие увеличить экспрессию трансгена .....	217
Ограничения современных методов переноса генов в клетки млекопитающих .....	220
Глава 14. Трансгенные животные и их использование .....	221
Общая схема получения трансгенных животных .....	221
Основные методы получения трансгенных животных .....	223
Трансгенные животные. Мыши .....	228
Использование трансгенных мышей .....	233
Трансгенные коровы, козы, овцы .....	235
Использование трансгенных свиней и ксенотрансплантация .....	237
Получение трансгенных рыб .....	242
Трансгенные птицы .....	245
Достоинства и недостатки трансгенных животных .....	246
Глава 15. Генная терапия .....	247
Понятие, генной или генетической, терапии .....	247
Стратегии генной терапии .....	250
Этапы генной терапии .....	250
Системы переноса трансгенов .....	253
Основные фазы клинических испытаний .....	267

---

Успехи генотерапии .....	268
Генная терапия в будущем .....	269
<b>Глава 16. Клонирование животных .....</b>	<b>270</b>
Основные стадии клонирования .....	272
Клонирование овцы Долли .....	274
Дефекты клонов .....	276
Использование клонирования и его ограничения .....	276
<b>Раздел 4. Методы геномики и транскриптомики .....</b>	<b>284</b>
<b>Глава 17. Геномные и постгеномные методы .....</b>	<b>284</b>
Секвенирование геномов .....	284
Геномные проекты .....	287
Геномика и метагеномика .....	291
Массовый анализ экспрессии генов .....	292
Заключение .....	303
Рекомендуемая литература .....	306
Общая литература .....	306
Дополнительная литература и полезные сайты Интернета .....	306
Именной указатель .....	315
Предметный указатель .....	316
Указатель латинских названий .....	323
Список использованной литературы .....	324