

KURS

„BIOLOGIA POD KLUCZ"

BIOTECHNOLOGIA I INŻYNIERIA GENETYCZNA

Prezentacja jest chroniona prawnie przed kopiowaniem bez pisemnej zgody autora i stanowi „utwór" i w myśl Ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. z 1994 r., Nr 24, poz. 83 z późn. zm.).

PODSTAWA PROGRAMOWA 2025



1. Rozróżnia biotechnologię tradycyjną i molekularną.
2. Przedstawia współczesne zastosowania metod biotechnologii tradycyjnej w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, rolnictwie, biodegradacji i oczyszczaniu ścieków.
3. Przedstawia narzędzia wykorzystywane w biotechnologii molekularnej (enzymy: polimerazy, ligazy i enzymy restrykcyjne) i określa ich zastosowania.
4. Przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (hybrydyzacja DNA, analiza restrykcyjna i elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA metodą Sangera).
5. Przedstawia zastosowania wybranych technik inżynierii genetycznej w medycynie sądowej, kryminalistyce, diagnostyce chorób.

PODSTAWA PROGRAMOWA 2025



6. Wyjaśnia, czym jest organizm transgeniczny i GMO; przedstawia sposoby otrzymywania organizmów transgenicznych.

7. Przedstawia potencjalne korzyści i zagrożenia wynikające z zastosowania organizmów modyfikowanych genetycznie w rolnictwie, przemyśle, medycynie i badaniach naukowych; podaje przykłady produktów otrzymanych z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie organizmów.

8. Opisuje klonowanie organizmów metodą transferu jąder komórkowych i metodą rozdziału komórek zarodka na wczesnych etapach jego rozwoju oraz przedstawia zastosowania tych metod.

9. Przedstawia sposoby otrzymywania i pozyskiwania komórek macierzystych oraz ich zastosowania w medycynie.

PODSTAWA PROGRAMOWA 2025



10. Przedstawia sytuacje, w których zasadne jest korzystanie z poradnictwa genetycznego.

11. Przedstawia ogólną zasadę działania terapii genowej.

12. Przedstawia szanse i zagrożenia wynikające z zastosowań biotechnologii molekularnej.

13. Dyskutuje o problemach społecznych i etycznych związanych z rozwojem inżynierii genetycznej oraz formułuje własne opinie w tym zakresie.

BIOTECHNOLOGIA



Biotechnologia to dziedzina nauki, która wykorzystuje organizmy, ich składniki oraz przeprowadzanie przez nie procesy w celu wytwarzania i późniejszego zastosowania określonych produktów lub metod.

Biotechnologię dzielimy na:

TRADYCYJNĄ

MOLEKULARNĄ



BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA

BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA



Biotechnologia tradycyjna wykorzystuje naturalnie występujące w środowisku organizmy i produkowane przez nie substancje.

Organizmy o określonych cechach otrzymuje się przez **selekcję sztuczną**.

Biotechnologia tradycyjna ma obecnie zastosowanie w: przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, rolnictwie, biodegradacji i oczyszczaniu ścieków

BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA W PRZEMYŚLE SPOŻYWCZYM





W wyniku **fermentacji mlekowej** przeprowadzanej przez bakterie kwasu mlekowego uzyskujemy kiszonki, jogurty i kefiry.

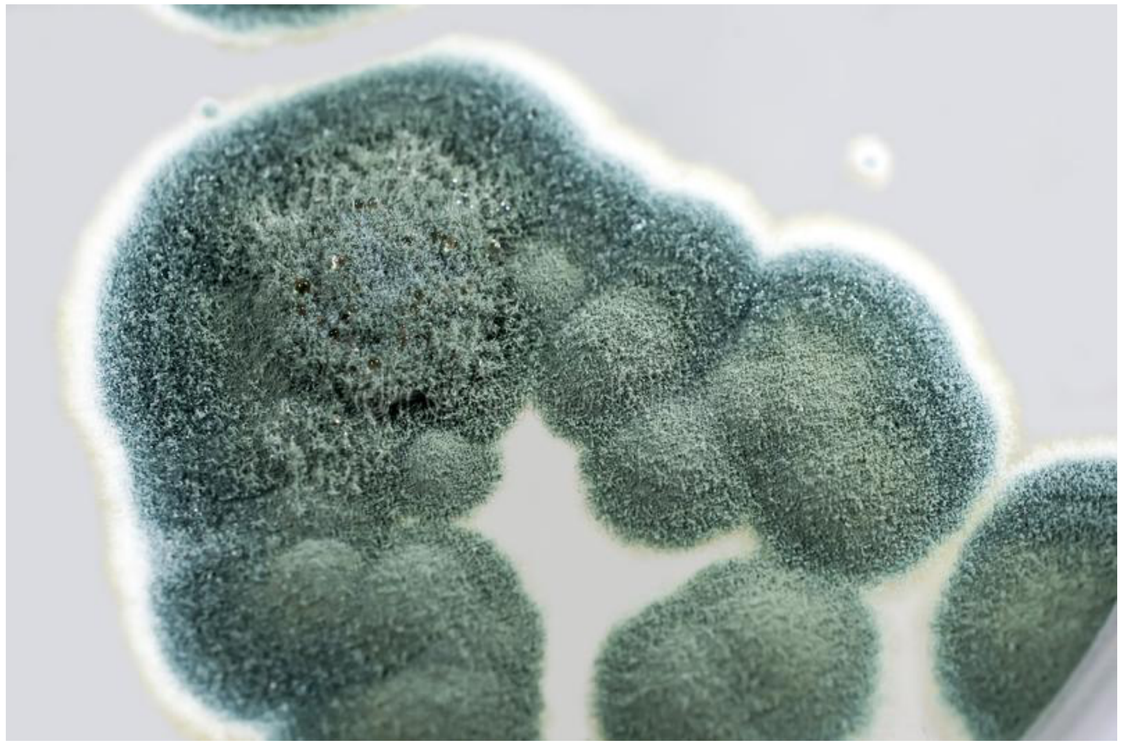
BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA W PRZEMYŚLE SPOŻYWCZYM





Fermentacja alkoholowa przeprowadzana przez drożdże (grzyby jednokomórkowe) jest wykorzystywana do produkcji **piwa, wina, pieczywa i ciast**.

BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA W PRZEMYŚLE FARMACEUTYCZNYM

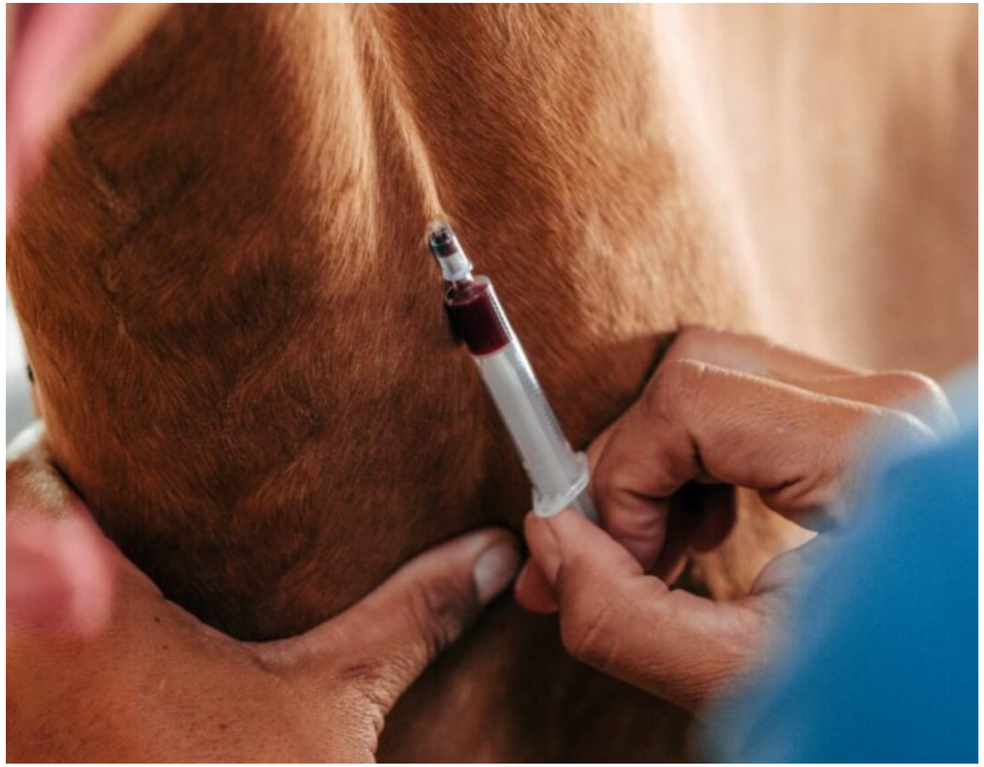




Antybiotyk **penicylina** jest naturalnie produkowany przez grzyba *Penicillum*. Związek ten jest izolowany, oczyszczany i po odpowiednim przygotowaniu stanowi składnik leków.

BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA W PRZEMYŚLE FARMACEUTYCZNYM





Surowice odpornościowe podawane np. po ukąszeniu żmiji są produkowane z wykorzystanem technik biotechnologii tradycyjnej. Pobrany od żmiji jad wstrzykuje się w niewielkich ilościach koniom, których układ odpornościowy produkuje przeciwciała przeciwko antygenom w jadzie żmiji. Przeciwciała te są następnie izolowane z krwi konia, oczyszczane i stanowią składnik surowicy.

BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA W ROLNICTWIE





Aby wzbogacić glebę w azot, stosuje się tzw. **szczepionki wzbogacające**, czyli rozsiewa się po glebie pożywkę z gatunkami bakterii **Rhizobium**. Bakterie te **asymilują azot atmosferyczny i przekształcają go w związki azotowe lepiej przyswajalne dla roślin**.

BIOTECHNOLOGIA TRADYCYJNA W OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW





Procesy biotechnologiczne wykorzystywane w oczyszczaniu ścieków bazują na **osadzie czynnym**, czyli **zawiesinie mikroorganizmów** (bakterii, pierwotniaków), których zadaniem jest **rozkład** (utlenianie) **związków organicznych** do takich produktów jak CO_2, H_2O, azotany, siarczany, fosforany.



BIOTECHNOLOGIA MOLEKULARNA

BIOTECHNOLOGIA NOWOCZESNA



Biotechnologia nowoczesna (molekularna) uzyskuje i wykorzystuje zmodyfikowane organizmy, komórki oraz enzymy, opierając się na najnowszych osiągnięciach biologii molekularnej.

Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej to: enzymy restrykcyjne (restryktazy), ligazy, polimerazy.

ENZYMY W BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ



Enzymy restrykcyjne naturalnie występują w **komórkach bakteryjnych**, gdzie **chronią przed infekcjami ze strony wirusów** (bakteriofagów).

Gdy wirusowy DNA dostanie się do komórki bakteryjnej, enzymy restrykcyjne rozpoznają w nim charakterystyczną sekwencję i tną go, doprowadzając do zniszczenia.

ENZYMY W BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ



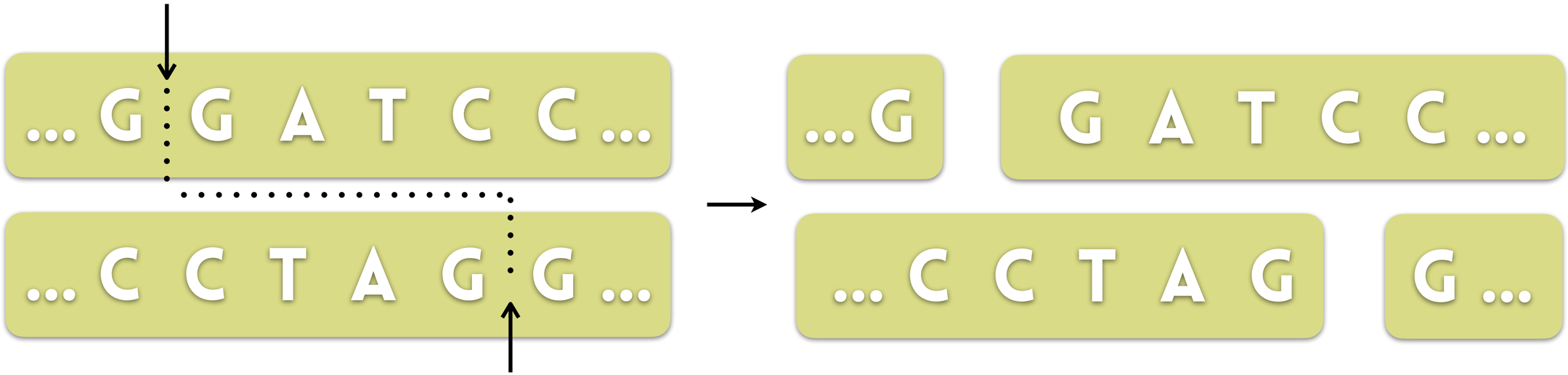
Enzymy restrykcyjne (restryktazy) służą do **precyzyjnego rozcinania DNA**. Enzymy te rozpoznają **krótkie, ściśle określone sekwencje w DNA** i w tym miejscu przecinają obie jego nici. Te określone sekwencje DNA mają zwykle długość od 4 do 8 par zasad i nazywane są **palindromowe,** czyli identyczne kiedy odczytujemy na obu komplementarnych niciach w tym samym kierunku. Miejsce cięcia może przebiegać :

- ukośnie - z wytworzeniem **lepkich końców**, posiadających niesparowane zasady.
- prosto - z wytworzeniem **tępych końców**, nieposiadających niespasowanych zasad.

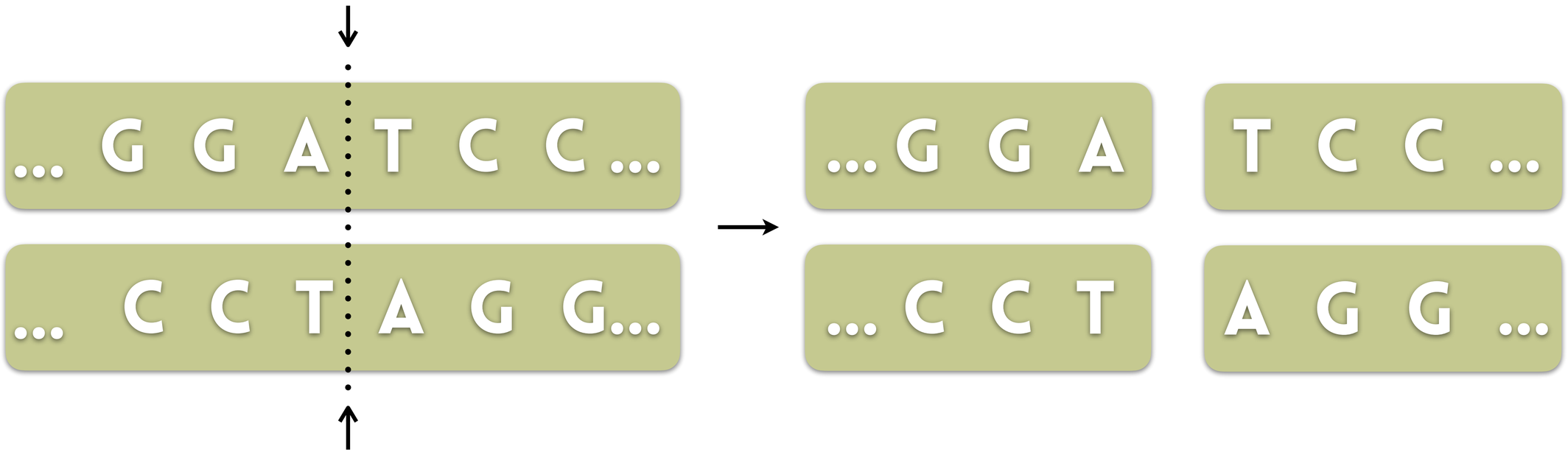
ENZYMY W BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ



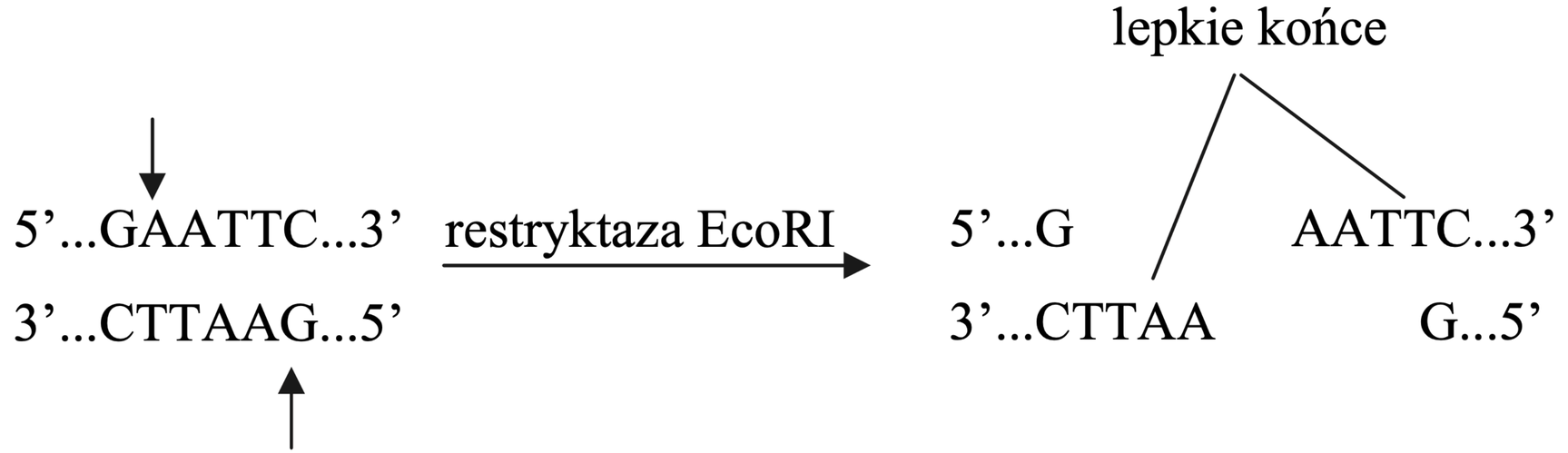
LEPKIE KOŃCE

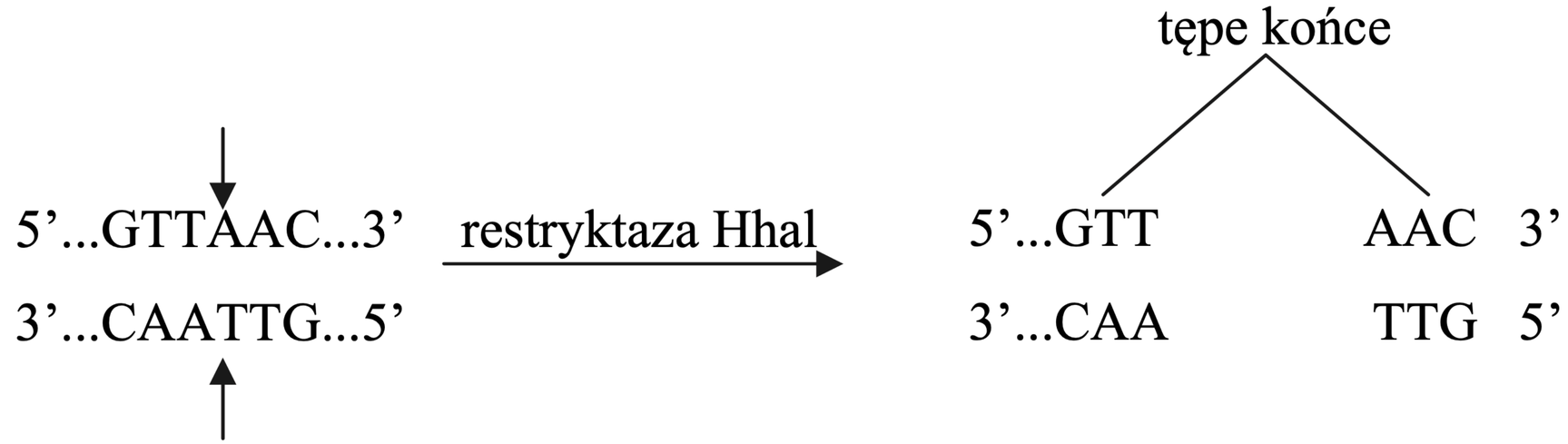


TĘPE KOŃCE



ENZYMY W BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ





ENZYMY W BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ



Ligazy służą do **łączenia** rozciętych wcześniej przez enzymy restrykcyjne fragmentów DNA. Łączenie DNA następuje poprzez wytworzenie **wiązania fosfodiestrowego** pomiędzy końcem hydroksylowym 3’ a końcem fosforowym 5’ w reakcji zależnej od **ATP**. Reakcja katalizowana przez ligazę to **ligacja**.

Przykład działania ligazy (łączenie fragmentów DNA z lepkimi końcami):

```
5'-AGTCTGATCTGACT-3'          5'-GATGCGTATGCTAGTGCT-3'
3'-TCAGACTAGACTGACTACG-5'           3'-CATACGATCACGA-5'
```

Powstaje:

```
5'-AGTCTGATCTGACTGATGCGTATGCTAGTGCT-3'
3'-TCAGACTAGACTGACTACGCATACGATCACGA-5'
```

ENZYMY W BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ



W tej reakcji tworzą się dwa rodzaje wiązań - **wodorowe** pomiędzy nukleotydami komplementarnymi w obrębie **lepkich końców** (a właściwie ich zasadami azotowymi) i **fosfodiestrowe** pomiędzy pierwszym i ostatnim nukleotydem łączących się łańcuchów (a właściwie ich cząsteczkami deoksyrybozy). Wiązania **wodorowe** tworzą się **spontanicznie**, natomiast tworzenie wiązań **fosfodiestrowych** katalizuje właśnie **ligaza DNA**.

Możliwa (choć mniej wydajna) jest też ligacja fragmentów zakończonych **tępymi końcami**. W tej reakcji powstają tylko nowe wiązania fosfodiestrowe. Ligacja lepkich końców DNA jest znacznie **wydajniejsza** ponieważ tworzące się wiązania wodorowe przytrzymują razem oba końce, co ułatwia reakcję.

ENZYMY W BIOTECHNOLOGII MOLEKULARNEJ



Polimerazy, np. polimeraza DNA, służą do **powielania** fragmentów DNA w reakcji PCR. Wszystkie polimerazy DNA działają na tej samej zasadzie — wytwarzają nową nić DNA, **komplementarną** do matrycy, rozpoczynając od **startera**.



TECHNIKI INŻYNIERII GENETYCZNEJ I ICH ZASTOSOWANIE

INŻYNIERIA GENETYCZNA



Inżynieria genetyczna to dziedzina zajmująca się manipulowaniem materiałem genetycznym.

Na ogół manipulacja genetyczna ogranicza się do pojedynczego genu, który należy zlokalizować, wyizolować, powielić i wprowadzić do organizmu biorcy.

ELEKTROFOREZA DNA



Elektroforeza DNA to technika rozdziału cząsteczek DNA. Cząsteczki są rozdzielane na agarowym żelu, który działa jak **sito molekularne**, rozdzielając cząsteczki na podstawie ich **wielkości** i **ładunku**.

Żel umieszcza się w buforze, przez który przepływa **prąd**. Powstaje tam **pole elektryczne**, które powoduje przemieszczanie się cząsteczek DNA. Mają one ładunek **ujemny**, dlatego przemieszczają się w kierunku **elektrody dodatniej**.

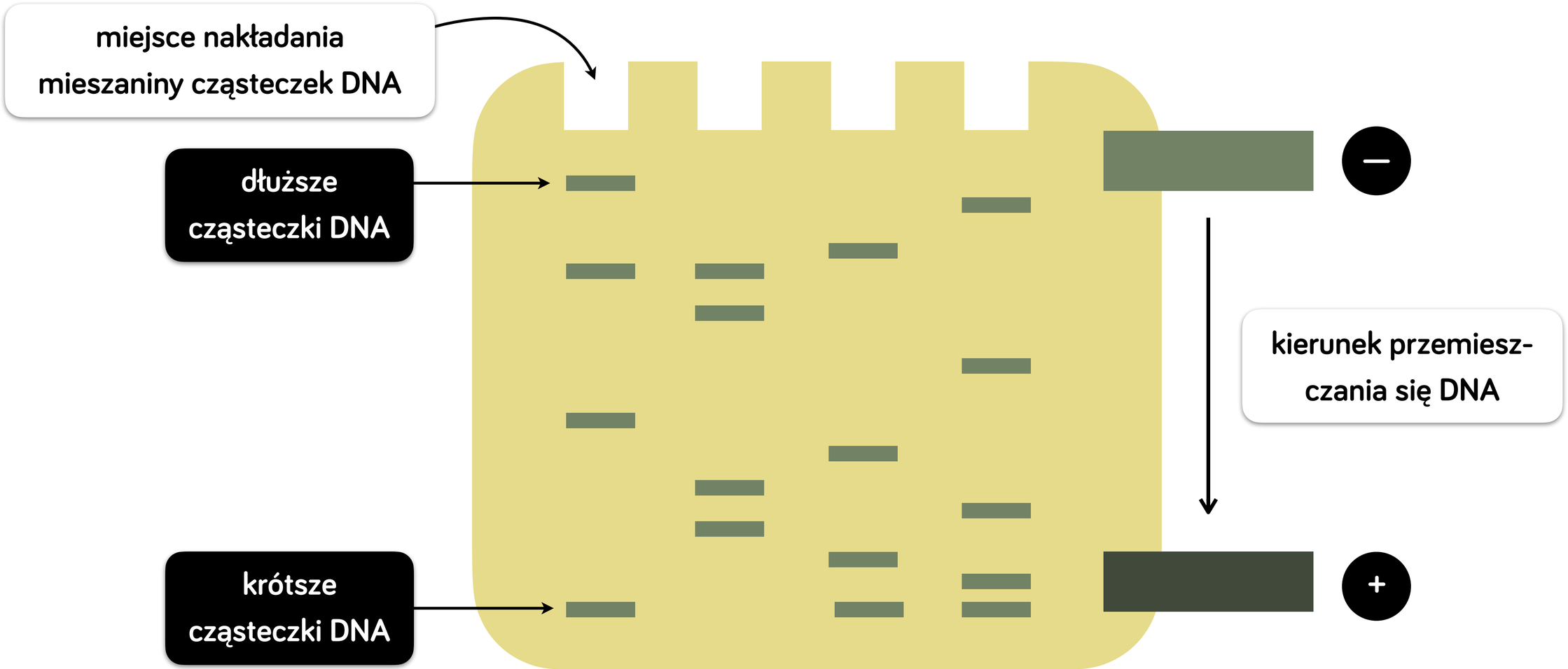
ELEKTROFOREZA DNA



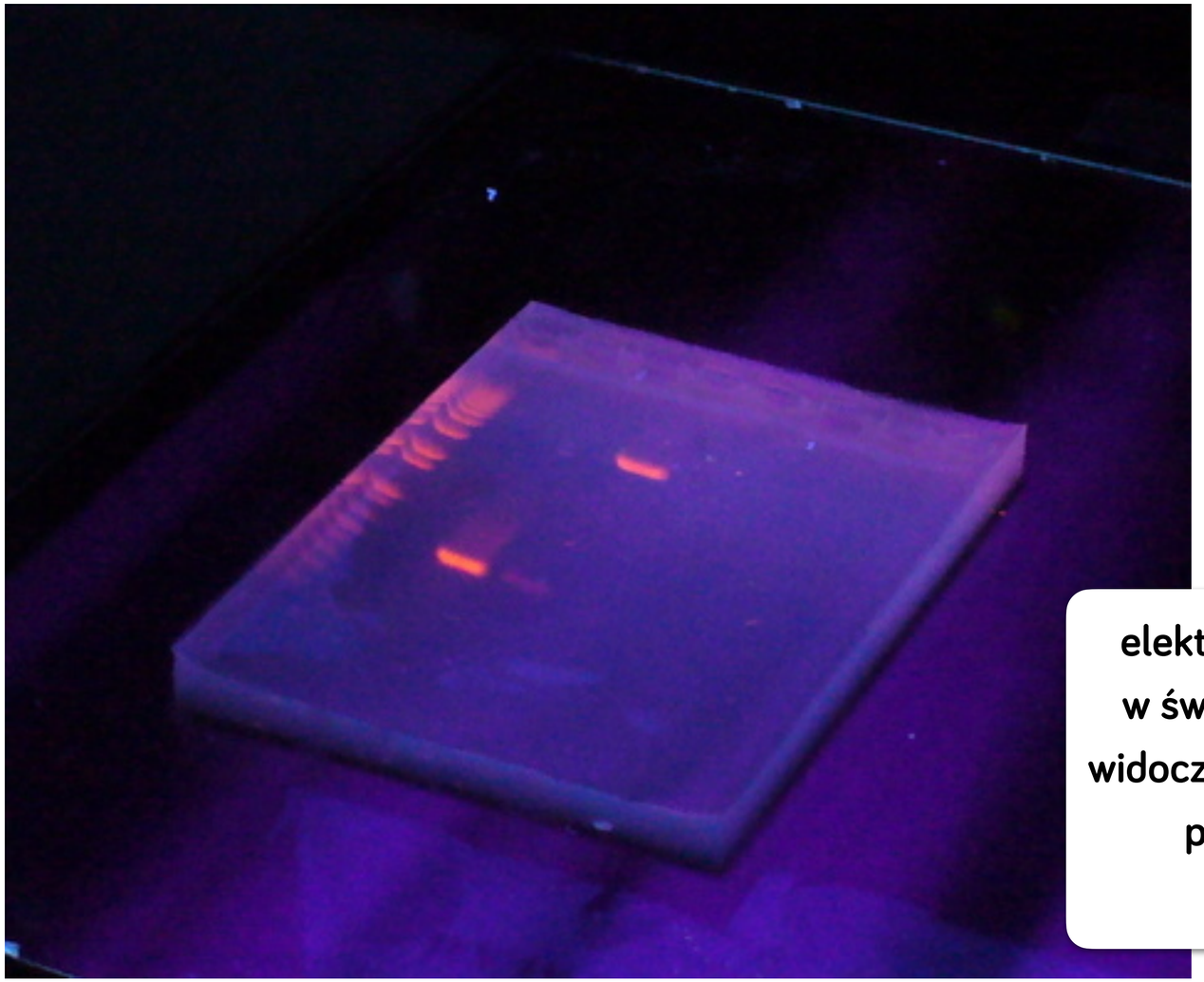
Małe cząsteczki DNA przemieszczają się w żelu **szybciej** i pokonują **dłuższą drogę**, natomiast **duże cząsteczki DNA** poruszają się **wolniej** i pokonują **krótsza drogę**. Dzięki temu mieszanina cząsteczek DNA o różnych długościach zostaje rozdzielona i uwidoczniona w postaci **prążków**.

W żelu znajduje się **barwnik**, który łączy się z DNA. Taki kompleks wykazuje **fluorescencję** w świetle UV, co umożliwia uwidocznienie prążków.

ELEKTROFOREZA DNA - PRZEBIEG



ELEKTROFOREZA DNA



elektroforeza w świetle UV, widoczne różowe prążki

ANALIZA RESTRYKCYJNA

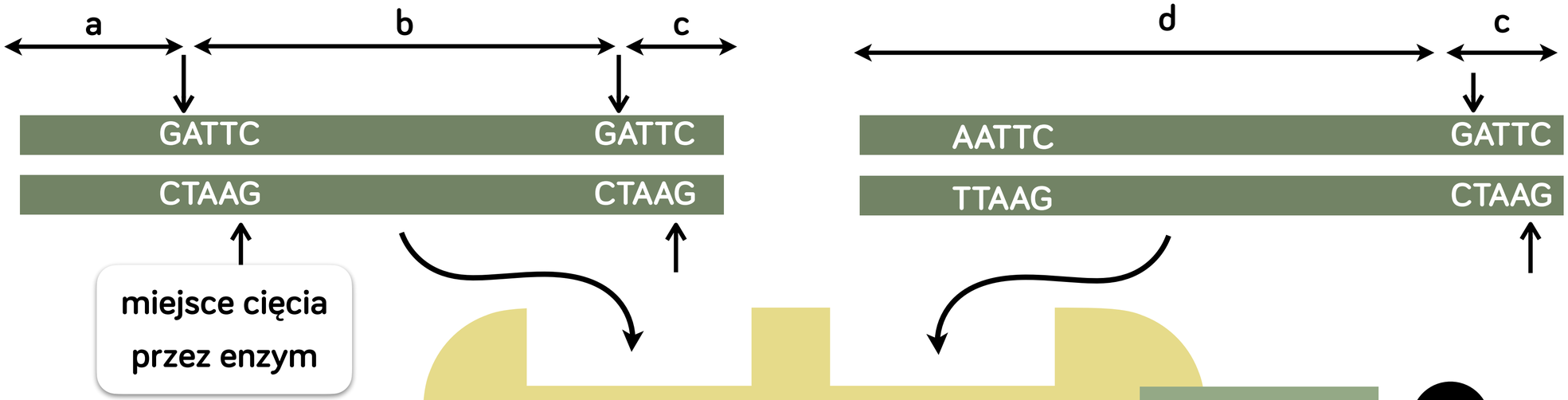


Analiza restrykcyjna to technika polegająca na **rozcinaniu DNA wybranymi enzymami restrykcyjnymi**, a następnie porównywaniu ilości i długości powstałych fragmentów DNA za pomocą **elektroforezy**.

Stosuje się ją w wielu metodach biotechnologii molekularnej, ponieważ pozwala ona na **odróżnienie od siebie cząsteczek DNA**.

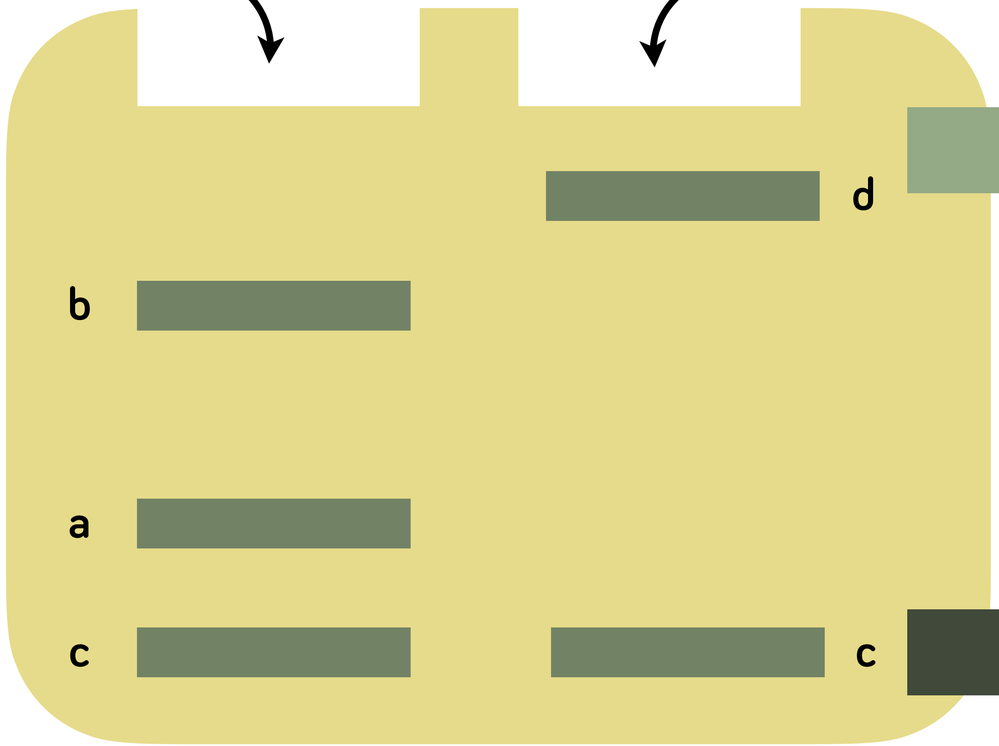
ANALIZA RESTRYKCYJNA

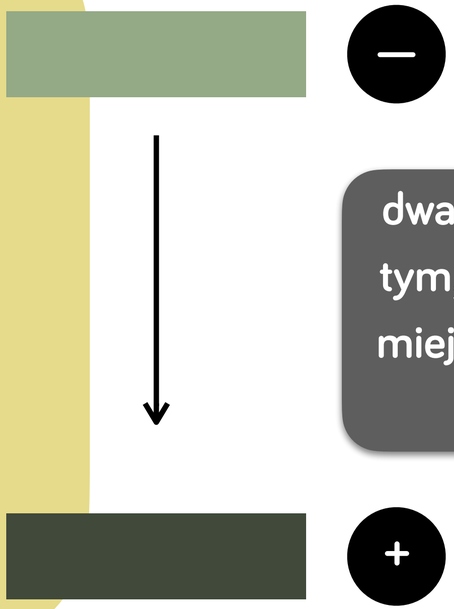




fragmenty cząsteczek DNA przecięte restryktazami

miejsce cięcia przez enzym



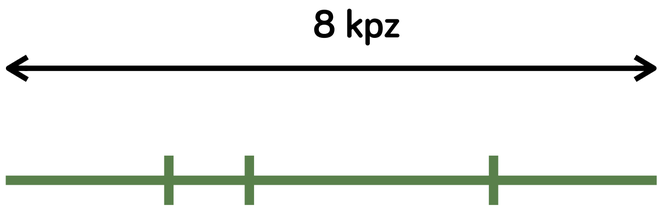


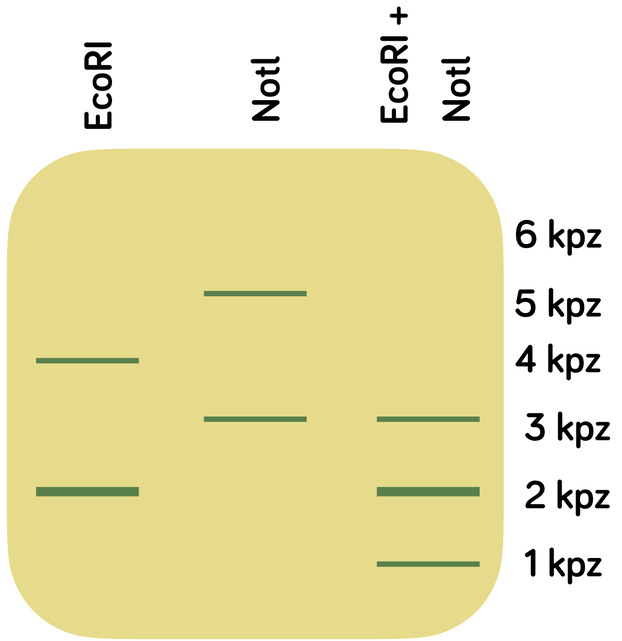
trzy prążki świadczą o tym, że DNA ma dwa miejsca rozpoznawane przez enzym

dwa prążki świadczą o tym, że DNA ma jedno miejsca rozpoznawane przez enzym

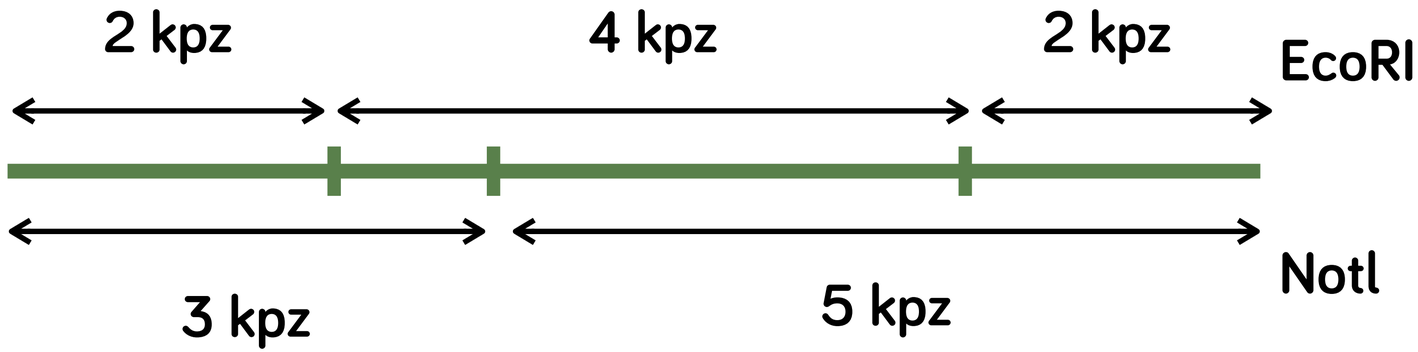
ANALIZA RESTRYKCYJNA

Schemat po lewej przedstawia liniowy fragment chromosomu o długości 8 kpz z zaznaczonymi miejscami restrykcyjnymi. Schemat po prawej przedstawia wynik elektroforezy odcinków DNA powstałych w efekcie trawienia tego fragmentu enzymami restrykcyjnymi EcoRI i NotI.





ANALIZA RESTRYKCYJNA





HYBRYDYZACJA DNA



Hybrydyzacja DNA polega na łączeniu się jednoniciowych fragmentów DNA z komplementarnymi, krótkimi odcinkami DNA, nazywanymi **sondami molekularnymi**.

Sondy molekularne są często **znakowane fluorescencyjnymi związkami**, dzięki czemu po odnalezieniu przez sondę poszukiwanego fragmentu DNA obserwuje się pod mikroskopem świecące punkty.

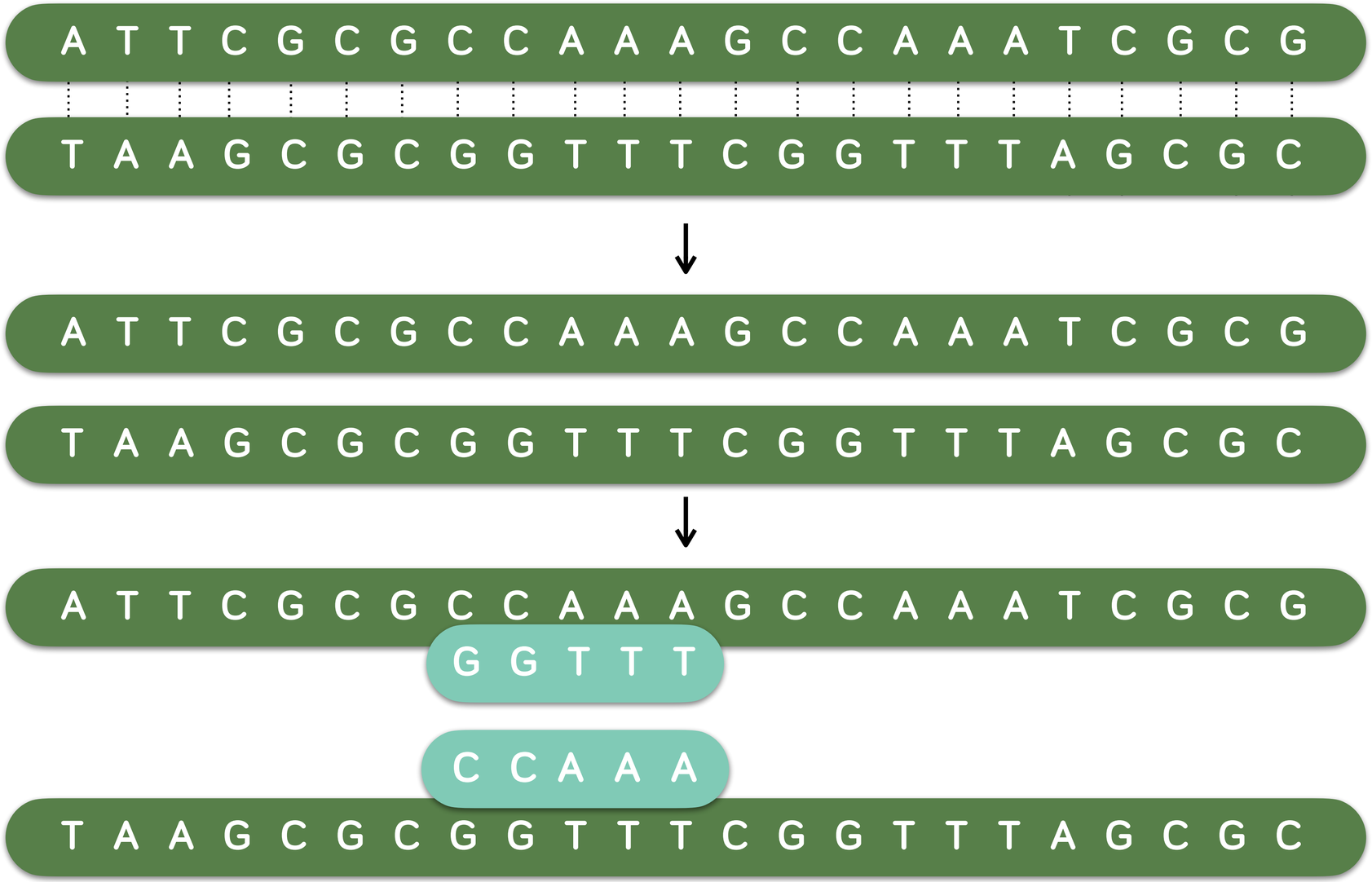
HYBRYDYZACJA DNA



Dzięki hybrydyzacji DNA można szybko i precyzyjne ustalić lokalizację wybranych sekwencji DNA w chromosomie.

Aby wykonać hybrydyzację DNA należy **zdenaturować dwuniciową cząsteczkę DNA** (rozdzielić na dwie nici poprzez zerwanie wiązań wodorowych) i wprowadzić znakowaną sondę. Sonda z wykorzystaniem **zasady komplementarności** połączy się z szukanym genem.

HYBRYDYZACJA DNA



G G T T T

C C A A A

METODA PCR



Metoda PCR, czyli łańcuchowa reakcja polimerazy pozwala na **wielokrotne powielanie wybranego fragmentu DNA** w krótkim czasie z udziałem enzymu - **polimerazy DNA.**

Substratami w PCR są:

- **matryca DNA**, czyli powielany dwuniciowy DNA - może to być pojedyczne cząsteczka (śladowa ilość) lub cały genom,
- **startery DNA** - muszą być komplementarne do końców powielanego fragmentu DNA
- **polimeraza DNA** - ze względu na duże wahania temperatury podczas reakcji PCR musi ona być **termostabilna**, czyli nie może ulec rozkładowy w wyniku tych wahań; jest pozyskiwana z bakterii żyjących w gorących źródłach,
- **wolne deoksyrybonukleotydy**.

METODA PCR – PRZEBIEG



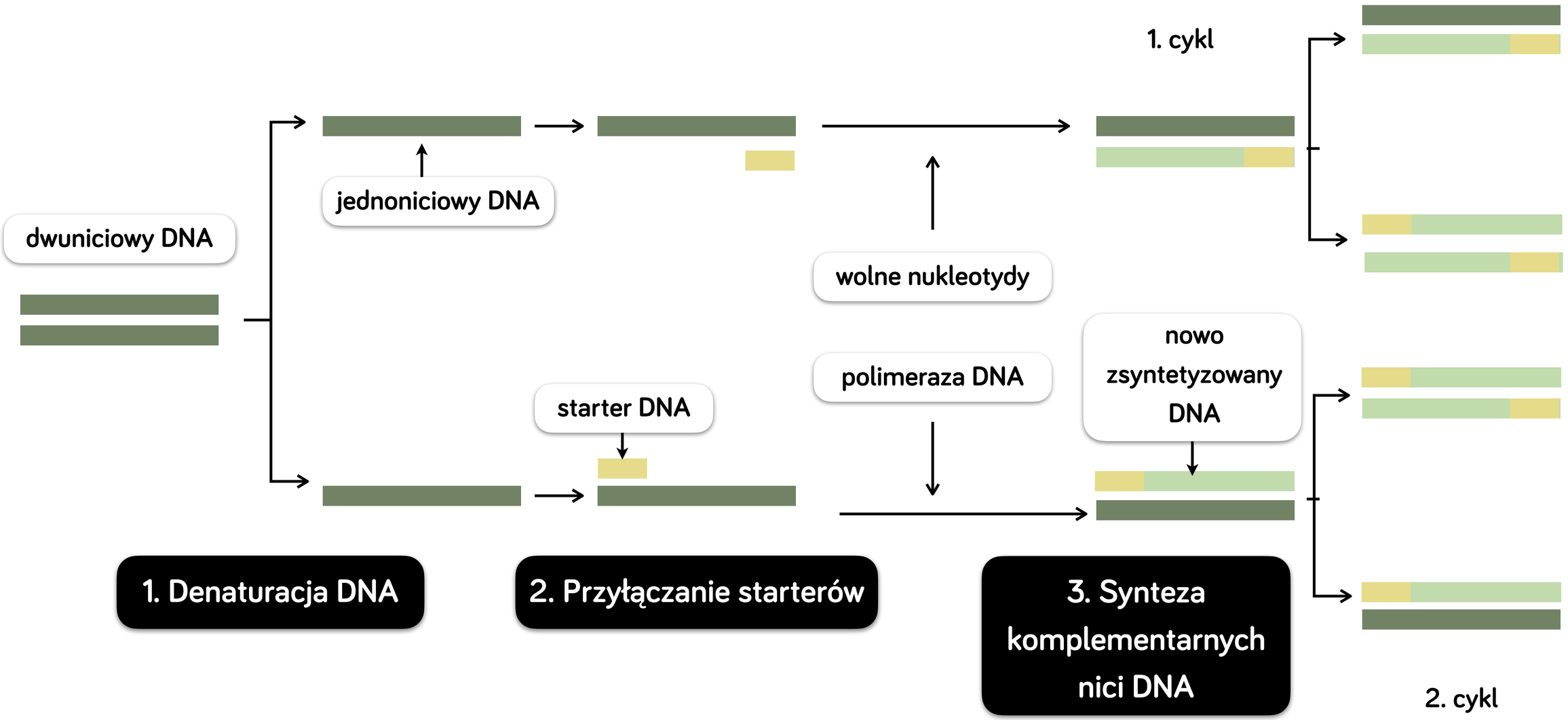
Powielanie DNA zachodzi w cyklach (30-35 cykli). **Cykl** przebiega w **trzech** następujących etapach (**wszystkie w jednej probówce!**):

1. **Denaturacja DNA** - w wysokiej temperaturze (ok. 95°C) dochodzi do rozerwania wiązań wodorowych i cząsteczka DNA jest rozdzielana na dwie pojedyncze nici.

2. **Przyłączanie starterów** - zachodzi samoistnie na skutek schłodzenia mieszaniny reakcyjnej do 40 - 60°C. Startery łączą się na zasadzie komplementarności z fragmentami matrycy DNA.

3. **Synteza komplementarnych nici DNA** - przebiega w temperaturze ok. 70°C, która jest optymalna dla działania polimerazy DNA. Polimeraza tworzy nową nić zaczynając od startera.

METODA PCR - PRZEBIEG



METODA PCR



Warunkiem przeprowadzenia PCR jest znajomość sekwencji nukleotydów początkowej i końcowej. **Nie musimy więc znać sekwencji odcinka powielanego**.

Podczas kolejnych cykli PCR liczba powstających cząsteczek DNA wzrasta **wykładniczo** - $\mathbf{2^n}$, gdzie **n** to liczba cykli, zatem np. po pięciu cyklach otrzymuje się 32 cząsteczki DNA ($2^5 = 32$)

ZASTOSOWANIE METODY PCR



w sądownictwie - jako pewny dowód w ustalaniu ojcostwa, pokrewieństwa

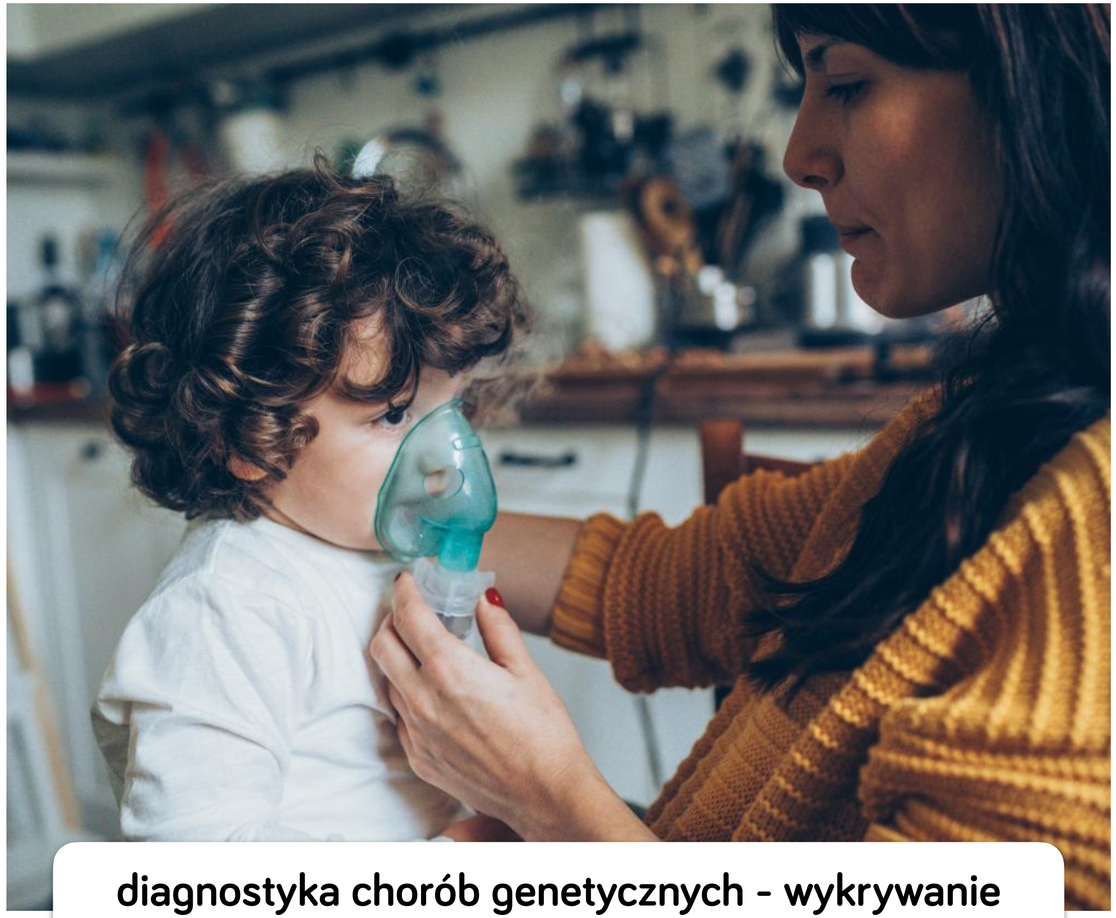


w kryminalistce - do namnożenia DNA znalezionego na miejscu zbrodni i ustalenia sprawcy

ZASTOSOWANIE METODY PCR



diagnostyka chorób zakaźnych - wykrywanie infekcji SARS-CoV-2 czy HIV



diagnostyka chorób genetycznych - wykrywanie mutacji genów w mukowiscydozie, fenyloketonurii



ORGANIZMY GMO I TRANSGENICZNE

ORGANIZMY GMO



Organizmy GMO, czyli **organizmy modyfikowane genetycznie**, to organizmy o zmienionym genomie metodami inżynierii genetycznej. Istnieje kilka podstawowych metod otrzymywania takich organizmów i są to:

- **zmiana aktywności wybranych genów** - najczęściej w wyniku hamowania (wyciszania) ekspresji genu, w wyniku czego dana cecha jest mniej zaznaczona lub w ogóle się nie ujawnia,
- **wstawienie dodatkowej kopii genu, który w genomie już występuje** - w wyniku tego zabiegu dochodzi do nasilenia danej cechy,
- **wprowadzenie do genomu genu pochodzącego z organizmu innego gatunku** - skutkuje to pojawieniem się nowej cechy.

ORGANIZMY TRANSGENICZNE



Organizmami transgenicznymi nazywamy takie organizmy, które w swoim genomie jądrowym posiadają **fragment obcego DNA, pochodzący od innego gatunku**.

Wprowadzenie obcego geny, nazywanego **transgenem**, odbywa się przy użyciu metod inżynierii genetycznej.

UWAGA!



Każdy organizm transgeniczny jest organizmem zmodyfikowanym genetycznie (GMO), ale nie każdy organizm GMO jest organizm transgenicznym!

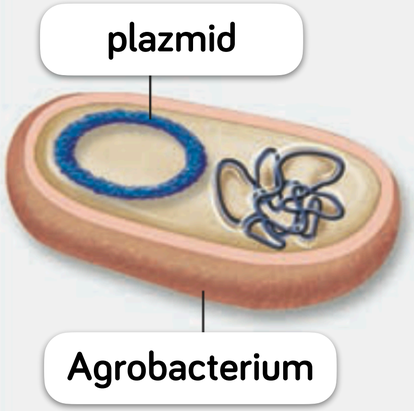
OTRZYMYWANIE ROŚLIN TRANSGENICZNYCH



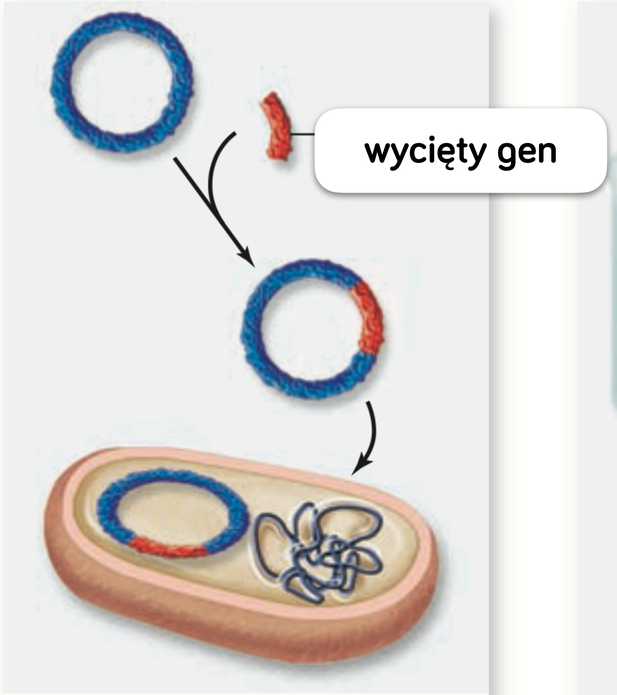
W tworzeniu roślin transgenicznych stosuje się **bakterie** *Agrobacterium*, które w naturalny sposób **infekują rośliny** i wprowadzają do nich swój **plazmid**.

W ten plazmid, metodami inżynierii genetycznej, można wstawić **transgen**, który następnie zostanie umieszczony w komórce roślinnej.

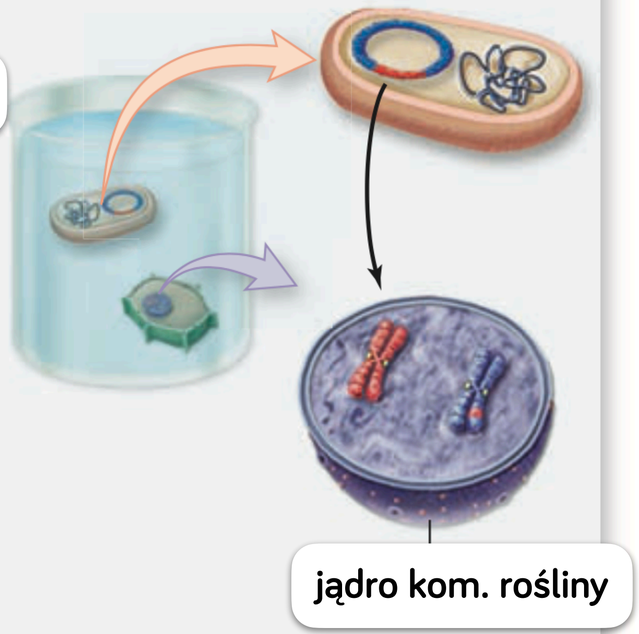
OTRZYMYWANIE ROŚLIN TRANSGENICZNYCH



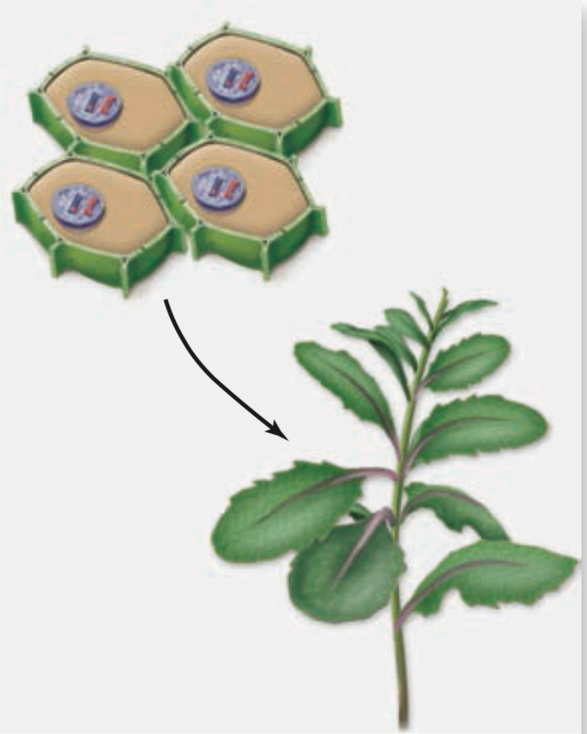
Plazmid jest usuwany z bakterii i rozcinany przez restryktazy.



Wybrany gen jest izolowany z DNA innego organizmu i łączony z plazmidem przez ligazy. Plazmid z transgenem trafia z powrotem do komórki bakteryjnej.



Komórki roślinne są inkubowane ze zmodyfikowanymi genetycznie bakteriami. Dochodzi do infekcji komórek roślinnych i wprowadzenia do nich obcego genu.



Komórki rośliny się rozmnaża, w wyniku czego utworzą one roślinę transgeniczną.

ZASTOSOWANIE GMO



KORZYŚCI

- **w medycynie** - do syntezy różnych enzymów i przeciwciał stosowanych w diagnostyce, produkcji antybiotyków czy hormonów,
- **w przemyśle spożywczym i rolnictwie** - do zwiększenia plonowania roślin, wzrostu odporności na infekcje i ataki innych organizmów, poprawiania walorów smakowych, wydłużenia czasu przydatności owoców i warzyw do spożycia,
- **w ochronie środowiska** - do produkcji biodegradowalnych tworzyw, monitoringu stanu czystości środowiska, produkcji biopaliw z biomasy.

ZAGROŻENIA

- wpływ pożywienia GMO na zdrowie i życie człowieka,
- ryzyko przenoszenia genów (np. oporności na antybiotyki) z organizmów modyfikowanych genetycznie na organizmy dzikie,
- toksyczne oddziaływanie GMO na pożyteczne owady,
- niekontrolowane rozprzestrzenianie się transgenów w środowisku wskutek krzyżowanie się GMO z organizmami dzikimi,
- wypieranie rodzimych gatunków przez gatunki GMO i zubożenie biocenoz.



BIOTECHNOLOGIA W BADANIACH EWOLUCYJNYCH I SYSTEMATYCE ORGANIZMÓW



Znajomość sekwencji nukleotydów w DNA otwiera przed badaczami możliwości **określenia pokrewieństwa gatunków** i budowania ich drzewa rodowego.

Ze względu na wielkość genomów porównuje się tylko **wybrane fragmenty DNA**, a miarą pokrewieństwa gatunków jest **liczba różnic** występujących w określonych sekwencjach.

Badania sekwencji DNA potwierdziły, ze **gatunek ludzki jest bliżej spokrewniony z szympansem niż z gorylem**.

DRZEWO RODOWE CZŁOWIEKA OPARTE NA SEKWENCJI DNA

