

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 рестрикций.....	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 мембранны	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 антисмыловых (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
Глава 9. Получение рекомбинантных белков.....	144
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
Раздел 2. Использование одноклеточных организмов и клеток насекомых в качестве продуцентов чужеродных белков	155
Глава 10. Экспрессия генов в клетках прокариот	155
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
Глава 11. Использование дрожжей в генной инженерии и биотехнологии.....	168
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
Глава 12. Бакуловирусы как одни из наиболее перспективных объектов для синтеза гетерологичных белков	182
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
Раздел 3. Млекопитающие как объект генной инженерии и биотехнологии.....	195
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
Глава 16. Клонирование животных	270
Основные стадии клонирования	272
Клонирование овцы Долли.....	274
Дефекты клонов	276
Использование клонирования и его ограничения	276
Раздел 4. Методы геномики и транскриптомики	284
Глава 17. Геномные и постгеномные методы	284
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