

Генная инженерия и создание генномодифицированных источников пищи

Генная инженерия бактерий, высших растений, животных и области ее применения

1. Нуклеиновые кислоты и факторы наследственности у живых организмов

Важнейшим компонентом всех живых организмов являются нуклеиновые кислоты: рибонуклеиновые и дезоксирибонуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты (ДНК) могут быть одно- и двухцепочечные. ДНК, за редким исключением, двухцепочечные. РНК, за редким исключением, одноцепочечные.

Важнейшая функция РНК - участие в процессе синтеза белков в клетке, ДНК - определение специфичности и передача единиц наследственности.

Подавляющая часть ДНК сосредоточена в ядре, в цитоплазме эукариот содержится менее 1 % всей ДНК клетки. ДНК эукариот почти вся находится в хромосомах ядер, лишь небольшое ее количество содержится в митохондриях, а у растений и в плазидах. Суммарный материал хромосом - хроматин. Число хромосом колеблется от одной до 100, чаще 10-50. У эукариот хромосомы всегда парные, по две каждого сорта. Наследственными факторами или единицами наследственности у живых организмов являются гены, которые лежат в хромосомах в линейном порядке. Число генов в одной клетке человека находится в пределах между 5 и 125 тысячами. Бактерии содержат по одной хромосоме в форме замкнутой в виде кольца нити, состоящей из двухцепочной ДНК и не имеющей ядерной оболочки. В цитоплазме многих бактерий кроме хромосомной ДНК содержатся добавочные маленькие кольца ДНК, присутствие которых необязательно. Они получили название плазмид. Плазмиды несут информацию для 2-200 белков. Плазмидная ДНК составляет 1-15% от хромосомной ДНК бактерий. Плазмиды способны автономно размножаться и стабильно наследуются. Некоторые плазмиды способны включаться в хромосому бактерий. В одной клетке бактерий мелких плазмид - несколько десятков, крупных - одна или две.

2. Генная инженерия бактерий

Процесс создания трансгенного организма достаточно сложен и часто требует индивидуального подхода. Однако в любом случае его можно подразделить на несколько общих этапов:

Получение (выделение) нужного гена (трансгена), намеченного для переноса. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома) или из геномной библиотеки; синтезирован искусственно - химическим (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным (с использованием механизма обратной транскриптазы) путем; получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Создание специальных генетических конструкций — векторов (переносчиков), в составе которых содержатся гены (трансгены), которые будут внедряться в геном другого вида или экспрессироваться в клетках про- или эукариот. Для конструирования рекомбинантной ДНК

(рекДНК) векторную ДНК (например, плазмиду) и чужеродную ДНК содержащую интересующий ген (трансген), разрезают одной и той же рестриктазой; в результате образуются одинаковые концы. К генам, синтезированным химическим путем или полученным по матрице их мРНК, такие концы можно «пришить» искусственно. Затем производят смешивание фрагментов ДНК (вектора и трансгена) и «сшивание» их ДНК-лигазой. Концы чужеродной ДНК и плазмиды взаимодействуют друг с другом, образуя комплементарные пары оснований. Происходит гибридизация векторной и чужеродной ДНК. Концы фрагментов замыкаются с помощью водородных связей и ковалентно «сшиваются» с помощью фермента ДНК-лигазы.

Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение рекДНК, содержащей трансген, в клетки реципиента (например, *E. coli*). Плазида, встроенная в бактерию, ведет себя, как вектор (переносчик) нового гена, который реплицируется в каждом новом поколении.

Молекулярная селекция — отбор трансформантов, т.е. клонов, несущих рекДНК. В процессе генетической трансформации *E. coli* могут образоваться три типа клеток: клетки, не содержащие плазмиду, содержащие плазмиду без встройки (без рекДНК), содержащие плазмиду с рекДНК. Для отбора трансформантов среди нетрансформированных клеток используют различные маркерные гены, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

Выращивание измененных клеток в целые трансгенные организмы. Синтез определенного белка — продукта введенного гена.

Первый, второй и третий из перечисленных этапов представляют собой последовательное создание рекомбинантной ДНК, четвертый и пятый — трансгенез и выявление трансгенного организма.

После введения в реципиентную клетку фрагмента чужеродной ДНК происходит ее клонирование с целью получения большого числа копий или начинается синтез продукта, закодированного во введенном гене. Чаще всего эти процессы осуществляются в бактериальных клетках.

Генетическая рекомбинация заключается в обмене генами между двумя хромосомами. Обмен генами и введение в клетку гена, принадлежащего другому виду, можно осуществить посредством генетической рекомбинации. Этот подход был разработан на бактериях, в частности на кишечной палочке, в клетки которой вводили гены животных, человека и добивались их репликации (размножения). Выделение фрагментов ДНК в хромосомах, несущих гены с необходимыми свойствами, производят с помощью вырабатываемых клетками бактерий ферментов рестрикции (рестриктаз). В клетках кишечной палочки и других бактерий были обнаружены ферменты, разрезающие на куски ДНК.

Рестриктазы распознают в ДНК специфичные для них участки длиной в 4-6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с ровными (тупыми) концами, во втором - стороны оборванных цепочек ДНК чуть-чуть

заходят одна за другую. Такие концы называются липкими, они могут слипаться между собой в силу комплиментарности.

Скрепить липкие концы помогает ДНК-лигаза, сшивающая фосфодиэфирные связи.

В настоящее время известно более 500 рестриктаз, способных рубить ДНК в 120 различных последовательностях. Это дало возможность получать фрагменты ДНК, содержащие желаемые гены. Участки ДНК, разрезаемые рестриктазами, несложно разделить с помощью электрофореза.

Скрепить сцепившиеся липкие концы фрагментов разных ДНК помогает фермент ДНК-лигаза. Она сшивает фрагменты с образованием полной структуры двойной спирали ДНК.

Следующей задачей было создание функционально активных, способных реплицироваться гибридных ДНК. С этой целью интересующий фрагмент ДНК включают в состав вектора, с помощью которого он может быть размножен. Вектор - это молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечивать там ее размножение. Клетки, в которые вектор переносит вшитый в него ген, получили название реципиентов.

В качестве векторов чаще всего используют плазмиды бактерий. Главное свойство плазмид состоит в их способности реплицироваться независимо от хромосомы. По размеру ДНК плазмиды в 100 раз меньше ДНК бактериальной хромосомы. В плазмиде таких размеров все же может разместиться до сотни генов.

Первая такая плазида была открыта английским ученым Стэнли Коуэном в 1974 г., которую он назвал своим именем. Она самостоятельно размножается. Концы ее способны слипаться между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, получаемыми под действием той же рестриктазы.

Следующая проблема - заставить клетку воспринять рекомбинантную ДНК. Объектом первых опытов по генной инженерии была избрана кишечная палочка *E.coli*. Клетки кишечной палочки выдерживают на холоде в растворе кальция, затем подвергают «тепловому шоку». После этого клеточная мембрана становится проницаемой для поступления извне молекул ДНК. В плазмиду была включена группа генов из хромосомы *E.coli*, ответственных за синтез аминокислоты триптофана. Когда в клетки *E.coli* ввели гибридную ДНК, они стали вырабатывать столько ферментов, участвующих в биосинтезе этой аминокислоты, что бактерии превратились в фабрику по производству триптофана.

Помимо плазмид, в качестве векторов стали использовать и ДНК вирусов, размножающихся в клетках бактерий. Клетка, получившая гибридную ДНК, размножившись, образует клон. Это открыло путь для производства различных белков, лекарственных препаратов, гормонов, путем искусственного синтеза их генов и вставки их в клетки с помощью плазмид. Важнейший из них - инсулин, получаемый из поджелудочной железы свиней.

3. Генная инженерия растений

Существует несколько достаточно широко распространенных методов

внедрения чужеродной ДНК в геном растения.

1. С помощью бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (от лат.- полевая бактерия, вызывающая опухоли), которая обладает способностью встраивать участки своей ДНК в растения, после чего пораженные клетки растения начинают очень быстро делиться и образуется опухоль. Сначала ученые получили штамм этой бактерии, не вызывающий опухоль, но не лишенный возможности вносить свою ДНК в клетку. В дальнейшем нужный ген сначала клонируют в *Agrobacterium tumefaciens* и затем заражают уже этой бактерией растение. После чего инфицированные клетки растения приобретают нужные свойства, а целое растение выращивают из одной его клетки. Однако этот метод "работает" не на всех растениях: агробактерия, например, не заражает такие важные пищевые растения, как рис, пшеница, кукуруза. Поэтому разработаны и другие способы.

2. Клетки, предварительно обработанные специальными реагентами, разрушающими толстую клеточную оболочку, помещают в раствор, содержащий ДНК и вещества, способствующие ее проникновению в клетку. После чего, как и в первом случае, выращивают из одной клетки целое растение.

3. Метод бомбардировки растительных клеток специальными, очень маленькими вольфрамовыми пулями, содержащими ДНК. С некоторой вероятностью такая пуля может правильно передать генетический материал клетке и так растение получает новые свойства. А сама пуля ввиду ее микроскопических размеров не мешает нормальному развитию клетки.

Новые свойства трансгенных растений:

1. Высокая урожайность.
2. Устойчивость к гербицидам. Гены устойчивости к гербицидам обнаружены у сальмонелл, некоторых растений (петуния), сине-зеленых водорослей, путем встраивания гена в геном растения получили растения устойчивые к гербицидам.
3. Повышение ценности растительного белка. Перспективно получение форм кукурузы, богатых лизином, поскольку лизин увеличивает прибавку веса животных на 25-50%. Цистеин и метионин увеличивают рост шерсти у овец на 10-100%. Ген гороха, ответственный за синтез этих аминокислот, вводят в люцерну (бедную цистеином и метионином) и скармливают овцам.
4. Устойчивость к засолению. Устойчивость обеспечивает аминокислота пролин. Ген, ответственный за ее выработку, пересажен от галлобактерий.
5. Создание морозоустойчивых растений осуществляется пересадкой антифризных генов из рыб.

6. Повышение усвояемости растениями атмосферного азота осуществляется пересадкой генов, ответственных за азотфиксацию (nit-генов) из бактерий *Rhizobium* в растение.

4. Генная инженерия животных

Способы получения трансгенных животных:

1. а) получение оплодотворенной яйцеклетки от животного донора;

б) ген в составе вектора вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки;

в) яйцеклетку имплантируют в реципиентную женскую особь;

г) отбирают потомков, которые содержат в себе чужеродный ген (трансгенные);

д) скрещивают между собой трансгенных потомков.

2. Вектором на основе ретровируса животных инфицируют восьмиклеточный эмбрион, который потом имплантируют в самку.

3. Трансгенную конструкцию вводят путем микроинъекции в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки, которая затем переносится в суррогатную мать.

4. Стволовые клетки модифицируются в культуре, после чего их переносят в эмбрион на стадии бластоцисты.

5. Перенос гена осуществляют при помощи дрожжевых хромосом, что позволяет переносить несколько генов.

Преимущества трансгенных животных

1. Создание трансгенных животных с измененным обменом веществ в направлении повышения качества и эффективности производства продукции.

2. Создание популяций животных, генетически устойчивых к ряду заболеваний.

3. Создание животных, являющихся продуцентами биологически активных белков для медицины и других потребностей человека (лактофферин, интерлейкины, урокиназа и др.), секретируемых в молоко.

4. Создание трансгенных животных-доноров внутренних органов для пересадки человеку (ксенотрансплантация)

Анализ рынка показал, что существует огромный коммерческий интерес к производству целого ряда белков, необходимых для проведения диагностических, терапевтических и профилактических мероприятий в медицине и ветеринарии.

Молочная железа трансгенных животных является идеальным источником производства рекомбинантных белков. Она физиологически обладает огромным потенциалом для синтеза белков. Кроме того, молоко содержащее рекомбинантные белки, имеет высокий гигиенический стандарт и может быть легко извлечено с использованием имеющихся технологий.

Рядом экспериментов на мышах, кроликах, свиньях, овцах и козах было продемонстрировано, что в молочной железе трансгенных животных может быть достигнута достаточно высокая экспрессия рекомбинантных белков.

Синтез рекомбинантных белков идет в двух направлениях:

1. синтез белков в молоко с целью их последующей очистки и использования
2. синтез белков в молочной железе с целью изменения состава и свойств молока.

Наибольшие успехи достигнуты в первом направлении.

Повышение качества и эффективности производства продукции

1. изменение состава и свойств молока

а) количественное и качественное изменение состава белков с целью изменения перерабатывающих свойств.

б) увеличение антимикробной активности молока

в) изменение типа и количества жирных кислот в молоке

г) изменение белкового состава молока с целью его лучшей адаптации для питания людей.

д) получение молока с низким содержанием лактозы.

Например: лактофферин человека используется для экспрессии в молоке с/х животных с целью придания ему новых свойств. Повышение его в молоке коров рассматривается как средство для профилактики маститов, а также для уменьшения количества бактерий в молоке, снижения уровня или предотвращения возникновения кишечных инфекций у новорожденных телят. Полученное молоко может служить идеальным источником железа для телят и людей.

Одним из путей изменения белкового состава молока является уменьшение количеств основных аллергенов молока (β -лактоглобулина, α -лактоальбумина).

2. Изменение качества шерсти

В качестве объектов исследований были выбраны главным образом овцы т.к. они являются основным источником шерстной продукции для человека. Получили трансгенных овец, экспрессирующих в шерстных фолликулах ген кератина.

Трансгенные животные как доноры внутренних органов

Ксенотрансплантация – межвидовая пересадка органов: от близкородственных видов (от обезьяны человеку), от не родственных видов (от свиньи к человеку). При трансплантации органов возникает ряд проблем: отторжение органов после пересадки, передача через пересаживаемые органы заболеваний, физиологическая несовместимость (маловероятно, что печень

свиньи окажется в состоянии обеспечить все функции системы печени человека).

Для решения проблемы гипер острой реакции отторжения является генетическое изменение органов доноров с целью подавления реакции отторжения.

Путем переноса соответствующих конструкций в эмбриональные линии могут быть получены трансгенные животные, которые несут другие клеточные поверхностные антигены.

Хотя полученные результаты являются обнадеживающими, предстоит еще много сделать, прежде чем можно будет перейти к экспериментальным пересадкам внутренних органов свиней человеку.

Уже в течение нескольких лет успешно используется тканевая трансплантация кожи и сердечных клапанов свиней человеку. Перфузия – рассматривается в качестве возможности поддержания жизни пациентов с печеночной недостаточностью. Кровь пациента прокачивают через печень свиньи и вновь возвращают ему после детоксикации.

Вопросы:

1. Что такое нуклеиновые кислоты, какова их функция?
2. Какие новые свойства приобретают трансгенные бактерии, растения и животные?
3. Какие способы получения трансгенных растений существуют?