

А.Г. ПЕСНЯКЕВИЧ

# **СОВРЕМЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**

Учебное пособие по факультативу для учащихся 11 классов  
общеобразовательных учреждений

**Минск 2010**

## Оглавление

§1. Общие представления о селекции, биотехнологии и генетической инженерии.....	3
§2. Возникновение и развитие генетической инженерии.....	6
§3. Рестриктазы как инструмент генетической инженерии .....	8
§4. Разделение фрагментов ДНК по размерам и обнаружение фрагментов с определенной последовательностью нуклеотидов.....	11
§5. Понятие о плазидах и векторах как инструментах генетической инженерии. Клонирование генов.....	14
§ 6. Особенности реализации генетической информации в про- и эукариотических клетках .....	19
§ 7. Особенности методического арсенала современной генетической инженерии. Полимеразная цепная реакция.....	24
§ 8. Особенности методического арсенала современной генетической инженерии. Современные векторы, улучшенные варианты отбора клонов, электропорация.....	30
§ 9. Создание и области применения трансгенных бактерий .....	35
§ 10. Получение трансгенных грибов и их применение .....	38
§ 11. Кто был самым первым генным инженером?.....	44
§ 12. Принцип введения генетической информации в растительные клетки с помощью агробактерий.....	47
§ 13. Трансгенные растения с улучшенными агротехническими характеристиками.....	50
§ 14. Трансгенные растения с улучшенными пищевыми и техническими качествами .....	54
§ 15. Возможности применения генно-инженерных методов к животным. Использование культур клеток насекомых .....	58
§ 16. Возможности применения генно-инженерных методов к животным. Векторы для работы с клетками млекопитающих.....	63
§ 17. Методы получения трансгенных животных и перспективы их использования.....	68
§ 18. Надо ли современному человеку бояться трансгенных организмов?.....	76

## **§1. Общие представления о селекции, биотехнологии и генетической инженерии**

Современный человек, в отличие от человека первобытного и всех остальных видов живых существ, способен целенаправленно изменять среду обитания, создавая при этом наиболее оптимальные условия для собственной жизни. Говоря по-другому, все остальные существа в обеспечении своей жизнедеятельности вынуждены довольствоваться тем, что предоставляет им биосфера, и только люди планомерно и последовательно изменяют не только неживую часть биосферы, но и живые ее составляющие.

Началом такой деятельности Homo sapiens можно считать переход от простого собирательства и охоты к выращиванию растений и разведению животных для целей пропитания. Руководствуясь сугубо утилитарными целями – получить как можно больше пищи и необходимых материалов (например, для изготовления одежды), люди отбирали для размножения не любых представителей конкретных видов животных и растений, а именно тех, которые по своим качествам наиболее соответствовали запросам человека. Этот осуществляемый тысячелетиями процесс, названный Чарльзом Дарвином бессознательным искусственным отбором, привел к появлению внутривидовых групп одомашненных животных и растений - пород и сортов.

По мере развития общества и увеличения потребностей людей разнообразие пород и сортов возрастало. При этом организмы некоторых отбираемых сортов и пород стали настолько сильно отличаться от своих диких предков, что уже не могли существовать и поддерживать свою численность в естественных условиях. Фактически, это были уже не продукты природы, а продукты человеческой деятельности. С возникновением промышленного производства, требовавшего еще большего разнообразия исходных веществ биологического происхождения в качестве сырья, направленная на изменение живых организмов деятельность людей усилилась. Бурное развитие в 17-19 веках естественных наук, в частности, химии, физики и биологии, привело не только к технологическому прогрессу, но и к разработке методов более быстрого получения новых пород и сортов. Появился новый вариант искусственного отбора, названный Дарвином методическим или сознательным.

Главным отличием такого отбора было конкретное определение конечной цели: осуществлявший отбор человек заранее планировал ожидаемый результат (например, получение породы овец с более тонкой и длинной шерстью) и корректировал в зависимости от этого выбор оставляемых для размножения организмов в каждом

поколении. Более того, накапливаемый со временем опыт наиболее продуктивного подбора родительских пар и выращивания сельскохозяйственных растений и животных в сочетании с развитием биологии как науки, позволял проводить такую коррекцию наиболее эффективно. Фактически, с этого времени можно вести отсчет такого рода человеческой деятельности, как **селекция**.

Сформировавшаяся на основе практической деятельности селекция получила статус науки благодаря возникновению и развитию генетики. Понимание того, чем именно и как определяются наследственные признаки организмов, в том числе и хозяйственно-полезные (вспомните, пожалуйста, о знакомых вам из курса биологии 10 класса законах Менделя и хромосомной теории Моргана), позволило в 20 веке существенно усовершенствовать получение новых сортов и пород.

Кроме того, в 19-20 веках, благодаря развитию микробиологии, в круг объектов деятельности селекционеров были введены бактерии и грибы. Люди с незапамятных времен использовали эти организмы в хозяйственной деятельности при выпечке хлеба, получении спиртных напитков и молочно-кислых продуктов, квашении фруктов и овощей, мочке льна и др., однако, в силу отсутствия достаточных сведений о биологии размножения этих существ, не применяли к ним в полной мере направленный искусственный отбор. Развитие человеческого общества в 20-ом столетии привело к значительному изменению потребностей людей: в обиход человека были введены неиспользуемые ранее продукты микробного происхождения, например, антибиотики, что стимулировало изыскание новых путей для отбора улучшенных вариантов используемых в промышленности микроорганизмов. Такие варианты бактерий или грибов принято называть не сортами или породами, а штаммами. Для создания новых штаммов селекционеры стали применять искусственный мутагенез (получение наследственных изменений организмов в результате контролируемого человеком воздействия химических и физических факторов), а также использовать открытые в середине 20-го века свойственные бактериям способы обмена генетической информацией (полового процесса) – трансформацию, трансдукцию и конъюгацию.

Трансформация – перенос генетической информации от одних бактерий к другим в результате проникновения небольших фрагментов ДНК погибших бактерий через оболочку живой бактериальной клетки и включение их в передающийся по наследству генетический аппарат этой клетки.

Трансдукция – перенос небольших фрагментов ДНК от одних бактерий к другим с помощью вирусов бактерий (бактериофагов).

Конъюгация – перенос генетической информации от одних бактерий к другим в результате непосредственного контакта двух живых бактериальных клеток.

Наиболее существенные изменения селекционная работа претерпела после окончательного доказательства роли ДНК как носителя наследственной информации и развития так называемой молекулярной биологии. Возможность выделения из клеток молекул нуклеиновых кислот и направленного воздействия человека непосредственно на них позволила разработать принципиально новые методы селекции. Ранее при получении сортов, пород или штаммов селекционеры имели возможность совместить в одном организме определенного вида несколько полезных с хозяйственной точки зрения признаков, характерных для разных особей этого же вида, но не более. Молекулярная же биология позволяет объединить генетическую информацию организмов различных, (практически любых) видов и тем самым наделить полученный штамм, сорт или породу признаками, исходно ему не свойственными, но зато наиболее полезными для использования таких организмов человеком. Фактически, селекционеры, подобно инженерам, получили возможность собирать из отдельных генов новые, до сих пор не существовавшие в природе комбинации, подобно тому, как в технике или строительстве собираются из отдельных блоков механизмы или здания. Именно поэтому в язык современного человека в настоящее время прочно вошли такие термины, как **биотехнология и генетическая инженерия.**

В самом широком смысле **под биотехнологией понимают все виды деятельности человека, при которых из какого-либо сырья получают те или иные продукты, но с помощью живых организмов или образуемых ими веществ (например, ферментов).** С этой точки зрения биотехнология существует уже как минимум несколько тысячелетий, но только в 20-м веке человечество, благодаря генетической инженерии, обрело возможность перевести биотехнологические процессы на качественно новый, гораздо более продуктивный уровень. Это, с одной стороны, позволяет получать и использовать необходимые человеку продукты во все возрастающих масштабах и во все более широком ассортименте, но с другой стороны, порождает, как и все новое, определенное беспокойство людей, связанное с потенциальными возможностями генетической инженерии. С тем, как именно осуществляется селекция и генно-инженерная деятельность в современном обществе, вы и познакомитесь в следующих разделах.

**Вопросы к §1. 1.** Что лежало в основе появления искусственного отбора как определенного направления человеческой деятельности? **2.** Чем отличается селекция от бессознательного искусственного отбора? **3.** Какие организмы и почему стали объектами селекционной деятельности в 20-м веке? **4.** Чем

отличается генетическая инженерия от селекции? **5.** Что характерно для биотехнологии конца 20- начала 21 веков?

## **§2. Возникновение и развитие генетической инженерии**

Описанные выше методы селекционной работы базируются на установленных генетиками закономерностях передачи наследственных признаков от родителей к потомкам. Представления об этих закономерностях развивались постепенно и одновременно накапливались сведения о структурах, являющихся материальными носителями наследственности.

Первоначально представления о наследственных зачатках (или в современной трактовке – генах) были чисто гипотетическими. Основоположник генетики Грегор Мендель предположил их существование еще в 1865 году, но никаких сведений о том, что именно они собой представляют, в те времена еще не было. Изучение половых клеток и процессов их формирования позволило к концу 19 – началу 20 веков доказать, что носителями наследственных зачатков являются располагающиеся в ядрах клеток структуры – хромосомы, причем каждая хромосома представляет собой совокупность многих генов, расположенных в определенном порядке. Однако представление о структуре самих генов сформировалось только во второй половине 20-го столетия, когда было доказано, что материальными носителями наследственности являются особые химические вещества – нуклеиновые кислоты. Молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) обладают удивительной способностью удваиваться перед делением клетки, в результате чего каждая дочерняя клетка и сохраняет признаки материнской. Иными словами именно передача из поколения в поколение этих молекул и определяет наследование признаков. Более того, стало понятно, что изменения признаков потомков по сравнению с признаками родителей являются следствием изменения именно этих молекул. Таким образом, генетика и селекция с организменного и клеточного уровней изучения живых организмов постепенно переходила на уровень молекулярный.

Крайне важной предпосылкой такого перехода стало усовершенствование методов биохимии, позволившее выделять молекулы нуклеиновых кислот и белков из организмов и осуществлять химические реакции с их участием вне живых клеток. Оказалось, что нуклеиновые кислоты всех организмов имеют практически одинаковые характеристики, а код, который определяет соответствие последовательности нуклеотидов в цепи ДНК последовательности аминокислот в первичной структуре белковых молекул, является универсальным. Благодаря этому, изучая молекулы самых простых по уровню

организации и строению организмов – бактерий, удалось установить особенности химического строения носителей наследственной информации и общие закономерности происходящих с ними процессов в клетках всех живых организмов. Более того, в 1973 году Стенли Коэну и Герберту Бойеру удалось объединить в одну молекулу фрагменты ДНК из разных организмов, и эта молекула существовала, функционировала и передавалась по наследству дочерним клеткам размножающихся бактерий. С этого времени и ведется отсчет нового направления человеческой деятельности - **технологии рекомбинантных ДНК, в дальнейшем получившей название генетической инженерии.**

Доказательством того, что эта технология важна не только для узкого круга ученых-биологов, а имеет существенное значение для развития всего человечества, стало экономическое признание успехов генетической инженерии: 15 октября 1980 года стоимость акции фирмы «Джинтек» («Genetech») на Нью-Йоркской фондовой бирже поднялась с 35 до 89 долларов. Причиной этого стало сообщение, что эта компания начинает производство нужного для помощи страдающим диабетом людям гормона инсулина на основе бактерий, полученных с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Причем этот инсулин практически не отличается от человеческого, так как в клетки микроорганизма ввели молекулу, состоящую из фрагментов ДНК Homo sapiens (ген, несущий информацию о характерной для белка инсулина последовательности аминокислот) и ДНК широко используемой в лабораторной практике бактерии Escherichia coli, известной как кишечная палочка. Такая реакция биржи много стоит: интерес к акциям «Джинтек» далеких от науки, но зато хорошо умеющих считать и приумножать свои деньги людей наглядно продемонстрировал, что создание организмов с направленно измененной генетической информацией является реальностью, а не вымыслом писателей-фантастов. Более того, бизнесмены увидели в этой деятельности небывалые перспективы и начали активно финансировать подобные исследования, что и сделало к концу 20-го века базирующуюся на генетической инженерии финансовую деятельность самой доходной отраслью экономики.

В следующих разделах вы узнаете, как именно осуществляется создание рекомбинантных молекул ДНК и каким образом можно добиться, чтобы эти ДНК активно функционировали в клетках организмов различных уровней организации.

**Вопросы к § 2. 1.** Что определило возможность перехода селекционной работы на молекулярный уровень? **2.** Как вы думаете, почему именно на бактериях были осуществлены эксперименты, показавшие возможность направленного изменения наследственной информации?

### **§3. Рестриктазы как инструмент генетической инженерии**

Все химические реакции в живых клетках происходят с участием особых молекул - биологических катализаторов, называемых ферментами или энзимами. Воздействие таких молекул на другие, например молекулы ДНК, заключается в ускорении их химических превращений, причем молекулы самих катализаторов в ходе таких реакций не изменяются и используются многократно. Основополагающим в развитии генетической инженерии стало открытие группы ферментов, способных разъединять молекулы ДНК на фрагменты.

О существовании таких ферментов стало известно в результате экспериментов по изучению размножения вирусов бактерий - бактериофагов. Вирусы представляют собой небольшие по размерам частицы, состоящие из одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, заключенных в белковую оболочку, называемую капсид. Поскольку сами вирусы не имеют никаких органоидов и молекул, необходимых для биосинтеза нуклеиновых кислот и белков, для своего размножения они используют клетки других организмов. Такой способ существования относится к симбиотическому, и представляет собой такую разновидность симбиоза, как паразитизм. Как это и свойственно симбиотическим взаимоотношениям, каждый конкретный вид вирусов способен проникать только в клетки определенных видов, что связано, прежде всего, с особенностями поверхностных структур капсида вируса и клетки-хозяина. Другими словами, вирусу сначала необходимо прикрепиться к клетке снаружи. Если такое прикрепление оказывается возможным, вирусы некоторых видов проникают в клетки как целостные частицы, а вирусы других видов особым образом вводят в клетку свою нуклеиновую кислоту, что оказывается достаточным для размножения вируса. Дело в том, что именно нуклеиновая кислота несет в себе информацию о вирусных белках, поэтому проникшие целыми вирусы обязательно претерпевают так называемое «раздевание» - освобождение вирусной нуклеиновой кислоты из капсида. Если нуклеиновая кислота вируса представляет собой двунитевую ДНК (к настоящему времени открыты вирусы, содержащие либо обычные двунитевые молекулы ДНК, либо одонитевые молекулы ДНК, либо молекулы РНК), практически сразу может начаться процесс транскрипции, приводящий к появлению вирусных информационных РНК. В результате трансляции этих иРНК на рибосомах клетки возникают белки, необходимые для создания новых капсидов и для осуществления репликации вирусной ДНК. Новые молекулы вирусной ДНК «упаковываются» в капсиды, и в клетке возникает несколько сотен новых вирусов. Далее



вирусы покидают «взрастившую» их клетку либо путем отпочковывания от ее поверхности, либо путем полного разрушения клетки.

Ясно, что для клетки присутствие таких «гостей» крайне нежелательно, поэтому в процессе эволюции у организмов выработался особый способ защиты от чужеродных нуклеиновых кислот, попадающих в их цитоплазму. Эта защита определяется присутствием в клетке особых ферментов - **эндонуклеаз**, способных «узнавать» и разрушать чужие молекулы ДНК. Такие ферменты способны разрывать ковалентные связи между нуклеотидами в цепи ДНК, причем такое разрушение молекул осуществляется специфически, только в конкретных участках, представляющих определенную последовательность нуклеотидов.

Сравнение эндонуклеаз из клеток организмов различных видов показало, что каждый вид обладает своими, только ему присущими эндонуклеазами, способными узнавать в молекуле ДНК строго определенные сочетания нуклеотидов. Здесь следует вспомнить, что у каждого организма в его молекулах ДНК нуклеотиды расположены в определенном порядке, что собственно и определяет отличие одних организмов от других. Но, с другой стороны, поскольку нуклеотидов в ДНК всего лишь четыре разновидности, определенные их короткие сочетания, могут повторяться. Поэтому разрушительному воздействию эндонуклеаз теоретически должна подвергаться любая молекула ДНК, в которой имеется так называемый сайт узнавания – определенная последовательность нуклеотидов. Такие последовательности, конечно же, имеются и в собственной ДНК клетки, но почему же эта ДНК не разрушается? Оказывается, что нуклеотиды в сайтах узнавания для имеющихся в клетках этого вида организмов эндонуклеаз особым образом изменены химически – к ним присоединены дополнительные группировки (например, метильные остатки  $\text{CH}_3$ ), присутствие которых предотвращает присоединение эндонуклеазы. Иными словами говоря, клетки каждого организма особым образом «метят» свою собственную ДНК в сайтах узнавания для собственных эндонуклеаз. Такой процесс в молекулярной биологии называют модификацией ДНК, а ферменты, которые катализируют этот процесс, модифицирующими ферментами. Поскольку у каждого вида организмов ДНК «помечена» в местах узнавания именно для своих рестриктаз, любая «чужая» для этого организма ДНК будет разрушаться эндонуклеазами этой клетки, а своя собственная - сохраняться.

Учитывая то, что такое воздействия на вирусную ДНК ограничивает размножение вирусов, такие ферменты с момента их открытия стали называть **рестриктазами** (от англ. restriction – ограничение). Этот термин в современной молекулярной биологии используется на равных с термином эндонуклеазы.

Для обозначения рестриктаз (эндонуклеаз) различных видов организмов было решено использовать в названии фермента первые буквы латинского наименования образующего данную рестриктазу вида и далее несколько букв и (или) римских цифр. Дело в том, что в клетках одного и того же вида организмов, как правило, образуется не одна, а несколько рестриктаз, отличающихся по способности узнавать различные сочетания нуклеотидов. Это обеспечивает большую возможность уничтожения разных по нуклеотидному составу «чужих» ДНК, т.е. обеспечивает защиту от большего числа вирусов. В качестве примера приведем названия нескольких рестриктаз: для обозначения эндонуклеаз, образуемых клетками уже известной вам кишечной палочки *Escherichia coli* используются обозначения *EcoRI* и *EcoRV*, где первая буква происходит от названия рода, две последующие – две первые буквы видового эпитета, буква R означает рестриктаза, а следующая за ней римская цифра – ее номер. То есть *EcoRI* и *EcoRV* – это первая и пятая рестриктазы из продуцируемых клетками кишечной палочки. Соответственно, подобные, но отличающиеся по сайтам узнавания ферменты из клеток *Haemophilus parainfluenzae* называются *HpaI* и *HpaII*. Необходимость введения таких названий связана с тем, что в настоящее время уже известно несколько сотен различных эндонуклеаз, различающихся по месту и характеру воздействия на ДНК.

Изучение эндонуклеаз различных организмов показало, что они отличаются не только по специфичности к сайтам узнавания. Оказалось, что некоторые эндонуклеазы могут, в зависимости от условий, не разрывать фосфодиэфирную связь между нуклеотидами в цепи ДНК, а присоединять к нуклеотидам дополнительные химические группировки, защищающие этот участок ДНК от расщепления такой же эндонуклеазой. Такую активность называют модифицирующей, и она нужна клеткам для того, чтобы защищать свою собственную вновь синтезируемую перед делением ДНК от расщепления. Кроме того, для проявления модифицирующей активности некоторых эндонуклеаз обязательно наличие молекул АТФ. С учетом особенностей узнавания и разрезания молекул ДНК, а также наличия у них модифицирующей активности и зависимости от присутствия молекул АТФ эндонуклеазы разделили на три класса (или типа). Эндонуклеазы класса I способны не только расщеплять молекулу ДНК в своем сайте узнавания, но и модифицировать ее, для их работы необходимо присутствие АТФ. Эндонуклеазы класса II обладают только рестрицирующей активностью в пределах сайта узнавания и не нуждаются для ее проявления в молекулах АТФ. Эндонуклеазы класса III прикрепляются к молекуле ДНК в одном месте (сайте узнавания), но разрыв связей между нуклеотидами

осуществляют в другом участке, расположенном на расстоянии нескольких десятков нуклеотидов от сайта узнавания. Их активность также зависит от АТФ.

Открытие вышеописанного механизма защиты от вирусов, да и вообще от любой чужеродной генетической информации оказалось важным не только чисто в теоретическом плане, но и в плане развития генетической инженерии. Оказалось, что выделенные из клеток различных видов бактерий эндонуклеазы способны разъединять молекулы ДНК и вне клетки, как говорят биологи *in vitro* (т.е. вне живого). А это означало, что можно, используя конкретную рестриктазу разделить множество одинаковых молекул ДНК на одинаковые фрагменты. С другой стороны, учитывая то, что эндонуклеазы различных видов бактерий разрезают молекулы ДНК в разных участках, можно последовательно воздействовать на одни и те же молекулы, получая с каждым этапом все более мелкие фрагменты. Фактически, открытие рестриктаз дало в руки генетическим инженерам своеобразные волшебные ножницы, позволяющие правильно нарезать невидимые глазом молекулы. Удобнее всего в качестве такого инструмента оказалось использовать эндонуклеазы класса II – и АТФ в реакционную смесь добавлять не надо, и они всегда будут только резать. Поэтому в настоящее время для целей генетической инженерии на специальных предприятиях выращивают бактерии различных видов и получают из их клеток уже более сотни различных рестриктаз, но все они относятся ко второму классу.

Фрагментация ДНК, называемая в генетической инженерии **рестрикцией**, необходима для того, чтобы отобрать из полученных небольших участков те, которые содержат интересующую генных инженеров наследственную информацию, и далее использовать их для объединения с ДНК другого организма. Как именно удастся проводить такой отбор, вы узнаете из следующего раздела.

**Вопросы к §3.** **1.** В чем суть рестрикции как биологического явления? **2.** Почему именно эндонуклеазы класса II были выбраны для целей генетической инженерии? **3.** Почему в генетической инженерии используют не одну, а множество различных рестриктаз?

#### **§4. Разделение фрагментов ДНК по размерам и обнаружение фрагментов с определенной последовательностью нуклеотидов**

Для первоначального разделения полученных в результате действия рестриктаз фрагментов ДНК используют метод, получивший название **гель-электрофорез**.

Метод основан на том, что молекулы ДНК в растворе солей определенной концентрации имеют на своей поверхности отрицательные заряды. При пропускании

через раствор постоянного электрического тока хаотическое (броуновское) движение молекул меняется на направленное перемещение их к положительно заряженному электроду. Если такое воздействие осуществляется не в обычном водном растворе, а в желеобразной массе застывшего 1% раствора агарозы, молекулы ДНК различного размера движутся с различными скоростями – чем длиннее молекула, тем медленнее она движется, поскольку испытывает больше соударений с образовавшимися гелевыми частицами агарозы.

Агароза – это особым образом обработанный полисахарид агар-агар, получаемый из красных водорослей. Отличительной чертой этого вещества является его способность даже в небольших (менее одного процента) концентрациях при температурах ниже 40° С образовывать в водных растворах сплошную плотную массу, обычно называемую гелем. Раствор агарозы готовят путем растворения ее в воде при температурах от 70° С до 100° С, а затем наливают еще не остывший раствор в специальную емкость с ровным и гладким дном. При остывании раствор желируется и получается определенной толщины пластинка. Раствор молекул ДНК вносят в заранее подготовленные в этой пластинке углубления (лунки), которые расположены у одного из концов пластинки, и всю пластинку помещают в специальной камере с электродами. Камеру заполняют водным раствором солей и подключают к генератору постоянного электрического тока таким образом, чтобы ток проходил через пластинку геля. Время воздействия электрического тока выбирают такое, чтобы все молекулы ДНК успели переместиться из лунки в толщу геля, но даже самые мелкие из них не прошли через весь гель.

При перемещении фрагментов ДНК различного размера из одного и того же места (лунки), одинаковые по размерам молекулы движутся с одинаковой скоростью. Поэтому через некоторое время в толще геля образуются скопления одинаковых по размерам молекул, но они будут располагаться в разных участках пластинки. После окончания электрофореза пластинку окрашивают способным связываться с ДНК красителем, что делает видимыми те участки, в которых расположились молекулы.

В тех случаях, когда просто требуется отобрать молекулы определенного размера, соответствующий участок пластинки вырезают и вымывают из него ДНК специальными растворами.

Размеры молекул ДНК можно выражать либо в специальных единицах молекулярной массы – дальтонах, либо, что делают гораздо чаще, в числе пар нуклеотидов или азотистых оснований. В последнем случае принято после соответствующей цифры писать сокращение п.н. (синонимом является п.о.) или т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

(синоним – т.п.о.). Иногда в русскоязычных публикациях сохраняют английскую аббревиатуру, в этих случаях сокращению п.н. соответствует b (от англ. base – основание), а сокращению т.п.н. – kb (от англ. kilobase – тысяча оснований) Для того, чтобы получить конкретную цифру для фрагментов ДНК, размеры которых неизвестны, одновременно в этой же пластинке геля проводят электрофоретическое разделение молекул с уже известными размерами и сравнивают положение в геле изучаемых и эталонных молекул.

Но разделить ДНК на фрагменты – это только половина задачи. Хорошо бы еще и узнать, в каком из фрагментов находится интересующий исследователя ген. Ген – это определенная последовательность нуклеотидов в цепи ДНК, которая содержит информацию о той или иной молекуле белка или РНК. Если нуклеотидная последовательность для конкретного гена уже известна, существует возможность обнаружить ее в разделенных электрофорезом фрагментах. Эта возможность основана на том, что молекулы ДНК состоят из двух комплементарных цепей и при определенных условиях эти цепи могут быть отделены друг от друга. Например, если молекулы ДНК нагреть до температуры выше 70 °С, удерживающие две цепи водородные связи между азотистыми основаниями разрываются. Такая тепловая денатурация ДНК обратима – если температуру понизить, цепи объединяются вновь.

Зная об этом, и придумали **метод гибридизации молекул ДНК**, заключающийся в следующем. Полученные в результате действия рестриктаз и разделенные по размерам с помощью электрофореза фрагменты переносят на специальный нитроцеллюлозный фильтр, но таким образом, чтобы порядок их расположения в геле сохранялся и на фильтре. Это легко достигается наложением фильтра на гель и созданием условий для движения молекул в сторону фильтра. Затем фильтр в специальном растворе нагревают до температуры, при которой молекулы ДНК становятся одонитевыми, и вносят в раствор заранее подготовленные одонитевые фрагменты ДНК, последовательность нуклеотидов в которых соответствует конкретному гену. Но эти ДНК особые – их нуклеотиды содержат радиоактивные изотопы какого-либо входящего в нуклеотид химического элемента, чаще всего фосфора. После этого температуру понижают, и происходит ренатурация, т.е. восстановление двунитевых молекул. Часть таких молекул будет включать не исходные нерадиоактивные нити, а те, которые были специально внесены в раствор. Причем здесь проявит себя комплементарность – радиоактивные нити присоединятся к тем фрагментам ДНК, в которых и находится искомый ген. Далее фильтр тщательно отмывают от не связавшихся радиоактивных молекул, высушивают, и прикладывают к фотопластинке на несколько часов. После проявления фотопластинки на

ней будут заметны темные пятна засвеченной радиоактивным излучением эмульсии. Сопоставив расположение пятен с расположением фрагментов ДНК в геле, легко установить, во фрагментах какого размера находится искомый ген. Именно эти фрагменты и используют в дальнейшей работе.

**Вопросы к §4.** **1.** На каком свойстве молекул ДНК основан метод гель-электрофореза? **2.** Подумайте, почему для электрофореза используют постоянный, а не переменный ток? **3.** В каких единицах принято выражать размеры фрагментов ДНК? **4.** Что необходимо сделать, чтобы определить размеры анализируемых фрагментов ДНК? **5.** Каким способом можно узнать, в каком из фрагментов ДНК находится нужный ген?

## **§5. Понятие о плазмидах и векторах как инструментах генетической инженерии.**

### **Клонирование генов**

Как вам уже известно, клетки живых организмов при размножении обязательно передают дочерним клеткам копии своих молекул ДНК. Для этого в клетках существуют специальные ферменты, катализирующие реакции удвоения молекул ДНК, и все необходимые для такого удвоения (репликации) компоненты. Поэтому и догадались использовать для получения большого количества нужных молекул ДНК самые простые и самые быстро размножающиеся организмы – бактерии. Их можно легко размножить в лабораторных условиях и получать необходимое количество их клеток менее, чем за сутки. Самое главное заключается в том, как ввести в клетки бактерий нужную ДНК и добиться того, чтобы она не исчезала из клеток при их размножении.

Для решения этой проблемы очень важными оказались сведения о том, что у бактерий часть генетической информации заключена не в основной большой по размерам молекуле ДНК (так называемом нуклеоиде или бактериальной хромосоме), которая в единственном экземпляре имеется в каждой бактериальной клетке, а в гораздо меньших по размерам кольцевых молекулах ДНК, называемых **плазмидами**.

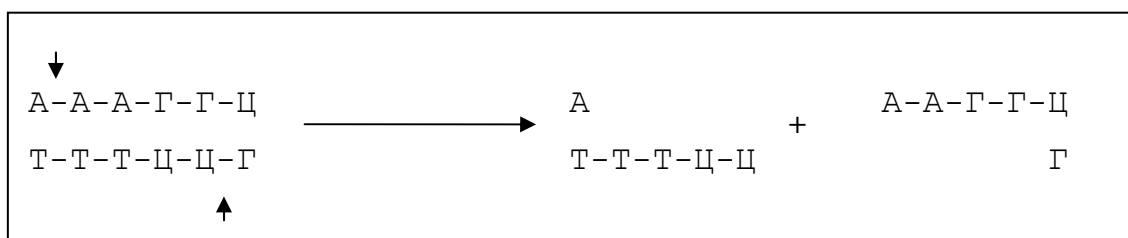
Наличие плазмид у бактерий имеет для их существования очень большое значение. Дело в том, что эти организмы из-за малых размеров, очень простого (можно сказать, примитивного) строения их клеток и ограниченности процессов обмена веществ, не имеют возможности постоянно поддерживать в своих клетках и передавать по наследству большое количество молекул ДНК. Для сравнения, в клетках даже одноклеточных эукариот как минимум несколько, а иногда и несколько сотен хромосом, в то время как у бактерий это одна молекула ДНК. В этой единственной бактериальной хромосоме имеется тот минимальный набор генов, который обеспечивает им существование в строго

определенных условиях. Если же условия обитания популяции конкретного вида бактерий изменяются, большинство особей этой популяции просто гибнет, то есть они изначально не приспособлены к широкому диапазону условий. Однако, если у каких-либо отдельных бактерий из этой популяции, оказываются плазмиды, на которых имеются гены, позволяющие выживать в этих изменившихся условиях, то именно эти бактерии начнут интенсивно размножаться, и, более того, передавать эти плазмиды бесплазмидным клеткам путем трансформации, конъюгации или трансдукции. Таким образом популяция выживет. Но, если условия опять улучшатся, и те гены, которые расположены на плаزمиде уже не будут нужны, большинство вновь образующихся при делении бактерий окажутся без плазмид. Дело в том, что в этой ситуации содержащие плазмиды бактерии будут проигрывать бесплазмидным бактериям в скорости размножения, потому что им приходится тратить материальные и энергетические ресурсы на образование сейчас уже не нужных молекул ДНК. Фактически получается так, что бактерии, грубо говоря, пользуются плазмидами только тогда, когда они им нужны. Это резервная, дополнительная генетическая информация, которая сохраняется лишь у некоторых членов популяции. Особенно важно здесь то, что половые процессы у бактерий (конъюгация, трансформация, трансдукция) могут осуществляться между представителями не только одного вида (как это имеет место у высших организмов), но и между представителями различных родов, семейств и даже классов. По-другому говоря, бактериям оказывается доступен целый океан дополнительной генетической информации, который содержится в клетках отдельных особей различных видов. Минусом такого, казалось бы, наиболее экономного способа существования является то, что далеко не всегда рядом оказываются носители нужной именно сейчас генетической информации, и в этом случае большинству бактерий приходится погибать. Очевидно, так существовать могут только очень многочисленные и быстро размножающиеся существа. Для выживания всех остальных нужен гораздо больший индивидуальный и постоянный набор генов, что мы и наблюдаем на примере эукариотических организмов.

Для целей генетической инженерии важным оказалось и то, что некоторые плазмиды могут присутствовать в одной бактериальной клетке в нескольких (иногда десятках) экземплярах (копиях) и реплицируются (т.е. удваиваются) чаще, чем бактериальная хромосома. Вот в такие так называемые многокопийные плазмиды и внедряют нужный ген, если хотят его, условно говоря, размножить.

Сделать это можно используя уже известные вам эндонуклеазы класса II (рестриктазы). Если подобрать такую рестриктазу, чтобы она разрешила кольцевую

молекулу только в одном месте, то плазмидная ДНК превратится в линейную. ДНК, в которой находится нужный генному инженеру ген, необходимо также обработать такой же рестриктазой, тогда в ней тоже образуются так называемые «липкие концы». Дело в том, что двуниевая молекула ДНК разделяется большинством рестриктаз ступенчато, то есть так, что на концах молекулы остаются небольшие, протяженностью в несколько нуклеотидов, одонитевые участки, причем нуклеотиды таких участков комплементарны друг другу. Например, разрезание в указанном сайте даст следующие «липкие концы»



Поскольку одинаковые «липкие концы» образуются и в плазмидной ДНК и в ДНК, содержащей нужный ген, возможно объединение двух таких разных молекул в одну, причем такая ДНК замкнется в кольцо. Возникнет плазида, в составе которой окажется фрагмент ДНК с нужным геном. Однако, для того, чтобы такое объединение было прочным, одних водородных связей между азотистыми основаниями нуклеотидов недостаточно. Необходимо связать объединившиеся за счет «липких концов» цепи ковалентными связями между дезоксирибозой и остатками фосфорной кислоты в каждой из нитей. Такую реакцию катализирует еще один широко используемый в генетической инженерии фермент – **ДНК-лигаза** (от ligament – связка).

Суммируя все выше сказанное, процедуру объединения молекул ДНК можно описать следующим образом. ДНК бактериальной плазмиды и содержащую нужный ген ДНК обрабатывают одной и той же рестриктазой в отдельных пробирках. Затем контролируют с помощью электрофореза наличие в каждой пробирке фрагментов ДНК и после этого объединяют два раствора. Добавляют лигазу и проводят реакцию с ее участием. Это последний этап называется **лигирование**.

Поскольку участвующие в реакции молекулы ДНК объединяются по «липким концам» случайным образом, в пробирке образуется три типа молекул: 1) вновь объединившиеся фрагменты содержащей нужный ген ДНК; 2) замкнувшиеся в кольцо молекулы исходной плазмидной ДНК; 3) кольцевые молекулы, состоящие из плазмидной ДНК и присоединенного к ней фрагмента с нужным геном. Теперь главной задачей становится отбор молекул третьего типа.



Чтобы понять, как это делается, следует подробнее рассмотреть, что собой представляет плазмидная ДНК, пригодная для введения в клетки бактерий чужеродной ДНК. В генетической инженерии такие плазмиды называют векторными или просто **векторами**. Один из примеров таких векторов - плаزمида pBR322 (рис. 1).

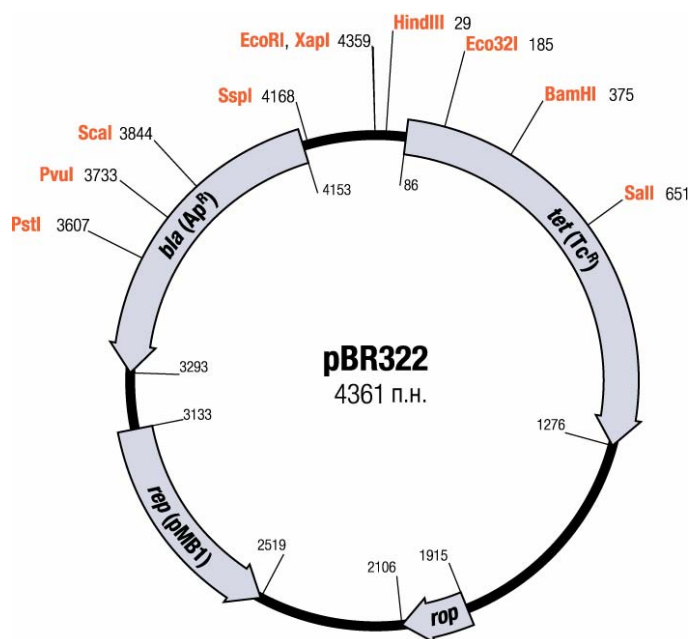


Рис. 1. Один из наиболее известных и широко применяемых в генетической инженерии векторов pBR322 – плазмида Боливара-Родригеса.

В ее составе обязательно находятся несколько участков: 1) *rep* - место начала репликации ДНК; 2) ген *bla*, определяющий устойчивость бактерий к одному из антибиотиков, ампициллину ( $Ap^r$ ); 3) ген *tet*, определяющий устойчивость к еще одному антибиотику, тетрациклину ( $Tc^r$ ). (Написанная как надстрочный знак латинская буква «r» происходит от англ. resistance – устойчивость).

Все эти участки являются обязательными вот почему. Место начала репликации должно обеспечивать увеличение числа копий этой ДНК в клетке бактерий и тем самым передачу плазмиды в дочерние клетки при размножении бактерий. Ген устойчивости к антибиотику ампициллину позволяет отобрать те бактерии, в клетках которых имеется плазмид-вектор. Ген устойчивости к тетрациклину позволит определить, в каких бактериях находится плазмид, имеющая в своем составе фрагмент с клонируемым геном.

Итак, после проведения реакции объединения ДНК (лигирования) смесью образовавшихся молекул обрабатывают специально подготовленные клетки бактерий. Чаще всего для этого используют определенные штаммы уже известной вам кишечной палочки – *Escherichia coli*, клетки которых чувствительны к действию ампициллина и тетрациклина. В определенных условиях происходит трансформация (вспомните §1), в

результате чего в клетки бактерий попадают различные находящиеся в смеси молекулы ДНК. Далее бактерии переносят на питательную среду, в которую добавлен антибиотик ампициллин. На такой среде будут размножаться только те бактерии, в клетки которых проникли молекулы типа 2 или молекулы типа 3, так как в составе этих молекул имеется ген устойчивости к ампициллину. При размножении на поверхности плотной питательной среды возникающие при делении дочерние клетки остаются в этом же месте, поскольку подвижность в условиях этой среды ограничена. Это приводит к тому, что на поверхности среды за 20-30 часов образуются видимые невооруженным взглядом скопления бактериальных клеток – колонии, состоящие из нескольких сотен тысяч клеток. Причем все клетки в каждой из таких колоний сохраняют наследственные признаки исходной клетки, которая начала размножаться в этом участке среды. Это очень важно, поскольку на следующем этапе клетки из каждой такой колонии проверяют на устойчивость к антибиотику тетрациклину.

Сделать это можно следующим образом. Прикасаются к каждой колонии тонкой стерильной (т.е. лишенной каких бы то ни было микроорганизмов) палочкой и сначала дотрагиваются этой палочкой до поверхности содержащей антибиотик тетрациклин среды в одной чашке Петри (так называются специальные сосуды, в которых выращивают бактерии), а затем до поверхности содержащей ампициллин среды в другой чашке Петри. В результате этого взятые из одной колонии бактерии оказываются на разных чашках под воздействием различных антибиотиков. Если через сутки на чашке с ампициллином бактерии определенных колоний размножаются и образуют видимое взглядом скопление, а на чашке с тетрациклином - нет, то именно такую колонию и отберут для дальнейшей работы.

Чтобы понять, почему это так, необходимо снова вернуться к рис. 1. Обратите внимание, что в пределах последовательности определяющего устойчивость бактерий к тетрациклину гена имеются места узнавания для нескольких рестриктаз - HindIII, Bam HI и SalI. Важно, что во всех остальных участках ДНК этой плазмиды таких же сайтов узнавания нет. Благодаря этому, при обработке любой из этих рестриктаз ДНК плазмиды-вектора именно в пределах гена *tet* появятся «липкие концы», по которым и может произойти встраивание клонируемого фрагмента. Если встраивание действительно осуществляется, ген тетрациклинустойчивости, условно говоря, «разорван» встроившимся фрагментом ДНК. А это значит, что содержащие такую плазмиду бактерии уже не могут образовывать кодируемый геном Tet белок и, следовательно, размножаться на среде с тетрациклином.

Отобранные таким образом бактерии размножают в питательной среде с ампициллином. В этих условиях в каждой клетке будут содержаться плазмидные ДНК со встроенным фрагментом, то есть при размножении таких бактерий фактически будет «размножаться» и искусственно введенный в плазмиду ген. А это значит, что выделяя из бактерий плазмидную ДНК и отделяя от нее с помощью рестрикции вставленный фрагмент, можно получить практически любое количество нужной для генно-инженерных экспериментов ДНК любого организма, например, человека. Важно и то, что получив однажды такие бактерии, можно сохранять их в специальных условиях практически неограниченное время и использовать далее по мере необходимости. Кроме того, можно сохранять не сами бактерии, а уже выделенную из них плазмидную ДНК со вставкой. В тех случаях, когда такая ДНК снова требуется в больших количествах, ее опять вводят посредством трансформации в клетки бактерий и дальше наращивают этих бактерий столько, сколько нужно.

Конкретные имеющие тот или иной чужеродный для них ген бактерии обычно называют **клоном**, то есть совокупностью одинаковых по содержащейся в них наследственной информации клеток. Именно поэтому описанная в параграфах 3-5 процедура получила название **клонирование генов**. (Пожалуйста, не путайте этот термин с клонированием организмов, о котором речь пойдет несколько позже).

Однако создать рекомбинантную молекулу ДНК – это только половина дела. Важно добиться того, чтобы ген, перенесенный из одного организма в другой, нормально функционировал, то есть заключенная в нем генетическая информация воплощалась в белок. Вот здесь уже многое зависит от особенностей клеток тех организмов, которые служили источником гена, и тех, в которых этот ген после клонирования находится.

**Вопросы к § 5.** **1.** Что такое бактериальные плазмиды? **2.** Почему именно плазмиды используют для клонирования? **3.** Какими свойствами должна обладать пригодная для клонирования плаزمид- вектор? **4.** Какой именно способ обмена генетической информацией из трех, известных вам из §1, используется при клонировании генов? **5.** Опишите процедуру отбора клонов с плазмидой, несущей клонированный ген.

## **§ 6. Особенности реализации генетической информации в про- и эукариотических клетках**

Условно говоря, «работа гена» заключается в том, чтобы содержащаяся в гене наследственная информация была реализована. В общем смысле процесс ее реализации во всех клетках осуществляется посредством двух последовательных этапов – транскрипции и трансляции, в результате чего в клетке появляется белок, способный выполнять

конкретную функцию. Фактически вся жизнь клетки, да и любого живого организма в целом, протекает в зависимости от того, какие именно белки появляются на том или ином этапе жизни, и этот принцип существования является универсальным, то есть общим для всех живых существ. Однако, между организмами различных уровней организации, например, бактерией и человеком, имеются существенные для целей генетической инженерии отличия в реализации наследственной информации.

Исходя из особенностей строения и функционирования, клеток все живые организмы принято делить на две большие группы - надцарство Прокариоты и надцарство Эукариоты. Названия этих групп происходят от главного отличительного признака клеток таких организмов – наличия или отсутствия ядра в клетках. Поскольку ядро по-гречески - *карион*, не имеющие ядра клетки называют прокариотическими, то есть доядерными (функцию ядра у таких клеток выполняет находящаяся непосредственно в цитоплазме большая кольцевая молекула ДНК – нуклеоид, в которой и содержится основная наследственная информация). Организмы же, у которых основная наследственная информация сосредоточена в находящемся в ядре хромосомах, называют собственно ядерными, или эукариотическими. Вторая отличительная черта эукариот – это наличие внутри клетки различных специализированных структур (органовидов или органелл), таких как эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, лизосомы, вакуоли, митохондрии, пластиды, центриоли, рибосомы. В прокариотических клетках из всего выше перечисленного присутствуют только рибосомы. И третье – структура генов, то есть содержащих информацию о белках фрагментов ДНК, у эукариот не такая, как у прокариотических организмов.

Для осуществления первого этапа реализации наследственной информации – транскрипции необходимо, чтобы осуществляющий синтез информационной РНК фермент РНК-полимеразы (транскриптаза) присоединился к строго определенному участку ДНК перед началом той последовательности нуклеотидов, которая кодирует порядок аминокислот в белке. Это необходимо для того, чтобы построение соответствующей данному гену информационной РНК начиналось всегда с одного и того же нуклеотида, что следует из непрерывности генетического кода. Участок присоединения РНК-полимеразы называется промоторной областью гена или **промотором**, а определяющая собственно порядок аминокислот в белке область называется **структурной частью гена**. Наличие таких областей характерно как для прокариотических, так и для эукариотических генов, однако и промоторы и структурные части генов этих организмов имеют отличия.

В частности, в промоторах генов прокариот место присоединения РНК-полимеразы, представляющее собой последовательность нуклеотидов ТАТААТ (этот участок называется также **Прибнов бокс** по фамилии ученого, определившего эту последовательность), находится на расстоянии 10-ти нуклеотидов от начала структурной области гена. В то же время в генах эукариотических клеток обеспечивающая присоединение РНК-полимеразы последовательность – это не 6, а 4 нуклеотида ТАТА (так называемый **Хогнесс бокс**, т.е. открытый Хогнессом) и располагается она на расстоянии 25-ти нуклеотидов от точки начала транскрипции. Из этого следует, что гены эукариот в прокариотических клетках и, наоборот, гены прокариот в эукариотических не могут быть транскрибированы, а, следовательно, закодированная в них информация не сможет реализоваться в виде белковой молекулы. Это препятствие в функционировании гена внутри чужеродной для него клетки генетическая инженерия научилась преодолевать. Теперь, чтобы сделать ген прокариотического организма (например, бактерии) работающим в клетках эукариот (например, клетках растений) с помощью рестрикции и последующего лигирования объединяют промотор какого-либо эукариотического гена и структурную часть прокариотического. Такая **генетическая конструкция** или «гибридный ген» будет транскрибироваться эукариотической РНК-полимеразой, то есть «работать» в эукариотической клетке.

Подобным образом создаются и генетические конструкции, способные функционировать в клетках прокариот. Например, если структурную часть гена инсулина человека объединить с промотором какого-либо бактериального гена и ввести такую последовательность ДНК в способную реплицироваться в клетках бактерий плазмиду-вектор, то такие бактерии будут синтезировать человеческий гормон, необходимый для помощи страдающим диабетом людям.

Однако, на пути создания способных «работать» в прокариотических клетках генов эукариот имеется еще одно препятствие. Дело в том, что значительная часть эукариотических генов имеет прерывистую структуру, то есть состоит из чередующихся участков – **интронов и экзонов** (рис.2). Экзоны представляют собой кодирующие области гена, в них содержится информация о порядке аминокислот в соответствующем этому гену белке, тогда как интроны этой информации не содержат. Образующаяся при транскрипции таких генов РНК (так называемый первичный транскрипт) в клетках эукариот обязательно подвергается особому воздействию, получившему название **сплайсинг** (от англ. splice – сцепление). Суть сплайсинга заключается в удалении из первичного транскрипта участков, комплементарных интронам, и соединении

соответствующих экзонам участков, причем так, чтобы при трансляции получался соответствующий гену белок. Наличие у эукариот такого процесса позволяет им с одного гена получать несколько пригодных для трансляции зрелых матричных РНК, поскольку вырезание разных участков при сплайсинге дает разное сочетание последовательностей. У прокариотических организмов таких генов нет, поэтому нет и специальных ферментов, осуществляющих процесс сплайсинга. Это и создает проблему при клонировании имеющих экзонно-интронную структуру генов в клетках бактерий - на рибосомах в таком случае транслируется первичный транскрипт и, следовательно, получается не такой белок, как в эукариотических клетках.

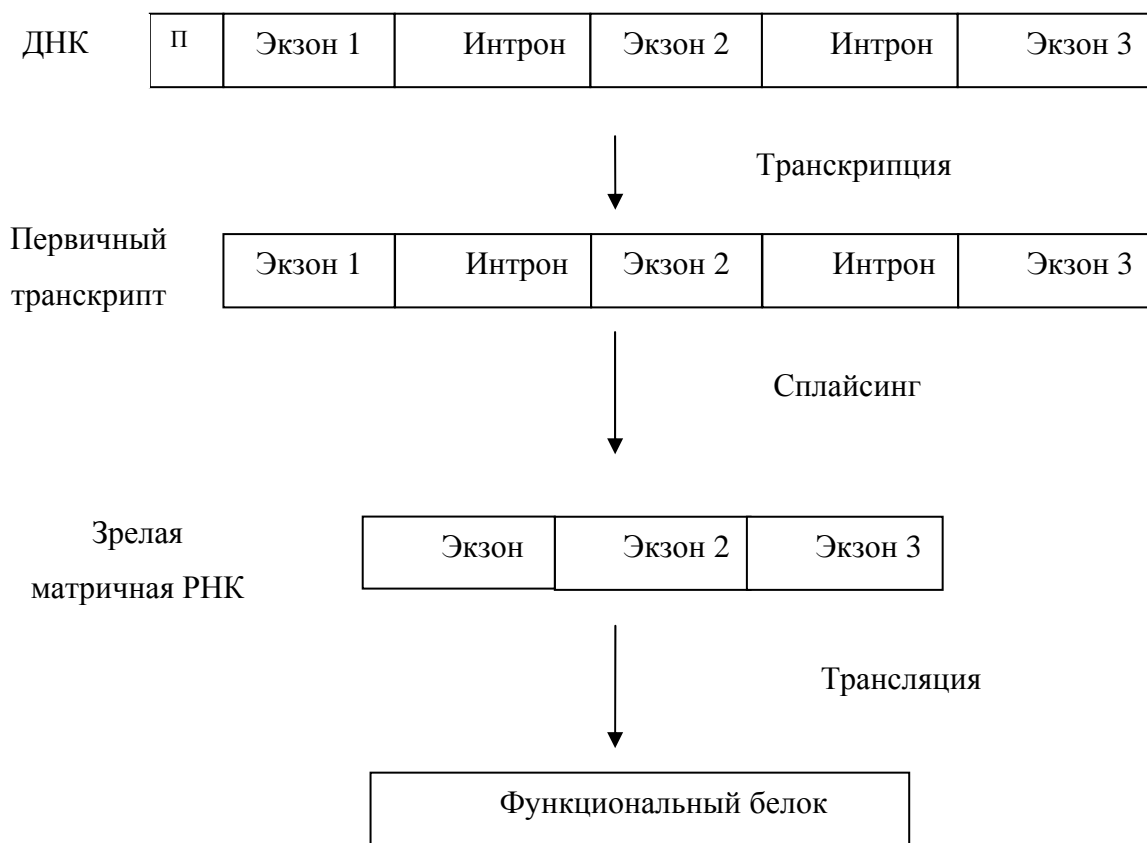


Рис. 2. Схема «работы» имеющего прерывистую структуру гена эукариот.  
Буквой «П» обозначена промоторная область гена.

Однако и эту проблему генным инженерам удалось решить. Здесь помогло открытие еще одного фермента – **обратной транскриптазы (ревертазы)**. Этот фермент был

обнаружен у особых вирусов, генетическая информация которых заключена в молекуле РНК, а не ДНК.

Вирусы являются особой неклеточной формой живых существ, паразитирующих в клетках других организмов. Они представляют собой одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, заключенных в белковую оболочку, которая называется капсид. Способ существования вирусов заключается в следующем. Вирусная частица проникает в клетку организма, являющегося для этого вида вирусов хозяином, после чего капсид вируса разрушается, а закодированная в нуклеиновой кислоте вируса генетическая информация реализуется. Результатом этого является перестройка жизнедеятельности клеток хозяина – они начинают синтезировать не свои, а вирусные белки и нуклеиновые кислоты, и через некоторое время внутри каждой инфицированной вирусом клетки формируется несколько сотен новых вирусов. Далее эти вирусы освобождаются из клетки либо путем ее разрушения, либо путем отпочковывания от ее поверхности и проникают в новые клетки этого же организма.

В тех случаях, когда нуклеиновой кислотой вируса является ДНК, описанный путь размножения вируса начинается сразу же после освобождения ДНК из капсида. У РНК-содержащих вирусов этому процессу обязательно предшествует еще один - на нити вышедшей из капсида РНК строится комплементарная ей нить ДНК, которая затем достраивается до обычной двунитевой молекулы. И далее уже с этой двунитевой ДНК осуществляется транскрипция, и тем самым запускается процесс размножения вируса. Такой процесс синтеза ДНК на матрице РНК осуществляется за счет имеющихся в капсидах РНК-содержащих вирусов молекул фермента, называемого РНК-зависимая ДНК-полимераза. Поскольку построение ДНК на матрице РНК по сути своей является противоположным транскрипции процессом, этот фермент и называют обратной транскриптаза или коротко – ревертаза.

Как и другие ферменты, обратная транскриптаза способна проявлять свою каталитическую активность *in vitro*, поэтому в генетической инженерии для клонирования имеющих экзонно-интронную структуру генов эукариот поступают следующим образом. Сначала из клеток выделяют зрелую матричную РНК, появляющуюся в клетке при функционировании выбранного для клонирования гена. Как вы уже знаете, такая РНК содержит только соответствующие экзонам нуклеотиды, то есть фактически кодирует аминокислотную последовательность нужного белка. Затем с помощью обратной транскриптазы проводят реакцию синтеза ДНК на матрице этой РНК. Полученные таким образом молекулы (их принято называть комплементарными ДНК или сокращенно

кДНК) объединяют с промотром какого-нибудь прокариотического гена и вводят путем лигирования в состав плазмиды-вектора по уже знакомой вам схеме. После трансформации такой векторной ДНК бактерий в их клетках будет продуцироваться эукариотический белок.

**Вопросы к § 6.** **1.** Зачем нужны промоторные области в генах? **2.** Чем отличаются промоторы про- и эукариотических генов? **3.** Чем отличаются структурные части про- и эукариотических генов? **4.** Почему при клонировании некоторых генов эукариот приходится использовать обратную транскриптазу? **5.** Что такое кДНК?

## **§ 7. Особенности методического арсенала современной генетической инженерии.**

### **Полимеразная цепная реакция**

Теперь, когда вы уже знаете об основных принципах клонирования генов, следует остановиться на том, как развивались и совершенствовались методы, позволяющие использовать эти принципы.

Несмотря на то, что при описании генно-инженерных манипуляций с генетическим материалом почти всегда говорят так, будто речь идет об одной молекуле (например, «...плазида была рестрицирована с помощью фермента BamHI...» или «...фрагмент ДНК человека был интегрирован в плазмиду рBR322...»), под эти всегда подразумевается проведение химических реакций, в которых участвуют как минимум десятки или сотни тысяч молекул. основополагающим фактором, обеспечивающим успех таких реакций, является уровень чистоты участвующих в реакциях соединений. Поэтому можно без преувеличения сказать, что современная молекулярная биология и генетическая инженерия – это, по сути, тонкая препаративная биохимия.

С одной стороны, применяемые в генетической инженерии ферменты – это белки со сложной пространственной структурой и высокой чувствительностью к условиям среды. Источником ферментов являются клетки живых организмов, состоящие из огромного множества различных молекул, в том числе и белковых. А для успешной работы они должны быть не только гомогенными и максимально очищенными препаратами, но и сохранять свою каталитическую активность при хранении и использовании. Поэтому для их выделения и очистки используются сложные, длительно протекающие и дорогостоящие химические методы. В середине 70-х годов 20 века первые генные инженеры испытывали в связи с этим значительные трудности, однако за несколько лет возникла и развилась специальная индустрия, предназначенная для обслуживания генно-инженерных работ. В настоящее время специализированные фирмы производят не только



полный набор необходимых ферментных препаратов, но и все остальные химические реактивы, используемые в генно-инженерных и молекулярно-биологических исследованиях. Кроме того, была разработана и производится специальная химическая посуда для проведения реакций в микрообъемах (из-за высокой цены реактивов все реакции стараются проводить с использованием минимальных количеств растворов) и дозаторы (микропипетки), позволяющие набирать растворы в объемах порядка 0,1 микролитра (микролитр – одна миллионная часть литра). Важно, что эта посуда сделана из химически инертных пластиков и используется, как правило, единожды – это позволяет избегать возможных загрязнений и тем самым максимально стандартизировать условия химических реакций.

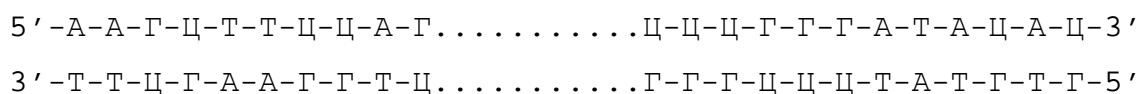
С другой стороны, для успешного клонирования генетического материала необходимо иметь чистые препараты нуклеиновых кислот, выделенные из клеток конкретного вида организмов. Получать такие препараты приходится уже собственно генным инженерам, но в настоящее время для выделения нуклеиновых кислот из клеток животных, грибов, растений или бактерий производятся специальные наборы реактивов и приборы. При этом надо подчеркнуть, что техническое оснащение процессов выделения ДНК или РНК имеет не меньшее значение, чем химическое. На определенных этапах для этих процедур требуются гомогенизаторы тканей, устройства для механического или ультразвукового разрушения клеток, центрифуги с охлаждением, ультратермостаты, приборы для электрофореза и спектрофотометры.

Следует помнить, что нуклеиновые кислоты присутствуют в клетках в очень небольшом количестве, по сравнению, например, с белками или липидами, поэтому получать пригодные для генно-инженерных работ концентрации ДНК или РНК было не просто. Сейчас я с удовлетворением пишу в этом предложении слово «было», поскольку в последнем десятилетии 20-го века в методический арсенал молекулярной биологии и генетической инженерии вошел метод, который позволяет при очень малом количестве исходной ДНК получать нужные фрагменты (фактически, гены) в тех количествах, которые необходимы. Речь идет о так называемой **полимеразной цепной реакции или сокращенно ПЦР**.

Возможность осуществления полимеразной цепной реакции основана на нескольких важных предпосылках. Как известно, ДНК большинства организмов состоит из двух комплементарных друг другу нуклеотидных цепей. Именно благодаря этому в клетках происходит удвоение этих молекул или репликация. Одним из основных ферментов, участвующих в процессе репликации является полимеразы, которая катализирует

образование ковалентных связей между нуклеотидами, благодаря чему и получается нуклеотидная цепь. Как удалось установить, этот фермент может выполнять свою функцию не только в клетке, но и *in vitro*, что и послужило основой для разработки метода ПЦР. Еще одной важной деталью в функционировании полимеразы является то, что она может «строить» новую цепь только начиная от двунитевого участка молекулы ДНК. Кроме того, известно, что водородные связи между азотистыми основаниями нуклеотидов двух цепей исчезают при температурах выше 90 °С и спонтанно, без катализа, образуются при температурах 50- 60 °С.

И еще одна важная деталь – увеличить количество нужного фрагмента ДНК (или, как говорят в молекулярной биологии, амплифицировать фрагмент) возможно только тогда, когда известно расположение 10-15 нуклеотидов в его начале и стольких же в конце. Знать это необходимо для того, чтобы искусственно, химическим путем, синтезировать короткие одностранные цепочки ДНК, которые называют олигонуклеотидами или праймерами для ПЦР. Праймеров для амплификации одного фрагмента необходимо два и они практически всегда будут разными. Чтобы стало понятнее, о чем идет речь, рассмотрим условный пример. Допустим, в начале и конце фрагмента имеются следующие последовательности:



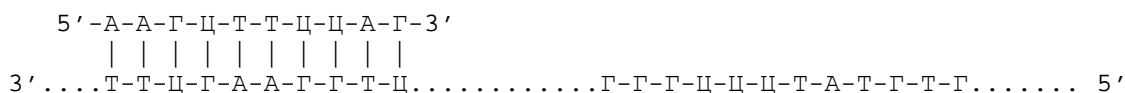
(Здесь и далее точками в наших схематичных изображениях молекул обозначены любые другие нуклеотиды, которые располагаются в этих же цепях).

Тогда праймер для начала будет 5'А-А-Г-Ц-Т-Т-Ц-Ц-А-Г3', а праймер для конца фрагмента будет 3'Г-Г-Г-Ц-Ц-Ц-Т-А-Т-Г-Т-Г5'. Необходимость использования двух праймеров связана с тем, что полимеразы всегда присоединяют новые нуклеотиды только к 3'-концу цепи. Здесь есть резон подчеркнуть, что именно это свойство полимераз и позволяет при проведении ПЦР направленно проводить многократное копирование только нужного фрагмента.

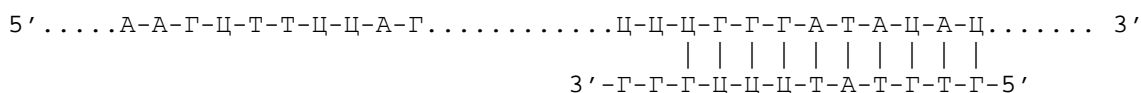
Как же это происходит? Для начала надо иметь хотя бы одну двунитевую молекулу той ДНК, фрагмент которой необходимо амплифицировать. Очень важно также, чтобы в исходном препарате была ДНК только изучаемого организма, поскольку для полимеразы безразлично, какая ДНК служит матрицей для образования новой цепи. Это обязательно учитывают при выделении ДНК для проведения ПЦР и стремятся в максимальной степени избежать загрязнения, условно говоря, “чужой” ДНК.

При подготовке смеси для ПЦР объединяют микрообъемы растворов, содержащих: 1) исходную ДНК, 2) первый праймер, 3) второй праймер, 4) смесь всех четырех необходимых для построения ДНК нуклеотидов, 5) ДНК-полимеразу бактерий *Thermus aquaticus* (сокращенно Таq-полимераза) или бактерий *Pyrococcus furiosus* (полимераза Pfu). ДНК-полимеразы именно этих микроорганизмов выбраны отнюдь не случайно – эти бактерии относятся к так называемым термофилам и обитают в воде горячих источников, поэтому все их белки, в том числе и полимеразы, хорошо противостоят тепловой денатурации. Нагревание до 95 °С не изменяет пространственную структуру этих молекул, а 75 °С - оптимальная температура для проявления их полимеразной активности. Для сравнения - применявшаяся в первых экспериментах по разработке метода ПЦР ДНК-полимераза I бактерий *Escherichia coli* при 75 °С полностью и необратимо утрачивает свои свойства.

Полученную смесь подвергают нагреванию до 95 °С, в результате чего водородные связи между азотистыми основаниями нуклеотидов исчезают, и двунитевая ДНК превращается в одонитевую. Затем температуру медленно понижают до 55 °С, при которой вновь образуются водородные связи, что приводит к присоединению праймеров к тем участкам одонитевых молекул ДНК, к которым они комплементарны (на жаргоне молекулярных биологов эту часть реакции называют «отжиг праймеров»). Получаются вот такие молекулы:



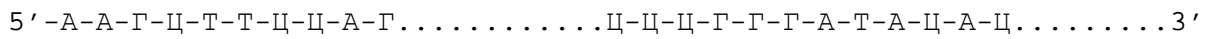
и



Затем температуру повышают до 75 °С, и, поскольку эта температура является оптимальной для присутствующей в этом же растворе полимеразы, происходит присоединение нуклеотидов к 3'-концу праймеров (напомню, что полимеразы всегда начинают работать только от двунитевого участка молекулы). А это означает, что первая из наших молекул становится двунитевой вправо от места присоединения праймера, а вторая – влево.

Когда синтез новых цепей закончен (на это уходит обычно около 3 минут) переходят ко второму этапу (учтите, что вместо слова «этап» в научной литературе при описании ПЦР часто используют слова «раунд» или «цикл»). Для этого смесь снова на короткое время нагревают до 95 °С. При этом все присутствующие в смеси двунитевые молекулы

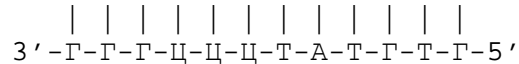
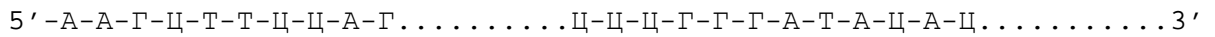
вновь распадаются на одностранные, и тогда появляются молекулы, у которых один конец будет представлен одним из праймеров, а именно:



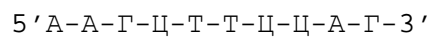
и



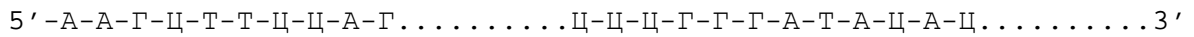
Смесь охлаждают до 55 °С, и праймеры (поскольку они изначально добавлены в избытке) вновь присоединяются к комплементарным им участкам, но уже и на этих новых нитях-матрицах:



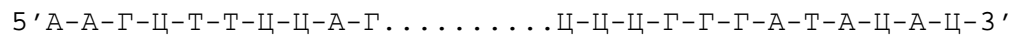
и



Смесь нагревают до 75 °С. Так как и нуклеотиды для синтеза новых цепей добавлены в избытке, а ДНК полимеразы сохраняет свою активность, повторяются все события, уже описанные для первого этапа. В результате этого в конце второго этапа появляются не только молекулы, характерные для первого этапа, но и молекулы



и



Это важнейший момент в понимании того, в чем суть полимеразной цепной реакции. Ведь на третьем этапе (раунде, цикле) при воздействии температуры 95 °С появятся первые одностранные молекулы



и



являющиеся матрицами для синтеза того фрагмента ДНК, который мы и хотим размножить (амплифицировать). В конце третьего этапа этот фрагмент появляется уже как двунитевой, а это значит, что на четвертом этапе нужных одностранных матриц станет больше. И далее, с каждым последующим этапом число нужных нам двунитевых молекул будет нарастать в геометрической прогрессии, за счет чего через 30 этапов их будет в 10<sup>6</sup> раз больше, чем остальных двунитевых молекул ДНК, присутствующих в смеси. Такое

лавинообразное нарастание численности и стало основанием для того, чтобы назвать эту реакцию цепной по аналогии с цепной ядерной реакцией в физике.

Как уже отмечалось выше, эта методика стала широко распространенной именно после направленного поиска продуцентов термостабильных ДНК-полимераз и получения препаратов этих полимераз, пригодных для проведения реакций *in vitro*. До появления полимераз Taq и Pfu необходимо было после каждого этапа заново добавлять полимеразу, что мешало поддерживать температурный режим, увеличивало объем реакционной смеси, определяло время проведения реакции порядка 10 часов. В настоящее время ПЦР, включающую 30-35 этапов (циклов), с использованием специального прибора, позволяющего автоматически по заданной программе нагревать и охлаждать микропробирки с единожды приготовленной смесью для ПЦР (такие приборы называют амплификаторы или термоциклеры), можно провести за 2 с половиной часа.

В целях генетической инженерии амплифицированные фрагменты можно использовать для клонирования. Для этого часть полученной после ПЦР суспензии молекул используют для проведения электрофореза и убеждаются, что в смеси в значительном количестве присутствуют молекулы заданной длины. Затем либо вымывают эти молекулы из геля, либо берут оставшуюся часть раствора с продуктами ПЦР и проводят смешивание и лигирование с заранее подготовленной ДНК плазмиды-вектора.

Помимо генетической инженерии метод ПЦР находит широкое практическое применение в других сферах научной и практической деятельности. В медицине, ветеринарии, в защите сельскохозяйственных растений от болезней с помощью ПЦР можно обнаруживать вирусы, бактерии или другие содержащие ДНК объекты, даже если они присутствуют в исследуемых образцах в таких количествах, которые не детектируются никакими другими методами. Сочетание метода обратной транскрипции (о нем вы уже знаете из предыдущего параграфа) и ПЦР позволяет обнаруживать в исследуемом материале и ничтожно малые количества определенных РНК. В этом случае сначала получают соответствующую искомой РНК кДНК, а затем амплифицируют ее до нужных количеств. Благодаря этому при постановке или подтверждении диагноза можно выявлять не только ДНК-содержащие, но и РНК-содержащие вирусы, вызывающие болезни людей, животных или растений. В криминалистике метод ПЦР позволяет в сочетании с другими методами установить принадлежность исследуемого материала не только конкретному виду организмов, но и конкретному индивидууму.

В научно-исследовательской работе клонирование генов с предварительным использованием ПЦР также получило очень широкое распространение. При исследовании

конкретных организмов ПЦР позволяет быстро клонировать и секвенировать (определять последовательность нуклеотидов) определенные гены и межгенные участки ДНК, что, в свою очередь, дает возможность определять видовую и внутривидовую принадлежность, устанавливать происхождение и эволюционные взаимоотношения для конкретных видов. Благодаря этому современная биологическая систематика все больше и больше превращается в так называемую геносистематику, чему способствует создание общемировых баз данных, доступных для исследователей разных стран через систему Интернет. Кроме того, ПЦР-амплификация, клонирование генов и последующая их экспрессия в клетках микроорганизмов позволяет изучать ранее недоступные для исследования из-за их малого количества белковые молекулы, например, некоторые рецепторы для гормонов или действующие внутри клеток регуляторные белки. И это еще далеко не все возможности, которые открывает ПЦР для современной биологии и медицины.

**Вопросы к § 7. 1.** Почему степень чистоты химических веществ и тщательное соблюдение условий проведения реакций имеют важное значение для генетической инженерии? **2.** Что такое ДНК-полимераза и зачем она нужна генным инженерам? **3.** Чем ДНК-полимераза Taq лучше ДНК-полимеразы *Escherichia coli* для осуществления ПЦР? **4.** Что такое праймеры для ПЦР и почему их нужно два? **5.** Зачем нужно неоднократно нагревать и охлаждать смесь, в которой проводится ПЦР? **6.** На месте преступления обнаружены микроскопические фрагменты кожи преступника. В преступлении подозреваются три человека. Один из них страдает серповидноклеточной анемией, при которой в молекуле гемоглобина шестой аминокислотный остаток - это не остаток валина, а остаток глутаминовой кислоты. Составьте план-схему исследования с применением метода ПЦР, по результатам которого будет обвинен или оправдан один из подозреваемых.

## **§ 8. Особенности методического арсенала современной генетической инженерии.**

### **Современные векторы, улучшенные варианты отбора клонов, электропорация**

Вы уже знакомы с основным принципом клонирования генов и отбора клонов бактерий, обладающих направленно введенной генетической информацией. Описанный в параграфе 5 вариант клонирования с помощью плазмиды pBR322 занимает несколько дней, поскольку основан на первоначальном отборе любых плазмидсодержащих клонов и затем уже поиске среди них клонов, имеющих плазмиду со вставкой. В настоящее время разработаныходы, при которых уже при первом выращивании колоний можно отобрать среди них нужные.

Один из примеров такого подхода является использование в качестве вектора для клонирования плазмид из серии pUC. Эти плазмиды предназначены для клонирования

генов в клетках *Escherichia coli*, но необходимо использовать особые штаммы этих бактерий, у которых удалена из хромосомной ДНК часть лактозного оперона.

Лактозный оперон – это группа генов, кодирующих белки, необходимые для использования бактериями содержащегося в молоке млекопитающих углевода - лактозы. Лактоза представляет собой дисахарид, состоящий из остатков глюкозы и галактозы, и для того, чтобы питаться лактозой, бактериям необходимо сначала разделить эту молекулу на ее составляющие. Сделать это может специальный фермент, который называется  $\beta$ -галактозидаза. Аминокислотная последовательность этого фермента кодируется геном *lacZ*, который входит в лактозный оперон наряду с генами *lacY* и *lacA*.

Главная особенность оперонной структуры в организации генетической информации заключается в следующем. Вы уже знаете из параграфа 6, что гены имеют так называемые промоторные области, без которых невозможна транскрипция. Но у бактерий, которые имеют минимум генетической информации (см. параграф 5), не все гены обладают собственным промотором. Наоборот - большинство прокариотических генов собраны в группы и расположены в этих группах так, что их структурные части фактически примыкают друг к другу. При этом у первого гена в каждой такой группе есть промотор, а вот терминатор транскрипции (последовательность нуклеотидов, которая обеспечивает отделение РНК-полимераза от ДНК) есть только у последнего гена. Поэтому если транскрипция начинается, то получается так называемая полицистронная мРНК, в которой содержится информация сразу о нескольких белках. Эти белки, как правило, нужны для выполнения одной, но жизненно необходимой в данных условиях функции. Например, в лактозном опероне первый ген (*lacZ*) кодирует  $\beta$ -галактозидазу, второй (*lacY*) -  $\beta$ -галактозидпермеазу, а третий ген (*lacA*) -  $\beta$ -галактозид-трансацетилазу. Все эти белки появляются в клетке тогда, когда необходимо питаться лактозой, и отсутствуют тогда, когда в окружающей среде лактозы нет. Таким путем бактериальная клетка «экономит» внутриклеточное пространство и материальные ресурсы, в частности молекулы АТФ и аминокислоты, из которых строятся белки.

Но особенно важно, что транскрипция собранных в один оперон генов может включаться именно тогда, когда это действительно необходимо. Работа различных оперонов регулируется разными путями, но один из путей регуляции активности лактозного оперона использован в плаزمиде серии *pUC*. Как уже указывалось выше, при отсутствии лактозы в окружающей клетку среде транскрипция с промотора *lacP* не происходит. Это связано с тем, что в промоторной области лактозного оперона между местом прикрепления РНК-полимеразы и первым нуклеотидом структурной части гена  $\beta$ -

галактозидазы имеется специальный участок, получивший название оператор и обозначаемый *lacO*. К этому участку может присоединяться специальный белок *LacI*, кодируемый отдельным, не входящим в лактозный оперон геном *lacI*. Этот ген находится рядом с лактозным опероном, но имеет свой собственный промотор. Четыре молекулы (тетрамер) белка *LacI*, присоединенные к оператору, препятствуют транскрипции за счет того, что на пути движущейся по молекуле ДНК РНК-полимеразы возникает механическое препятствие. Таким путем подавляется (репрессируется) активная работа лактозного оперона, поэтому белок *LacI* назвали белок-репрессор.

Для того, чтобы лактозный оперон перешел в активное состояние, необходимо отсоединение тетрамера *LacI* от оператора. Это происходит при взаимодействии с белком-репрессором углеводов молекул, относящихся, как и лактоза, к  $\beta$ -галактозидам. Более того, если молекула репрессора связана с  $\beta$ -галактозидом, она уже не может присоединяться к ДНК. Фактически, лактоза и схожие с ней по химической природе молекулы обеспечивают включение лактозного оперона в работу (индуцируют его активность), поэтому их называют индукторами. В свою очередь, опероны, которые переходят в активное состояние только при наличии индуктора, называют индуцибельными оперонами.

Для бактериальной клетки это очень хороший путь регуляции – сама лактоза, которой можно питаться, включает в клетке систему, которая для этого питания нужна. Пока лактозы много, все вновь образующиеся молекулы белка-репрессора *LacI* (а ген *lacI*, имея собственный промотор, активен постоянно) связываются с ней и, следовательно, не могут связаться с оператором лактозного оперона. Когда все молекулы лактозы будут использованы для питания, новые молекулы репрессора останутся без нее, присоединяться к оператору, и лактозный оперон выключиться. И правильно, зачем синтезировать те белки, которые сейчас не нужны?

Вот теперь, когда вы уже знаете про этот путь (кстати, лишь один из нескольких из уже открытых путей регуляции жизнедеятельности клетки), можно посмотреть, как его использовали в генетической инженерии.

При создании плазмид серии *pUC* в стандартную маленькую плазмиду, обладающую точкой начала репликации и геном устойчивости к ампициллину, встроили фрагмент хромосомной ДНК *Escherichia coli*. В этом фрагменте имеется ген *lacI* с собственным промотором, промотор лактозного оперона *lacP*, оператор и часть структурной последовательности гена *lacZ*. Важно подчеркнуть, что для целей генетической инженерии этот фрагмент немного изменили (модифицировали). Модификация



заключалось в том, что между оператором и началом структурного гена вставили короткую последовательность, содержащую сайты узнавания для 14 рестриктаз (EcoRI, SacI, KpnI, XmaI, SmaI, BamHI, XbaI, SalI, HincII, AccI, PstI, BspMI, SphI, HindIII). Такие последовательности в генетической инженерии и молекулярной биологии называют полилинкерами и их существует в настоящее время несколько разновидностей, отличающихся набором сайтов для рестриктаз. Необходимость использования разных полилинкеров при создании плазмид-векторов различного назначения объясняется тем, что во всей остальной части плазмиды не должно быть таких же сайтов, как в полилинкере. Говоря по-другому, все входящие в полилинкер сайты для рестриктаз должны быть в ДНК этой плазмиды-вектора единственными (уникальными). Только в этом случае клонируемый фрагмент будет встраиваться туда, куда надо. И еще одна важная особенность - наличие полилинкера в этом месте фрагмента не влияет на обычный характер работы лактозного оперона.

Первые этапы клонирования с использованием векторов pUC ничем не отличаются от обычных. ДНК, являющуюся источником клонируемого фрагмента, и ДНК плазмиды pUC обрабатывают одной из перечисленных выше 14-ти рестриктаз. Затем полученные рестрикты смешивают, проводят лигирование и трансформацию клеток специального штамма *Escherichia coli* из серии XL-Blue, у которых в хромосомной ДНК отсутствует находящийся в плазмиде фрагмент лактозного оперона.

После трансформации бактерии высевают на плотную питательную среду, содержащую 1) антибиотик ампициллин, 2) изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (сокращенно ИПТГ), 3) 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид (сокращенно X-Gal). Каждый из этих компонентов среды имеет свое назначение.

Ампициллин обеспечивает размножение только тех клеток, которые в результате трансформации получили плазмиду.

ИПТГ проникает в плазмидосодержащие клетки и, будучи  $\beta$ -галактозидом, взаимодействует с белком-репрессором LacI, что приводит к отсоединению репрессора от оператора. В результате этого начинается транскрипция находящегося на плазмиде фрагмента лактозного оперона и в клетках появляется фермент  $\beta$ -галактозидаза. Говоря коротко, ИПТГ – это индуктор для лактозного оперона, причем на среде с ИПТГ лактозный оперон «включается» в несколько раз быстрее, чем на среде с лактозой. И еще важно, что этот  $\beta$ -галактозид, в отличие от лактозы,  $\beta$ -галактозидазой не расщепляется, и, следовательно, лактозный оперон на такой среде все время будет находиться в дерепрессированном состоянии.

X-Gal же, в отличие от ИПТГ, является субстратом для  $\beta$ -галактозидазы, но при воздействии на него этого фермента он из бесцветного вещества превращается в вещество голубого цвета, которое дальше клетками не используется. Поэтому продуцирующие  $\beta$ -галактозидазу клетки образуют на этой среде голубые колонии.

А теперь самое важное: если при лигировании между промотором и началом структурной части гена  $\beta$ -галактозидазы (а именно здесь, как вы помните, и находится полилинкер!) встроился клонируемый отрезок ДНК, в трансформированных клетках не появляется  $\beta$ -галактозидаза. А это значит, что вещество голубого цвета в клетках не образуется, и колонии, клетки которых имеют плазмиду со встроенным геном, будут не голубыми, а белыми. То есть сразу же, при первом высеве трансформированных клеток, вы легко отличаете нужные колонии от ненужных! Именно поэтому векторы серии pUC получили в настоящее время наиболее широкое распространение.

Входящие в серию варианты плазмид отличаются друг от друга либо полилинкерами, либо генами антибиотикорезистентности, что дает возможность клонировать очень широкий спектр фрагментов ДНК из различных организмов. ДНК всех этих вариантов; штаммы бактерий, предназначенные для использования конкретного варианта; соответствующие антибиотики, X-Gal и ИПТГ производятся и продаются специализированными фирмами. Это дает возможность в настоящее время проводить клонирование и последующие этапы генно-инженерных работ с меньшими затратами времени и большей эффективностью, чем в 90-х годах 20-го века.

Улучшились также и методы введения нужных молекул ДНК в клетки. В отдельных случаях именно этап трансформации клеток бактерий, грибов, растений или трансфекции клеток животных являлся камнем преткновения в молекулярно-биологических и генно-инженерных исследованиях. В настоящее время эффективность этого этапа значительно повышена в результате разработки и применения так называемой электропорации. Суть этого приема заключается в применении кратковременного, длящегося миллисекунды воздействия постоянного электрического тока на клетки, находящиеся в растворе молекул ДНК. Считается, что электрический импульс вызывает образование в мембранах клеток существующих мгновения пор, что и позволяет довольно крупным молекулам ДНК проникать в цитоплазму, после чего мембрана восстанавливает свое прежнее состояние. Несмотря на то, что часть клеток при таком воздействии гибнет, выжившие клетки практически все оказываются трансформированными.

Работающим над усовершенствованием метода электропорации молекулярным биологам, физикам и инженерам удалось подобрать оптимальные условия подготовки

клеток, режимы воздействия тока и сконструировать соответствующие приборы (электропораторы) для работы с клетками различных организмов. Поэтому в настоящее время имеется возможность вводить молекулы ДНК практически в любые клетки.

**Вопросы к § 8.** **1.** Что такое оперон и как он организован? **2.** Что такое оператор и зачем он нужен в опероне? **3.** Какие опероны называют индуцибельными? **4.** Фрагмент какого оперона использован в плазидах серии рUC? **5.** Какие вещества и зачем добавляют в питательную среду при использовании плазмид серии рUC? **6.** Что такое полилинкер? **7.** Что такое электропорация и для чего она нужна?

### **§ 9. Создание и области применения трансгенных бактерий**

В конце двадцатого века организмы, искусственно получившие не свойственную им изначально наследственную информацию, стали называть трансгенными или просто трансгенами. Теперь вы уже знаете, как можно ввести в бактерии новую для них генетическую информацию. Однако возникает резонный вопрос: «А кому нужны такие «ненормальные» бактерии?»

Ясно, что, создавая новые штаммы, ученые стремятся так подобрать вводимую наследственную информацию, чтобы выращиваемые бактерии приносили как можно больше пользы. И прежде всего это касается такой отрасли биотехнологии как микробиологическая промышленность, которая существовала еще до появления генетической инженерии. Уже в 50-60-ых годах двадцатого века из биомассы выращиваемых в специальных установках (ферментерах) бактерий получали аминокислоты, в том числе и незаменимые (вспомните из курса 9 класса «Человек и его здоровье» что это такое), витамины, некоторые трудно синтезируемые в искусственных условиях органические кислоты, полисахариды, красители. Используемые для таких целей штаммы-продуценты раньше отбирали среди обычных бактерий и далее улучшали их производственные характеристики путем искусственного мутагенеза. Теперь же с помощью генно-инженерных методов удается объединить в клетках продуцентов несколько свойств, присущих различным бактериям, и тем самым сделать производство более рентабельным.

Один из примеров – это получение бактерий, способных продуцировать нужный для окрашивания тканей краситель синего цвета индиго (именно им окрашивают всеми любимые джинсы). Ранее этот краситель получали путем химического синтеза, но путем переноса генов из бактерий рода *Pseudomonas* в клетки кишечной палочки (*Escherichia coli*) получили бактерии, способные превращать аминокислоту триптофан в индиго.

Еще один пример – это создание нового штамма-продуцента особого полисахарида ксантана, который используется как загуститель в производстве косметики (например, кремов для бритья) и особо стойких к истиранию красок (например, используемых для нанесения разметки на асфальтовые покрытия на улицах и автострадах). Ранее для выращивания продуцента ксантана - бактерий рода *Xanthomonas* использовали в качестве питательного вещества глюкозу. Теперь же получен штамм-продуцент, который можно выращивать на отходах пищевой промышленности – молочной сыворотке. Это было сделано путем переноса в бактерии *Xanthomonas*, не способные изначально питаться молочным сахаром – лактозой, генов из кишечной палочки, нужных для использования лактозы в качестве питательного вещества. Обычно при масштабном производстве сыра и творога большую часть образуемой сыворотки выливают в канализацию, загрязняя тем самым водоемы и грунтовые воды. Используя же такой штамм-продуцент, можно получить двойную выгоду – сэкономить ценную глюкозу и защитить окружающую среду от загрязнения.

Созданы трансгенные штаммы бактерий и непосредственно для борьбы с загрязнением среды химическими веществами или нефтью, для чего в клетки таких штаммов вводят гены, кодирующие разрушающие вредные вещества ферменты. Нанесение таких бактерий на поверхность возникающих при авариях танкеров нефтяных пятен позволяет разрушить значительную часть нефти еще до достижения пятном берега и предотвратить или хотя бы снизить степень загрязнения прибрежных зон и побережья. С помощью подобных бактерий возможно также проводить очистку почв, загрязненных отходами химической промышленности или в результате длительного употребления пестицидов.

Важными являются и трансгенные бактерии, с помощью которых получают необходимые для получения рекомбинантных молекул ДНК ферменты – рестриктазы, ДНК-полимеразы, лигазы, обратные транскриптазы, о которых вы уже знаете из предыдущих параграфов. Особенно это касается двух последних групп ферментов, поскольку кодирующие их гены являются генами вирусов и получать их из вирусов сложно и экономически не выгодно. Таким образом продукты генетической инженерии обеспечивают прогресс самой этой отрасли.

Генетическая инженерия позволяет использовать бактерии и в несколько необычном качестве. Например, получены штаммы бактерий, дающие снег для лыжных трасс при температурах выше нуля. Для этого были клонированы и поставлены под более сильные промоторы гены некоторых видов бактерий, которые кодируют белок, вызывающий замерзание воды при температуре +2 - +4 °С. Разбрызгивание суспензии таких

трансгенных бактерий с помощью «снежных пушек» при плюсовой температуре над трассами позволяет справиться с капризами погоды.

Еще одно достижение генетической инженерии - это получение на основе бактерий продуцентов таких органических веществ, которые вообще не способны синтезироваться прокариотическими организмами. Такие бактерии получают путем введения в их клетки генетических конструкций, состоящих из генов или соответствующих зрелым матричным РНК кДНК из клеток растений, животных или человека и промоторных областей какого-либо бактериального гена. Помимо уже упоминавшегося гормона поджелудочной железы инсулина с помощью трансгенных штаммов бактерий получают гормоны гипофиза (соматотропин и тиреотропин), гормон щитовидной железы кальцитонин, интерфероны человека и животных, интерлейкины человека, факторы VIII и IX из системы белков свертывания крови и некоторые другие имеющие медицинское применение препараты.

Ранее такие препараты невозможно было получать в достаточных количествах, поскольку их источником могла быть только донорская кровь людей. Благодаря успехам генетической инженерии врачи получили возможность оказывать эффективную помощь страдающим тяжелыми заболеваниями людям. Так, факторы свертывания крови помогают при гемофилии, кальцитонин – при нарушениях минерализации костной ткани у взрослых (остеопорозе) и рахите у детей, интерфероны – при различных вирусных заболеваниях и рассеянном склерозе, интерлейкины - при различных нарушениях в работе иммунной системы, тиреотропин – при заболеваниях щитовидной железы.

Трансгенные бактерии находят применение не только в промышленности, но и в научных исследованиях. Одним из примеров может быть создание генетических конструкций, позволяющих следить за перемещениями и распространением бактерий-паразитов в организме хозяина. В частности, для изучения болезней растений в фитопатогенные бактерии вводят ген так называемого зеленого светящегося белка GFP (от англ. green fluorescent protein). Этот ген был клонирован из ДНК медузы *Aequorea Victoria* и объединен с промоторной областью одного из генов кишечной палочки. При введении такой конструкции в бактериальные клетки в них синтезируется и накапливается белок, который при воздействии на него ультрафиолетового излучения сам начинает испускать свет с длиной волны, соответствующей зеленому цвету. Если такими бактериями заразить растение и затем через определенные промежутки времени облучать такое растение ультрафиолетом в темноте, можно увидеть, насколько быстро и по каким тканям растения перемещаются бактерии от места их введения.

**Вопросы к § 9. 1.** Подумайте, каким образом методами генетической инженерии можно повысить количество синтезируемого бактериями конкретного белка? **2.** Известно, что для синтеза определенного вещества у бактерий имеется оперон и его активность контролируется белком-репрессором. Что, по вашему мнению, можно сделать с помощью генетической инженерии, чтобы повысить выход этого вещества при промышленном выращивании этих бактерий? **3.** Для получения вакцин из группы анатоксинов необходимо выращивать в промышленных условиях опасных возбудителей инфекционных заболеваний, чтобы наработать их токсины и затем превращать их в вакцины. Меры безопасности на таких предприятиях требуют больших финансовых вложений. Чтобы вы предложили сделать методами генетической инженерии для удешевления производства вакцин?

### **§ 10. Получение трансгенных грибов и их применение**

В экспериментах по созданию бактериальных продуцентов эукариотических белков выяснилось, что некоторые белки человека и животных, продуцируемые в прокариотических клетках, не полностью соответствуют таковым, синтезируемым в исходном эукариотическом организме, и вследствие этого не могут выполнять свою функцию. Дело в том, что многие белки эукариот после их синтеза на рибосомах должны претерпевать дополнительные химические изменения, так называемые **посттрансляционные модификации**. Как правило, это присоединение к определенным входящим в белок аминокислотам других молекул, например, глюкозы (гликозилирование), групп  $\text{CH}_3$  (метилование), остатков фосфорной кислоты (фосфорилирование) и т.п. Кроме того, некоторые эукариотические белки в клетках прокариот не могут приобрести третичную структуру, так как для образования нужных для формирования третичной структуры дисульфидных связей необходимо присутствие особых, эукариотических вариантов ферментов дисульфидизомераз. Поэтому для получения таких белков начали использовать не бактерии, а эукариотические микроорганизмы - дрожжи.

Основаниями для этого стали следующие особенности дрожжей. Хотя для грибов неизвестен природный способ обмена генетической информацией, подобный трансформации у бактерий, в дрожжевые клетки можно при определенных условиях эффективно вводить молекулы ДНК. Несмотря на наличие характерной для грибов плотной клеточной стенки из хитина, при обработке клеток дрожжей ацетатом лития в растворе, содержащем высокие концентрации нужной ДНК, происходит их трансформация. Кроме того, можно путем воздействия определенных ферментов (хитиназ и гемицеллюлаз) можно получать лишенные клеточной стенки дрожжевые клетки, которые называют дрожжевыми протопластами. Для поддержания протопластов в

жизнеспособном состоянии приходится использовать так называемые гипертонические растворы, в которых поступление воды в клетку ограничено, но и в таком растворе протопласты дрожжей воспринимают ДНК с эффективностью, сопоставимой с таковой для искусственной трансформации бактерий. После трансформации протопласты переносят в условия, в которых клеточная стенка восстанавливается и отбирают клетки, несущие дополнительную генетическую информацию. Плюс к этому, возможно применение уже знакомого вам метода электропорации для получения трансгенных дрожжей.

Особенно важно, что в клетках дрожжей, помимо типичных эукариотических хромосом, имеются кольцевые молекулы ДНК – плазмиды. Наиболее изученным в культуральном и физиологическом отношении видом дрожжей являются пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, что связано с практикой применения культур этого вида в биотехнологических процессах (хлебопечение и производство спирта). Генетический аппарат и особенности размножения этих грибов также детально изучены, поэтому основой для разработки векторов для генетической инженерии дрожжей стали так называемые двухмикронные плазмиды *Saccharomyces cerevisiae* (сокращенно 2мкм-плазмиды).

**Для введения в дрожжевые клетки стабильно наследуемой чужеродной генетической информации используют три основных подхода.** Первый заключается в использовании системы автономной репликации 2 мкм-плазмид. Поскольку все основные манипуляции по комбинированию нужных последовательностей ДНК оптимально производить в клетках *E.coli*, получены стандартные дрожжевые векторы, включающие как обязательные компоненты сайт начала репликации в прокариотических клетках (участок *oriV* из плазмиды pBR322) и сайт инициации репликации в клетках дрожжей (обычно для этого используют фрагмент 2 мкм-плазмиды). Такие искусственно созданные плазмиды называют векторами челночного типа, так как они могут, условно говоря, переходить из бактерий в дрожжи и потом опять возвращаться, подобно тому, как космический корабль из серии «Шаттл» возвращается с орбиты на Землю.

Селективным маркером для поддержания вектора в бактериальных клетках является ген ампициллинрезистентности из pBR322, а в качестве такого же маркера для поддержания в дрожжевых клетках используют, как правило, какой-либо дрожжевой ген биосинтеза той или иной аминокислоты (лейцина, гистидина, триптофана) или азотистого основания (урацила). Естественно, что в этом случае в качестве трансформируемых

дрожжевых культур используют соответствующего мутанта, дефектного по такому же гену.

Кроме того, конечно же, вектор должен иметь какой-либо полилинкер, т. е. короткую последовательность с уникальными сайтами рестрикции для улучшения условий введения нужных последовательностей ДНК в состав векторной молекулы. В таких плаزمидях последовательность полилинкера находится между промотором и терминатором какого-нибудь дрожжевого гена. Терминатор – это последовательность ДНК, которая находится в конце структурной части эукариотических генов и является сигналом для окончания транскрипции. Такое расположение полилинкера обеспечивает для встроенной структурной части любого другого гена (например, из бактерий или из человека) условия для правильной транскрипции в клетках дрожжей. Как правило в таких плазмидях используют так называемые сильные дрожжевые промоторы, которые обеспечивают высокий уровень транскрипции и в целом выражения (экспрессии) введенного чужеродного гена. Поэтому такие плазмиды в молекулярной биологии дрожжей называют **эписомные экспрессирующие векторы**.

Однако при промышленном применении сконструированных таким образом штаммов выявился существенный недостаток – при длительном и масштабном (в емкостях более 10 литров) клетки начинают терять плазмиду. Поэтому на основе эписомных векторов были сделаны векторы, обеспечивающие встраивание вводимого фрагмента ДНК в ДНК дрожжевых хромосом, так называемые **интегрирующие векторы**. Отличие таких молекул заключается в том, что в их состав вводятся последовательности какого-либо известного хромосомного гена либо как единый фрагмент, либо в виде двух фрагментов, окаймляющих предназначенную для введения в геном дрожжей последовательность. В качестве примеров таких векторов наиболее часто упоминают конструкции, разработанные для другого вида дрожжей - *Pichia pastoris*.

Дело в том, что широкое применение *Saccharomyces cerevisiae* в практической биотехнологии показало как наличие некоторых проблем в культивировании трансгенных дрожжей этого вида, так и довольно высокую стоимость получаемых на их основе препаратов. Поэтому уже давно в поле зрения «грибных» генных инженеров находятся другие виды – *Schizosaccharomyces pombe* (интересны тем, что не почкуются, а делятся, а это имеет значение при промышленном культивировании) и способные утилизировать относительно дешевые субстраты в качестве источников углерода и энергии *Yarrowia lipolytica* (растет на алканах – отходах переработки нефти), *Hansenula polymorpha* и *Pichia pastoris* (метанолутилизирующие дрожжи). Существенно также и то, что эти виды



дрожжей отличаются от *Saccharomyces cerevisiae* и друг от друга системами посттрансляционной модификации белков и системами их секреции. Это позволило подобрать оптимальные условия для получения некоторых белков животных и человека, продукцию которых не удавалось получить в стандартных штаммах пекарских дрожжей.

Один из вариантов интегрирующих векторов *Pichia pastoris* в качестве обеспечивающих рекомбинационное встраивание последовательностей содержит начало и конец гена алкогольоксидазы 1 (у дрожжей этого вида образуются две алкогольоксидазы – 1 и 2, первая из них является основной, вторая – вспомогательной, но в норме их совместное действие и позволяет клеткам активно использовать метанол для питания. Замена одного из генов на вставку несколько снижает скорость роста на метаноле, но это снижение не сильно сказывается на промышленном культивировании таких штаммов. Существенно также и то, что оба эти гена экспрессируются наиболее активно именно в присутствии метанола как индуктора, т.е. имеют так называемые метанолиндуцируемые промоторы). Первый фрагмент гена алкогольоксидазы 1 (5'-фрагмент) одновременно является и промотором для вводимого в геном дрожжей гена.

Суть так называемого рекомбинационного встраивания заключается в следующем. После попадания такой плазмиды в ядро дрожжевой клетки, она может контактировать с тем участком хромосомы дрожжей, в котором располагается ген алкогольоксидазы 1. При таком контакте участки этого гена, находящиеся на плазмиде, тесно сближаются с такими же участками на хромосоме. В этих местах может происходить разрыв ДНК плазмиды и ДНК хромосомы, а затем их воссоединение, но таким образом, что фрагмент плазмиды окажется в составе хромосомной ДНК. Вероятнее всего, здесь срабатывает характерная для эукариот способность к кроссинговеру между копиями дочерних хромосом при мейозе, о которой вы уже должны знать из школьного курса биологии (вспомните опыты Томаса Моргана с мухами-дрозофилами). Естественно, что такие события случайны и происходят с очень низкой частотой, но, применяя специальные способы отбора, можно отобрать те клетки дрожжей, в которых такое встраивание произошло. Размножая такие клетки, получают штамм, у которого введенная генетическая информация уже не будет утрачиваться даже при длительном и масштабном культивировании. Недостатком таких штаммов является не достаточно высокий для промышленности выход чужеродного белка, что связано с тем, что в клетках присутствует только одна копия клонированного гена, а не несколько, как при использовании эписомных экспрессирующих векторов.

Еще один стабильный вариант наследования чужеродной генетической информации получил название «искусственная дрожжевая хромосома» или на жаргоне генных

инженеров – «як» (от английской аббревиатуры YAC – Yeast Artificial Chromosome). Этот вариант векторных молекул разработан для *Saccharomyces cerevisiae* и используется для вставок больших (длиной более 100 т.п.н.) фрагментов ДНК. Для получения промышленных штаммов дрожжей такие варианты не находят широкого применения, но зато широко применяются для изучения ДНК высших эукариот, включая человека. В частности, секвенирование генома *Homo sapiens* в рамках соответствующей долголетней международной программы осуществлялось с использованием YAC.

В упрощенном виде плазида для получения искусственных дрожжевых хромосом (pYAC) состоит из нескольких обязательных фрагментов:

1) фрагмент уже известной вам плазмиды pBR322, содержащий точку начала репликации в бактериях *E. coli* и ген устойчивости к ампициллину;

2) последовательность, обеспечивающую автономную репликацию линейных молекул в клетках дрожжей;

3) последовательность, соответствующая центромерной области дрожжевой хромосомы;

4) два дрожжевых гена биосинтеза аминокислот или азотистых оснований (например, триптофана и урацила), расположенные по разные стороны от центромеры (такое расположение обеспечивает отбор только тех клеток, в которых будут молекулы, несущих оба плеча этой искусственной хромосомы);

5) две теломерные области дрожжевой хромосомы;

6) находящийся между центромерной и теломерной последовательностями уникальный сайт рестрикции (например, для *SmaI*);

7) два тоже уникальных (т.е. нигде более в этой плазмиде не встречающихся) сайта рестрикции для другой рестриктазы, располагающиеся по обращенным друг к другу концам теломерных областей (например, *BamHI*-сайты).

ДНК такой плазмиды, наработанная в *E. coli*, подвергается обработке рестриктазой *BamHI*, а затем щелочной фосфатазой (последнее необходимо, чтобы не образовывались вновь кольцевые молекулы – щелочная фосфатаза отщепляет фосфатные группы с 5'-концов, а без них ДНК-лигаза не соединяет молекулы). В результате этого получают не кольцевые молекулы ДНК, а линейные, по концам которых располагаются теломеры. Затем такую ДНК обрабатывают рестриктазой *SmaI* и смешивают с ДНК организма, последовательности которого хотят клонировать в дрожжах, обработанной этой же рестриктазой. В результате лигирования получают линейные молекулы с теломерными последовательностями по концам и центромерой, которые после введения в клетки

дрожжей, дефектных по тем генам синтеза аминокислот или оснований, которые имеются в плазмиде, поддерживаются как автономные хромосомы. Отбор обеспечивается появлением у трансформированных клеток способности расти на среде без триптофана и урацила, а для подтверждения наличия вставки часто используют какой-либо маркерный ген, продукт которого дает цветную реакцию. В этом случае такой ген располагается так, чтобы вставка по уникальному сайту нарушала его рамку считывания, и на специальной среде отбираются неокрашенные колонии. С этим принципом вы уже знакомы на примере применения фрагмента лактозного оперона в бактериальных плаزمиде серии pUC, описанном в параграфе 8.

Таким образом, высокая степень изученности физиологии и в особенности генетической организации дрожжей, создание на этой основе эффективных систем введения и экспрессии генетической информации обусловило наиболее широкое практическое применение именно дрожжевых трансгенных организмов. Кроме того, вещества, получаемые с помощью трансгенных дрожжей, не рассматриваются как потенциально опасные с точки зрения генетической безопасности, поскольку вид *Saccharomyces cerevisiae* обозначен соответствующими органами контроля США и ряда других стран как GRAS – generally recognized as safe, а это значит, что нет необходимости получать специальное разрешение на выпуск и распространение получаемых продуктов. На начало 21-го века с помощью дрожжей производили используемые в качестве вакцинных препаратов поверхностный антиген вируса гепатита В и белок малярийного плазмодия, используемые в качестве диагностических препаратов белок вируса гепатита С и антигены вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1, используемые в качестве лекарственных средств антитрипсин (лечение эмфиземы легких), фактор роста эпидермиса (лечение ожоговых ран), фактор XIIIa из системы свертывания крови (помощь при гемофилии). В настоящее время количество получаемых с помощью трансгенных дрожжей белков других организмов продолжает неуклонно расти.

Поскольку для выращивания дрожжей в промышленных условиях можно использовать не только имеющие пищевую ценность углеводы (например, глюкозу или крахмал), но и такие соединения как метиловый спирт или углеводороды нефти, открываются перспективы сделать такие биотехнологические производства ещё более выгодными экономически.

**Вопросы к § 10. 1.** В чем преимущество дрожжей над бактериями при применении их в качестве продуцентов эукариотических белков? **2.** Как можно встроить клонированный ген в хромосому дрожжей? **3.** Что такое YAC и зачем они нужны? **4.** Как вы думаете, зачем в искусственной дрожжевой хромосоме

нужна центромерная последовательность? **5.** Почему при клонировании генов в дрожжах *Hansenula polymorpha* и *Pichia pastoris* используют промоторы гена алкогольоксидазы?

### **§ 11. Кто был самым первым генным инженером?**

Чтобы ответить на вынесенный в название параграфа вопрос, нам придется отвлечься и окунуться в такую область биологии, как фитопатология. Эта отрасль науки занимается изучением болезней растений, прежде всего сельскохозяйственных, и организмов, эти болезни вызывающих. Таких микроорганизмов известно не мало, но есть среди них один особенный. Называется он *Agrobacterium tumefaciens* или по-русски агробактерия опухоль образующая. При заражении растения такими бактериями в месте их внедрения (обычно это нижняя часть стебля) в результате усиленного деления растительных клеток образуется опухоль, называемая корончатый галл.

У растений деление клеток зависит от количества определенных веществ – фитогормонов, и обычно эти гормоны образуются верхушечными почками и распределяются по остальным органам растения так, чтобы каждая часть растения росла и развивалась в соответствии с особенностями данного вида растений. В случае же образования вызванной присутствием агробактерий опухоли фитогормоны образуются самими опухольными клетками, что и заставляет их делиться вне зависимости от фитогормонов, поступающих от верхушечных почек. Причем это свойство образовывать фитогормоны сохраняется у клеток опухоли и после удаления из растения бактерий, вызвавших такое изменение. Детальное изучение опухольных клеток и обычных клеток стебля таких растений показало, что в хромосомах клеток опухоли присутствуют дополнительные участки молекул ДНК, которые в обычных клетках обнаружить не удастся. Сравнение таких участков ДНК с молекулами ДНК агробактерий позволило установить, что эти участки действительно передаются из клеток бактерий в растительные клетки, причем в бактериальных клетках они находятся в составе специальных плазмид, называемых Ti-плазмидами (от англ. tumor inducing – индуцирующий опухоль). Тот участок Ti-плазмиды, который переносится из агробактерий в хромосомы растений, получил название T-ДНК (от англ. transfer – переносить, перемещать).

В T-ДНК располагается 2 группы генов: 1) гены, от которых зависит образование фитогормонов в растительных клетках; и 2) гены, определяющие синтез растительными клетками особых веществ – опинов. Опины представляют собой измененные аминокислоты, которые не могут быть использованы клеткой для биосинтеза белка, и для растительной клетки их образование не только не нужно, но и не выгодно энергетически.

Зато для агробактерий опины являются питательными веществами, причем использовать их в таком качестве способны только агробактерии. Благодаря этому, даже если в сформировавшуюся на растении опухоль попадают другие микроорганизмы, агробактерии имеют перед ними явные преимущества в конкурентной борьбе за место проживания. Таким образом, вводя в клетки растений T-ДНК, агробактерии осуществляют особый, нигде более не встречающийся тип паразитизма, получивший название генетическая колонизация хозяина. Действительно, обычные паразиты, внедряясь в организм-хозяин, используют для своей жизнедеятельности лишь то, что изначально у хозяина имеется. Агробактерии же генетически изменяют своего хозяина, заставляя его вырабатывать вещества абсолютно ему не нужные, но зато необходимые паразиту. И с этой точки зрения именно агробактерий можно условно считать первыми генными инженерами, использующими введение наследственной информации для изменения организмов других видов с целью улучшения условий своего существования.

Наличие у агробактерий такой способности сделало их широко распространенными паразитами. Специально проведенные исследования показали, что поражаться агробактериями могут практически все растения из класса Двудольные, представители отдела Голосеменные и некоторые папоротникообразные. В какой-то мере растительный мир от сплошного заражения этими паразитами спасает то, что агробактерии колонизируют только растения со свежими повреждениями живых покровных тканей и расположенной под ними паренхимы. Как правило, в природных условиях такие повреждения растениям наносят насекомые или их личинки. Самостоятельно нарушать целостность покровов и разрушать клетки, как это делают многие другие фитопатогенные микроорганизмы, агробактерии не могут – у них нет для этого специальных ферментов. Это вполне объяснимо – ведь при их образе жизни им нужны не умирающие, а наоборот, здоровые постоянно делящиеся клетки растений, которые бы вырабатывали нужные агробактериям питательные опины.

Зависимость колонизации растения агробактериями от наличия свежих повреждений удалось объяснить на уровне молекулярной биологии. Сначала было установлено, что для успешной трансформации растительных клеток в опухолевые необходимо присутствие так называемого раневого сока – жидкости, вытекающей из поврежденных клеток. Более детальное исследование показало, что только определенные вещества в этом раневом соке являются индукторами для расположенных в ДНК Ti-плазмиды генов, которые назвали *vir*-генами (от слова *virulence* - вирулентность, т.е. способность заражать). Эти почти тридцать генов организованы в несколько оперонов, активность которых в определенных

условиях регулируется совместно. В молекулярной биологии такие находящиеся под единым регуляторным контролем опероны называют регулоном. Такому общему регуляторному контролю есть логичное объяснение – продукты всех этих генов нужны для установления контактов с растительной клеткой и введения в нее T-ДНК.

Так вот, для индукции *vir*-регулона агробактерий нужны определенные компоненты раневого сока растений. Агробактерии узнают об их присутствии с помощью специальных расположенных на их поверхности молекул, которые при связывании с компонентами раневого сока передают сигнал внутрь клетки. Результатом этого сигнала является активация транскрипции входящих в *vir*-регулон оперонов и появление белков, которые будут обеспечивать перенос T-ДНК из бактериальной клетки в растительную.

Кроме генов *vir*-регулона и T-ДНК в составе Ti-плазмид имеются гены, обеспечивающие способность агробактерий питаться опинами, и гены, обеспечивающие способность этих плазмид передаваться при конъюгации (вспомните § 1). Эти гены также собраны в оперон, который называется *tra*-опероном (от англ. transfer – перенос). Для существования агробактерий это тоже важно, и вот почему. Известно, что при быстром размножении клетки бактерий могут терять плазмиды, поскольку они являются необязательными носителями генетической информации (вспомните § 5). Потерявшие плазмиды клетки оказываются в худшем положении, чем сохранившие ее, потому что потеряли способность использовать для питания опину. Однако, благодаря тому, что в плазмиде есть *tra*-оперон, плазмидосодержащие клетки передают бесплазмидным копии Ti-плазмид, и вся популяция увеличивает свою способность к выживанию. Подтверждением такого объяснения наличия *tra*-оперона в Ti-плазмидах может служить тот факт, что активность этого оперона у агробактерий регулируется опинами как индукторами.

Здесь следует подчеркнуть, что все эти сведения об образе жизни агробактерий, расположении определенных генов именно в составе Ti-плазмид и характере регуляции их активности являются важными не только с научной, но и с практической точки зрения. Ведь именно они позволили более полно понять механизмы природной трансформации растений и разработать эффективные методы их направленной трансформации человеком в рамках современной генетической инженерии и биотехнологии.

**Вопросы к § 11.** **1.** В чем особенность паразитизма агробактерий? **2.** Что такое регулон? **3.** Какие группы генов присутствуют в составе природных Ti-плазмид? **4.** Какие гены расположены в пределах T-ДНК? **5.** Как вы думаете, в промоторах расположенных в пределах T-ДНК генов Прибнов бокс или Хогнесс бокс? **6.** Что такое *tra*-оперон?

## **§ 12. Принцип введения генетической информации в растительные клетки с помощью агробактерий**

Открытие в середине 70-х годов 20-го века агробактериальной трансформации растений позволило человеку генетически изменять не только микроорганизмы, но и растения. Здесь основополагающим моментом стало изучение особенностей переноса T-ДНК из бактерий в растения. Было установлено, что для введения в растительную клетку своей ДНК агробактерии с помощью специальных белков отделяют одну нить от двунитевой молекулы Ti-плазмиды и направляют ее в образующийся из других белков канал, соединяющий цитоплазму бактериальной и растительной клеток. Причем для того, чтобы этот процесс осуществился, необходимыми являются два небольших участка T-ДНК, располагающиеся по ее концам и состоящие из 25 пар нуклеотидов. Вся же остальная последовательность T-ДНК в этом процессе не участвует. А это значит, что если с помощью уже известной вам технологии создания рекомбинантных ДНК заменить располагающиеся в T-ДНК гены на любые другие, то они будут передаваться в растительную клетку так же, как и собственные гены T-ДНК.

Собственно процесс получения трансгенного растения состоит из нескольких этапов. На первом этапе проводится вставка последовательности выбранного для введения в геном растения гена в T-ДНК. Для осуществления этого этапа используют специальные плазмиды, полученные следующим образом. T-ДНК переклонировали из природных Ti-плазмид в стандартные векторы *E.coli* и заменили гены синтеза фитогормонов и опинов на так называемый маркерный ген (обычно это ген устойчивости к антибиотику канамицину) и полилинкерную последовательность.

Маркерный ген в таких плаزمидах особенный – он должен работать в растительной, то есть эукариотической клетке. Поэтому к последовательности бактериального структурного гена неоминифосотрансферазы (этот фермент химически модифицирует антибиотики неоминин и канамицин и тем самым делает их неактивными) присоединен эукариотический промотор. Полилинкер в таких плазмидах также присоединен к эукариотическому промотору с таким расчетом, чтобы клонируемый ген мог с этого промотора транскрибироваться. Интересно, что в большинстве стандартных плазмид для трансформации растений использованы промоторы не собственно растительных генов. Один из наиболее широко используемых для этих целей промоторов – это  $P_{nos}$ , промотор гена нопалинсинтетазы из гена T-ДНК одной из природных Ti-плазмид. Нопалинсинтетаза – это фермент, который в клетках растений обеспечивает синтез одного

из опинов – нопалина. Второй популярный среди генных инженеров растений промотор – это промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, его сокращенное обозначение Р<sub>35S</sub> RNA<sub>CaMV</sub>. Оба эти промотора считаются сильными и обеспечивают транскрипцию в клетках любых тканей высших растений.

Еще одной особенностью таких плазмид является наличие в них либо *tra*-оперона, либо (и это бывает чаще) так называемого сайта мобилизации (сокращенно *mob*-сайта). Это короткая последовательность нуклеотидов, обеспечивающая конъюгативный перенос такой плазмиды из клеток *E.coli* в клетки агробактерий с помощью так называемой мобилизующей плазмиды, у которой имеется *tra*-оперон.

Чтобы ввести какой-либо ген в состав такой плазмиды, ДНК, в которой содержится этот ген, и плазмидную ДНК обрабатывают одной из соответствующих сайтам полилинкера рестриктаз, смешивают, обрабатывают лигазой и затем трансформируют клетки кишечной палочки. Далее с помощью конъюгации (вспомните § 1 этой книги) передают плазмиду из клеток кишечной палочки в клетки агробактерий, в которых присутствует так называемая «обезоруженная» *Ti*-плазида (из нее удалена собственная *T*-ДНК).

Здесь следует остановиться в изложении, чтобы подчеркнуть одну особенность разговоров о трансгенных растениях. Очень часто в описаниях самих трансгенных растений или путей их получения употребляют выражения такого характера: «ген был введен в растение путем...» или «введенный в растение ген обеспечивает...». Однако следует понимать, что трансформировать целое растение практически невозможно – даже если ввести агробактерии в растение и в месте введения произойдет перенос *T*-ДНК, то генетическая трансформация произойдет всего лишь в нескольких сотнях или тысячах клеток. Вся остальная часть растения останется не трансформированной, так как *T*-ДНК не может распространяться по растению, передаваясь от клетки к клетке. Кроме того, отличить и тем более отобрать те клетки, в которые проникла *T*-ДНК с клонированным геном, в этом случае практически невозможно. Поэтому во всех экспериментах по трансформации растений с помощью агробактерий используют специальным образом полученную суспензию отдельных растительных клеток.

Содержащие две плазмиды клетки агробактерий смешивают с клетками того вида растений, в который предполагается ввести находящийся в составе первой плазмиды ген. Клетки агробактерий прикрепляются к поверхности растительных клеток и, благодаря активности *vir*-генов *Ti*-плазмиды, происходит перенос *T*-ДНК из переданной от *E.coli* плазмиды, а, следовательно, и нужного гена, в клетки растений.



Задачей следующего этапа является отбор тех растительных клеток, в которых действительно присутствует новая генетическая информация. Для успешного решения этой задачи важными являются два свойства изолированных клеток растений. Первое – это, что они могут размножаться на специальных плотных (агаризованных) средах, формируя бесформенные комочки из множества одинаковых клеток, так называемые каллусы. И второе – жизнедеятельность клеток растений подавляется антибиотиком канамицином, что и используется для отбора трансформированных клеток. Именно для этого в составе переносимой в клетки растения Т-ДНК и находится ген неомицинофосфотрансферазы под эукариотическим промотором. Кодированный этим геном белок способен лишать антибиотики канамицин и неомицин их активности, поэтому после переноса побывавших в контакте с клетками агробактерий растительных клеток на содержащую канамицин среду, каллусы образуются только из тех клеток, в которые передалась Т-ДНК.

Последним этапом является восстановление из каллуса целостного растения. Этот этап также достаточно легко осуществим, поскольку для растений характерна высокая способность к регенерации – всем известно, что почти любое растение можно размножить вегетативно, вырастив его из небольшого участка стебля или листа. Для развития целостного растения из каллуса, в котором все клетки одинаковы, к питательной среде добавляют фитогормоны в сочетании, необходимом для дифференциации каллусных клеток на ткани. В течение нескольких дней или недель (время регенерации зависит как от условий, так и от вида растений) происходит развитие стеблей, корней и листьев, после чего такое растение переносят с агаризованной среды в почву.

Важно подчеркнуть, что поскольку такое растение ведет свое начало от одной первоначальной клетки, в которую и проникла Т-ДНК, во всех клетках этого растения и получаемых от него вегетативным способом потомков будет обязательно присутствовать переданный при трансформации ген.

Далее у этого растения определяют степень выраженности того признака, который определяется введенным геном, и если признак достаточно хорошо себя проявляет, такое растение становится родоначальником будущего сорта. Полученных путем вегетативного размножения потомки такого растения в течение нескольких лет проверяют по специальной методике, убеждаются, что введение новой генетической информации не ухудшило, а улучшило хозяйственно-полезные признаки, и затем предлагают новый сорт для использования.

**Вопросы к § 12.** **1.** В каких клетках осуществляют введение выбранного для трансформации растения гена в состав Т-ДНК? **2.** Чем отличаются плазмиды для трансформации растений от плазмид, предназначенных для получения трансгенных бактерий? **3.** Что такое *mob*-сайт и почему он должен быть в плаزمиде, предназначенной для трансформации растений? **4.** Как вы думаете, какая часть Т-ДНК не должна быть затронута при подготовительных генно-инженерных манипуляциях с векторными плазмидами? **5.** Почему маркерный ген, расположенный в пределах Т-ДНК должен иметь эукариотический промотор? **6.** Что такое каллус?

### **§ 13. Трансгенные растения с улучшенными агротехническими характеристиками**

Изначально общим направлением любой селекционной работы в растениеводстве было и остается получение сортов, дающих наибольшее количество урожая при наименьших затратах. В современном сельском хозяйстве решающим фактором является применение агротехнических приемов, направленных на борьбу с сорной растительностью, насекомыми-вредителями и возбудителями болезней. Эти приемы являются наиболее дорогостоящими, поэтому именно они и привлекли первоначально основное внимание генных инженеров.

Использование гербицидов (так называют химические препараты для борьбы с сорняками) связано с двумя основными проблемами. Гербициды губительно действуют не только на сорные, но и на культурные растения, поэтому применять их приходится до появления всходов выращиваемых растений, что не всегда дает максимальный эффект, а после появления всходов – точно (то есть непосредственно наносить гербицид на каждое сорное растение), что требует большего времени и затрат. Кроме того, длительное применение гербицидов на одних и тех же площадях приводит к их накоплению в почве, что ухудшает рост культурных растений. Поэтому задачей селекционеров стало получение сортов, не только устойчивых к действию гербицидов, но и способных разрушать гербицид или уменьшать его токсичность.

Для решения этой задачи проводился и проводится специальный поиск генов, кодирующих ферменты, способные действовать на тот или иной гербицид. Дело в том, что в сельскохозяйственной практике в разных странах и разных климатических зонах применяются разные гербициды. Поэтому найти какой-то, условно говоря, универсальный ген, продукт которого действовал бы на все гербициды, невозможно. К настоящему времени ряд таких генов уже найден и успешно введен в сельскохозяйственные растения. Примерами могут служить перенос из клеток стрептомицетов в клетки растений гена,

кодирующего фосфинотрицинацетилтрансферазу – фермент, разрушающий гербицид биаллофос; из клеток бактерий рода *Pseudomonas* - гена дегалогеназы, которая разрушает гербицид далапон; из клеток гриба рода *Myrothecium* – гена цианамидгидратазы, которая ядовитый цианамид превращает в легко разрушаемую почвенными микроорганизмами мочевины.

Даже далекие от сельского хозяйства люди слышаны в современном мире о вредности химических инсектицидов (так называются вещества, губительно действующие на насекомых-вредителей). Их применение в широких масштабах во второй половине 20-го века привело не только к загрязнению наземных экосистем, но и вод мирового океана. Причем большинство из них являются ядовитыми не только для насекомых, но и для многих других организмов, включая человека. Отказаться от их применения, как иногда предлагают не совсем сведущие в сельском хозяйстве люди, не возможно, поскольку потери урожая тогда достигнут катастрофических размеров. Решить эту проблему помогает генетическая инженерия.

Для создания растений устойчивых к насекомым-вредителям в конце 20-го века начали применять гены из бактерий, способных вызывать заболевание и гибель насекомых. Называются эти бактерии *Bacillus thuringiensis* и их отличительной чертой является способность накапливать в своих клетках и спорах специальный белок – энтомотоксин. Причем энтомотоксины разных подвидов не одинаковы и, в отличие от химических инсектицидов, действуют избирательно, то есть поражают только конкретные виды насекомых и являются безвредными для остальных живых существ. Проведенный микробиологами поиск природных штаммов этих бацилл, поражающих разных вредителей сельского хозяйства, и клонирование из их клеток генов энтомотоксина позволили создать генетические конструкции, которые были успешно введены в ряд сельскохозяйственных растений. Фактически, после введения таких генов растения становятся ядовитыми для насекомых-вредителей: съдающее небольшое количество растения насекомое погибает, поскольку в его организм попадает синтезированный в клетках трансгенного растения энтомотоксин. При этом для всех остальных организмов данный белок абсолютно безвреден. Выгода от применения таких сортов очевидна – не только сохраняется окружающая среда, но и значительно удешевляется производство сельхозпродукции, так как нет необходимости тратить средства на получение, транспортировку и применение химических инсектицидов.

Имеются определенные успехи и в борьбе с вирусами растений. Проблема вирусных заболеваний всегда являлась наиболее острой, поскольку подействовать на вирус вне

клетки достаточно трудно. Здесь генным инженерам помог открытый фитопатологами факт, что клетки растений, внутри которых находится много белков вирусных оболочек определенного вируса, поражаются этим и другими вирусами гораздо в меньшей степени. Гены, кодирующие белки вирусных оболочек, были клонированы и введены в сельскохозяйственные растения, что сделало такие растения пусть и не абсолютно, но гораздо более устойчивыми к вирусным заболеваниям, чем исходные сорта. Еще один подход основан на применении так называемых противовирусных белков, которые были обнаружены, например, у растения из семейства Лаконосовых - фитолакка американа. Сок фитолакки ранее применялся для опрыскивания сельскохозяйственных растений с целью их защиты от вирусов, и биохимикам удалось установить, что противовирусный эффект связан с конкретными белками. Кодирующие эти белки гены фитолакки и были использованы для создания устойчивых к вирусам растений по уже знакомой вам схеме.

Для получения риса, устойчивого к вызываемым грибами болезням, генные инженеры пошли по пути усиления продукции собственных защитных белков растения. В частности, при заражении растения грибом в растении появляется особый фермент – хитиназа, который разрушает основной компонент клеточных стенок гриба – хитин. Однако, во многих случаях хитиназа не успевает образовываться вовремя и грибок поражает растение раньше, чем оно сможет защититься. Созданная молекулярными биологами генетическая конструкция обеспечивает постоянный синтез хитиназы в клетках растения, а не только после контакта с грибом, что, естественно, делает рис гораздо более устойчивым к вызываемым грибами заболеваниям (микозам) и позволяет существенно уменьшить применение противогрибных ядохимикатов (фунгицидов). Для стран – основных производителей риса такие сорта не только более экономически выгодны, но и позволяют снизить степень загрязнения водоемов фунгицидами (рис выращивается в воде, а перед уборкой воду с рисовых полей отводят в реки), которые представляют собой очень токсичные и медленно разрушающиеся в природных условиях вещества.

Одной из проблем при возделывании растений в ряде регионов мира является неблагоприятная периодичность выпадения осадков и повышенная засоленность почв. У растений, приспособленных к обитанию в почвах, из которых в растение поступает малое количество воды, выявлена способность синтезировать и накапливать в клетках низкомолекулярные вещества, так называемые осмопротекторы. В такой роли могут выступать сахара, спирты, четвертичные производные аммиака, некоторые аминокислоты (пролин) и такое вещество, как бетаин. Последний образуется в клетках растений из холина в два этапа, первый катализируется холинмонооксигеназой, второй –

бетаинальдегид-дегидрогеназой. Но образовывать бетаин могут не все растения и среди них достаточно мало сельскохозяйственных. На табаке было показано, что можно либо перенести из продуцирующих бетаин растений (например, шпината) два гена, или использовать ген микроорганизмов, у которых один фермент - холиндегидрогеназа катализирует оба превращения. В последнем случае ген *betA* из *E.coli* переносили под промотором 35S РНК CaMV и солеустойчивость повысилась на 80%.

Физиологами растений было показано, что при стрессовых воздействиях физических факторов (повышенная температура; избыточная освещенность; большая, чем обычно, доза ультрафиолета) в клетках растений образуется надпероксидный анион  $O_2^-$ , что и вызывает нарушение обычного метаболизма и, как следствие этого, ограничение в росте, развитии и формировании клеток и органов. Как и у всех аэробных организмов, у растений имеется защита от этого аниона – фермент супероксид-дисмутаза, причем существует несколько ее изоформ, различающихся по ионам металлов, входящих в состав кофермента. Это Cu/Zn-супероксид-дисмутаза, Mn-супероксид-дисмутаза и Fe-супероксид-дисмутаза (последняя имеется не у всех видов покрытосеменных). Каждая из них локализуется в норме в характерных для этой изоформы компартментах клетки: Cu/Zn – в хлоропластах и в меньших количествах в цитоплазме клеток, Mn-содержащая – в митохондриях. Гены этих двух ферментов были клонированы посредством выделения соответствующих матричных РНК и синтеза *in vitro* кДНК, и затем оба варианта под промоторами 35S РНК CaMV были введены в клетки табака. Табак в данном случае использовался как лабораторное модельное растение. Оказалось, что растения со сверхэкспрессией гена Cu/Zn-супероксид-дисмутазы могли нормально фотосинтезировать при повышенном уровне освещенности, тогда как у обычных растений в таких же условиях интенсивность фотосинтеза резко снижалась. Проверка обоих вариантов на чувствительность к обработке озоном показала, что лучший эффект защиты достигается при сверхэкспрессии гена Mn-содержащей супероксид-дисмутазы. Оба варианта оказались устойчивы также к гербициду метилвиологену. Эти полученные на модельных растениях результаты дают основание надеяться на получение стрессоустойчивых сортов широко возделываемых пищевых и кормовых сельскохозяйственных растений.

**Вопросы к § 13.** **1.** Зачем нужны гербицидоустойчивые сорта сельскохозяйственных растений? **2.** Как были созданы основные сорта растений, устойчивых к насекомым-вредителям? **3.** Какие два подхода использовали для получения вирусоустойчивых растений? **4.** Сверхпродукция какого белка может повысить устойчивость растений к микозам? **5.** Какими путями предполагается повышать устойчивость растений к стрессовым воздействиям среды?

## **§ 14. Трансгенные растения с улучшенными пищевыми и техническими качествами**

В отличие от традиционной селекции, создание новых сортов с помощью генетической инженерии позволяет решать не только обычные задачи увеличения урожайности и удешевления процесса сельскохозяйственного производства. Очень существенным для производителей и потребителей являются так называемые товарные качества сельхозпродукции.

Здесь очень показательным является пример с томатами, широко потребляемыми во всем мире. Ранее огромной проблемой была сохранность снятых томатов, поскольку плоды этих растений естественным образом размягчаются за счет выделяемых их клетками ферментов, в основном целлюлаз и полигалактуроназ. Попросту говоря, не съеденный вовремя помидор просто превращался в мало аппетитное месиво. Биохимики установили, что процесс естественного созревания плодов и их размягчения для освобождения семян стимулируется вырабатываемым этими же клетками газом этиленом. Молекулярные биологи установили, какие именно гены отвечают за образование этилена, а генные инженеры добились, образно говоря, их «выключения», чтобы томаты перестали продуцировать этилен.

Для получения томатов с повышенной лежкостью плодов использовали и еще один подход. Он заключается в получении кДНК на матрицах зрелых иРНК гена полигалактуроназы и создании генетических конструкций, дающих при экспрессии в клетках растений так называемую антисмысловую РНК. Эта РНК является комплементарной той иРНК, которая должна при трансляции давать белок. Идея здесь такова: при большом количестве антисмысловой РНК она образует с иРНК двунитевые молекулы, которые уже не могут связываться с рибосомами, что и приводит к уменьшения количества этого белка в клетках. В плодах томатов с антисмысловой РНК полигалактуроназного гена количество фермента составляет только 10% от такового в плодах обычных сортов, и именно эти сорта, известные как FLAVR SAVR, получили самое широкое распространение. В настоящее время кроме томатов получены трансгенные сорта мускусной дыни, плоды которой также не размягчаются при хранении.

Генетическая инженерия позволяет изменять и вкусовые качества плодов или листьев. В Африке произрастает растение дискориофиллум Каминса, плоды которого содержат особый белок монеллин. Особенность этого белка в том, что он представляет собой, вероятно, самое сладкое из известных веществ – по современным оценкам он в 3000 раз

слаще обычного пищевого сахара из сахарного тростника. Местные жители используют костянки этого растения в пищу, но использовать этот белок в промышленных масштабах не удастся – даже непродолжительное нагревание и присутствие слабых кислот (например, лимонной или яблочной) приводит к потере уникального сладкого вкуса. Биохимики выяснили, что белок этот имеет четвертичную структуру и состоит из двух соединенных нековалентными связями молекул, а молекулярные биологи определили два гена дискореофиллюма, в которых закодированы аминокислотные последовательности для каждой из частей монеллина. После клонирования этих генов по отдельности, генные инженеры соединили их в один и смогли получить белок, который был более устойчив к кислотам и сохранял сладкий вкус в их присутствии. Такой единый ген был введен в растения томатов и салата, которые чаще всего употребляют в пищу без термической обработки. Более сладкие, чем обычно, растения могут, как предполагают их создатели, привлечь внимание людей, страдающих диабетом, для которых потребление сладких продуктов, содержащих глюкозу и сахарозу, нежелательно.

С помощью генетической инженерии возможно изменение не только вкуса, но пищевой ценности сельскохозяйственной продукции. Основным питательным веществом для животных и человека в растительных тканях являются углеводы (крахмал, моно- и дисахариды), которые почти у всех растений одинаковы и присутствуют в значительных количествах. Количество же белков и тем более их аминокислотный состав не соответствуют запросам животноводства и пищевой промышленности, поскольку в белках растительного происхождения необходимых для полноценного питания незаменимых аминокислот недостаточно. Наиболее насыщенными белками органами растений являются семена, где накапливаются так называемые запасные белки. Изучение аминокислотного состава запасных белков семян у различных растений показало, что количество тех или иных незаменимых аминокислот является видовым признаком, что и послужило основой для экспериментов по переносу генов запасных белков семени из одних растений в другие.

Второй подход, который используется в этом направлении, – это изменение аминокислотного состава конкретных запасных белков (желательно тех, которые преобладают в количественном отношении). Для этого в последовательность клонированного гена запасного белка путем мутагенеза *in vitro* вводят кодоны, соответствующие незаменимым аминокислотам. Кроме того, такие гены пытаются вводить в геном под более сильными, чем исходный промотор этого гена, промоторами. Однако, экспрессия генов запасных белков семян в растении достаточно сложно

регулируется, т.к. синтезируются эти белки не одновременно, а последовательно и существует конкретный порядок не только синтеза, но и укладки в протеинопластах. Поэтому сверхэкспрессия и значительное изменение аминокислотного состава могут существенно повлиять на процесс формирования семян. Изучение запасных белков семян основных пищевых и кормовых растений - бобовых (фазеолины, вициллины), подсолнечника (гелиантины), злаков (ячменя – гордеины, пшеницы – глиадины и проламины, кукурузы – зеины) показало, что наибольшие различия в аминокислотных последовательностях разных белков одного и того же растения и белков из разных растений обнаруживаются в районе С-конца в так называемой гипервариабельной области. Из этого следует, что эта часть белковых молекул менее существенна для пространственной упаковки в соответствующих компартментах, и, значит, именно в эту область можно вносить генетические изменения с наименьшими последствиями в плане изменения конформации. Проблема правильной упаковки запасных белков в семенах имеет место и при экспрессии чужеродных генов. Например, фазеолин бобовых и зеин кукурузы синтезируются в табаке и подсолнечнике, но их накопление в семенах не соответствует ожидаемому.

Третий подход в улучшении аминокислотного состава запасных белков семян связан не с изменением собственно генов этих белков, а с изменением общего количества аминокислот, синтезируемых в растении. Используя некоторые бактериальные гены из систем биосинтеза аминокислот, удалось получить трансгенные варианты растений рапса и сои, у которых количество лизина в клетках было в 100 раз больше, чем у исходных растений, и, что особенно поразительно, в запасных белках сои количество лизиновых остатков увеличилось в 5 раз, а в семенах рапса – в 2 раза. Основное применение такой сои видят в изготовлении из нее соевой муки, которую традиционно используют как пищевую добавку к кормам из кукурузы. Обычно к таким комбикормам обязательно добавляют лизин микробиологического производства, что и делает эти корма достаточно дорогими, следовательно, такая соевая мука удешевит комбикорм. Перспектива – введение такой же конструкции непосредственно в растения кукурузы.

Получены первые растения картофеля, у которых улучшены качественные характеристики крахмала. Обычно этот полисахарид в клубнях представляет собой смесь амилопектина (имеет разветвленные цепи) и амилозы (имеет линейные цепи). Крахмал считается тем более качественным, чем больше в нем амилопектина. Путем введения гена амилазы картофеля в обратной ориентации под сильным промотором получен вариант, у которого количество амилозы снизилось до нуля. Считается, что антисмысловые РНК,



комплементарно взаимодействуя с РНК, считываемой с нормального гена амилазы, препятствуют ее трансляции.

Не обходят своим вниманием генные инженеры и декоративные цветочные растения – получены сорта петуний, роз, гвоздик, тюльпанов и хризантем с необычным цветом лепестков. Для их создания были изучены ферменты, от которых зависит образование окрашивающих венчик пигментов, и созданы новые, ранее не характерные для растений этих видов, сочетания генов, кодирующих такие ферменты.

Подвергаются направленным генетическим изменениям и так называемые технические растения. Прежде всего это коснулось масличных культур, поскольку растительные жиры в огромных масштабах потребляются не только в пищевой, но и в парфюмерной промышленности. Масла различных видов растений отличаются по составу входящих в молекулы жира остатков многоатомных органических кислот и от этого зависят важные для производителей физические свойства – вязкость, температуры плавления и кипения, стойкость в эмульгированном состоянии и другие. Поэтому для производства наносимых на кожу кремов, лосьонов и других косметических средств используют масла довольно редких и медленно растущих растений, например, представителей семейства Лавровые. Генетическая инженерия нашла пути создания сортов быстро культивируемых травянистых растений, прежде всего рапса, масло которых отличается от исходного рапсового и фактически заменяет дорогие масла того или иного тропического растения. Используя аналогичные подходы, то есть, внося изменения в комплекс генов, определяющих биосинтез жирных кислот в растениях рапса, удалось также получить сорта, масло которых может быть использовано в качестве моторного. Эти более термостойкие масла по ряду параметров превышают широко используемые в двигателях внутреннего сгорания смазочные смеси, известные как минеральные или синтетические масла.

Перспективным является и еще одно направление в получении трансгенных растений, связанное с медицинскими аспектами. Предпосылками для интенсивной работы в данном направлении являются: 1) экспериментально доказанная возможность получать в растительных клетках антигены болезнетворных микроорганизмов и антитела животных при введении в геном растений соответствующих генов; и 2) меньшие экономические затраты на производство подобных препаратов из растительного сырья. Тем более, что для создания активного искусственного иммунитета против некоторых болезней достаточно контакта антигенов с поверхностью слизистой оболочки пищеварительного тракта. Попросту говоря, возможно создать растения, питаясь которыми можно

фактически получать прививку. Если такие растения будут созданы (а в ряде стран уже проводится работа по созданию томатов и бананов с такими свойствами), это позволит сократить расходы на обучение и оплату работы медицинского персонала, осуществляющего плановую вакцинацию населения. Особенно это важно для тех стран, в которых уровень экономического развития и развития системы здравоохранения не позволяют проводить за свой счет массовую профилактическую вакцинацию. Таким государствам оказывают помощь более развитые страны, но, тем не менее, уровень заболеваемости и смертности от некоторых инфекционных болезней в странах так называемого третьего мира остается еще очень высоким.

**Вопросы к § 14.** **1.** Какие пути изменения пищевой ценности растений уже используются с целью получения новых сортов? **2.** Каким путем с использованием методов генетической инженерии можно, не изменяя исходный ген и регуляцию его активности, снизить в клетках количество кодируемого этим геном белка? **3.** Пофантазируйте, какое из пищевых растений вы хотели бы изменить и предложите генно-инженерный путь достижения таких изменений.

## **§ 15. Возможности применения генно-инженерных методов к животным.**

### **Использование культур клеток насекомых**

Несмотря на то, что животные представляют собой гораздо более сложноустроенные организмы, чем бактерии, грибы или растения, в настоящее время уже существуют реальные возможности направленного изменения их генетической информации.

Одна из сложностей генно-инженерных манипуляций с клетками животных заключается в невозможности использования плазмидных векторов для введения ДНК в клетки животных. Однако во второй половине 20-го века, благодаря успехам вирусологии и молекулярной биологии, стало понятно, что в качестве векторных молекул могут быть использованы нуклеиновые кислоты вирусов животных. Более того, совершенствование методик поддержания и даже размножения отдельных клеток животных на искусственных питательных средах, то есть создания так называемых культур клеток, позволило реально приступить к разработке специальных векторных систем на основе вирусов.

Одним из примеров использования вирусов для введения и экспрессии чужеродной генетической информации является генно-инженерное применение бакуловирусов. Эти вирусы с середины 20-го века используются для биологического контроля за численностью насекомых-вредителей в лесном и сельском хозяйстве. Механизм их репродукции в организмах членистоногих достаточно хорошо исследован и заключается в следующем. После попадания вириона бакуловирусов в клетку эпителия кишечника

насекомого, он проникает в ядро, где и происходит так называемое «раздевание», т.е. освобождение двунитевой ДНК из белкового капсида. В ядре происходит репликация этой ДНК, затем экспрессия генов, кодирующих белки собственно вирионов, и образование новых вирусных частиц. Некоторая часть вновь образовавшихся вирионов отшнуровывается от клеток и гемолимфой насекомого разносится по организму животного, но большая часть собирается в компактную структуру внутри клетки и покрывается специальной оболочкой, состоящей в основном из белка полиэдрина, т.е. переходит в неактивное состояние. За счет активных вирусов, распространяющихся по организму, постепенно происходит накопление таких полиэдриновых частиц во многих клетках организма насекомого и через 5-6 дней после заражения насекомое погибает. Считается, что за это время происходит 10 раундов репликации вирусных частиц в каждой инфицированной клетке и в теле мертвого насекомого доля содержащих множество вирионов полиэдриновых частиц достигает 25% от сухой массы. Такие полиэдриновые комплексы могут длительное время сохраняться в окружающей среде, пока не будут съедены следующим насекомым. В кишечнике насекомого полиэдриновый матрикс распадается под действием протеаз, и освободившиеся вирионы поражают клетки кишечника.

Эти особенности жизненного цикла бакуловирусов и привлекли к ним внимание генных инженеров. Длительность присутствия вируса в клетках и синтез большого количества белка давал основания для введения в его геном структурных генов чужеродных белков под промотор гена полиэдрина. ДНК бакуловирусов в последней четверти 20-го века была расклонирована в системе *E.coli* и определена функция основных генов. Было установлено, что цикл развития вируса не нарушается, если из генома удалить структурный ген полиэдрина, т.е. репродукция вирусных ДНК продолжается в обычном порядке, хотя полиэдронов (содержащих вирионы кристаллов из полиэдрина) не образуется. Кроме того, оказалось, что промотор гена полиэдрина является очень сильным и работающим конститутивно. Основным видом вируса, на котором проводятся все исследования генно-инженерного направления, является вирус множественного ядерного полиэдроза *Autographa californica* (сокращенно AcMNPV). В природе он поражает более 30 видов насекомых и, что более важно, хорошо репродуцируется в культурах клеток.

Удачным оказалось и то, что оказалось возможным нарабатывать ДНК вируса в клетках бактерий *Escherichia coli*. В результате специально проведенных экспериментов были получены вирусные ДНК, в которых вместо гена полиэдрина встроен фрагмент,

содержащий: 1) точку начала репликации из плазмиды pBR322; 2) ген устойчивости к канамицину; 3) фрагмент гена *lacZ*, в который встроен сайт интеграции для транспозируемого фрагмента (наличие этого сайта не препятствует нормальной экспрессии гена *lacZ*). Такая генетическая конструкция может реплицироваться в клетках бактерий как плазида, но поскольку несет практически весь (за исключением гена полиэдрина) геном бакуловируса, ее назвали бакмида. ДНК бакмиды инфекционна также, как и ДНК собственно бакуловируса – если такой ДНК обработать клетки чувствительного к вирусу насекомого, в клетках происходит репродукция вируса, но без образования полиэдриновых скоплений.

Именно бакмиды в настоящее время наиболее широко используют для введения различных генов в клетки насекомых. Особенность применения бакмид состоит в том, что из-за довольно больших размеров осуществлять встраивание в них нужного гена путем рестрикции и последующего лигирования затруднительно. Для того, чтобы преодолеть эту трудность в последовательность гена *lacZ* встроили не обычный полилинкер, а сайт для транспозируемого фрагмента. Это позволяет делать вставку нужного гена в клетках *E. coli* за счет особого процесса – транспозиции.

Транспозиция – это перенос определенных фрагментов ДНК из одного места в другое в пределах одной молекулы или из одной молекулы ДНК в другую. Этот процесс естественным образом происходит в клетках бактерий, его открыли и изучили в 70-х годах 20-го столетия. Суть его заключается в следующем. Если в пределах небольшого, включающего несколько генов, участка ДНК имеются так называемые повторы (одинаковые по нуклеотидному составу последовательности), под воздействием определенного фермента, получившего название транспозаза, этот участок может вырезаться из исходной молекулы и вставляться в другое место. Такие окаймленные повторы генов, способные перемещаться из одной молекулы в другую, называются транспозоны, и к настоящему времени их уже открыто большое количество у различных видов бактерий. Это позволяет считать, что перемещение транспозонов из хромосом в плазмиды, перенос их вместе с плазмидами от одних бактерий к другим является одним из природных путей повышения генетического разнообразия прокариотических организмов.

Изучение процесса перемещения транспозонов показало, что для проявления активности транспозазы не имеет значения, какие гены находятся между повторами. Это и использовали для создания системы «загрузки» бакмид нужными генами. В эту систему кроме собственно бакмиды входят еще две плазмиды, способные поддерживаться в клетках *Escherichia coli*. Одна из них имеет ген устойчивости к антибиотику гентамицину

и расположенный недалеко от него полилинкер, вплотную к которому слева примыкает промотор гена полиэдрина, а справа – терминатор этого же гена. Этот фрагмент плазмиды, в свою очередь, окаймлен слева и справа повторами, необходимыми для транспозиции, то есть фактически представляет собой искусственно созданный транспозон. Вне пределов транспозона на этой же плазмиде располагается ген устойчивости к антибиотику ампициллину. Именно эту плазмиду используют для вставки путем рестрикции и лигирования гена, который необходимо ввести в клетки насекомых, поэтому ее условно называют плазида-донор.

Вторая же плазида несет на себе ген транспозазы и ген устойчивости к антибиотику тетрациклину. Ее называют плазида-помощница и вот почему. Для «загрузки» бакмиды нужным геном ее совмещают в одной клетке с двумя этими плазмидами. Делают это путем трансформации клеток с бакмидами смесью ДНК плазмиды-помощницы и ДНК плазмиды-донора, в которой в искусственном транспозоне уже находится предназначенный для загрузки ген. После посева на среду, содержащую одновременно канамицин, ампициллин и тетрациклин, колонии на ней сформируют только те бактерии, в которых имеются все три плазмиды. Если такие бактерии перенести в жидкую среду и дать им размножиться, то в их клетках будет происходить перенос искусственного транспозона (транспозиция) благодаря активности транспозазы, ген которой находится на плазмиде-помощнице.

Важно, что этот искусственный транспозон будет переноситься не только куда попало, но и в бакмиду, в которой, как вы помните, находится сайт интеграции транспозона в пределах последовательности гена *lacZ'*. Теперь, чтобы отобрать клетки, в которых транспозиция произошла именно в это место, бактерии надо посеять на плотную среду, в которой содержатся одновременно антибиотик канамицин, антибиотик гентамицин и уже известные вам из параграфа 8 ИПТГ и X-Gal. На этой среде колонии бактерий, в которых транспозиция произошла куда надо, будут иметь белый, а не голубой цвет.

Далее бактерии из такой колонии размножают, выделяют из них ДНК бакмиды и обрабатывают этой ДНК клетки насекомых. В генно-инженерных манипуляциях с клетками животных этот этап традиционно называют не трансформацией, а трансфекцией. Связано это с тем, что термин трансформация еще до появления генетической инженерии уже использовался в медицине для обозначения превращения обычных клеток в раковые, например «...в результате злокачественной трансформации клеток печени...». Имеющийся в составе бакмиды чужеродный ген будет экспрессироваться в клетках

насекомых, потому что, как вы помните, он был вставлен между промотором и терминатором гена полиэдрина.

Разработка вот такой бакмидной системы введения генов позволила экспериментально проверить возможность экспрессии более 500 генов. Практическое применение культур клеток насекомых для наработки того или иного белка определяется сравнением эффективности его продукции и необходимого уровня функциональной активности с таковыми, характерными для белков, полученных в других трансгенных системах, например в дрожжах. Наиболее часто такие культуры используются для получения белков возбудителей вирусных болезней человека и животных, например, антигена вируса синего языка, антигена вируса Денге типа I, белка оболочки вируса иммунодефицита человека первого типа, капсидного белка вируса простого герпеса, гемагглютинирина вируса гриппа, белка вируса Ласса, белков полиовирусов, гликопротеина вируса бешенства, гликопротеина 50 вируса псевдобешенства, антигена ротавируса обезьян. Это обусловлено тем, что посттрансляционные модификации белков таких вирусов в норме определяются системами, характерными для клеток животных, которые могут отсутствовать в клетках других организмов. Кроме имеющих потенциальное вакцинное применение вирусных белков экспрессированы в клетках насекомых ген одного из белков малярийного плазмодия, ген одного из антигенов возбудителя сибирской язвы. Показана также возможность применения клеток насекомых для получения белков человека, имеющих отношение к ряду наследственных патологий: регулятора проницаемости мембран, дефект которого приводит к муковисцидозу; аденозиндезаминазы (ее дефектность приводит к связанному с обменом пуринов T- и B-клеточному иммунодефициту), липазы поджелудочной железы человека; щелочной фосфатазы (снижение ее количества имеет место при гипотиреозе и при замедленном росте у детей), или белков имеющих различное терапевтическое применение:  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерферонов; интерлейкина-2; эритропоэтина. Из белков, не связанных с возможностью медицинского применения, можно упомянуть мышинные моноклональные антитела, ДНК-полимеразу человека  $\alpha$  и другие белки человека, получаемые для изучения их структуры и функции (например, белки различных рецепторов, выделение которых из организма в достаточных для изучения количествах затруднительно).

**Вопросы к § 15.** **1.** Почему бакуловирусы оказались пригодными для генно-инженерной работы с клетками животных? **2.** Что такое бактериальные транспозоны и каково их значение для жизни и эволюции бактерий? **3.** Что такое бакмида? **4.** Зачем при получении векторов для трансфекции клеток насекомых

нужны ИПТГ и X-Gal? **5.** Подумайте, чем клетки насекомых лучше и чем хуже в качестве продуцентов белков человека по сравнению с дрожжевыми клетками.

## **§ 16. Возможности применения генно-инженерных методов к животным. Векторы для работы с клетками млекопитающих**

Помимо методов генно-инженерных манипуляций с культурами клеток насекомых в конце 20-го века были разработаны подобные методы и для культур клеток млекопитающих. Связано это с давно имеющим место повышенным интересом исследователей к медицинским, ветеринарным и другим животноводческим проблемам. Кроме того, как указывалось выше, некоторые белки позвоночных животных и человека не экспрессируются в полной мере в гетерологичном генетическом окружении из-за отсутствия тех или иных систем их посттрансляционной модификации.

Векторы для введения чужеродной генетической информации разрабатывались по уже известному вам принципу, предполагающему осуществление основных подготовительных манипуляций и наработку гибридных ДНК в системе *E.coli*, поэтому включают все те же фрагменты: тот или иной полилинкер, ген ампициллинустойчивости и *oriV* из pBR322. Еще одним необходимым компонентом таких векторов является фрагмент, обеспечивающий отбор трансфицированных клеток млекопитающего (селективный маркер).

В качестве таковых наиболее часто используются несколько: 1) поставленный под тот или иной обеспечивающий транскрипцию в клетках конкретного вида животных промотор ген неоминифосфотрансферазы из бактериальных транспозонов. Его применение оказалось возможным потому, что нечувствительные к канамицину клетки млекопитающих чувствительны к генетицину, известному как соединение G-418. Это блокирующее трансляцию на эукариотических рибосомах вещество инактивируется неоминифосфотрансферазой за счет фосфорилирования, поэтому синтезирующие этот фермент клетки выживают. 2) ген дегидрофолатредуктазы (DHFR), обеспечивающей разрушение токсичного для клеток метотрексата (Это вещество - его химическое название 4-Амино-N<sup>10</sup>-метилптероилглутаминовая кислота – тормозит синтез ДНК и приводит к остановке митоза, поэтому его используют для лечения раковых заболеваний). Поскольку нормальные клетки млекопитающих также продуцируют этот фермент, векторы с таким селективным геном используют только для трансфекции специальных DHFR<sup>-</sup> - клеточных линий. Существенно, что уровень устойчивости к метотрексату зависит от числа копий гена, поэтому, повышая концентрацию этого вещества в среде, можно отобрать такие

клетки, в которых количество копий вектора (а значит, и копий введённого на нем чужеродного гена) наиболее высокое. 3) ген глутаминсинтетазы, которая присоединяет ионы  $\text{NH}_4^+$  к аминокислотам, тем самым участвуя как в синтезе аминокислот, так и в освобождении некоторых тканей и органов (в частности, мозга у человека) от образующегося там аммиака. Поэтому этот фермент всегда имеется в клетках млекопитающих, но при попадании в клетки токсичных производных аминокислот его может не хватать для их обезвреживания. Одним из таких токсичных соединений является метионинсульфоксимин. Если его добавлять в среду культивирования клеток, выживать на ней будут лишь те, у которых имеет место сверхэкспрессия гена глутаминсинтазы, т.е. клетки несущие много копий вектора.

И последним обязательным компонентом вектора должен быть фрагмент, обеспечивающий репликацию и стабильное наследование в клетках животных. В качестве таковых здесь используются гены различных вирусов млекопитающих, таких как ретровирусы, вирусы простого герпеса, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы.

Основой для получения **ретровирусных векторов** являются ретровирусы мыши. Их геном состоит из двух одинаковых одноцепочечных молекул РНК, которая функционально разделена на шесть областей: 1) 5'-LTR (long terminal repeat) – правый длинный концевой повтор; 2) не кодирующую белков, но ответственную за упаковку РНК в капсид область пси<sup>+</sup> ( $\psi^+$ ); 3) кодирующую три белка внутренней оболочки капсида (gag); 4) кодирующую обратную транскриптазу и интегразу (pol); 5) кодирующую белок оболочки (env); 6) 3'-LTR – левый длинный концевой повтор.

Жизненный цикл вируса заключается в синтезе комплементарной ДНК на матрице геномной РНК сразу же после проникновения вириона и разрушения его капсида. Это возможно потому, что в капсиде вируса уже содержится несколько молекул обратной транскриптазы, упакованных в него еще при сборке вириона. Затем кДНК транспортируется в ядро, где встраивается в определенные сайты хромосом благодаря имеющимся в ее последовательности концевым повторам. После встраивания с сильного промотора, локализованного в 5'-LTR, осуществляется транскрипция, и вновь синтезированные РНК перемещаются в цитоплазму, где в результате трансляции появляются белки Gag, Pol и Env. При этом часть молекул РНК не транслируется, а упаковывается в формирующиеся капсиды вместе с молекулами обратной транскриптазы. Сформированные вирионы освобождаются из клетки-хозяина и могут в дальнейшем инфицировать новые клетки.



Наличие ДНК-стадии в жизненном цикле ретровирусов делает возможным осуществление всех генно-инженерных манипуляций на уровне ДНК, поскольку и она оказывается инфекционной. Для создания ретровирусных векторов кДНК генома вируса объединили с ДНК стандартной плазмиды pBR322 E.coli и получили «обезоруженные» укороченные варианты, лишенные областей env, pol и части области gag. Вставку ДНК чужеродного гена осуществляют в стык с оставшейся частью области gag, что делает возможной транскрипцию этой ДНК в клетке животного с вирусного промотора, локализованного в 5'-LTR. Чужеродный ген (или несколько генов) могут иметь и свои пригодные для экспрессии в клетках млекопитающих промоторы. ДНК такого гибридного вируса можно непосредственно вводить в клетки кальциевым методом или электропорацией, но эффективность перемещения ее в ядро и интеграции в хромосомы хозяина является невысокой по сравнению с таковой нормального вируса. Учитывая это, была разработана система упаковки гибридных вирусных молекул в капсиды.

Для этого используют специальную линию клеток мыши, в геноме которых присутствуют два укороченных варианта ретровируса. Один из вариантов представляет собой последовательность 5'-LTR + gag + 3'-LTR, второй - 5'-LTR + pol, env + 3'-LTR, т.е. оба варианта лишены необходимой для упаковки РНК в капсид области  $\psi^+$ . В клетках такой линии синтезируются все необходимые для построения капсида белки и обратная транскриптаза, но формирующиеся капсиды остаются пустыми. Если в такие клетки дополнительно ввести несущий чужеродную генетическую информацию ретровирусный вектор, в котором, как обсуждалось выше, имеется  $\psi^+$ -область, происходит упаковка РНК вектора, т.е. гибридной. Получающиеся вирусные частицы сепарируют от культуры клеток «пакующей» линии и используют в дальнейшем для трансфекции нужных клеток, либо (если это позволяют свойства клетки-мишени) совместно культивируют «пакующую» линию и выбранные для трансфекции клетки, а затем проводят высеv на селективную среду, обеспечивающую отбор только трансфецированных клеток-мишеней. Такая система введения гетерологичных генов в клетки млекопитающих оказывается высоко эффективной, но емкость ретровирусных векторов не превышает 8 т.п.н., так как молекулы, большие, чем РНК вируса дикого типа, не упаковываются.

Еще одна система векторных молекул для клеток млекопитающих разработана на основе **вируса простого герпеса 1 типа** (сокращенно **HSV** от англ. herpes simple virus). Этот вирус привлекает, с одной стороны, хорошо изученным геномом, состоящим из двунитевой ДНК длиной 152 т.п.н. (сравните с 8 т.п.н. для ретровирусных векторов), и, с другой стороны, выраженной нейротропностью. Он размножается в нервных клетках

человека, куда проникает за счет слияния вириона с поверхностью тела нейрона, причем его репродукция не происходит постоянно, а инициируется определенными изменениями на уровне организма (т.е. он относится к латентным вирусам). Поэтому его и рассматривают как потенциальный вектор для генно-инженерной терапии длительно текущих нервных болезней.

В геноме вируса выявлены области, замена которых на чужеродную ДНК не сказывается на основных этапах репродукции, но введение ДНК непосредственно в геном вируса затрудняется его существенными размерами. Поэтому создана и используется специальная, основанная на особенностях репликации ДНК вируса система, состоящая из двух компонентов. Первый компонент – это плазмиды *E.coli*, несущая два участка из генома HSV: 1) последовательность, необходимую для упаковки вирусной ДНК в капсид, и 2) точку начала репликации ДНК вируса. Между этими участками располагается полилинкер, по которому и встраивается в выбранный для введения в клетки млекопитающих ген. Второй компонент – вирус простого герпеса, из генома которого удалены последовательности, обеспечивающие инициацию репликации и упаковку вирусной ДНК в капсид.

Для получения несущих нужный чужеродный ген вирусных частиц этим вирусом инфицируют клетки, а затем трансфецируют их ДНК плазмиды с нужным геном. За счет кодируемых генами вируса белков начинается репликация ДНК плазмиды, причем происходит она, как и положено для вируса простого герпеса, по модели «катящегося кольца»: в точки инициации репликации происходит односторонний разрыв и к 3'-концу присоединяются новые нуклеотиды, тогда как вторая нить остается ковалентно замкнутой матрицей. Отходящая новая нить в свою очередь становится матрицей для построения второй нити. По достижении растущей двунитевой ДНК размера, соответствующего размеру вирусного генома, происходит отрезание фрагмента, а процесс продолжается дальше. Параллельно идет наработка белков вирусного капсида и отрезанные фрагменты упаковываются. Таким образом чужеродный ген не только попадает в вирусные частицы, но и амплифицируется: поскольку длина плазмидной ДНК примерно в 10 раз меньше длины нормальной ДНК HSV, в каждой вирусной частице оказывается 10 копий вводимого гена. Это и послужило основанием для названия таких плазмид ампликон-плазмидами.

Эти, а также не рассмотренные здесь векторные системы на основе аденовирусов, находят применение при изучении особенностей функционирования клеток млекопитающих, то есть используются пока чисто в научных целях. Однако имеется

потенциальная возможность и ведутся разработки использования таких систем для получения трансгенных животных и для лечения наследственных болезней человека (это направление условно называют генотерапией).

Для генотерапии человека разрабатываются и другие методы введения генетической информации, называемые невирусными системами доставки генов. Среди них бомбардировка определенных тканей через разрез микрочастицами золота; использование липосом (комплексы из положительно заряженных липидов и отрицательно заряженных ДНК, предлагаемые для этих целей, называются липоплексы, входят они в клетку хорошо, но в клетке из-за слияния с ними лизосом большая часть ДНК в них разрушается); использование ДНК-конъюгатов (ДНК смешивают с поли-L-лизином, к которому ковалентно пришито много молекул белка, комплементарного какому-нибудь клеточному рецептору. Поли-L-лизин образует вокруг ДНК оболочку и такая структура после введения в организм взаимодействует с рецептором. Далее этот комплекс поглощается путем эндоцитоза подобно комплексу гормон-рецептор, и поэтому образовавшаяся эндосома не сливается с лизосомами, а находящаяся в ней ДНК не повреждается); и даже простое введение суспензии молекул ДНК в мышцу с помощью шприца. Частота трансфекции клеток такими методами значительно ниже, чем при использовании вирусных систем. Но их продолжают улучшать и разрабатывать, поскольку часть из них снимает характерное для вирусных систем ограничение по емкости вектора, и, вероятно, они могут понадобиться для введения в клетки искусственных хромосом человека, так называемых микрохромосом.

Разработка таких хромосом ведется на основе объединения теломерных участков, центромерных последовательностей и точек инициации репликации. В конце 90-х годов 20-го века была продемонстрирована возможность получения трех вариантов микрохромосом. Один из них был получен путем укорочения исходной хромосомы, второй – также укорочения + замена центромерной области на другую, введенную путем трансфекции; третий – посредством лигирования *in vitro* двух теломерных и одного центромерного участка и затем введения этой конструкции в клетки. Естественно, что все это пока подготовительные работы и до практического (генотерапевтического) применения микрохромосом пока еще далеко. На мышах для введения чужеродных ДНК значительной протяженности опробована система на основе искусственных дрожжевых хромосом (YAC), которые можно вводить либо в мужской пронуклеус зиготы микроинъекцией, либо в эмбриональные стволовые клетки кальциевым методом или электропорацией.

**Вопросы к § 16. 1.** Какие гены наиболее часто используются в качестве селективных маркеров при работе с клетками млекопитающих? **2.** Какие особенности жизненного цикла ретровирусов обусловили их применение в качестве векторов, несмотря на то, что они являются РНК-содержащими? **3.** Что такое ампликон-плазмида? **4.** Что такое емкость генно-инженерного вектора и чем она ограничивается при использовании вирусных векторных систем? **5.** Как можно создать искусственную хромосому человека?

### **§ 17. Методы получения трансгенных животных и перспективы их использования**

Успехи в получении трансгенных растений, а также разработка методов введения чужеродной ДНК в изолированные клетки животных легли в основу применения генно-инженерных приемов в селекции млекопитающих. Однако на данном направлении генетической инженерии пришлось столкнуться с определенными трудностями.

Прежде всего, это значительно более сложное строение организма высших животных по сравнению с высшими растениями, а значит и более сложное взаимодействие генов и их продуктов при реализации генетической информации. Поэтому предсказать все возможные изменения, которые могут возникнуть вследствие введения чужеродной генетической информации, для животных значительно сложнее, чем для растений. Во-вторых, невозможность использовать регенеративные свойства, присущие только отдельным тканям животного организма, для восстановления целостного организма из одной клетки. В-третьих, отсутствие у высших животных бесполого размножения, которое можно было бы использовать для поддержания линии генетически модифицированных организмов. В-четвертых, абсолютная раздельнополость высших животных, что не позволяет использовать самооплодотворение для таких же целей и приходится использовать близкородственные скрещивания. В-пятых, невозможность осуществления полного развития организма высших млекопитающих из зиготы в искусственных условиях (вне материнского организма). Тем не менее, начиная с середины 80-х годов прошлого века, развернулись работы по получению генетически модифицированных животных и за относительно короткий срок были достигнуты значительные успехи.

Модельным объектом для трансгеноза высших животных стали легко разводимые человеком лабораторные мыши. Основными методами введения генетической информации в их организм являются трансфекция бластомеров 8-клеточного эмбриона с помощью ретровирусных векторов, введение генетически модифицированных с помощью тех же векторов стволовых клеток в эмбрионы на более поздних стадиях развития и

прямое введение ДНК в зиготу до слияния мужского и женского ядер. Последний метод, получивший название **метода микроинъекций**, несмотря на технические сложности и трудоемкость, получил наибольшее распространение.

Для его реализации у самок белых мышей стимулируют овуляцию путем введения сыворотки беременной лошади и через 48 часов – хорионического гонадотропина человека, в результате чего в яичниках мыши образуется более 30 яйцеклеток вместо обычных 5-10. Затем осуществляют скрещивание таких самок с самцами и их быстрое умерщвление для вымывания оплодотворенных яйцеклеток из яйцеводов. Полученные таким образом клетки еще не являются полноценными зиготами, поскольку в них еще не произошла кариогамия (слияние ядер). С использованием микроманипулятора, под микроскопом поочередно фиксируют каждую клетку и с помощью инъекционной пипетки (тонкая стеклянная трубочка, соединенная с создающим давление механизмом) в ядро слившегося с яйцеклеткой сперматозоида (мужской пронуклеус) вводится суспензия молекул ДНК, содержащих необходимую генетическую информацию. Когда ядро яйцеклетки (женский пронуклеус) и ядро сперматозоида сливаются и получается полноценная зигота, она микрохирургическим путем имплантируется в матку так называемой суррогатной матери - самки, которая была перед этим скрещена с вазэктомизированным самцом (в семенной жидкости таких самцов нет сперматозоидов), поскольку у мышей не разработаны другие методы (например, гормональные) для подготовки матки самки к имплантации. В матку одной самки вводят от 25 до 40 зигот, для того, чтобы хотя бы часть из них имплантировалась нормально и началось дальнейшее развитие эмбрионов. Через три недели рождается трансгенное потомство, которое оценивается в дальнейшем на наличие введенных генов и выраженность желаемого признака.

Метод трудоемок и требует специальной подготовки: квалифицированный специалист в течение рабочего дня подвергает микроинъекции несколько сотен яйцеклеток, при этом часть яйцеклеток повреждаются и становятся непригодными для имплантации. Кроме того, имеются определенные трудности и в ходе собственно имплантации, а также не каждая имплантированная зигота в дальнейшем развивается нормально (поэтому их имплантируют больше, чем в норме может развиваться в матке мыши). К сожалению, и часть родившихся детенышей могут оказаться мало жизнеспособными и умирают на ранних стадиях постэмбрионального развития.

Для дальнейшего выращивания оставляют только тех выживших потомков, у которых произошло закрепление введенной генетической информации. Для их идентификации

производят выделение ДНК из небольшого количества тканей животного (у мышей для этого используют фрагмент хвоста) и осуществляют ПЦР с необходимыми праймерами. Анализ продуктов ПЦР позволяет отобрать необходимых животных (для мышей из 1000 имплантированных зигот получается от 30 до 50 трансгенных потомков) и по достижению половой зрелости проводить получение чистых линий путем традиционного инбридинга. Получаемое в таких скрещиваниях потомство анализируется тем или иным способом на наличие необходимых генов в гомозиготном состоянии. На этом этапе также встречаются определенные трудности, связанные уже с выражением интегрированных генов, вследствие чего окончательный выход (получение чистой линии) оказывается еще менее эффективным. Однако, если чистая линия уже получена, то ее поддержание уже не составляет особых проблем, и возможно практическое использование трансгенных животных в научных или промышленных целях.

Еще один подход – это **введение генетически модифицированных стволовых клеток в бластоцисту**. Для этого клетки из бластоцисты (зародыша на стадии начала формирования второго зародышевого листка) изолируют и поддерживают какое-то время в культуре. Такие клетки (сокращенно называемые ES-клетки) способны к пролиферации и обладают плюрипотентностью, т.е. способностью в дальнейшем развиваться в клетку любой ткани. Посредством трансфекции с использованием тех или иных векторов на основе вирусов млекопитающих в эти клетки вводится чужеродная генетическая информация, и дальнейшая задача состоит в том, чтобы отобрать те варианты клеток, в которых произошла встройка в определенный участок генома. Дело в том, что интеграция чужеродного фрагмента не должна нарушить ни процессы развития эмбриона, ни процессы постэмбрионального развития до половой зрелости. Уже известны некоторые сайты генома мыши, инсерции в которые оказывались удачными в этом отношении, поэтому в векторе, предназначенном для трансфекции ES-клеток, маркерный и ген и необходимый трансген располагают между последовательностями, гомологичными последовательностям из таких сайтов. В качестве маркерного гена используют ген  $Neo^r$ , продукт которого придает клеткам млекопитающих устойчивость к G-418 (генетицину), поэтому культивирование клеток на среде с этим соединением позволяет отобрать те из них, в которых произошла встройка векторной молекулы в геном (это так называемая позитивная селекция). Однако, иногда встройки могут происходить в различные участки генома, в том числе и важные для развития эмбриона и потомства, поэтому в составе вектора находятся еще два гена, наличие которых позволяет убрать клетки с ненужными вставками. Это два разных гена тимидинкиназы из генома вируса простого герпеса –

HSV-tk1 и HSV-tk2. Они располагаются в векторе слева и справа от нужных для направленной интеграции гомологичных фрагментов и если встраивание произошло случайно, не по этим гомологичным последовательностям, то в геноме клетки оказывается хотя бы один из генов тимидинкиназы. Его присутствие в геноме легко обнаружить при выращивании клеток на среде с ганцикловиром, поскольку он под воздействием этого фермента превращается в токсическое для клетки соединение. Таким образом, если после трансфекции ES-клетки поместить на среду, одновременно содержащую и генетицин (G-418) для позитивной селекции и ганцикловир - для негативной, будут размножаться только те клетки, в которых произошла интеграция в нужный сайт хромосомы.

Еще один метод отбора клеток с правильно произошедшей интеграцией основан на ПЦР, но для этого используют другие векторы. В таких векторах рядом с трансгеном, между ним и одной из необходимых для гомологичной рекомбинации последовательностей, располагают короткую так называемую уникальную последовательность (US), которая нигде больше в геноме животного не встречается (она может быть как природной, например из генома бактерий, так и синтетической). Для идентификации нужных клеток необходимы два праймера: один из них (P1) комплементарен этой уникальной последовательности, а второй (P2) – последовательности из того сайта хромосомы, в который предполагается встройка. Если после амплификации ДНК из трансфицированных клеток выявляется фрагмент предусмотренного размера, то, значит, именно в этих клетках интеграция произошла в нужное место хромосомы.

Далее клетки такого клона с использованием микроманипулятора вводят в бластоцисту мыши, и затем имплантируют эту бластоцисту в матку суррогатной матери. После этого по описанной выше схеме получают чистые трансгенные линии.

Считается (и тому есть экспериментальные подтверждения), что такой метод потенциально применим не только к мышам, но и к любым млекопитающим.

Каково же практическое использование трансгенных животных? Больше всего в настоящее время используются трансгенные лабораторные мыши. Они нашли применение в научных исследованиях.

Один из примеров - это получение животных с дефектом по какому-либо конкретному гену, что необходимо для изучения функции этого гена. В настоящее время получено более 300 линий таких мышей, и это позволило идентифицировать многие гены млекопитающих. Для проведения так называемого «нокаута гена» конструируют специальные последовательности, в которых селективный маркерный ген, например, тот

же ген Neo<sup>r</sup>, размещают внутри последовательности предназначенного для «нокаута» гена с таким расчетом, чтобы протяженные участки гена справа и слева от маркера обеспечивали успешную рекомбинацию с геном дикого типа в клетках млекопитающих и замену его на дефектный.

Еще одно направление в создании трансгенных мышей – это создание моделей наследственных болезней человека, таких как артрит, мышечная дистрофия, нейродегенеративные нарушения, болезнь Альцгеймера, образование опухолей и других. На мышах также отрабатываются варианты получения необходимых для изучения механизмов тех или иных болезней белков, получить которые в других системах экспрессии (бактериях, дрожжах, растениях, клетках насекомых) не удастся. Здесь предполагается создание системы секреции таких белков в молоко (вставки в последовательность гена  $\beta$ -казеина козы «сработали» на мышах), чтобы потом получить такой крупный или мелкий рогатый скот и иметь мощный источник необходимого белка.

С этой точки зрения наиболее подходящими животными являются **коровы**, в молоке которых около 35 г/литр белка, а годовые удои высокопродуктивных пород порядка 10 000 литров. Методику получения трансгенных коров начали отрабатывать сначала 90-х годов 20-го века и она заключается в следующем. Ооциты коров вымывают из яичников убитых на бойнях животных и *in vitro* создают им условия для созревания в яйцеклетки. Здесь же проводится их оплодотворение спермой быка, после чего клетки особым образом центрифугируют, чтобы уплотнить желток и сделать тем самым видимым мужской пронуклеус. Далее проводят микроинъекции необходимой генетической конструкции по стандартной методике и переносят зиготы в условия, обеспечивающие развитие зиготы в эмбрион. Полученные *in vitro* эмбрионы вводят в матку коровы, находящейся на стадии течки и они без хирургического вмешательства имплантируются в стенку матки. На определенной стадии развития эмбриона в матке отбирают небольшое количество клеток и посредством ПЦР удостоверяются в присутствии в геноме плода последовательности трансгена. Метод пока низко эффективен, но реален. Считается, что постепенно его этапы будут усовершенствованы и получение трансгенного крупного рогатого скота для медицинских и сельскохозяйственных целей станет обычным делом.

В медицинском аспекте предполагается экспрессия нужных генов клетках молочной железы и получение в дальнейшем из молока необходимых для терапии тех или иных болезней человека белков (например, белков системы свертывания крови для помощи гемофиликам), а в сельскохозяйственном – получение не содержащего лактозу молока путем экспрессии гена лактазы (некоторые люди плохо переносят потребление молочных



продуктов именно из-за присутствия в них лактозы), получение молока обогащенного казеином посредством гиперэкспрессии собственно коровьего гена (необходимо для производства сыров), получение животных, устойчивых к различным инфекционным заболеваниям (стоимость ветеринарного обслуживания животных составляет около 20% стоимости продуктов животноводства). Реализация последней цели должна заключаться во введении в геном животных конкретных генов переменных доменов иммуноглобулинов, обеспечивающих образование паратопов, специфичных для наиболее важных эпитопов антигенов патогенных для данного вида вирусов и бактерий. Подобный подход в получении резистентных пород потенциально применим и к другим сельскохозяйственным животным.

Получение трансгенных **овец и коз** пока обсуждается в основном с точки зрения использования их молока для получения медицинских препаратов, поскольку генетические конструкции для экспрессии генов человека в клетках молочной железы этих животных получены и апробированы. В этих гибридных ДНК используются промоторы гена  $\beta$ -лактоглобулина, гена  $\beta$ -казеина и гена  $\alpha_{S1}$ -казеина, а среди клонированных генов человека – ген активатора плазминогена, ген  $\alpha$ -антитрипсина (при отсутствии этого белка развивается эмфизема, дефицит ингибитора сывороточных протеаз, поражение легких, цирроз печени), ген фактора IX системы свертывания крови (белок нужен для лечения гемофилии В), ген лактоферрина, ген урокиназы, ген интерлейкина-2 (ИЛ-2 находит применение при лечении меланомы, глиобластомы и рака почек), ген CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator, трансмембранный белок, нарушения в структуре которого приводят к муковисцидозу - образованию большого количества слизи в дыхательных путях и как следствие этого повышению заболеваемости таких людей респираторными болезнями в несколько раз и их высокой смертности из-за аллергической реакции на нуклеиновые кислоты возбудителей). Существенно, что трансгенные овцы и козы в большинстве случаев не имеют отклонений в лактации, а вскармливаемое таким молоком потомство - отклонений в развитии. Из перспектив сельскохозяйственного применения трансгенного мелкого рогатого скота упоминают только овец с повышенной скоростью роста шерсти. Этот вариант был получен путем введения кДНК гена инсулиноподобного фактора роста 1 овцы под промотором гена кератина мышцы.

Получение трансгенных **свиней** также имеет место, причем ввиду близости физиологических и тканевых характеристик свиньи и человека, здесь также в основном преследуют медицинские цели. В частности, предполагается разработать и осуществить

трансгеноз свиньи с целью использования органов таких животных для пересадок человеку. Одно из препятствий при межвидовой трансплантации – это так называемое гиперострое отторжение, проявляющееся почти сразу же после пересадки. Оно вызывается осаждением антител на поверхности клеток пересаженного органа и активации системы комплемента по классическому пути, что, естественно, моментально разрушает клетки. Выяснилось также, что основным антигеном, который вызывает образование антител у выбранных как модель обезьян, является углеводный компонент поверхностных белков клеток свиньи. Предполагается, с одной стороны, «подобраться» к генам свиньи, кодирующим поверхностные антигены и изменить их так, чтобы убрать или модифицировать этот углеводный компонент, а с другой стороны, ввести в геном свиньи гены человека, контролирующие образование ингибиторов системы комплемента, защищающих собственные клетки от его действия. Эти гены уже клонированы и экспрессированы в организме свиньи и одно из животных действительно имело клетки, не повреждающиеся комплементом человека в опытах *in vitro*. После пересадки тканей такой свиньи приматам отторжение все-таки наблюдалось, но не по схеме гиперострого отторжения. Вероятно, шло отторжение за счет активации макрофагов Т-хелперами первого типа как это обычно имеет место при внутривидовых пересадках органов.

Еще одним успешным в этом направлении трансгенозом свиньи считается получение животных, продуцирующих человеческий гемоглобин. В этом случае в геном свиньи ввели два гена  $\alpha$ -цепи гемоглобина человека, один ген  $\beta$ -цепи гемоглобина и регуляторную область гена  $\beta$ -цепи под промотором свиного гена  $\beta$ -цепи гемоглобина. Перспективы применения таких свиней – приготовление из крови компонентов кровезаменителей.

В сельскохозяйственном аспекте путем введения гена бычьего гормона роста под промотором гена металлотионеина пытались получить породу быстрорастущих мясных свиней. Однако, хотя трансгенные животные быстрее росли, у них обнаруживались язвы желудка и кишечника, почечная и сердечная недостаточность, воспаления суставов и снижение защитных свойств слизистой оболочки дыхательных путей (повышенная заболеваемость пневмониями).

Параллельно с проблемами введения новой генетической информации в клетки млекопитающих решалась и проблема получения идентичных потомков, поскольку даже внутрисемейные скрещивания не гарантируют точного воспроизведения генотипа уже полученного трансгенного животного. Это направление получило наименование **клонирование животных.**

Решение проблемы успешного клонирования животных пока видят в поиске клеток эмбриона или взрослого организма, которые полностью сохраняли бы плюрипотентность, т.е. способность экспрессировать все гены, необходимые для начальных этапов эмбрионального развития. Если такие клетки обнаруживаются (у коров это клетки эмбриона, у овец – клетки эпителия молочной железы), то далее осуществляют перенос ядра такой клетки в цитоплазму яйцеклетки, из которой предварительно свое гаплоидное ядро удаляют. В экспериментах с клетками молочной железы овцы введение ядер осуществляли с помощью слияния клеток с применением полиэтиленгликоля, на коровах – с помощью микроманипулятора. На следующем этапе добиваются дробления такой своеобразной зиготы *in vitro* и имплантируют в матку «суррогатной» матери.

Проводятся также исследования по созданию системы получения трансгенных **птиц**. Сложности заключаются в том, что у птиц при оплодотворении в яйцеклетку проникает, как правило, несколько сперматозоидов, но лишь один из них сливается с ядром. Поэтому осуществлять инъекции в мужской пронуклеус считается нецелесообразным, а проверка возможности введения ДНК в цитоплазму яйцеклетки показала, что в ядро такая ДНК не проникает. Были проверены возможности трансфецирования клеток зародыша кур и перепелов стандартными ретровирусными векторами млекопитающих и оказалось, что это возможно. Часть полученных таким образом цыплят и перепелят наследовали маркерный ген и не продуцировали вирусных частиц, но опасения, что присутствие ретровирусного генома может иметь нежелательные последствия при потреблении полученных от таких птиц продуктов, заставили дальше отказаться от такого подхода. К настоящему времени используют метод введения ДНК в бластомеры куриных эмбрионов с помощью липосом. Для этого из слегка насиженных яиц извлекают эмбрион, разделяют его на клетки и смешивают их с суспензией липосом, содержащих чужеродную ДНК. Добиваются слияния липосом с клетками, а затем вводят суспензию таких клеток в подзародышевую область свежеснесенных яиц, которые перед такой процедурой подвергают несильному (540-660 рад в течение часа) облучению. Облучение убивает часть клеток исходного зародыша и после введения трансфецированных бластомеров они с большей вероятностью войдут в состав развивающегося эмбриона. Если из такого яйца в дальнейшем вылупливается птенец, то в части его клеток можно обнаруживать присутствие введенного гена. Такие цыплята называются химерными и их в дальнейшем используют для скрещивания. Анализ потомства позволяет выявить особи, у которых трансген присутствует во всех клетках, и такая птица становится основателем чистой линии, получаемой уже стандартным инбридингом.

Потенциальное хозяйственное использование трансгенных птиц видят в следующем: получение пород кур, устойчивых к различного рода инфекциям (бактериозы и болезни, вызываемые одноклеточными животными, наносят серьезнейший ущерб промышленному птицеводству); пород с измененным составом желтка и мяса (меньше жира и холестерина); пород с измененным составом белка, причем предполагается поставить под промоторы генов овальбумина гены ряда используемых в медицинских целях белков, чтобы потом извлекать эти белки из яичного белка.

Еще одна группа позвоночных животных, которых уже коснулась своим крылом генетическая инженерия – это **рыбы**. Методически работа с яйцеклетками рыб является самой несложной и введения ДНК в икринки можно осуществлять микроинъекцией или электропорацией без особого труда. Тем более, что введение линейализированной ДНК просто в цитоплазму оплодотворенных яйцеклеток или бластомеров четырехклеточного зародыша оказывается вполне эффективным. Трансфецированные икринки просто оставляют в воде оптимальной для развития эмбриона температуры и выход трансгенного потомства может достигать 70%. Наличие введенного гена у мальков определяют посредством ПЦР.

Из успехов трансгеноза рыб упоминают работу с лососем, в которой была использована кДНК гена гормона роста лосося, поставленная под промотор и сайт полиаденилирования гена антифризного белка североамериканской бельдюги. Экземпляры потомства нерки с такими генами в возрасте одного года весили в 10 раз больше обычной нерки, выращенной в таких же условиях. Обсуждается возможность получения пород проходных и разводимых (форель, карп) рыб, устойчивых к болезням и стрессовым воздействиям при скученном содержании.

**Вопросы к § 17. 1.** В чем заключаются основные трудности получения трансгенных животных? **2.** В чем суть метода микроинъекций? **3.** Зачем нужны трансгенные мыши? **4.** Как получить точную генетическую копию? **5.** Пофантазируйте, какое изменение и в каких сельскохозяйственных животных следовало бы получить

### **§ 18. Надо ли современному человеку бояться трансгенных организмов?**

Вопрос о так называемой генетической безопасности (сейчас чаще как синоним применяют термин биобезопасность) возник еще в середине 70-х годов XX века. Причем инициировали его обсуждение сами же ученые, которые стояли у истоков генетической инженерии. Печальный опыт открывших ядерную энергию физиков не прошел бесследно

– теперь человечество старается прогнозировать все возможные последствия достижений науки и не допускать их использования во вред мировому сообществу.

Понимание того, что новые комбинации генов могут привести к непредсказуемым результатам, является неотъемлемой частью планирования всех экспериментов по созданию трансгенных организмов. Поэтому практически всегда, прежде чем начать непосредственную работу по созданию новых сортов или штаммов, проводится тщательный теоретический анализ возможных изменений в подвергающихся генно-инженерному воздействию существах. Кроме того, прогнозируется возможность переноса созданных человеком генетических конструкций от используемых человеком трансгенных организмов к свободноживущим и распространения их в природных популяциях. Если в результате такого прогнозирования выявляются хоть какие-нибудь неясные возможности, такой генно-инженерный проект просто прекращают. При этом разработчики таких проектов руководствуются не только осознанием своей ответственности перед человечеством, но и реальными экономическими факторами.

Дело в том, что затраты на осуществление предварительных теоретических и практических исследований (надо понять, какой именно ген необходимо заменить или подвергнуть модификациям, чтобы желаемый результат был достигнут), на практическое создание собственно генетических конструкций и их введение в клетки модифицируемых организмов, на проверку выраженности придаваемых трансгенному организму свойств и оценку того, не повлияли ли внесенные генетические изменения на исходные хозяйственно-полезные качества штамма или сорта, достаточно велики. И если в процессе работы, а еще хуже - на этапах уже хозяйственного использования сортов или штаммов выяснятся нежелательные характеристики трансгена, то все затраченные деньги будут потеряны. Более того, фирма, допустившая такой промах, фактически может считать себя банкротом, потому что сообщения в средствах массовой информации обеспечат этой фирме такую антирекламу, что и другая ее продукция не будет покупаться. Именно поэтому сами производители трансгенных организмов уже после создания подходящего сорта или штамма по специально разработанной схеме проводят его тщательную практическую проверку на безопасность.

Кроме того, в большинстве развитых стран приняты специальные законы, регламентирующие использования трансгенных организмов и продуктов из них. Для выполнения этих законов созданы государственные учреждения, которые уже со своей стороны проводят проверку каждого ввозимого в страну трансгена и только после нее

выдают разрешение на его использование. Таким образом, каждый полученный на основе генно-инженерных организмов продукт проходит двойную проверку.

Международное регулирование распространения трансгенных организмов (их все чаще теперь называют ГМО – генетически модифицированные организмы) осуществляется в рамках Конвенции о биологическом разнообразии. Вошедшие в эту Конвенцию страны в 2000 году приняли особый документ - Картахенский протокол по биобезопасности, основная цель которого «...содействие обеспечению надлежащего уровня защиты в области безопасной передачи, обращения и использования живых измененных организмов, являющихся результатом современной биотехнологии, способных оказывать неблагоприятное воздействие на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия, с учетом также рисков для здоровья человека и с уделением особого внимания трансграничному перемещению» (Картахенский протокол, статья 1). Беларусь присоединилась к Протоколу в мае 2002 года. Картахенский протокол вступил в силу 11 сентября 2003 года.

В Республике Беларусь в 2005 году принят закон, который регулирует создание и распространение трансгенных организмов. Коротко суть этого закона представлена в таблице

Система обеспечения безопасности в соответствии с Законом Республики Беларусь «О безопасности генно-инженерной деятельности» (на примере генно-инженерных сортов сельскохозяйственных растений)

Ступень	Содержание ступени	Исполнитель
I. Создание генно-инженерных организмов	1. Выбор генов для трансгеноза, изучение их свойств и свойств протеинов - продуктов этих генов, сравнение их с известными опасными генами, анализ возможных неблагоприятных эффектов будущих генно-инженерных организмов, содержащих отобранные трансгены, на здоровье человека и окружающую среду 2. Создание генно-инженерных организмов, оценка их биобезопасности 3. Подготовка досье о безопасности генно-инженерных организмов для здоровья человека и окружающей среды (по определенной законодательством форме)	Разработчик генно-инженерных организмов
II. Высвобождение генно-инженерных организмов в	1. Государственная экспертиза безопасности генно-инженерных организмов для здоровья человека и окружающей среды	Эксперты, Экспертный совет при Министерстве природных ресурсов и охраны окружающей среды

окружающую среду для проведения испытаний	2. Выдача разрешения на высвобождение генно-инженерных организмов в окружающую среду	Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды
	3. Испытания генно-инженерных организмов в условиях контролируемого высвобождения (то есть с соблюдением мер, ограничивающих распространение генно-инженерных организмов в окружающей среде)	Разработчик под контролем Минприроды (его территориальных органов)
	4. Государственное сортоиспытание отобранных по комплексу положительных признаков форм	Комитет по государственному испытанию и охране сортов при Минсельхозпрод
III. Государственная регистрация генно-инженерных сортов растений	1. Включение выделившихся по результатам сортоиспытания форм в список сортов — кандидатов на внесение в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород	Комитет по государственному испытанию и охране сортов растений при Минсельхозпрод
	2. Государственная экспертиза безопасности для здоровья человека генно-инженерных сортов, которые могут быть использованы в хозяйственной деятельности в качестве продовольственного сырья (тесты на токсичность и аллергенность, существенную эквивалентность). Подготовка экспертного заключения	Эксперты, аккредитованные лаборатории, Экспертный совет при Министерстве здравоохранения
	3. Принятие решения о включении генно-инженерного сорта в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород	Комитет по государственному испытанию сортов при Минсельхозпрод

В связи с этим вызывает некоторое удивление осуществляемая средствами массовой информации ряда стран своеобразная контрпропаганда таких продуктов и созданное на основе этого довольно мощное общественное движение против трансгенных организмов. Однако все становится понятным, если обратиться не к биологической, а экономической сущности вопроса.

Как вы уже поняли из предыдущих параграфов, применение трансгенных организмов существенно удешевляет производство продуктов. Соединенные Штаты Америки, первыми начавшие массовое использование трансгенных организмов (например, по данным на 2001 год в этой стране трансгенные растения томатов составляли более 90%, трансгенная кукуруза – более 85% и т. д.), вытесняют с мирового рынка более дорогие аналогичные товары производителей из других стран. Это создает

огромную проблему для стран, где сельскохозяйственное производство составляет значительную часть экономики (в частности, стран Центральной и Южной Европы), и грозит разорением огромного количества фермерских хозяйств, что, соответственно, приведет к социальному взрыву. Для того, чтобы избежать подобного рода последствий, правительства многих стран принимают меры для сдерживания натиска более дешевых американских товаров, стараясь тем самым получить время для перестройки своей экономики, при этом прекрасно понимая все преимущества использования трансгенных организмов. В рамках такого сдерживания и осуществляется пока пропаганда против трансгенов.

Расчет здесь довольно прост – умело подаваемые через средства массовой информации намеки на возможность проявления якобы неучтенных учеными последствий вызывают опасения у далеких от экономики и науки слоев населения, которые и составляют большинство покупателей. И хотя ни в одной из стран ни разу не было доказано, что товары, включающие сырье из генетически модифицированных организмов действительно хуже или, тем более, опаснее обычных, они раскупаются не так быстро, как могли бы.

В такой ситуации, когда в каждой стране имеются и сторонники, и противники применения трансгенных организмов, большинство стран, уважая права покупателей, постепенно вводит обязательную маркировку товаров, содержащих сырье из генетически модифицированных организмов. Чаще всего, это специальный знак, представляющий собой аббревиатуру GMF от английской фразы genetic modified food (дословно – генетически модифицированная пища), и наноситься он должен на товар, включающий как минимум 10% указанного сырья. Для примера - если в печенье из обычной пшеничной муки добавлено 10 % муки из трансгенной кукурузы, устойчивой к насекомым-вредителям, это должно быть учтено производителем и доведено до сведения покупателей указанным выше образом. Считается, что это даст возможность каждому из нас в ближайшие годы лично, исходя из своих пристрастий и вкусов, решать, потреблять ли полученную на основе трансгенов продукцию.

Вопросы о генетически модифицированных животных и о клонировании животных и человека также широко обсуждаются, но несколько в другом аспекте. Дело в том, что в отличие от растениеводства, в животноводстве всегда имеется проблема сохранения хозяйственно ценных пород и гарантированного получения сохраняющих породные качества животных при их массовом разведении. Решение этой проблемы несомненно даст существенную экономическую выгоду и улучшит в целом продуктивность



сельскохозяйственного производства. Кроме того, если получить животное, в молоке которого бы содержался не просто молочный белок казеин, а какой-либо из белков, нужных для лечения того или иного заболевания человека, и далее путем клонирования получать потомков такого животного, то такие, условно говоря, живые фабрики лекарств, могли бы решить некоторые из медицинских проблем. Такое потенциально возможное применение трансгенных животных для нужд медицины и сельского хозяйства не вызывает особых протестов и нареканий.

Однако, поскольку люди также относятся к классу Млекопитающие, в настоящее время уже никто не сомневается, что клонирование человека также является возможным. Именно поэтому в средствах массовой информации, а в ряде стран уже и на правительственном уровне, обсуждается вопрос о допустимости такого рода экспериментов. Данная проблема имеет прежде всего этический характер и несколько своеобразно трактуется далекими от науки людьми. Для самих же генных инженеров очевидно, что получить точную в плане психологического и умственного развития копию человека просто невозможно. Человек, как существо социальное, формируется в значительной степени в период длительного постэмбрионального развития, поэтому даже однояйцевые близнецы, выросшие в различных условиях, существенно отличаются друг от друга.

Исходя из этого, никто и не собирается получать клоны человека, например, как это любят показывать в фантастических фильмах, для использования их в качестве двойников известных личностей или же создания армии сверхчеловеков для завоевания мира. Начатые в настоящее время эксперименты преследуют лишь одну цель – научиться помогать смертельно больному человеку, используя клетки полученного путем клонирования эмбриона. Дело в том, что уже давно вошедшие в практику медицины методы пересадок органов и тканей (например, костного мозга при лейкемии) не дают пока 100 % успеха именно из-за различий людей на генетическом уровне. Преодолеть отторжение клеток и тканей и призвано клонирование человека. Попросту говоря, если этот путь действительно окажется возможным, каждому человеку при необходимости можно будет создавать специальный банк клеток его же организма и использовать их для успешного лечения неизлечимых в настоящее время болезней. Станет ли реальной такая перспектива, человечество, как прогнозируют футурологи, может узнать уже в первой половине нашего века.

**Вопросы к § 18. 1.** Подумайте теперь, после прохождения этого курса (прочтения этой книги), о своем отношении к проблеме создания трансгенных организмов. **2.** Проведите опрос среди своих

одноклассников, родственников или знакомых по теме «Нужно ли создавать трансгенные организмы?». **3.** Попробуйте сделать для одноклассников или школьников младших классов доклад о том, зачем и как получают трансгенные организмы. **4.** Проведите диспут с противниками генетической инженерии и попробуйте обоснованно убедить их в неправильности их взглядов.