

## **ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И РАСТЕНИЯ: СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ИХ РОЛЬ В ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА**

**Иванов А.В.** – сотрудник Отделения молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ РАН

Эти лекции являются частью дополнительного курса для 10–11 классов с углубленным изучением биологии. Главная задача такого курса – рассказать о наиболее интересных открытиях, передовых методах и последних достижениях современной биологии. Среди других вопросов, рассматриваемых в этом курсе – получение и использование трансгенных животных, клонирование организмов, принципы изучения геномов, важнейшие открытия в области биохимии, биологии клетки, систематики организмов.

### **Введение**

С самого момента возникновения человечество использовало для питания и других хозяйственных нужд продукты, получаемые от различных растений и животных. Многие из таких растений и животных по мере развития цивилизации были окультурены и превратились в классические объекты сельского хозяйства. В качестве примера среди растений можно привести пшеницу, виноград, рис, кукурузу, среди животных – овец, коз, свиней, коров, а среди микроорганизмов – пекарские дрожжи. И с самых давних времен человек пытался улучшить эти растения и этих животных: увеличить урожайность и плодовитость, улучшить внешний вид, вкус, стойкость против различных заболеваний, неблагоприятных условий окружающей среды и многое другое. Сначала для достижения этих целей применялся искусственный отбор от лучших производителей, однако этот процесс очень долгий и не всегда ведущий к созданию нового сорта или породы. Затем, благодаря прогрессу науки, в начале XX века стали доступны методы генетики и селекции, многократно ускорившие создание новых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов. Использование таких методов достаточно ограничено, так как работы ведутся в пределах генома одного вида животных или одного рода растений и микроорганизмов. Но наука не стоит на месте, и достижения последних десятилетий XX века в таких областях биологии как генетика, молекулярная биология, микробиология позволили выйти за эти рамки и

создать генетически модифицированные организмы с признаками, которыми они не обладали ранее.

Что же следует называть генетически модифицированными (ГМ) или трансгенными организмами? Все они получены с помощью методов генетической инженерии – системы экспериментальных приемов, позволяющих создавать организмы с новыми наследственными свойствами. Основным принципом генетической, или геномной, инженерии является конструирование искусственных генетических структур в виде так называемых рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Начало этой новой отрасли молекулярной биологии было положено в 1972 году, когда Пол Берг с сотрудниками опубликовали первую работу о получении *in vitro* (по латински «в стекле», то есть вне организма) рекомбинантной молекулы ДНК, состоящей из фрагментов фаговой, бактериальной и вирусной ДНК.

В настоящее время генетическая инженерия – одна из наиболее перспективных областей биологии. Она бурно развивается и, что, наверное, самое главное, дает практические результаты. По областям применения можно выделить генетическую инженерию микроорганизмов, растений и животных. При этом возникает вопрос о том, можно ли приравнять понятия «генетическая инженерия» и «биотехнология». Последний термин имеет более широкое значение, так как включает в себя любое производство на основе использования живых организмов. Но именно геномная инженерия в середине 70-х годов дала биотехнологии огромный импульс к развитию, а сегодня практически любое биотехнологическое производство основано на использовании трансгенных организмов.

### **Современная биотехнология микроорганизмов**

Началом промышленной генетической инженерии принято считать 1980 год (всего через 8 лет после работы Берга!), когда в США был выдан первый патент на модифицированный штамм микроорганизма, способного разлагать нефть. Еще через два года был разрешен для клинического использования полученный из бактерии первый лекарственный препарат – человеческий инсулин. Сейчас прикладная промышленная микробиология развивается по нескольким основным направлениям: 1) производство продуктов биосинтеза трансгенных микроорганизмов, например, антибиотиков, гормонов, ферментов и витаминов; 2) использование биомассы микроорганизмов – производство медицинских вакцин, различных дрожжей, белково-витаминных концентратов и заквасок для получения кисломолоч-

ных продуктов и силосования кормов; 3) биотехнологии, основанные на уникальных способностях некоторых бактерий производить органические кислоты, этанол, углеводы и метан. Сюда же можно отнести и переработку некоторых отходов с возможностью получения полезных соединений, в первую очередь, горючих газов. Рассмотрим каждое из этих направлений подробнее.

#### *Использование трансгенных микроорганизмов в медицине*

Ни для кого не секрет, что такая актуальная сейчас проблема состояния здоровья человека в значительной степени зависит от обеспечения необходимыми медикаментами. В настоящее время биотехнология на основе использования трансгенных микроорганизмов предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных, диагностических и профилактических лекарственных препаратов, а также позволяет производить в достаточных количествах широкий спектр лекарственных средств, которые раньше были малодоступны. Биотехнологические медицинские препараты по объему продаж в настоящее время составляют более 5% общего мирового рынка, а по прогнозам к 2005 году достигнут более 15%. Среди примерно 50 новых видов лекарств, вакцин и препаратов для диагностики, появляющихся на рынке ежегодно, 10–15 получены с помощью биотехнологических методов. Еще более 350 новых биопрепаратов находится сейчас в стадии клинического изучения, причем большинство из них предназначены для лечения болезней, которые ранее считались неизлечимыми.

К самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза, относятся антибиотики. По разнообразию и показаниям к применению они занимают первое место среди продукции мировой фармацевтической промышленности. Сегодня известно более 6000 видов антибиотиков, более 100 из которых находят применение в медицинской практике, в том числе при лечении таких тяжелых заболеваний, как туберкулез, менингит, плеврит, пневмония. Отдельные антибиотики применяют при лечении онкозаболеваний. Объем мирового рынка антибиотиков увеличивается в последнее время на 10–20% в год и составляет более 23 млрд долларов.

Вторым классом лекарственных препаратов, производимых биотехнологическим путем, являются гормоны. В медицинских целях применяются два основных типа гормонов, различающихся по молекулярному строению: стероидные и пептидные. Среди стероидных гормонов можно

выделить кортизон и преднизолон, которые широко применяют при лечении различных аллергических заболеваний, в том числе такого тяжелого, как бронхиальная астма, а также ревматоидного артрита и других недугов. Другой обширной группой стероидов являются половые гормоны, такие как эстроген, широко применяемые для оральной контрацепции и лечения ряда заболеваний. Пептидные гормоны сейчас практически целиком производятся путем синтеза с помощью генетически модифицированных микроорганизмов. Сюда можно отнести уже упоминавшийся инсулин, а также такие антивирусные, антиопухолевые и иммуномодулирующие агенты как интерфероны и интерлейкины.

Особое место среди лекарственных средств занимают ферменты. Как и пептидные гормоны, они имеют белковую природу, то есть состоят из аминокислот. Это вызывает значительные трудности для их получения традиционным фармацевтическим путем – химическим синтезом. Генная инженерия дает возможность обеспечить многих нуждающихся самыми различными ферментами. Например, при лечении заболеваний пищеварительных органов применяются протеолитические ферменты. Эти же ферменты используют при лечении ожоговых поражений и различных ран для удаления некротических тканей. При лечении патологии обмена веществ применяют также липазы, расщепляющие жиры. Протеиназы с фибринолитическим действием используют для растворения тромбов, а антикоагулянты, например плазмин, эффективны при лечении инфаркта миокарда. С помощью таких препаратов, как стрептокиназа и урокиназа, лечат тромбоз коронарных сосудов сердца, легких, конечностей. Подобное перечисление можно продолжать бесконечно, практически для каждой болезни сейчас найдется лекарство, полученное с применением генно-инженерных методик.

Важный вклад микробной биотехнологии в медицину состоит в получении профилактических препаратов, причем этот вид продукции не имеет дублера в химической промышленности. В первую очередь это производство вакцин против различных инфекций. Необходимый антиген можно получить с помощью непатогенного (аттенуированного) микроорганизма, полученного генно-инженерными методами, и таким образом избежать опасностей, связанных с применением обычных вакцин. Только в США в результате массовой вакцинации за последние 45 лет заболеваемость полиомиелитом снизилась в 4000 раз. Также быстро снизилась заболеваемость корью, краснухой, дифтерией после введения соответствующих вакцин в практику.

К числу важных практических достижений генной инженерии необходимо отнести и получение диагностических препаратов. Сегодня уже более 200 новых диагностикумов введены в медицинскую практику, разработаны способы диагностики такого опасного заболевания, как СПИД. Широко применяются методы генной диагностики, то есть выявления дефектных генов, включая пренатальную диагностику.

#### *Использование биомассы ГМ микроорганизмов*

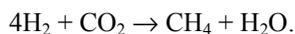
Согласно прогнозам, к 2050 году население Земли возрастет до 10 млрд человек и для обеспечения его потребности в продукции сельского хозяйства нужно будет увеличить объем производства на 75%. При этом человеку недостает в первую очередь белка животного происхождения, который по аминокислотному составу более богат, чем растительный белок. Промышленная микробиология поставляет животноводству, по крайней мере, три вида важных веществ: кормовой белок и белково-витаминные концентраты (БВК), незаменимые аминокислоты и кормовые антибиотики. Добавление 1 т БВК в корма обеспечивает экономию 7 т фуражного зерна и дополнительное производство 0,8 т свинины или 5 т мяса птицы. Включение 1 т ГМ кормовых дрожжей в рацион телят и поросят позволяет экономить 6 т цельного молока. Эти ценные продукты получают путем переработки ГМ микроорганизмами подсолнечной лузги, кукурузных кочерыжек, соломы и других отходов сельского хозяйства, которые содержат клетчатку. Второй вид сельскохозяйственной биотехнологической продукции – незаменимые аминокислоты, производство которых для медицины и пищевой промышленности интенсивно развивается во всем мире. Среди них такие, как лизин и метионин, обязательно должны содержаться в готовом виде в пище человека и кормах животных. Метионин производят с помощью химической технологии, а лизин – в основном биотехнологически за счет ГМ микроорганизмов. Добавление лизина в корм скоту резко увеличивает объем мясной продукции: на 1 т лизина высвобождается 40–50 т фуражного зерна и получается дополнительно более 10 т мяса.

Помимо этого, в последнее время в животноводстве и растениеводстве используется около 100 биопрепаратов, таких как стимуляторы роста животных и растений, энтомопатогены и бактериальные удобрения. Применение таких средств позволяет отказаться от использования или снизить дозы применяемых химических средств защиты и минеральных удобрений,

что приводит к повышению качества продукции и созданию экологически чистых технологий.

### *Экологические аспекты генной инженерии*

Известно, что потребление природных энергетических ресурсов во всем мире намного превосходит процессы восстановления запасов полезных горючих ископаемых. Понятно, что необходимы поиски новых нетрадиционных решений. Одним из наиболее перспективных направлений является использование биомассы зеленых растений, которые являются консервантами солнечной энергии. Всего 2% биомассы растений используется для пищи человека и на корм животных, остальное количество в 20 раз превышает годовое потребление энергии полезных ископаемых. Иными словами, конверсия растительной биомассы в энергию может помочь решить энергетические проблемы. Традиционный способ применения растений для получения тепла – сжигание – крайне малоэффективен, реализуется только 10% энергозапасов, при этом окружающая среда загрязняется дымом, а в атмосфере накапливается CO<sub>2</sub>. Альтернативой является конверсия биомассы в биогаз и биоэтанол с помощью генно-модифицированных микроорганизмов. При этом реализуется 50–80% потенциальной энергии, без загрязнения атмосферы, без вредных отходов. Отходы такого производства служат высококачественным удобрением. Основным продуцентом здесь являются метаногенные бактерии из царства Архей, подцарства Эвриархеот. Принцип действия установки по получению биогаза, или метантенка, следующий: при высокой температуре и отсутствии молекулярного кислорода происходит сбраживание органических веществ разнообразной микрофлорой, в результате чего образуется водород и углекислота. Далее за дело берутся метанообразующие археи, которые используют эти газы для «карбонатного дыхания», получая необходимую для жизни энергию и выделяя метан:



В получении биогаза (CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> = 2/1) из отходов сельского хозяйства пионером является Индия, где в настоящее время функционирует около 1 млн установок для получения газа, который используется для бытовых нужд. В Китае функционирует более 70 млн малых метантенков, которые служат основным источником энергии в сельской местности и удовлетворяют нужды 70% крестьянских семей, где биогаз используется для отопления домов и приготовления пищи.

Из растительного сырья можно получать не только горючие газы, но и спирт этанол. Здесь в основе лежит процесс брожения, а главный продукт – пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*:



Впервые идея применения биоэтанола для энергетических целей возникла в 1975 году в Бразилии, а к 1997 году было сэкономлено 35,6 млрд долларов на уменьшении экспорта нефти. Затем подобные программы были разработаны в 1978 году в США и в 1998 году в Канаде. Биоэтанол используется в качестве моторного топлива либо в чистом виде, либо с добавлением бензина. Различные виды топлива могут содержать от 10 до 24% биоэтанола. Масштабы производства этанола в качестве топлива с каждым годом увеличиваются. В ближайшие годы биосистемы смогут обеспечить 10–15% производства энергии в таких странах, как США и Канада, и составят основу энергетики в Бразилии, Китае, Индии, на Филиппинах.

Следующая серия биотехнологий природоохранительного плана направлена на очистку земель и водоемов. Известно, что основной вред окружающей среде наносят стоки химических предприятий, содержащие различные синтетические органические соединения, разложение которых в природе происходит крайне медленно. Многие из таких отходов являются ксенобиотиками – токсичными веществами, не включающимися в метаболизм живых организмов. Эти вещества созданы фантазией человека, и природа их не знает. Микробиологи изучают пути катоболизма ксенобиотиков, возможности их разложения и детоксикации. Среди огромного разнообразия бактерий можно найти отдельные организмы, использующие самые уникальные варианты путей метаболизма, включающие необычные химические соединения. Опираясь на глубокие знания физиологии бактерий, ученые создают организмы с такой комбинацией метаболических путей, что становится возможна переработка или разложение самых необычных, в том числе токсичных, соединений. На основе этих исследований создают биотехнологические способы очистки воды от неприродных соединений, а также методы, позволяющие контролировать загрязнения окружающей среды. В настоящее время ежегодный объем продаж таких препаратов для контроля и мониторинга загрязнений составляет около 10 млн долларов, а в ближайшей перспективе эта цифра может достичь 200 млн долларов.

Еще одна беда, стоящая перед человечеством – загрязнения земель и водоемов нефтью и нефтепродуктами. Подобные загрязнения занимают

огромные площади вокруг мест добычи нефти, нефтеперерабатывающих предприятий и портов. Нередко причинами экологических бедствий становятся аварии на судах, особенно танкерах, когда нефтью загрязняются акватории и берега рек и морей. Методы генной инженерии активно используются для разработки штаммов-деструкторов, способных быстро разлагать массивные скопления нефтепродуктов.

### *Способы получения ГМ микроорганизмов*

Каким же образом человек смог научить микроорганизмы вырабатывать все эти вещества? Как известно, способность организмов синтезировать те или иные биомолекулы, в первую очередь белки, закодирована в их геноме. Поэтому достаточно «добавить» нужный ген, взятый из другого организма, в бактерию, которая способна расти в простых условиях и чрезвычайно быстро размножаться. Но попытки провести перенос в бактерии непосредственно геномной ДНК привели к противоречивым результатам. Только в 70-е годы были получены воспроизводимые результаты с применением так называемой векторной трансформации. В основе этого подхода – использование векторных молекул – ДНК, способных переносить содержащиеся в них гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом. Решающую роль в этих экспериментах сыграли также методы получения индивидуальных генов, наработка их в необходимом количестве путем клонирования, то есть практически неограниченного размножения в бактериальных клетках.

В основе всех достижений генетической инженерии лежит одна из особенностей строения генома бактерий – наличие у них небольших, отличных от хромосомы, кольцевых молекул ДНК, называемых плазмидами. Плазмиды широко распространены в природе и встречаются у подавляющего числа прокариотических организмов, а также у низших эукариот – дрожжей. Важным свойством плазмид является их способность реплицироваться (размножаться) вместе с ДНК клетки-хозяина, и поэтому в последнее время их считают внутриклеточными паразитами или симбионтами. Клетки-хозяева не нуждаются в плазмидах для выживания в обычных условиях, но часто плазмиды придают им ряд особых свойств. Плазмиды придают бактериям способность к половому размножению (F-фактор), устойчивость к антибиотикам и дезинфицирующим средствам (R-фактор), возможности усвоения некоторых сложных органических веществ, например, углеводов.

Основная масса исследований, которые привели к развитию генной инженерии, проводилась на классическом объекте микробиологов – кишечной палочке *Escherichia coli*. С помощью специальных ферментов – эндонуклеаз рестрикции, или рестриктаз, плазида, несущая какой-нибудь маркерный ген, например, ген устойчивости к определенному антибиотику, разрезается в строго определенном месте с образованием с каждой стороны нескольких (от одного до пяти) неспаренных оснований – «липких концов». С помощью таких же рестриктаз получается фрагмент генома организма-донора, несущий нужный ген, например, ген человеческого инсулина. В последнее время донорную ДНК чаще получают путем «пришивания» «липких концов» к молекуле ДНК, полученной путем обратной транскрипции с матричной РНК нужного гена (кДНК). Главную роль здесь играет фермент обратная транскриптаза, или ревертаза, впервые открытая у ретровирусов (таких как ВИЧ и некоторые возбудители злокачественных новообразований – онковирусов). Далее за счет комплиментарного взаимодействия неспаренных оснований «липких концов» происходит включение нужного гена в плазмиду, при этом образуется новая рекомбинантная (гибридная) ДНК. Завершает процесс фермент ДНК-лигаза, которая ковалентно зашивает разрывы в цепях ДНК.

Следующий этап – перенос рекомбинантной плазмиды в бактерию. Такой процесс – включение чужеродной ДНК в бактериальную клетку – носит название трансформации, а молекула ДНК – вектор. Это явление иногда встречается в природе, что говорит о том, что трансформация – это естественный биологический процесс. В естественных условиях трансформация встречается у таких бактерий, как возбудитель пневмонии *Diplococcus pneumonia* и *Bacillus subtilis*. Необходимым условием трансформации является синтез бактериями особого белка компетентности, что происходит только во время активного роста колонии микроорганизмов. Бактерии с трансформированными плазмидами легко отобрать: они способны расти в присутствии антибиотика, против которого в плазмиде имеется ген устойчивости.

Другой способ построения векторных молекул использует бактериофаги – особую группу вирусов, заражающих исключительно бактерии. Наиболее широкое применение получил бактериофаг  $\lambda$ . Средняя часть генома этого вируса не несет в себе важных функций и может быть заменена на чужеродный фрагмент ДНК. В настоящее время существует очень много векторов, сконструированных на основе различных плазмид и бактериофагов.

Значительно сложнее подвергнуть генетической модификации эукариотические микроорганизмы, к которым относятся грибы, протисты, растения и животные. Наибольшее значение как для биотехнологических производств, так и для генетических исследований имеют пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Как и у бактерий, у них имеются плазмиды, но использование их в качестве векторов часто оказывается не очень эффективно. Поэтому для того, чтобы возник стабильный трансформант, необходимы два последовательных события: проникновение рекомбинантной ДНК в клетку и ее интеграция в хромосомную ДНК. Такой метод называется интегративной трансформацией. В дальнейшем генно-инженерное конструирование у дрожжей пошло по пути создания кольцевых плазмид с центромерами, особыми участками ДНК, обеспечивающими связь с белками веретена деления и, следовательно, равномерное распределение таких плазмид между двумя клетками во время митоза. Развитие этого подхода привело к созданию целых искусственных мини-хромосом, содержащих, помимо центромерного участка, теломеры на концах, загнутые в виде шпильки, и репликаторы – участки начала репликации ДНК. Подобные мини-хромосомы могут включать сразу несколько полезных генов, что обеспечивает производство нужной биотехнологической продукции.

### **Генетическая инженерия растений**

В настоящее время трансгенные сельскохозяйственные растения, в первую очередь соя, кукуруза и хлопчатник, только в США занимают площадь более 200 млн. акров. К 1997 году в 30 странах мира проведено более 3 тысяч полевых испытаний новых сортов более 40 различных видов растений.

Формальной датой рождения генетической инженерии растений принято считать 1982 год, когда было получено первое в мире химерное растение санбин. Оно было так названо потому, что в геном подсолнечника был искусственно перенесен ген запасного белка бобовых фазеолин (по-английски, sunflower + been = sunbeen). За последующие неполные 20 лет ассортимент генетически модифицированных растений значительно возрос, в первую очередь, среди класса двудольных, хотя в последнее время ученые «нашли ключ» и к однодольным растениям (пшеница, рис, кукуруза, банан).

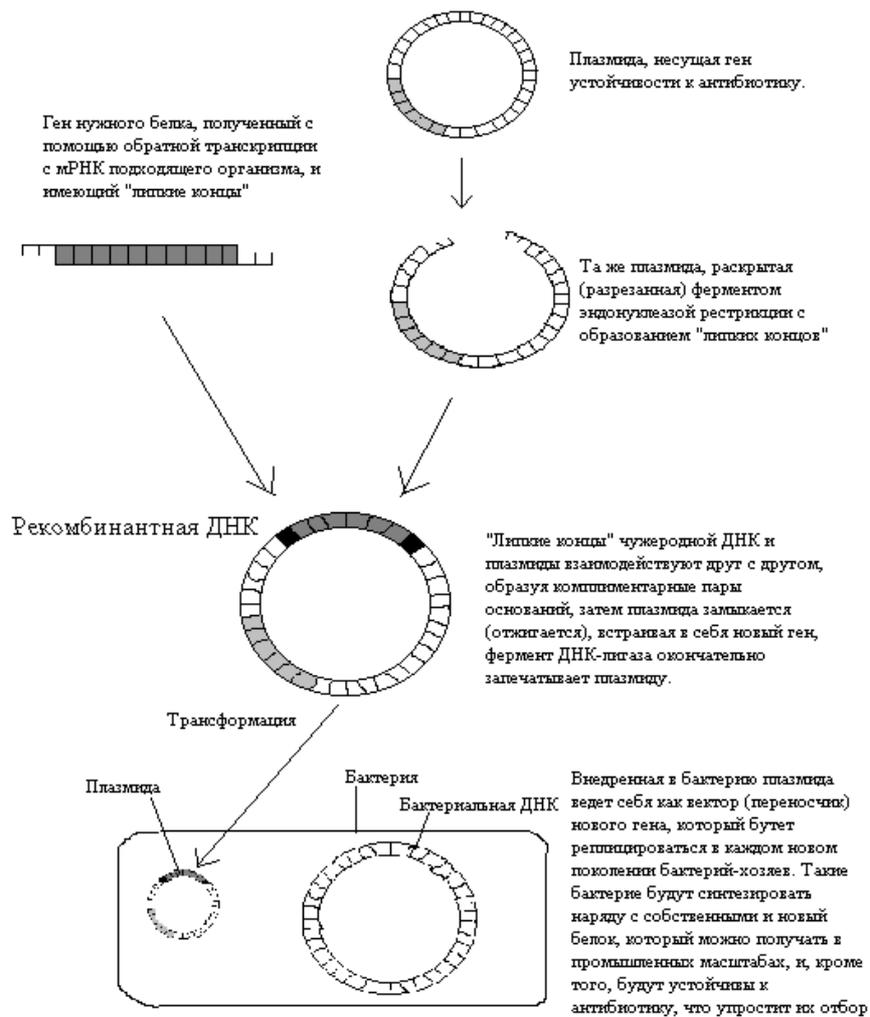


Рис. 1. Упрощенная схема получения генетически модифицированного микроорганизма

Вся работа с трансгенными растениями направлена на коренное изменение методов традиционной селекции – желаемые признаки получаются благодаря введению нужных генов непосредственно в растение вместо длительной работы по скрещиванию различных линий. Сложность такого подхода заключена в том, что в отличие от бактерий и дрожжей, растения, как и животные, являются многоклеточными организмами. Для получения продукта нужный ген должен находиться в каждой клетке организма, что достаточно сложно осуществить. В этом плане растения имеют одно важное преимущество перед животными: возможна их полная регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, способных давать семена, растений. Это свойство, называемое тотипотентностью, дает уникальную возможность получить из единичных клеток, генотип которых можно изменить аналогично микроорганизмам, целое растение с новыми признаками. Задача осталась за поиском подходящего вектора для переноса нужного гена в выделенные камбиальные клетки.

Исследователям помогла сама природа. Еще древним грекам было известно явление, называемое корончатыми галлами. В пораженных растениях клетки корончатых галлов приобретают способность неограниченно размножаться, оставаясь недифференцированными. Такие клетки по своим свойствам очень похожи на раковые клетки животных. Но только в XX веке ученым удалось установить и изучить причину возникновения такого явления. Виновницей оказалась одна из почвенных бактерий – *Agrobacterium tumefaciens*. Такая бактерия, как и многие другие, содержит плазмиды. Одна из них, названная Ti-плазмида (от английского сокращения «опухоль индуцирующая»), и оказалась опухолеродным агентом для клеток зараженного растения.

Ti-плазмида состоит из нескольких функционально различных участков ДНК. Наиболее важную роль играет участок T-ДНК, который переносится в клетку зараженного растения и встраивается в ее хромосому. Там находятся гены синтеза фитогормонов и опинов. Фитогормоны ауксин и цитикинин подавляют дифференцировку опухолевых растительных клеток и переводят их в состояние деления, а опины используются бактерией как источник углерода, азота и энергии. Другими участками ДНК в Ti-плазмиде являются *tra*-область, где локализованы гены, контролирующие конъюгацию бактерий, и *ori*-область, продукты которой обеспечивают раз-

множение плазмиды в бактериальной клетке. Еще один важный локус ДНК называется *vir*-область; там содержатся гены, ответственные за перенос Т-ДНК в растительную клетку и встраивание ее в хромосому.

При заражении какого-нибудь двудольного растения Агробактерией происходят следующие процессы: Агробактерии, в изобилии находящиеся в почве, вступают в контакт со стеблем растения, чаще всего в прикорневой области. Вероятность заражения и опухолевой трансформации значительно возрастает, если у растения имеются ранки или повреждения наружного слоя клеток. Бактерии прорастают в ткани растения, живут и размножаются в межклеточном пространстве, не проникая в клетки. Далее происходит процесс трансформации, который можно разделить на несколько этапов: прикрепление бактерии к стенке растительной клетки, проникновение Т-ДНК внутрь клетки, интеграция Т-ДНК в геном растения и экспрессия плазмидных генов. Переноса Т-ДНК не происходит, если растение-хозяин оказывается больным или нежизнеспособным. Если же хозяин окажется здоровым организмом, перенос Т-ДНК происходит примерно за 30 минут. После встраивания в хромосому Т-ДНК становится частью генома растения, и ее гены активно транскрибируются. Клетка приобретает свойства раковой, и происходит рост опухоли – корончатого галла. Бактерии используют трансформированные клетки как фабрику по производству опинов – источника азота, углерода и энергии.

Таким образом, Агробактерии научились генно-инженерным методам задолго до человека. *Ti*-плазида оказалась идеальным природным вектором для введения чужеродных генов в клетки растения. Необходимо также отметить следующие достоинства использования методов на основе применения *Ti*-плазмиды. Во-первых, круг растений – хозяев Агробактерии чрезвычайно широк, включая практически все двудольные растения. В последнее время ученые смогли добиться заражения и многих однодольных, главным образом злаков. Во-вторых, встроенная в геном растения Т-ДНК наследуется как простой доминантный признак по законам Менделя, а чужеродные гены имеют собственные регуляторные области. Для промышленного применения *Ti*-плазмиду необходимо лишь «немного» усовершенствовать. В целом векторная система на основе *Ti*-плазмиды должна содержать следующие участки: 1) комплекс генов *vir*-области, необходимой для переноса и интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому растения; 2) систему для узнавания чужеродных генов полимеразой растения – такой промотор есть в Т-ДНК; 3) маркер, необходимый для селекции трансформированных клеток; 4) уникальные сайты рестрикции, необходи-

мые для введения в конструкцию нужных генов. Также необходимым условием является отсутствие генов, приводящих к образованию опухоли.

Чаще всего для создания такой генно-инженерной конструкции используют следующий подход. Сегмент Т-ДНК вырезают из Тi-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в стандартную плазмиду-вектор бактерии *Escherichia coli*. Рекомбинантная плазида размножается, и в участок Т-ДНК вставляют нужный ген так же, как и в обычную плазмиду, с использованием рестриктаз. Такой молекулярный гибрид вводят в *Agrobacterium tumefaciens*, содержащий неизмененную Тi-плазмиду. Благодаря процессу рекомбинации происходит обмен гомологичными участками ДНК рекомбинантной и Тi-плазмид. В результате получится рекомбинантная Тi-плазида, несущая нужный ген. Последним этапом будет заражение единичных растительных клеток такой Агробактерией и выращивание целого растения, все клетки которого будут экспрессировать нужный ген.

Иногда оказывается проще использовать сразу две рекомбинантные плазмиды. Одна из них содержит только *vir*-область и является плазмидой-помощницей. Вторая плазида должна содержать Т-ДНК со встроенным нужным геном. Плазида-помощница способна переносить в растительную хромосому не только свою Т-ДНК, которой у нее и нет, но и соседнюю.

Для облегчения отбора полученных ГМ-растений рекомбинантная Тi-плазида несет специальный маркерный ген. В отличие от микроорганизмов, где в качестве маркера используется устойчивость к антибиотикам, в растениях используют особые белки, обладающие способностью светиться в ультрафиолетовом свете. Наиболее часто используют гены люциферазы светлячков и ген GFP медузы (по-английски, «зеленый светящийся белок»).

Помимо технологии, основанной на использовании Тi-плазмиды, в последнее время применяются и другие способы переноса рекомбинантной ДНК в растения. Современный арсенал методов трансформации очень обширен и включает такие подходы, как электропорация клеток (пропускание электрического разряда через смесь опытных клеток и рекомбинантных плазмид, при этом в мембранах клеток возникают бреши, и ДНК проникает в клетку и встраивается в геном), встряхивание смеси клеток, ДНК и микроигл (которые прокалывают мембраны аналогично электрическому току), опосредованная вирусами инфекция, микроинъекции ДНК в клетки. Промышленное применение нашла следующая технология: с помощью специального прибора «Shotgun» осуществляется обстрел растительных тканей мельчайшими пулями из золота или вольфрама, одетыми в молекулы ДНК.

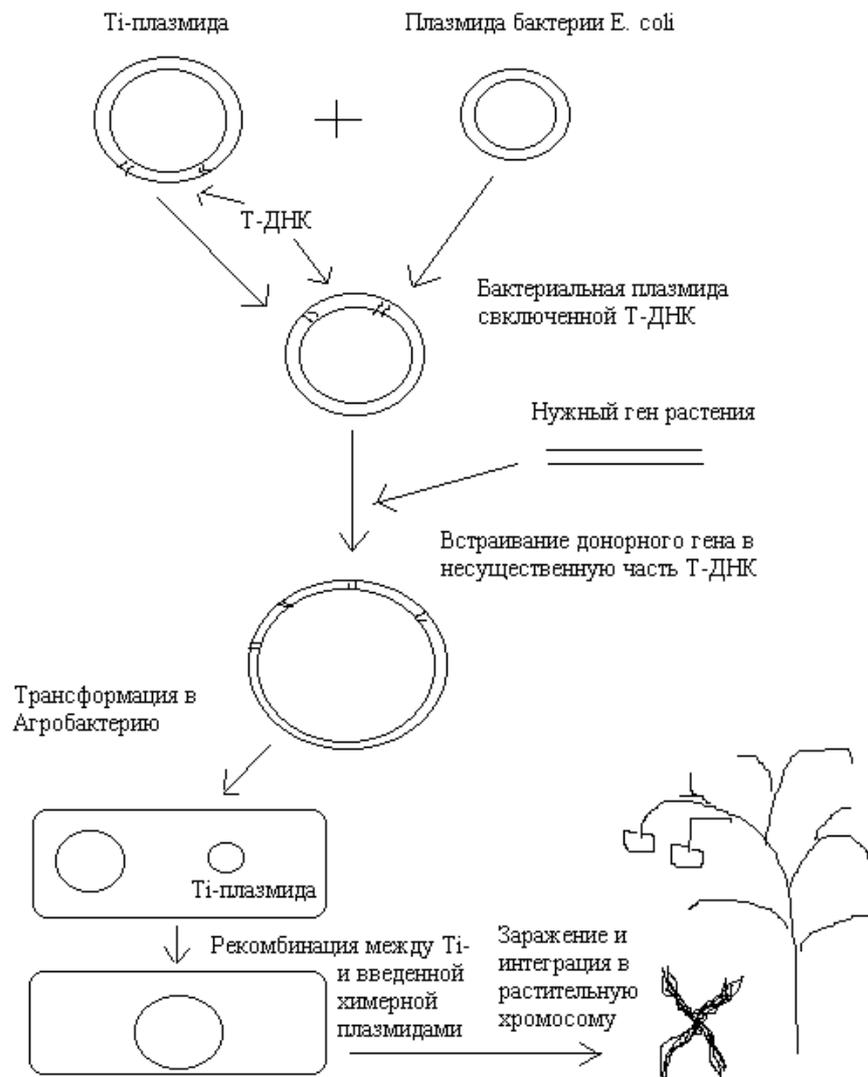


Рис. 2. Схема одного из вариантов получения вектора на основе Ti-плазмиды.

В отдельных случаях оказывается необходимо не ввести какой-нибудь новый ген в растение, а наоборот, заблокировать или ослабить действие природного гена. В качестве примера могут служить плоды томата, которые во время созревания содержат значительное количество специального белка PG, придающего плодам рыхлость. Для устранения этого белка в плоды вводят вектор, содержащий перевернутую копию его гена. В результате транскрипции получается антисмысловая (перевернутая) мРНК, которая комплиментарно связывается с нормальной мРНК. Образуется молекула двухцепочечной РНК, которая уже не может служить матрицей для синтеза белка. В результате получают томаты с новыми свойствами плодов, которые тверже, дольше хранятся и более устойчивы к грибковым заболеваниям.

Не менее перспективным является направление по генной инженерии не ядерного генома, а генома пластид и митохондрий. В трансгенном материале значительно увеличивается содержание продукта за счет более активных метаболических процессов. Еще множество различных подходов, включая регуляцию активности генов, находятся на стадии разработки.

#### *Основные направления практического применения ГМ растений*

Применение рассмотренных генно-инженерных методов позволило осуществить задачу, еще несколько лет назад казавшуюся фантастикой. Были созданы, а в настоящее время активно выращиваются новые сорта растений, сбалансированных по составу аминокислот, устойчивых к засухе и холоду, не поражаемые вредителями.

Наиболее остро стоит вопрос о получении растений, устойчивых к вредителям сельского хозяйства. Сейчас освоено достаточное количество приемов, позволяющих получать трансгенные растения, устойчивые к насекомым. Самым традиционным стал метод введения в геном растения гена Bt, полученного из бактерии *Bacillus thuringiensis*. Попадая в кишечник личинки насекомого, белок, кодируемый этим геном, распадается с образованием активизированного токсина. Личинка насекомого, попробовавшая такое растение, погибает. Токсин, вырабатываемый разными штаммами бактерий, действует только на определенные виды насекомых. Для других организмов, в первую очередь млекопитающих, такой белок совершенно безопасен, что проверено двадцатилетними исследованиями. Среди Bt-растений, продаваемых в США, преобладают хлопок и кукуруза, а также устойчивый к колорадскому жуку картофель.

Еще одной важной задачей является научить растения производить различные белки, жиры и сахара. Исследования последних лет имеют целью получить животные белки как можно большей концентрации в трансгенных растениях. Несомненный интерес для медицины вызывает получаемый из растений человеческий  $\beta$ -интерферон. Такой способ получения этого иммуномодулирующего агента оказался гораздо эффективнее и дешевле, чем при использовании микробиологических методов. Разработаны методы выращивания растений с бактериальными антигенами, что в значительной степени облегчает приготовление вакцин. Ярким примером является картофель, экспрессирующий белки – фрагменты токсина холеры. Иммунизация такой антихолерной вакциной вполне эффективно происходит путем преорального приема.

В одном из экспериментов удалось получить два растения со встроенными генами различных субъединиц иммуноглобулина. После скрещивания этих растений среди потомков оказалось несколько организмов, экспрессирующих обе цепи одновременно. Выведенная таким образом линия растений способна формировать антитела, причем в очень большой концентрации – до 1,3% суммарного белка листьев. Аналогичные опыты показали, что полностью функциональные секреторные моноклональные антитела способны собираться в ГМ табаке. Так как секреторные антитела являются особым оружием иммунной системы и выделяются непосредственно в ротовую полость и желудок человека и других млекопитающих, то на их основе можно создать очень эффективные антибактериальные препараты. Предполагается, что на основе моноклональных антител против бактерии *Streptococcus mutans*, вызывающей кариес, в ближайшем будущем удастся создать действительно антикариесную зубную пасту.

Но все это лишь малая доля того, на что способны трансгенные растения. Еще один пример: получены трансгенные растения с измененными декоративными свойствами, что активно используется в цветоводстве. С помощью генов, отвечающих за разные пигменты, выращиваются петунии с разноцветными цветками, на очереди – голубые розы с геном пигмента дельфиниума. Освоено выращивание партенокарпических плодов арбуза, кабачков и цитрусовых с отсутствием косточек. Ближайшей задачей исследователей является внесение изменений в геном растений с использованием механизмов гомологичной рекомбинации Cre-lox (контроль рекомбинации и локусов кроссинговера), а также создание искусственных растительных хромосом, что снимет все барьеры по объему вносимой генетической информации.

### Использованная литература

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Д. и др. Молекулярная биология клетки. М., Мир. 1994.
2. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений. Соросовский образовательный журнал. 1998, Т. 4, № 6, С. 3–8.
3. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология. М., Мир. 1996.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. М., Высшая школа. 1989.
5. Лещинская И.Б. Генетическая инженерия. Соросовский образовательный журнал. 1996, Т. 2, № 1, С. 32–39.
6. Лещинская И.Б. Современная промышленная микробиология. Соросовский образовательный журнал. 2000, Т. 6, № 4, С. 14–18.
7. Лутова Л.А., Павлова З.Б., Иванова М.М. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений. Генетика. 1998, Т. 34, С. 165–182.
8. Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды. Соросовский образовательный журнал. 2000, Т. 6, № 10, С. 10–17.
9. Льюин Б. Гены. М., Мир. 1987.
10. Рекомбинантные молекулы: значение для науки и практики. Ред. Бирс Р., Бэсит Э. М., Мир. 1980.
11. Семенова М.Л. Зачем нужны трансгенные животные. Соросовский образовательный журнал. 2001, Т. 7, № 4, С. 13–20.
12. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М., Мир. 1998.
13. Bevan M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res. 1984, V. 12, P. 8711–8721.
14. Hodgson C.P. The vector void in gene therapy. Biotechnology. 1995, V. 13, P. 222–225.
15. Ishida Y. et al. High efficiency transformation of Maize (*Zea mays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology. 1996, V. 14, P. 745–750.
16. Stitt M., Svab Z., Hajdukiewich P., Maliga P. Stable transformation of plastid in Higher Plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990, V. 87, P. 8526–8530.
17. Vaeck M. et al. Transgenic plants protected from insect attack. Nature. 1987, V. 328, P. 33–37.